Diego Lopes Mendes Barretti

**Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre o sistema renina
angiotensina cardíaco e sistêmico de ratos obesos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira

**São Paulo
2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Barretti, Diego Lopes Mendes

Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre o sistema renina angiotensina cardíaco e sistêmico de ratos obesos / Diego Lopes Mendes Barretti. -- São Paulo, 2010.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Edilamar Menezes de Oliveira.

Descritores: 1.Obesidade 2.Hipertrofia ventricular esquerda 3.Sistema renina angiotensina 4.Exercício 5.Ratos Zucker

USP/FM/DBD-347/10

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Carolina que sempre esteve ao meu lado me apoiando e incentivando em todas as decisões por mim escolhidas tanto no dia a dia quanto na escolha da minha profissão. A você, meu amor e gratidão!

Aos meus dois filhos, Luísa e Caio, que embora ainda muito pequenos me dão muita força nos momentos difíceis da minha vida transmitindo todo o amor sincero de uma criança inocente. Amo muito vocês!

À minha avó que, apesar de ter perdido a sua presença, contribuiu juntamente com o meu avô em grande parte da minha educação, sempre me ensinando os valores de vida.

À minha mãe que me deu a oportunidade de viver e sempre me apoiou nos meus caminhos aconselhando e comemorando minhas conquistas.

À minha sogra que a considero como uma mãe, sempre me ajudando no cuidado com os meus filhos nos momentos em precisei.

Aos familiares da minha esposa que me acolheram como um membro da família e me deram todo o suporte possível, contribuindo em grande parte na minha formação.

À Profa. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira que me acolheu e depositou sua confiança em mim como seu aluno, colaborando com o meu desenvolvimento pessoal e acadêmico. E que ao longo desses quatro anos não foi apenas uma orientadora, mas também uma grande amiga.

Aos amigos Valério e Flávio, que me ajudaram nos momentos de dúvida com o meu projeto, sendo sempre solícitos.

Aos amigos do Laboratório que de uma forma ou de outra ajudaram no desenvolvimento do projeto, seja auxiliando nos experimentos, nas análises e discussões dos resultados, na troca de idéias ou mesmo pela companhia durante estes anos. Tiago, Everton, Stéphanou, Marco, Ursula, Fernanda, Nathan, Cleber, Aline, Ellena, Telma, Wilson, Paulo, Vanessa, Nathalie, Alessandra, Marcelo, José Bianco, Julio, Carmão, Andréia, Luís Gustavo, Leonardo, Camila, Luiz Bechara e à Profa e chefe do Laboratório de Fisiologia Patrícia Chakur Brum.

Aos amigos e familiares por ai espalhados, uns mais próximos, outros nem tanto, mas sempre perguntando como ia o andamento do mestrado.

Ao programa de pós-graduação em Fisiopatologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Apoio financeiro: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) e Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

“O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice. Colhe, pois, a sabedoria. Armazena suavidade para o amanhã.”

(Leonardo da Vinci)

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento dessa publicação:

Referências: adaptado de *Internacional Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Sueli Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO.....	01
2	JUSTIFICATIVA.....	03
3	OBJETIVOS.....	03
3.1	Objetivo Geral.....	03
3.2	Objetivos específicos.....	03
4	REVISÃO DE LITERATURA.....	04
4.1	Obesidade.....	04
4.1.2	Classificação.....	04
4.1.3	Dados epidemiológicos.....	05
4.1.4	Etiologia e fisiopatologia.....	06
4.1.5	Modelos de obesidade.....	07
4.1.6	Obesidade e coração.....	09
4.1.7	Obesidade e exercício aeróbio.....	11
4.2	Sistema Renina Angiotensina.....	13
4.2.1	Histórico.....	13
4.2.2	Componentes do Sistema Renina Angiotensina.....	14
4.2.3	Mecanismos de ação.....	15
4.2.4	Sistema Renina Angiotensina no coração.....	17
4.2.5	Sistema Renina Angiotensina na obesidade.....	18
4.2.6	Sistema Renina Angiotensina e exercício físico.....	20
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	23

5.1	Amostragem.....	23
5.2	Treinamento dos animais.....	23
5.3	Testes de capacidade física.....	24
5.3.1	Medida do consumo de oxigênio.....	24
5.3.2	Protocolo de exercício físico até a exaustão.....	25
5.4	Medidas hemodinâmicas.....	25
5.4.1	Avaliação da pressão arterial.....	25
5.4.2	Avaliação da função ventricular.....	26
5.4.3	Função sistólica do ventrículo esquerdo.....	26
5.4.4	Função diastólica do ventrículo esquerdo.....	27
5.4.5	Massa do ventrículo esquerdo.....	27
5.4.6	Índice de performance miocárdica.....	27
5.5	Amostras de soros e tecidos.....	27
5.6	Análises Bioquímicas.....	28
5.6.1	Determinação da atividade da enzima conversora de angiotensina.....	28
5.6.2	Determinação da atividade da enzima conversora de angiotensina 2.....	28
5.6.3	Determinação da concentração da angiotensina II cardíaca.....	29
5.6.4	Determinação da concentração de proteínas teciduais.....	29
5.7	Análises moleculares.....	29
5.7.1	Análise da expressão de proteínas por Western blot.....	29
5.7.2	Determinação da expressão do gene da ECA, α e β MCP e ANF por RT-PCR.....	30
5.7.3	Extração do RNA total.....	31
5.7.4	Síntese de cDNA.....	31
5.7.5	Reação de polimerase em cadeia em tempo-real.....	32
5.8	Análise estatística.....	32
6	RESULTADOS.....	33
6.1	Marcadores de treinamento físico aeróbio.....	33
6.2	Medidas Hemodinâmicas.....	34
6.3	Perfil metabólico.....	34
6.4	Parâmetros corporais.....	35
6.5	Marcadores de hipertrofia cardíaca.....	36

6.6	Função cardíaca.....	37
6.7	Atividade da enzima conversora de angiotensina sistêmica e cardíaca.....	38
6.8	Expressão gênica da enzima conversora de angiotensina no ventrículo esquerdo.....	40
6.9	Atividade da enzima conversora de angiotensina 2 no ventrículo esquerdo.....	41
6.10	Concentração de angiotensina II plasmática e cardíaca.....	43
6.11	Receptor de angiotensina II cardíaco do tipo 1 e do tipo 2.....	43
7	DISCUSSÃO.....	45
7.1	Marcadores de treinamento físico aeróbio.....	45
7.2	Medidas hemodinâmicas.....	47
7.3	Perfil metabólico.....	47
7.4	Parâmetros corporais.....	49
7.5	Marcadores de hipertrofia cardíaca.....	50
7.6	Hipertrofia e função cardíaca.....	51
7.7	Componentes do sistema renina angiotensina sistêmico.....	52
7.8	Componentes do sistema renina angiotensina cardíaco.....	53
8	CONCLUSÃO.....	55
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT1: Receptor de angiotensina do tipo 1

AT2: Receptor de angiotensina do tipo 2

AGRP: Proteína relacionada ao agouti

Agt: Angiotensinogênio

Ang II: Angiotensina II

ANOVA: Análise de variância

CART: Neuropeptídeo regulador da transcrição da cocaína e anfetamina

CD36: Cluster de diferenciação 36

DAG: Diacilglicerol

DP: Delta peso

DTA: Toxina diftérica

ECA: Enzima conversora de angiotensina I

ECA-2: Enzima conversora de angiotensina II

EPM: Erro padrão da média

FC: Frequência cardíaca

Fej: Fração de ejeção

Fen: Fração de encurtamento

GM: Grupo magro

GMTR: Grupo magro treinado

GO: Grupo obeso

GOTR: Grupo obeso treinado

GV: Gordura visceral

HC: Hipertrofia cardíaca

HDL: Lipoproteína de alta densidade

IC: Insuficiência cardíaca

IMC: Índice de massa corporal

IPM: Índice de performance miocárdica

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

MCP: Miosina de cadeia pesada

MVE: Massa do ventrículo esquerdo

NPY: Neuropeptídio Y

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAS: Pressão arterial sistólica

PC: Peso corporal

PCF: Peso corporal final

PCI: Peso corporal inicial

PGC: Co-ativador transcricional

PPAR: Receptores de proliferadores de peroxissoma

SNS: Sistema nervoso simpático

SRA: Sistema renina angiotensina

T: Tíbia

TA: Tecido adiposo

TF: Treinamento físico

TRIV: Tempo de relaxamento isovolumétrico

VE: Ventrículo esquerdo

α -MSH: Hormônio liberador de melanócito

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistema de natação aquecido para ratos.....	24
Figura 2. Consumo de oxigênio de pico nos diferentes grupos.....	33
Figura 3. Frequência cardíaca após o período de treinamento físico.....	34
Figura 4. A) Expressão gênica do mRNA da α miosina de cadeia pesada no ventrículo esquerdo.....	36
B) Expressão gênica do mRNA da β miosina de cadeia pesada no ventrículo esquerdo.....	37
C) Expressão gênica do mRNA da relação α/β miosina de cadeia pesada no ventrículo esquerdo.....	37
Figura 5. A) Atividade da enzima conversora de angiotensina no soro.....	39
B) Atividade da enzima conversora de angiotensina no ventrículo esquerdo.....	39
Figura 6. A) Expressão gênica do mRNA da enzima conversora de angiotensina no ventrículo esquerdo.....	40
B) Correlação do mRNA da enzima conversora de angiotensina cardíaca pela atividade da enzima conversora de angiotensina cardíaca.....	40
Figura 7. A) Atividade da enzima conversora de angiotensina do tipo 2 no ventrículo esquerdo.....	41
B) Expressão protéica da enzima conversora de angiotensina do tipo 2 no ventrículo esquerdo.....	42
C) Correlação da atividade da enzima conversora de angiotensina do tipo 2 no ventrículo esquerdo pela sua expressão proteica no ventrículo esquerdo.....	42
Figura 8. A) Concentração de angiotensina II plasmática.....	43
B) Concentração de angiotensina II no ventrículo esquerdo.....	43
Figura 9. A) Expressão proteica do receptor de angiotensina do tipo 1 no ventrículo esquerdo.....	44
B) Expressão proteica do receptor de angiotensina do tipo 2 no ventrículo esquerdo....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Protocolo de treinamento físico.....	24
Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na construção dos primers para a reação em cadeia de polimerase em tempo real.....	32
Tabela 3. Efeitos da obesidade e do treinamento físico nas medidas hemodinâmicas.....	34
Tabela 4. Efeitos da obesidade e do treinamento físico nos parâmetros metabólicos.....	35
Tabela 5. Efeitos da obesidade e do treinamento físico nas medidas corporais.....	36
Tabela 6. Efeitos da obesidade e do treinamento físico na função cardíaca.....	38

RESUMO

Barretti DLM. Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre o sistema renina angiotensina cardíaco e sistêmico de ratos obesos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 67p

Introdução: A obesidade bem como um aumento da ativação do sistema renina angiotensina cardíaco estão profundamente envolvidos com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Por outro lado, o treinamento físico aeróbio, previne o desenvolvimento da obesidade e reduz o sistema renina angiotensina cardíaco em algumas patologias. Dessa forma, nosso objetivo foi de investigar se a obesidade e sua associação com o treinamento físico aeróbio alteram os componentes do sistema renina angiotensina sistêmico e cardíaco em ratos Zucker obesos. **Métodos:** Os ratos Zucker foram divididos da seguinte forma: grupo magro (GM), grupo obeso (GO), grupo magro treinado (GMTR) e grupo obeso treinado (GOTR). O Protocolo de treinamento aeróbio de natação foi realizado por um período de 10 semanas com 5 sessões semanais de 60 minutos de duração. A frequência cardíaca, pressão arterial sistólica, hipertrofia e função cardíaca, bem como os alguns dos componentes do sistema renina angiotensina sistêmico e cardíaco foram avaliadas após o período de treinamento físico. Mensuramos também no final do protocolo de treinamento a glicose, triglicérides, colesterol total, bem como suas frações: lipoproteína de baixa densidade e lipoproteína de alta densidade. **Resultados:** Ambos os grupos obesos apresentaram um aumento significativo do peso corporal em relação aos grupos magros, entretanto, o grupo obeso treinado apresentou um ganho do peso corporal reduzido (-59%) comparado com o grupo obeso sedentário. Essas modificações foram acompanhadas por uma queda de (-12%) na frequência cardíaca de repouso, (-57%) dos triglicérides, (-61%) da lipoproteína de baixa densidade e aumentou a lipoproteína de alta densidade em (+42%) no grupo obeso quando comparado com o grupo obeso sedentário. Além do mais, nossos resultados demonstraram que o treinamento aeróbio reduziu o aumento da massa cardíaca (-13%), da atividade (-27%) e expressão (-63%) da enzima conversora de angiotensina, angiotensina II (-44%), e do receptor de angiotensina II do tipo 2 (-35%) no coração e melhorou a disfunção diastólica na obesidade. Ainda, o treinamento físico aeróbio independente da obesidade aumentou a enzima conversora de angiotensina do tipo 2 cardíaca em ambos os grupos magros. **Conclusão:** Nossos dados demonstraram que o treinamento físico aeróbio reverteu os prejuízos metabólicos e cardíacos causados pela obesidade.

Descritores: 1.Obesidade 2.Hipertrofia ventricular esquerda 3.Sistema renina angiotensina 4.Exercício 5.Ratos Zucker

ABSTRACT

Barretti DLM. Effects of aerobic exercise training on cardiac and systemic renin-angiotensin system in obese rats [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 67p.

Introduction: Obesity and cardiac renin angiotensin system hyperactivity are profoundly involved in cardiovascular diseases. On the other hand, aerobic exercise training can prevent obesity and reduce cardiac renin angiotensin system components in some models of cardiac pathology. Therefore, our hypotheses was to investigate if obesity and it's association with aerobic exercise training alters the systemic and cardiac renin angiotensin system components in an obese Zucker rat strain. **Methods:** The rats were divided in the follow groups: Lean group (LG); lean group plus aerobic exercise training (LGTR); obese group (OG) and obese group plus aerobic exercise training (OGTR). Aerobic exercise training protocol consisted of 10 weeks swimming sessions of 60 min, 5 days/week. At the end of the protocol training we evaluated heart rate, systolic blood pressure, cardiac hypertrophy and function, local and system component of renin angiotensin system. We also measured systemic glucose, triglycerides and total cholesterol such as their fractions: low density lipoprotein and high density lipoprotein. **Results:** Both obese groups showed a significant augment in body weight when compared with lean groups, however, the obese trained group had less weight gain (-59%) than obese untrained group. These alterations were accompanied by (-12%) less resting heart rate, (-57%) triglycerides, (-61%) low density lipoprotein and augmented (+42%) high density lipoprotein in the obese group when compared with untrained obese group. Moreover, our results showed that exercise training reduced the increased cardiac mass (-13%), cardiac angiotensin converting enzyme activity (-27%) and expression (-63%), angiotensin II (-44%), and type 2 angiotensin II receptor (-35%), and improve the loss of diastolic function caused by obesity. Furthermore, exercise augmented cardiac ACE2 in both training groups. **Conclusion:** Our results showed that the aerobic exercise training improved the metabolic and cardiac alterations caused by obesity.

Descriptors: 1.Obesity 2.Left ventricular hypertrophy 3.Renin angiotensin system 4.Exercise 5.Zucker Rats

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica que atinge proporções epidemiológicas, sendo um importante problema de saúde pública. Sua causa é multifatorial, e pode ser desencadeada tanto por fatores genéticos, quanto ambientais. O sedentarismo e a alimentação inadequada estão entre os principais fatores ambientais que contribuem para o desenvolvimento da obesidade.

A ocorrência da obesidade está associada ao desenvolvimento de várias patologias associadas ao sistema cardiovascular. Dentre elas, temos a hipertrofia cardíaca (HC), que pode ocorrer devido a uma maior sobrecarga pressórica e/ou volumétrica, e uma maior ativação do sistema renina-angiotensina (SRA), tanto circulante quanto cardíaco, entre outros.

A HC decorrente da obesidade apresenta características patológicas e pode levar a disfunção ventricular, pois sua morfologia é diferente da HC fisiológica que ocorre com o treinamento físico (TF). Além disso, diferentes estímulos e mecanismos são ativados nesses diferentes tipos de hipertrofia.

O exercício físico realizado cronicamente, devido a sua característica intermitente, induz HC, sem prejuízo da função ventricular, a qual é classificada como uma HC fisiológica. Somando a essa característica do exercício, a atividade física, tem se demonstrado como uma importante forma terapêutica não farmacológica para o tratamento da obesidade, bem como na prevenção de outros fatores de risco associados a essa patologia.

Outro distúrbio causado pela obesidade é o aumento da gordura corporal, a qual pode desencadear uma série de alterações hormonais relacionadas ao acúmulo do tecido adiposo (TA). O TA, recentemente foi classificado como um órgão endócrino capaz de sintetizar e liberar vários hormônios e outras substâncias, dentre elas temos: ghrelina, citocinas inflamatórias, leptina e componentes do SRA. Vários autores demonstraram a existência de um SRA nos adipócitos, sendo que, na obesidade parece ocorrer um aumento na expressão dos componentes do SRA, levando ao aumento do sistema circulante. O aumento dos níveis de SRA circulante e local elevam os níveis de angiotensina II (Ang II), que exerce um importante efeito vasoconstritor e trófico sobre o miocárdio resultando em sobrecarga pressórica e HC patológica. O SRA

no tecido adiposo também desenvolve um papel na diferenciação dos adipócitos e possivelmente no acúmulo de gordura.

Em contraposição a isso, o exercício físico aeróbio realizado cronicamente, pode reduzir os níveis de gordura corporal, assim, consequentemente diminuindo os níveis do SRA, bem como seus efeitos deletérios para importantes órgãos, principalmente sistema renal e cardiovascular. Dessa forma o exercício físico aeróbio pode ser uma conduta não farmacológica interessante a ser adotada tanto para a prevenção quanto para o tratamento da obesidade.

Portanto, fica clara a existência de um SRA aumentado na obesidade, aumento esse que é prejudicial ao organismo. Contudo, pouco se sabe da regulação do SRA cardíaco na obesidade e sua associação com o TF aeróbio.

2 JUSTIFICATIVA

Embora já descrito na literatura os benefícios do TF aeróbio, no que diz respeito a obesidade, pouco se sabe dos seus efeitos na modulação do SRA cardíaco e circulante em ratos obesos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos do TF aeróbio na modulação do SRA cardíaco e sistêmico em ratos obesos.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a capacidade física dos animais pelo Consumo Máximo de Oxigênio e Teste de Capacidade Máxima;
- Determinar a Pressão Arterial e Frequência Cardíaca;
- Analisar a Função Ventricular pela medida Ecocardiográfica;
- Analisar a expressão gênica de marcadores de HC patológica;
- Analisar o SRA sistemicamente pela medida da atividade da ECA no soro e concentração de Ang II no plasma;
- Analisar o SRA local (coração) pela atividade da ECA, e da ECA-2 e quantificação da expressão gênica da ECA, e pela concentração de Ang II, bem como pela expressão protéica da ECA-2 e dos receptores de Ang II AT1 e AT2.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Obesidade

A obesidade é uma condição complexa que pode acarretar em mudanças nas condições sociais, biológicas e psicológicas do ser humano, podendo ser definida como um distúrbio multifatorial do balanço energético, que consiste em uma ingestão calórica maior que seu gasto energético ao longo do tempo, resultando em um aumento do peso corporal em detrimento de uma acumulação excessiva do tecido adiposo.

4.1.2 Classificação

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) para que um indivíduo seja classificado com sobrepeso ou obeso, o seu índice de massa corporal (IMC) para o sobrepeso deve estar entre (25 a 29.9) e 30 ou mais para a obesidade (1). O IMC é calculado da seguinte forma: a massa corporal em quilogramas dividida pela altura em metros elevada ao quadrado.

Outra forma de se classificar a obesidade é através da quantidade de gordura corporal por meios diretos, como: radioabsorciometria de feixes duplos (DEXA), ou indiretos, como: dobras cutâneas ou bioimpedância. Nesses casos, se aceita, como normalidade valores abaixo de 25% de gordura do peso corporal total para homens e 35% para mulheres (2). Existem também métodos mais simples de se avaliar a obesidade, porém, muito usado por especialistas clínicos, como: relação cintura quadril e circunferência abdominal. Essas medidas são muito usadas pelo fato de terem uma boa correlação com a quantidade de gordura visceral, uma vez que se sabe que a gordura visceral é a mais deletéria para o organismo. De fato, segundo a OMS, o aparecimento de comorbidades relacionadas a obesidade está associado ao maior acúmulo de TA visceral. Esse aumento de TA visceral pode trazer vários prejuízos à saúde, que incluem desde dificuldades respiratórias, problemas dermatológicos e distúrbios do aparelho locomotor, até enfermidades potencialmente letais, tais como, diabetes, doença da artéria coronária e certos tipos de câncer, enquanto que a gordura subcutânea parece não ser deletéria ao organismo (1).

Dessa forma, além do IMC, o uso de medidas como a circunferência da região abdominal, a quantidade de massa gorda ou a relação da cintura quadril para classificar o risco de doenças associadas à obesidade passa a ser uma estratégia interessante.

4.1.3 Dados epidemiológicos

A obesidade tem se tornado um grande problema de ordem pública, pois a cada ano que passa o número de pessoas com sobrepeso ou obesas aumentam. De acordo com um levantamento do Nutrition Examination Survey (NHANES), há um aumento relevante da obesidade e do sobrepeso na população norte americana, dados que eram de 33% para portadores de sobrepeso e 22,9% para obesidade (NHANES III – 1988-1994), passaram em 2004 para 31,1% com sobrepeso e 32,2% com obesidade, ou seja, um aumento da prevalência da obesidade nesse período de aproximadamente 32% (3, 4).

Outros dados publicados pela OMS mostram que mundialmente encontram-se aproximadamente 1,7 bilhões de indivíduos acima do peso, implicando em um problema que não é apenas das sociedades desenvolvidas, mas que também faz parte de sociedades em período de desenvolvimento (5)

O Brasil possui um quadro bem semelhante de sobrepeso e obesidade quando comparado com os países desenvolvidos. Dados coletados entre 2002 e 2003 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) demonstram que o excesso de peso para a população masculina acima de 20 anos é de 41,1% sendo que destes 8,9% são obesos e para a população feminina o perfil é semelhante 40,8% sobrepeso, sendo destes, 13% obesos.

Outro dado alarmante é a crescente prevalência da obesidade para crianças e adolescentes no Brasil. Estudo publicado por Abrantes e colaboradores, demonstra que crianças entre 2 e 10 anos possuem uma prevalência de sobrepeso de 10,8% e 7,3% de obesidade, enquanto que para adolescentes com idade entre 10 e 19 anos a prevalência de sobrepeso é de 9,9% e 1,8 para obesidade (6).

Esses dados indicam que se nenhuma providencia for tomada, o aumento da obesidade atingirá proporções catastróficas. De fato, um trabalho publicado no International Journal of Obesity, indicou que em 2030 aproximadamente 35,2% da população americana terão sobrepeso e 51,1% obesidade se nenhuma providência for tomada, somando esses números, temos 86,3% da população americana acima do peso o que demonstra um grande índice de obesidade (7).

Portanto, fica claro que, tanto o excesso de peso quanto a obesidade atingiu proporções epidemiológicas não só em países ricos, mas também em países

emergentes e que é necessário que se tome medidas efetivas para combater esse quadro.

4.1.4 Etiologia e fisiopatologia

As principais causas da obesidade são: fatores genéticos, endócrinos e ambientais. De fato, a etiologia da obesidade é bastante complexa, dentre os fatores genéticos, temos algumas mutações monogênicas que envolvem a via de sinalização do sistema nervoso central, como mutações no gene da leptina, do receptor de leptina da proopiomelanocortina e do receptor da melanocortina (8-11). Entretanto, essas mutações contribuem com uma parcela bem pequena da obesidade global (até 2005 apenas 176 casos de obesidade em decorrência de mutações monogênicas foram documentados), e não explicam o aumento acentuado da obesidade nos dias de hoje (12).

Contudo, essas mutações auxiliam muito na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento da obesidade. Um dos mecanismos mais bem estudado é o da sinalização da leptina.

A leptina é um hormônio secretado pelo TA, sua secreção é proporcional a quantidade de TA, sua função é de controlar a saciedade e o metabolismo, agindo em grupos de neurônios situados no núcleo arqueado do hipotálamo no sistema nervoso central (13). Nessa região do hipotálamo a leptina controla dois grupos de neurônios simultaneamente, entretanto, esse controle se faz de maneira oposta, pois, ela inibe neurônios responsáveis por liberar substâncias como a proteína relacionada ao agouti (AGRP) e neuropeptídeo Y (NPY) enquanto que estimula neurônios que secretam o hormônio liberador de melanócito (α -MSH) e o neuropeptídeo regulador da transcrição da cocaína e anfetamina (CART) (13). Seu efeito final ao inibir a via da AGRP e estimular a via α -MSH é uma diminuição da ingestão calórica e aumento do metabolismo. No entanto, como já dito anteriormente essas alterações gênicas pontuais não explicam o crescimento da obesidade atual.

A obesidade na maioria dos casos possui um fenótipo multifatorial que conta com a ação de múltiplos genes mais a interação com o ambiente, atualmente existem 244 genes candidatos relacionados a obesidade e os estudos de associação ainda são bastante controversos (12).

Entre os fatores ambientais o consumo excessivo de alimentos e a inatividade física têm sido os maiores contribuintes no desenvolvimento da obesidade. Paradoxalmente, ao mesmo tempo em que possuímos uma herança genética da era paleolítica de privação de alimentos e uma necessidade de atividade física para o sustento ou sobrevivência, vivemos em um ambiente obesogênico, com grandes ofertas de alimentos e baixo nível de atividade física, o que contribui em grande parte para o desenvolvimento da obesidade. Ou seja, genes que antigamente eram benéficos para o acúmulo de gordura em momentos de privação, atualmente podem ser maléficos no ambiente em que nos encontramos (14). Sendo assim, embora nossa biologia favoreça o acúmulo de tecido adiposo, também necessitamos de um ambiente que proporcione o desenvolvimento da obesidade causando uma relação sinérgica entre biologia e ambiente.

Os índios Pima, oferecem um exemplo interessante dessa interação gene - ambiente. Essa população aparentemente possui uma biologia favorável ao desenvolvimento da obesidade, pois uma parte dela vive no Arizona, região oeste dos Estados Unidos. Essa região é considerada um ambiente obesogênico. Enquanto que outra parte dessa população vive em um ambiente restritivo das montanhas do México. A prevalência de obesidade para esses índios que vivem nos Estados Unidos é muito maior quando comparado com os seus semelhantes que moram no México (15). Esse exemplo, nos mostra, a importância que um ambiente obesogênico tem no desenvolvimento da obesidade, felizmente, esses fatores ambientais podem ser alterados.

4.1.5 Modelos de obesidade

Muitas das alterações fisiológicas e estruturais causadas pela obesidade são difíceis de serem estudadas em humanos. Com o objetivo de melhor entender os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na obesidade, cientistas fazem uso de modelos de animais, como: ratos e camundongos.

Os dois principais modelos de obesidade são: os que desenvolvem obesidade por meio de dietas hipercalóricas e os que são obesos devidos a alguma alteração genética. Os modelos genéticos mais comuns são os camundongos que possuem mutação no gene da leptina ou no seu receptor (16, 17). O camundongo (ob/ob) não possui o gene da leptina enquanto que o camundongo (db/db) possui uma mutação no

gene do receptor da leptina, ambos além da obesidade desenvolvem diabetes. Outro modelo de camundongo é o (UCP-DTA) que possui a toxina diftérica (DTA) no tecido adiposo marrom, esse modelo desenvolve moderada obesidade e diabetes mellitus do tipo 2 (18).

Em relação a ratos, os modelos mais estudados são o Zucker obeso fa/fa e o Zucker obeso diabético. O modelo de obesidade fa/fa foi descoberto por Zucker e Zucker em 1961(19). Esse modelo genético é conhecido por possuir uma mutação espontânea no gene que codifica o receptor de leptina. Essa mutação é localizada no par de bases de número 880, constituindo na troca de um único nucleotídeo adenina por citosina, gerando a troca de um aminoácido Glutamina por Prolina no resíduo 269 (Glu269Pro), do receptor de leptina (11).

O receptor de leptina é transmembrânico e possui dois C domínios que se assemelham ao mecanismo de transdução de sinal da classe 1 de citocinas das gp130, esses domínios dimerizam entre si causando uma sinalização em cascata (11).

Interessantemente, essa alteração gerada no modelo (fa/fa) não altera a expressão do receptor, nem mesmo impede a ligação da leptina a ele, no entanto, a dimerização do receptor é prejudicada, impedindo o mecanismo de sinalização intracelular (11, 20).

O desenvolvimento da obesidade nesse modelo leva ao aparecimento de outros distúrbios metabólicos advindos do excesso de tecido adiposo como hiperinsulinemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, podendo desenvolver ou não hipertensão (21, 22). Assim, a linhagem Zucker oferece um modelo experimental atrativo para se estudar alterações cardiovasculares, como relatados por alguns estudos com o coração da linhagem Zucker, que demonstram que essa linhagem possui alterações da massa e função cardíaca (23). Os mecanismos propostos para as alterações cardiovasculares nesse modelo são alterações na isoforma da miosina e no metabolismo cardíaco que utilizaria principalmente lipídios ao invés de glicose (23).

Existem ainda, alguns modelos de ratos obesos por dietas hipercalóricas ou hiperlipídicas. Alguns grupos têm estudado a consequência dessas dietas no coração. No entanto algumas diferenças de interpretação são geradas devido a diferentes tipos de dietas. Dietas hiperlipídicas porém isocalóricas que estão associadas a níveis reduzidos de insulina e leptina parece atenuar a HC e o remodelamento cardíaco induzido por sobrecarga pressórica em modelos de ratos infartados (24, 25). Em

contraste dietas hiperlipidêmicas associadas ao desenvolvimento de resistência a insulina e obesidade quase sempre desenvolvem disfunção ventricular (26, 27), mas nem sempre (28).

Dessa forma, embora os modelos acima citados nem sempre se assemelhem com a obesidade humana, eles podem ajudar na elucidação de mecanismos que contribuem para o desenvolvimento da obesidade e assim, auxiliar na construção de estratégias de intervenção ao combate dessa doença.

4.1.6 Obesidade e coração

Dentre as co-morbidade presentes na obesidade, as doenças cardiovasculares são as que mais acometem o paciente obeso e são as mais responsáveis pelos custos de internações e despesas públicas (29). Portanto, o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos que levam a doenças cardíacas é de fundamental importância para a sua prevenção.

Evidências demonstram que a obesidade na ausência de outros fatores de risco está correlacionada com alterações cardíacas (ex. aumento da massa ventricular, aumento da câmara atrial, prejuízos subclínios da função sistólica e diastólica)(30). Fatores esses que se sustentados por um por longo período podem desenvolver uma insuficiência cardíaca (IC), como demonstrado por um estudo com participantes do estudo Framingham que teve como objetivo identificar a prevalência de IC em pacientes obesos de ambos os sexos. Esse estudo constatou que a IC aumenta de acordo com o IMC, independente de outros fatores de risco (31).

Contudo, dentre as alterações cardiovasculares acima citadas, a HC é uma das primeiras alterações estruturais ocorridas na obesidade, e o seu aparecimento é independente de outras patologias associadas (32, 33). A HC constitui um dos principais mecanismos de adaptação do miocárdio e envolve um complexo processo que abrange alterações genéticas, moleculares e celulares, atuando sobre miócitos e interstício que são manifestadas com modificações no tamanho, massa, geometria e função cardíaca em resposta a determinado estímulo (34). Ainda não existe um consenso na literatura quanto ao tipo de HC desenvolvida na obesidade (ex. concêntrica e excêntrica). A HC concêntrica é desenvolvida devido a uma sobrecarga pressórica que por sua vez leva a um aumento da síntese de proteínas contráteis, espessamento de miócitos e adição de novos sarcômeros predominantemente em

paralelo (34). Por outro lado, a HC excêntrica ocorre uma sobrecarga volumétrica, o que determina que sarcômeros adicionais sejam dispostos predominantemente em série, levando a miócitos mais longos e dilatação da cavidade ventricular (34).

Entretanto, a maioria dos estudos com obesidade encontram um maior aumento da parede do que da cavidade o que sugere uma leve predominância da HC concêntrica em obesos. A compreensão do fenótipo cardíaco desenvolvido com a obesidade nos fornece um entendimento dos mecanismos envolvidos na HC do obeso e pode ser de grande valia para o desenvolvimento de terapêuticas.

Estudos realizados em indivíduos obesos demonstram que a obesidade provoca exacerbação nervosa simpática e consequente aumento na resistência vascular, bem como aumento nos níveis dos componentes do SRA, aumentando, assim, a ocorrência de hipertensão arterial e o desenvolvimento de HC (35-37).

Em adição, um maior acúmulo de tecido adiposo, juntamente com um aumento da massa magra geram um aumento da demanda metabólica que por sua vez, também contribui para o desenvolvimento da HC do obeso. Essas alterações no quadro metabólico acarretam em um aumento da volemia gerando alterações hemodinâmicas. O aumento da volemia leva a sobrecarga cardíaca tanto na pré-carga quanto na pós-carga, predispondo um remodelamento ventricular que pode ocorrer por um aumento da espessura da parede do ventrículo, ou por um aumento da sua massa, bem como uma dilatação da câmara (38).

Esses dois tipos de HC (ex. concêntrica e excêntrica), juntamente com um estresse aumentado na parede ventricular geram um consumo aumentado de oxigênio pelo miocárdio com eventual ocorrência de disfunção ventricular. Inicialmente, essa sobrecarga cardíaca gera mecanismos como o aumento do drive simpático para compensar o prejuízo contrátil cardíaco, no entanto, em longo prazo esse mecanismo compensatório acarreta em efeitos deletérios ao coração (38).

Além das alterações hemodinâmicas, o obeso também pode possuir algumas alterações metabólicas e endócrinas que contribuem no desenvolvimento de cardiomiopatias.

O aumento da oferta de ácidos graxos livres e triglicérides para o coração, bem como o possível aumento dos níveis de insulina alteram o metabolismo cardíaco, diminuindo a captação de glicose e aumentando a captação de ácidos graxos (30). O

aumento da captação de ácidos graxos pelo miocárdio promove disfunção celular e ativa vias de apoptose cardíaca resultando em uma disfunção do coração (30).

Essas alterações metabólicas cardíaca em obesos parece ser a anormalidade mais precocemente avaliada, sugerindo que essa alteração pode ser a precursora de futuras disfunções contráteis. Posteriormente, a ativação de fatores de transcrição como o receptor de ativação e proliferação do peroxissoma α (PPAR α), e o co-ativador transcricional 1 (PGC1) que mediam o aumento da expressão de genes que estão envolvidos na oxidação de ácidos graxos e no seu transporte (39). Outra possível alteração, seria uma redistribuição do transportador de ácidos graxos o CD36 na membrana (39).

Um importante achado foi que essa alteração metabólica gera um maior consumo de oxigênio e uma perda da eficiência cardíaca (40). Essa perda de eficiência pode gerar uma limitação da reserva cardíaca o que por sua vez pioraria sua função em situações de maior estresse como é o caso da HC.

Ainda, além do prejuízo da sinalização da insulina acima citado, outro hormônio que possui um papel no desenvolvimento de doenças cardíacas é a leptina. A leptina pode influenciar fatores cardíacos devido a sua atuação na periferia ou indiretamente via SNS. Há uma extensa literatura mostrando as influências da leptina na obesidade e IC (41, 42).

A carência de leptina ou sua resistência leva ao acúmulo de lipídios em outros tecidos além do adiposo (pois, a leptina inibe a esteatose), o que pode gerar lipotoxicidade em vários órgãos. Modelos de obesidade que apresentam problemas na sinalização de leptina como ratos Zucker fa/fa exibem uma apoptose cardíaca aumentada (43).

Portanto, a obesidade leva a diversas alterações metabólicas, estruturais e endócrinas que agindo distintamente ou em conjunto de forma bastante complexa podem levar a diversas alterações na estrutura e função do coração que cronicamente podem resultar em IC e morte.

4.1.7 Obesidade e exercício aeróbio

Apesar da concordância de opiniões encontrada na literatura sobre os fatores de risco ligados à obesidade, ainda se discute qual o melhor tratamento para essa síndrome, já que a maioria dos obesos apresentam dificuldades na manutenção da

perda de peso a longo prazo. O insucesso nas dietas consecutivas, levando ao conhecido efeito iô-iô, pode exercer um efeito deletério à saúde. Vários estudos sugerem que a manutenção da massa magra com a prática de exercício previne uma redução do metabolismo de repouso que geralmente ocorre em casos de dietas (44).

Ainda, o exercício auxilia na redução do peso corporal e sua manutenção após um período de dieta sendo essencial para uma dieta bem sucedida, seus efeitos são tanto agudos como crônicos na mobilização de gordura, aumento da lipólise através do aumento da atividade da enzima lipase hormônio sensível, e da densidade mitocondrial bem como a sensibilidade de receptores β -adrenérgicos no TA e atua diminuindo principalmente a gordura visceral que é a mais prejudicial para o organismo (45-47).

Nesse sentido, a inclusão do exercício físico aos programas de emagrecimento tem se mostrado uma conduta bastante eficaz, já que ele favorece a manutenção do peso corporal em médio e longo prazo (48).

Além dos efeitos obtidos com o exercício em relação ao peso corporal, estudos demonstram que indivíduos obesos submetidos a uma dieta hipocalórica associada ao TF aeróbio apresentam uma melhora acentuada na resistência à insulina e função vascular que indivíduos obesos submetidos somente à dieta hipocalórica (49). Essas condutas não farmacológicas provocam diminuição no nível de insulina no plasma, sugerindo diminuição da resistência à insulina, diminuição dos níveis de renina plasmática e da atividade nervosa simpática, melhorando a vasodilatação e os níveis de HDL - colesterol no plasma (50, 51), demonstrando que o exercício aeróbio contribui de forma significativa não só na diminuição e prevenção do ganho de peso corporal e TA, mas também atenuando as co-morbidades relacionadas a obesidade.

Em um recente estudo, realizado com ratos que receberam dieta hiperlipídica foi demonstrado que o exercício foi capaz de prevenir o ganho de peso do TA, sobretudo o visceral, ainda nesse estudo foi visto um aumento de marcadores inflamatórios como interleucina 1 e 6, e $\text{TNF}\alpha$ no TA subcutâneo mas não no visceral, esse aumento que foi relacionado com uma melhora da tolerância a glicose, indicando um papel protetor do TA subcutâneo na prevenção da diabetes mellitus (52).

Ainda, interessante, estudos demonstram que o TF aeróbio, independente de dieta ou de perda de peso corporal reduz o TA, melhora a oxidação de lipídios no músculo esquelético e a pressão arterial em indivíduos obesos hipertensos (53, 54). O aumento da oxidação de lipídios no tecido muscular esquelético pode ser de particular

importância para o obeso, uma vez que esses lipídios estão associados ao desenvolvimento de diabetes mellitus (55).

Assim, o exercício físico aeróbio é uma ferramenta imprescindível no combate da obesidade, pois, ele auxilia na perda de peso através de uma redução de massa gorda e uma maior oxidação de gordura, além disso, ele ajuda no combate de doenças em detrimento da obesidade, como: resistência a insulina, dislipidemia e hipertensão.

4.2 Sistema renina angiotensina

O SRA corresponde a um complexo sistema hormonal, cujo papel fundamental está relacionado com o controle da pressão arterial e homeostasia hidroeletrolítica do organismo. Classicamente o SRA é visto como um sistema endócrino cujo principal peptídeo ativo, a Ang II, é responsável pela maioria dos efeitos fisiológicos observados (56).

4.2.1 Histórico

A descoberta do SRA iniciou-se no final do século 19, em 1898 com Tigerstedt e seu assistente Bergman, que analisando os efeitos do extrato renal de coelhos descobriram a existência de uma substância pressórica denominada por eles de renina devido a sua origem. Ainda, eles demonstraram que a renina possuía um grande efeito pressórico, levando a grandes indícios que juntamente com achados anteriores relacionavam a HC com doenças renais e aumento da pressão arterial (57).

Já no século seguinte, mais precisamente em 1934, depois de várias tentativas de construção de um modelo experimental de hipertensão arterial, Goldblatt e seu técnico construíram um modelo de hipertensão arterial em cachorros através de uma constrição parcial da artéria renal, demonstrando de fato o papel pressórico do rim. Juntando com a descoberta da liberação da renina pelo rim por Tigerstedt e Bergman, Goldblatt, sugeriu a existência de um mecanismo humoral renal (57). Contudo a ausência de metodologias adequadas naquela época ainda impossibilitava essa confirmação. Esses resultados deram um grande estímulo para o meio científico iniciar a busca por mecanismos responsáveis pelo aumento da pressão arterial.

Seis anos mais tarde, dois grupos independentes que trabalhavam simultaneamente, sendo um liderado por Braun Menéndez em Buenos Aires e outro liderado por Page em Indianápolis, descreveram que a renina era na verdade uma

enzima que clivava o hipertensinogênio uma proteína plasmática (atualmente angiotensinogênio (Agt), para formar aquele que seria o peptídeo de ação pressórica. O grupo de Braun Menéndez denominou esse peptídeo de hipertensina enquanto que o grupo do Page o chamou de angiotonina. Aproximadamente 17 anos mais tarde, os dois grupos entraram em consenso e juntaram as duas nomenclaturas, assim, passando a chamar o peptídeo de ação pressórica de angiotensina (Ang) (57). Mais tarde, na década de cinquenta, Skeggs e colaboradores descobriram a formação de duas angiotensinas diferentes, a Ang I e a Ang II. Ainda, Skeggs descobriu outra substância que clivava a Ang I, assim, descobrindo a existência da ECA (58).

4.2.2 Componentes do sistema renina angiotensina

A cascata de eventos bioquímicos do SRA inicia-se com a renina, uma enzima sintetizada e estocada nas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais. Essa enzima é liberada pela ativação direta do sistema nervoso simpático ou em condições de hipoperfusão renal como consequência, por exemplo, da queda da pressão arterial ou diminuição da osmolaridade sanguínea. Seu substrato é o Agt, sintetizado principalmente pelo fígado. Uma vez na circulação, o Agt é clivado a um decapeptídeo conhecido como Ang I. A Ang I sofre a clivagem de dois de seus aminoácidos da região N-terminal (His-Leu) pela ECA presente em maior concentração na membrana das células endoteliais da circulação pulmonar, e passa então a ser chamada de Ang II. A ECA também faz parte do sistema caliceína-cinina, sendo conhecida também como uma cininase, inativando a bradicinina. Esses dois hormônios peptídeos (bradicinina e Ang II) têm efeitos opostos no tônus vascular

A ligação da Ang II a seus receptores AT1 e AT2, localizados na membrana plasmática das células dos órgãos-alvo, é então responsável por uma série de eventos biológicos. As principais funções da Ang II são vasoconstrição periférica e controle da trofia cardíaca (59). Deve-se ressaltar, entretanto, que apesar da Ang II ser indiscutivelmente a substância ativa mais importante do SRA, diversos outros peptídeos podem ser formados por outras vias, e são também responsáveis por algumas ações específicas. Adicionalmente a essa via clássica, recentes evidências mostram que outros novos peptídeos de angiotensinas, com importantes funções biológicas são formados, como: Ang (1-7), Ang (3-8), (Ang IV) e a Ang (1-12) (60),

adicionando complexidade, mas também, possibilitando uma melhor compreensão das funções deste sistema em situações fisiológicas e patológicas.

A renina, a qual era considerada somente como uma enzima, pode ter uma ação celular via receptor específico (61). Outra via que foi descrita é dependente da ECA-2 (uma zinco metaloprotease com significante homologia com a ECA), que forma a Ang (1-9), um peptídeo biologicamente inativo, a partir da Ang I, enquanto a Ang (1-7) também é formada a partir da Ang I, porém pela ação de várias endopeptidases (NEP) tecido-específicas ou a partir da Ang II pela ação da ECA-2. A Ang (1-7) pode ser metabolizada pela ECA formando o peptídeo Ang (1-5), com função biológica ainda desconhecida. A Ang (1-7) exerce seus efeitos biológicos através dos receptores Mas (60). Diferentemente da ECA, a ECA-2 não hidrolisa Ang I a Ang II e sua atividade enzimática não é inibida por inibidores da ECA (62, 63). Portanto, a ECA-2 é efetivamente um inibidor da formação de Ang II por estimular vias alternativas de degradação de Ang I. Em conjunto, a Ang II e Ang (1-7) exercem um equilíbrio no SRA, permitindo um balanço entre os efeitos pressóricos e tróficos da Ang II e os efeitos vasodilatadores e antitróficos da Ang (1-7).

4.2.3 Mecanismos de ação

O SRA exerce seus efeitos principalmente controlando a resistência periférica (através do tônus vascular), a função renal e a estrutura cardiovascular (64). Seu controle se dá por três fatores, diminuição da perfusão renal, aumento da atividade nervosa simpática renal e alterações no volume plasmático. Além disso, esse sistema possui efeitos autócrinos e parácrinos tecido específico (65).

A Ang II atua de forma aguda no controle da PA, pois, ela age sobre a resistência periférica total via efeitos diretos sob os vasos sanguíneos, como: vasoconstrição direta dos vasos e indiretos, como: facilitação da neurotransmissão noradrenérgica periférica, pois, aumenta a liberação e diminui a recaptação de norepinefrina dos terminais nervosos simpáticos e por aumentar a resposta vascular a norepinefrina. A Ang II, também estimula a liberação de catecolaminas pela medula adrenal.

Enquanto que no rim, a ação da Ang II se dá principalmente no controle crônico da PA. O peptídeo atua na redução da excreção urinária de sódio e água. Além disso,

ela estimula a zona glomerulosa do córtex da adrenal e aumenta a síntese e secreção de aldosterona, um potente hormônio na retenção de sódio e excreção de potássio.

Por outro lado, a ação da Ang II sobre a estrutura cardiovascular deve-se a fatores hemodinâmicos e não-hemodinâmicos (diretos sobre o sistema cardiovascular). Os efeitos diretos da Ang II são: estimulação da proliferação e hipertrofia das células musculares lisas vasculares, aumento da produção da matriz extracelular pelas células musculares lisas, cardíacas e fibroblastos, e estimulação da hipertrofia de cardiomiócitos.

Os efeitos da Ang II são, sobretudo, via seus receptores AT1 e AT2. Tem sido demonstrado que seus receptores possuem diferentes vias de sinalização. Dentre os efeitos do AT1 os mais característicos são: vasoconstrição e ativação de vias de crescimento celular. Já o AT2, parece contrabalancear os efeitos do AT1. Contudo, um recente estudo demonstrou que o AT2 também pode participar de vias hipertróficas (66).

A ligação da Ang II a seus receptores ativa múltiplos sinais de transdução. Sua ligação ao seu receptor AT1 desencadeia mecanismos de segundo mensageiros. Já está bem documentado na literatura que o AT1 se liga a fosfolipase- β que por sua vez resulta na geração do inositol 1,4,5 fosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 estimula a liberação de cálcio dos estoques celulares enquanto que o DAG ativa a proteína cinase C. Além dessa via de sinalização tradicional, o AT1 também induz outras vias associadas a fatores de crescimento (tirosina cinases) e citocinas como a via da proteína janus cinase (JAK-STAT). Por outro lado, o AT2 atua na via das serinas e tirosinas fosfatases, fosfolipase A e óxido nítrico. O AT2 também pode induzir vias de produção de ceramidas e espécies reativas de oxigênio (67).

Recentemente, outro receptor envolvido na via da Ang (1-7) foi descoberto recebendo a denominação de receptor Mas, seus efeitos são principalmente em vias vasodilatadoras e anti-proliferativa (68). Estudos mais recentes revelaram que a Ang (1-7) que por sua vez está acoplado a proteína G ativa a via dependente de proteína cinase B (AKT), assim gerando a produção de óxido nítrico. Ainda, foi demonstrado que a Ang (1-7) potencializa os efeitos vasodilatadores da bradicinina (60).

As vias de sinalização tem sido alvo de muitos estudos com o intuito de desvendar os mecanismos fisiológicos e patológicos envolvidos nesse sistema, entretanto, muito ainda tem para ser descoberto. A elucidação das vias de sinalização

do SRA é de grande valia para o desenvolvimento de fármacos que auxiliem na prevenção de doenças relacionadas ao SRA.

4.2.4 Sistema renina angiotensina no coração

A visão clássica do SRA, a qual o sistema seria essencialmente dependente da existência de enzimas circulantes (renina e ECA) para produzir seus efeitos fisiológicos, sofreu profundas modificações. Hoje, o SRA é visto de forma mais ampla, em que a multiplicidade de funções do sistema é produto também da ação “parácrina”, “autócrina” e até “intócrina” da Ang II e de alguns de seus metabólitos produzidos localmente em vários tecidos (65).

A utilização de métodos bioquímicos aliados a técnicas modernas de biologia molecular permitiu a descoberta de muitos componentes do SRA em tecidos periféricos. A detecção de um ou mais RNAs mensageiros desses componentes (Agt, renina, ECA) em vários tecidos, como glândulas adrenais, rins, coração, vasos, tecido adiposo e cérebro, deu sustentação à existência de SRAs locais (69). Dessa forma, a tendência hoje é aceitar que os componentes circulantes possam ser absorvidos pelos tecidos, mas que os compartimentos dentro desses tecidos têm também a capacidade de gerar Ang II com concentrações de substrato e cinéticas diferentes e ainda pouco conhecidas, porém, independentes do circulante (65).

A existência de um SRA no coração vem sendo estudada, e vários RNAs mensageiros para os componentes desse sistema já foram identificados no coração (69, 70). Dentre os RNAs codificadores para as substâncias do SRA, a renina tem sido questão de debate. Apesar de ter sido encontrado mRNA no coração para a renina (69), uma possível contaminação do sistêmico pode ter ocorrido devido a uma pequena quantidade de amostra. Entretanto, outros autores sugerem ocorrer a presença da renina no coração em alguns casos patológicos (71), além disso, uma captação da renina do sistema circulante pode ser feita, armazenando a mesma no coração. Ao contrário da renina, os outros componentes do SRA no coração, já estão bem descritos por vários estudos.

Os efeitos fisiológicos do SRA existente no coração têm sido pesquisado, contudo, fica difícil diferenciar se os efeitos são gerados pelo SRA local ou sistêmico, uma vez que a Ang II sistêmica pode atuar nos seus receptores específicos localizados no coração. Entretanto, os efeitos do SRA no coração tornam-se claro, quando se faz

uso de inibidores da formação de Ang II ou de antagonistas dos receptores de Ang II, pois, alterações a nível celular são encontradas com o uso dessas substâncias, como por exemplo, o remodelamento cardíaco. O fato da utilização de inibidores ou bloqueadores da Ang II gerar alterações a nível celular sugere uma possível influência do sistema local.

O principal papel fisiológico do SRA no coração parece ser uma regulação de fatores de crescimento e proliferação, podendo tanto induzir como inibir o processo de trofia cardíaca. O estímulo trófico pode ser desencadeado devido a um processo adaptativo ao estresse mecânico gerado nas células do miocárdio (72).

Estudos com modelos animais de experimentação demonstram também uma participação do SRA em determinadas patologias cardíacas como HC e insuficiência cardíaca. Em modelos de obesidade estudos com inibidores da ECA revelam uma melhora nos parâmetros cardíacos como hipertrofia, função e metabolismo (73). Ratos Zucker obesos apresentam uma melhora do metabolismo da glicose com inibidores de ECA (74). Outro benefício encontrado em ratos Zucker com inibidores de ECA foi uma melhora na densidade capilar cardíaca, e tem-se sugerido que um dos principais mecanismos pelo qual a ECA prejudica a formação de novos vasos é pela degradação da bradicinina. A bradicinina atua principalmente na formação de vasos via VEGF. De fato, neste estudo, os autores demonstraram um aumento de VEGF quando a ECA foi inibida por perindopril (75). No entanto, poucos são os estudos que mediram os componentes do SRA em modelos de obesidade.

Portanto, o melhor entendimento da regulação dos componentes do SRA no coração em patologias como a obesidade pode auxiliar no combate das doenças cardíacas por ela desenvolvida.

4.2.5 Sistema renina angiotensina na obesidade

A obesidade aumenta o risco para doenças cardiovasculares. Além disso, a obesidade predispõe o indivíduo a ter vários outros distúrbios, como: aumento da resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão arterial, entre outros. Fatores esses que aumentam ainda mais o risco para uma doença cardiovascular.

Por muitos anos acreditava-se que o TA era apenas capaz de estocar o excesso de energia em forma de triglicerídeos e liberá-lo como ácidos graxos. No entanto esse paradigma foi quebrado e já é amplamente aceito que o TA é um órgão endócrino

capaz de secretar vários hormônios e citocinas que contribuem no desenvolvimento da obesidade e outras patologias associadas como diabetes mellitus do tipo 2. Para exemplificar, atualmente são conhecidas mais de 100 substâncias produzida pelo TA (76). Os componentes do SRA estão entre essas substâncias secretadas pelo TA, e está intimamente ligado ao desenvolvimento da obesidade e suas co-morbidades.

O primeiro componente do SRA demonstrado no TA foi o Agt no fim da década de 1980, sua expressão é maior no TA visceral do que no TA subcutâneo tanto em roedores quanto em humanos (77, 78). Posteriormente, todos os outros componentes foram descobertos. A funcionalidade do SRA no tecido adiposo é ainda controversa e parece ser modelo específico, no entanto, sem dúvida o SRA contribui substancialmente na fisiologia do TA. Interessantemente, enquanto a Ang II via AT2 estimula a lipogênese e a adipogênese em roedores ela inibe a adipogênese via AT1 em humanos (79).

Ainda, o SRA além da sua produção e fisiologia local no TA, seus produtos podem ser liberados na circulação alterando a fisiologia sistêmica. Fato esse, que foi demonstrado elegantemente em estudo com camundongos nocautes para Agt no TA de camundongos transgênicos com aumento da expressão de Agt no TA, bem como seus respectivos tipos selvagens. Nesse estudo, os camundongos nocaute não apresentaram Agt circulante enquanto que seu respectivo transgênico apresentou um aumento entre 20-30% de Agt quando comparado com o selvagem, indicando que o TA é uma poderosa fonte de Agt circulante (80).

Muitos desses efeitos fisiológicos acima citados do SRA no TA, estão envolvidos na fisiopatologia da obesidade. A obesidade concomitantemente com o aumento do TA leva a um aumento da expressão do SRA tanto no TA quanto na circulação. Trabalhos com humanos demonstram que componentes sistêmicos do SRA, como: renina, Agt e ECA estão aumentados, e a perda de peso corporal reduz esses valores (78). Contudo, a linhagem Zucker apresenta diminuição da renina circulante ao mesmo tempo que o Agt não se modifica (81), o que mais uma vez sugere uma diferença na regulação do SRA dependente do modelo a ser estudado. A obesidade pode exercer também um efeito indireto no SRA além dos efeitos diretos acima discutidos. Como citado no tópico sobre obesidade, essa patologia desencadeia uma maior ativação simpática, que pode também aumentar a atividade do SRA em indivíduos obesos.

O sistema nervoso simpático (SNS) facilita a síntese e liberação de renina, (enzima primordial para a formação de Ang II), dado ao aumento da atividade nervosa simpática renal, ou seja, a hiperatividade simpática exacerba a produção de renina, e consequentemente, aumenta a atividade do SRA (82). Somando a esse fato, há evidências da existência de todos os componentes do SRA nos terminais nervosos simpáticos, o que sugere uma maior ativação simpática direta, através dos componentes do SRA. (83) Além disso, a Ang II pode interagir com os receptores AT1, presentes na região pré-sináptica do neurônio, facilitando a síntese e liberação de noradrenalina pelos terminais nervosos dos neurônios simpáticos e medula adrenal (84). Dessa forma, o SRA, parece exercer uma retroalimentação positiva no SNS, aumentando a liberação de noradrenalina sistêmica, que por sua vez aumenta a liberação de renina, criando um ciclo vicioso, onde um retroalimenta o outro, levando a exacerbação da atividade de ambos, assim, aumentando seus efeitos deletérios na obesidade.

Em conclusão, na presença da obesidade a existência de um SRA no TA desencadeia mecanismos patológicos que auxiliam no acúmulo de TA, somando-se a isso, o SRA também pode ser ativado indiretamente pelo SNS, exacerbando ainda mais a doença.

4.2.6 Sistema renina angiotensina e exercício físico

A maior necessidade de oxigênio das células musculares durante o exercício ocasionada por uma maior demanda energética eleva o débito cardíaco, além disso, uma redistribuição do fluxo sanguíneo do organismo é necessária, a qual é feita diminuindo o aporte sanguíneo para a região esplâncnica durante o exercício, para órgãos como fígado, rins, estômago entre outros, e aumentando para a musculatura esquelética exercitada. Para que se possa ter uma ideia da magnitude dessa redistribuição, enquanto que no repouso de 15 a 20% do débito cardíaco é direcionado para a musculatura, em exercícios intensos esse valor pode chegar até 85%. Essa redistribuição do fluxo é feita principalmente pelo SNS, que atua diretamente na musculatura lisa dos vasos viscerais causando vasoconstrição e, assim, diminuindo o fluxo para essas regiões (85).

O rim é um órgão visceral que tem uma particular importância ao ser influenciado por essa redistribuição, pois um fluxo renal diminuído é um dos estímulos

para a secreção da renina. Outro estímulo fundamental para esse órgão é o aumento da atividade nervosa simpática, que age diretamente aumentando a liberação de renina. Assim, o SNS, tanto com sua ação direta, quanto com seu efeito indireto pela vasoconstrição visceral, exerce um importante papel na liberação de renina e regulação do SRA (86). A liberação de renina durante o exercício causa uma vasoconstrição visceral que por sua vez contribui para uma redistribuição do fluxo sanguíneo, ainda, a renina auxilia na manutenção do volume plasmático (87, 88)

Além dos efeitos viscerais encontrados, o SRA também atua de forma aguda no controle da pressão arterial, fato esse comprovado em um estudo realizado por Warren e colaboradores que demonstraram que tanto a inibição da ECA quanto o bloqueio de AT1 são capazes de diminuir a pressão arterial média durante o exercício (89). Em adição a esses fatos, Stebbins e colaboradores usaram o tratamento com losartan em animais com exercício dinâmico na esteira e demonstraram diminuição na PA durante o exercício, além do mais, o tratamento causou uma queda na resistência dos vasos coronários, fato esse que levantou a hipótese de que a Ang II tenha um papel na redistribuição do fluxo coronário (87). Esses dados demonstram que além do SRA juntamente com o aumento do SNS desempenharem um papel importante no redirecionamento do fluxo sanguíneo para as regiões ativas durante o exercício como a musculatura esquelética, o SRA também controla a pressão arterial e o fluxo coronariano.

Outro efeito importante do SRA se dá pelo controle da temperatura corporal. Sabe-se que a Ang II exerce um importante papel na regulação da temperatura corporal agindo em seus receptores no sistema nervoso central. Tem sido demonstrado que sua principal função é de diminuir a taxa metabólica, gerar uma diminuição da temperatura corporal e um aumento da temperatura na pele (90). Frente a essa ação da Ang II, Leite e colaboradores injetaram losartan no sistema nervoso central de animais experimentais e verificaram seu efeito na termorregulação do exercício dinâmico. Neste estudo a injeção de losartan gerou um aumento da temperatura corporal maior durante o exercício em relação ao controle, isso devido a uma elevação da temperatura mais rápida e também uma menor dissipação do calor produzido (91). Esse achado sugere que a Ang II, exercendo seu efeito no receptor AT1, tem um importante papel na termorregulação modulado pelo sistema nervoso central durante o exercício físico dinâmico. Desta forma, o SRA apresenta uma grande relevância no desempenho da

atividade física, pois um prejuízo na regulação da temperatura corporal leva a um aumento da temperatura interna e um declínio na capacidade metabólica do organismo.

Como foi demonstrado, o SRA tem um importante papel no controle da homeostase frente a realização de um exercício agudo, contudo, pouco são os dados na literatura quando se trata de adaptações crônica do exercício aeróbio e o SRA. Dados com indivíduos bem treinados demonstram que os níveis de renina plasmática estão menores, quando comparado com sujeitos sedentários (92-94). Ainda, Hespel e colaboradores em um trabalho realizado com 27 homens sedentários, mostraram que a atividade da renina plasmática, bem como a concentração de Ang I e Ang II estão diminuídas, após quatro meses de treinamento, e apresentam uma correlação com o desempenho físico, apesar dos níveis do SRA não terem sido estatisticamente diferente (95). Além disso, os indivíduos que tiveram valores mais baixos para os componentes do SRA tiveram uma correlação positiva com o aumento da capacidade máxima de oxigênio, concluindo que a diminuição do SRA devido ao treinamento, exerce uma forte influência no aumento da capacidade máxima de oxigênio (95). Mais recentemente, esses achados vêm de encontro aos estudos realizados com polimorfismos do gene da ECA, que mostraram que indivíduos com genótipo II ou DI apresentam maior desempenho aeróbio. Além disso, a presença do genótipo II leva uma maior eficiência mecânica muscular esquelética em humano (96, 97).

Em resumo, no exercício físico agudo a ativação do SRA desempenha um papel importante no redirecionamento do fluxo sanguíneo para as regiões ativas durante o exercício como a musculatura esquelética. Por outro lado, no exercício físico realizado de forma crônica, ou seja, no indivíduo treinado, onde já ocorreram as adaptações cardiovasculares e esqueléticas decorrentes do treinamento físico, tais como a bradicardia de repouso, maior vascularização na musculatura esquelética e aumento do débito cardíaco, a distribuição do fluxo sanguíneo para a periferia é menos dependente do SRA. Entretanto, a interação entre exercício físico e SRA ainda é pouco conhecida, pouco se sabe dos efeitos do treinamento físico aeróbio na modulação do SRA cardíaco e circulante na obesidade, regulando principalmente o processo de hipertrofia cardíaca no obeso.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Amostragem

Foram estudados 21 ratos Zucker, proveniente do Biotério da Faculdade Paulista de Medicina. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Bioquímica da Atividade Motora da EEFÉ-USP em sala climatizada a 22º-24º C, em gaiolas com 4 animais em cada e ciclo claro-escuro invertido. Os animais foram divididos em quatro grupos: 1) grupo magro (GM); 2) grupo obeso (GO); 3) grupo magro treinado (GMTR); 4) grupo obeso treinado (GOTR). Os grupos 1 e 2 permaneceram sedentários ao longo do protocolo enquanto que os grupos 3 e 4 realizaram atividade física aeróbia de natação. Água e comida foram administradas “ad libitum”. Os ratos foram identificados e pesados semanalmente.

Todos os procedimentos cirúrgicos e protocolos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal (COBEA, 1991). O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética (nº 1023/07) em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

5.2 Treinamento dos animais

O treinamento de natação foi realizado segundo protocolo adaptado de Medeiros e colaboradores (98), em sistema de natação com água aquecida entre 30-32ºC (figura 1).

O treinamento teve duração de 10 semanas, sendo realizado 5 sessões semanais com aumento gradual do tempo, chegando a 60 minutos, e da sobrecarga de trabalho (peso na cauda do animal), até ser atingido 5% do peso corporal (tabela 1).

Este protocolo foi caracterizado como treinamento de baixa intensidade e longa duração, sendo efetivo na promoção de adaptações cardiovasculares e no aumento da capacidade oxidativa muscular (98).

Figura 1. Sistema de natação aquecido para ratos

Semanas	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a
1	15min. s/s	20min. s/s	40min. s/s	60min. 5% pc	60min. 5% pc
2	40min. 3% pc	50min. 4% pc	60min. 5% pc	60min. 5% pc	60min. 5% pc
3	40min. 5% pc	50min. 5% pc	60min. 5% pc	60min. 5% pc	60min. 5% pc
4 a 10	60min. 5% pc	60min. 5% pc	60min. 5% pc	60min. 5% pc	60min. 5% pc

Tabela 1. Protocolo de treinamento físico. A tabela demonstra o protocolo de natação, com o tempo de treinamento da 1 a 10 semana do protocolo, realizado de 2 a 6 feira. (s/s) = sem sobrecarga (pc) = peso corporal.

5.3 Testes de capacidade física

5.3.1 Medida do consumo de oxigênio

A medida do consumo de oxigênio em ratos consiste na utilização de uma caixa metabólica conectada a um analisador de gases capaz de fornecer a concentração de oxigênio no interior da mesma (99). Nesse estudo, foi utilizada uma caixa metabólica (9,5 x 32,5 x 11,5 cm) subdividida, internamente na sua porção superior (0,9 cm), por uma placa que possui 64 furos (0,3 cm de diâmetro) e que serve como uma câmara de mistura. A essa câmara foi conectado um tubo na forma de “Y” de onde parte da amostra foi retirada por uma bomba (FANEM, MOD. CAL) e, outra parte, com menor fluxo, foi retirada pela bomba do analisador de gases (Sable Systems Subsamplers Version 3, SS-3). A parte da frente da caixa possui uma abertura de 0,2 cm da

superfície que permite a entrada de um fluxo de ar unidirecional sugado pelas bombas aspiradoras. Para a realização da medida do consumo de oxigênio durante a realização do exercício físico, a caixa metabólica foi posicionada sobre uma esteira rolante.

5.3.2 Protocolo de exercício físico progressivo até a exaustão

Antes da realização da medida do consumo de oxigênio, os animais foram submetidos a um período de adaptação ao exercício que consiste na prática da corrida durante 10 minutos, utilizando velocidades variadas, por três dias alternados. Após essa etapa, os animais realizam um teste progressivo até a exaustão utilizando protocolo com velocidade inicial de 6m/min, sendo intensificado a cada 3 minutos com velocidade de mais 3 m/min até chegar o instante em que o animal não conseguir manter o padrão de corrida.

5.4 Medidas hemodinâmicas

5.4.1 Avaliação da pressão arterial

A pressão arterial foi aferida após o protocolo de treinamento pelo método não invasivo de pletismografia da artéria caudal (registro indireto da pressão). Os animais foram mantidos sob restrição de movimentos em caixa de acrílico e submetidos a aquecimento moderado, para promover vasodilatação da artéria caudal. O registro da pressão arterial de cauda foi realizado através da colocação de manguito de borracha na região proximal da cauda e ligado ao esfigmomanômetro para insuflar e desinsuflar gradualmente o manguito de 0 a 250/300 mmHg.

Numa porção mais distal da cauda foi acoplado um transdutor pneumático para detecção dos sinais de passagem da onda de pulso de pressão arterial na artéria caudal e registrado no sistema AT/CODAS (DataQ Instruments, Inc., Ohio, USA), com frequência de amostragem de 1000 Hz. A pressão arterial de cauda equivale a pressão do manguito, em que o pulso de pressão desaparece ou reaparece, quando a pressão exercida sobre a cauda tornar-se ligeiramente menor que o valor da pressão intra-arterial, desobstruindo o fluxo sanguíneo na artéria caudal e permitindo a detecção do pulso de pressão.

A frequência cardíaca foi calculada a partir do intervalo de tempo de cada pulso de pressão arterial detectado pelo transdutor sem a oclusão da passagem do fluxo

sanguíneo na cauda. Foram realizadas, para cada animal, cinco medidas de pressão arterial de cauda e frequência cardíaca em repouso, sendo desprezadas a primeira e a última medida e calculada a média aritmética entre os valores restantes.

5.4.2 Avaliação da função ventricular

A avaliação da função ventricular foi realizada por meio da avaliação ecocardiográfica. As medidas ecocardiográficas seguiram as recomendações do Comitê de Padronização do modo M da Sociedade Americana de Ecocardiografia (100). É importante salientar que a acurácia e reprodutibilidade do exame ecocardiográfico transtorácico em estimar o tamanho e a função do ventrículo esquerdo em roedores têm sido confirmada em uma série de estudos (101). O exame ecocardiográfico transtorácico foi realizado após o período de sedentarismo e treinamento físico em todos os grupos estudados. Os exames foram realizados por um único observador e em cada exame foi coletado um total de três medidas para cada variável, sendo calculadas posteriormente as médias dessas medidas. O exame ecocardiográfico foi realizado com os animais anestesiados, por via intraperitoneal, com uma mistura de Xilasina (0,67 mg/Kg) e Ketamine (0,33 mg/kg). O animal anestesiado foi colocado em decúbito lateral em uma mesa cirúrgica apropriada. Foi utilizando o equipamento Sonos 5500 (Philips, Andover, Mass) com transdutor de 5 a 12 MHz, que permite imagens com 2 ou 3 cm de profundidade. Para o registro das imagens foi utilizado o posicionamento de três eletrodos, permitindo a visualização do sinal eletrocardiográfico, para o registro da frequência cardíaca. Foram obtidas vistas longitudinais e transversais do para-esternal e vista apical da cavidade 2 e 4 do coração, para a avaliação do fluxo mitral e da velocidade da fração de ejeção do ventrículo esquerdo através do Doppler. As imagens foram armazenadas em fitas de videocassete ou em discos ópticos, para análise posterior.

5.4.3 Função sistólica do ventrículo esquerdo

O parâmetro foi determinado pela mudança da área fracional, que corresponde à diferença da área diastólica pela área sistólica, dividida pela área diastólica e multiplicada por 100, para representação em porcentagem em três regiões (basal, média e apical) e pela fração de ejeção utilizando o método de Simpson (102).

5.4.4 Função diastólica do ventrículo esquerdo

Este parâmetro foi analisado usando os valores derivados da curva de velocidade do enchimento na diástole pela fração de ejeção do ventrículo esquerdo realizado pelo Doppler. Outro parâmetro realizado no Doppler para avaliar a função diastólica foi o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV).

5.4.5 Massa do ventrículo esquerdo

A massa do ventrículo esquerdo (MVE) foi calculada segundo a orientação da Sociedade Americana de Ecocardiografia, que estima a MVE por meio da utilização da seguinte fórmula matemática $MVE = [(DDVE + SIP + PP)^3 - (DDVE)^3] \times 1,047$, onde (DDVE) é o diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, (SIP) é a parede inter septal, e (PP) é a parede posterior do ventrículo esquerdo e $1,047(\text{mg/mm}^3)$ corresponde a densidade do miocárdio.

5.4.6 Índice de performance miocárdica

O índice de performance miocárdica (IPM) foi calculado pela soma do tempo de contração isovolumétrico e o tempo de relaxamento isovolumétrico dividido pelo tempo de ejeção

5.5 Amostras de soro e tecidos

Ao final do protocolo os animais foram decapitados e o sangue coletado sem anticoagulante para dosagem da ECA, ECA-2, glicose, colesterol e triglicérides, e com EDTA 7,5% (50 $\mu\text{l/ml}$ de sangue) e inibidores de proteases (para-hidroximercuribenzoato (*p*-OHHgBz) 1mM; fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 1 mM; pepstatina A 1 mM; orto-fenantrolina 30 mM) para medida da concentração de Ang II plasmática. As amostras foram mantidas no gelo e rapidamente centrifugadas (3.000 rpm X 10 min) e mantidas a -20°C até as análises serem realizadas. O VE coletado foi rapidamente congelado em nitrogênio líquido e mantido congelado em freezer a -80°C até a realização das análises bioquímicas e moleculares.

5.6 Análises bioquímicas

5.6.1 Determinação da atividade da enzima conversora de angiotensina

A atividade da enzima foi determinada conforme descrito por Alves e colaboradores (103), em homogeneizados de coração (VE) na proporção de 1g tecido: 10 ml de tampão Tris-HCl 0.1 M contendo 50mM de NaCl, pH 7.0. O homogeneizado obtido foi centrifugado por 15 min a 12000 rpm a 4°C. Foram incubados 20 µl de amostra de tecido e 5 µl de soro com 180 µl ou 195 µl de tampão de incubação com o substrato fluorescente (Abz-FRK(Dnp) P-OH (Abz = ortho-aminobenzol; Dnp = dinitrophenil) 15µM em tampão Tris-HCl 0.1M contendo NaCl 50mM e 10 µM ZnCl₂, pH 7.0), num volume final de 200 µl. A atividade da enzima foi determinada de forma contínua em fluorímetro (λ_{em} = 420nm e λ_{ex} = 320nm), por 40 minutos. O tempo da leitura e a quantidade de proteína utilizados na reação foram escolhidos de modo a assegurar a linearidade da formação do produto. Todas as amostras foram ensaiadas em duplicata, sendo que a fluorescência intrínseca da amostra foi corrigida através de brancos onde a reação foi inibida por captopril 1 mM.

A atividade enzimática obtida foi normalizada pela proteína de cada amostra, determinada através do método de Bradford (104). A atividade da ECA tecidual foi expressa em UF/mg de proteína (1mU = nmol de Abz-FRK (Dnp) P-OH hidrolisados por minuto) e em UF/ml de soro.

5.6.2 Determinação da atividade da enzima conversora de angiotensina do tipo 2

A atividade da enzima foi determinada conforme descrito por Huang e colaboradores (105, 106), em homogeneizados de coração (VE) na proporção de 1g tecido: 10 ml de tampão Tris-HCl 0.1 M contendo 50mM de NaCl, pH 7.0. O homogeneizado obtido foi centrifugado por 15 min a 12000 rpm a 4°C. Foram incubados 10 µl de amostra de tecido com 90 µl de tampão de incubação (0,2mM NaCl, 50 mM Tris, 0,5mM ZnCl₂, PH 7,5) com 10µM do substrato fluorescente (7-methoxycoumarin-4-yl) acetyl-YVADAPK (2,4-dinitrophenyl)-OH (M2195, Sigma Aldrich). Em um volume final de 100 µl. A atividade da enzima foi determinada de forma contínua em fluorímetro (λ_{em} = 405nm e λ_{ex} = 340nm), por 3 horas. O tempo da leitura e a quantidade de proteína utilizados na reação foram escolhidos de modo a assegurar a linearidade da formação

do produto. Todas as amostras foram ensaiadas em duplicata, sendo que a fluorescência intrínseca da amostra foi corrigida através de brancos onde a reação foi inibida por DX 600 (1mM, inibidor de ECA-2, Phoenix Pharmaceutical), garantindo ausência de reação enzima/substrato. A atividade enzimática obtida foi normalizada pela proteína de cada amostra, determinada através do método de Bradford (104). A atividade da ECA-2 tecidual foi expressa em UF/mg de proteína.

5.6.3 Determinação da concentração de angiotensina II cardíaca

O VE foi homogeneizado com um tampão contendo (fosfato de sódio 0.1 M, sucrose 0.34 M, NaCl 0.3 M) juntamente com uma mistura de inibidores de proteases e centrifugado a 10 000 x g , 4°C, 10 min. O sobrenadante foi coletado e passado por uma coluna de extração de peptídeos (Sep-Pak C18 columns, Waters). A angiotensina absorvida foi eluída com metanol e secada numa centrifuga a vácuo. O precipitado foi ressuspensionado num tampão de ELISA (EIA), misturado e centrifugado a 3000 g for 10 minutos a 4°C. A concentração de Ang II foi determinada pelo método de ELISA, de acordo com as instruções (SPI-BIO). A concentração de proteínas de cada amostra foi determinada como descrito abaixo.

5.6.4 Determinação da concentração de proteínas teciduais

A concentração de proteínas de cada amostra foi determinada pelo método de Bradford, utilizando albumina bovina sérica como padrão. As leituras foram realizadas em microplacas em 595 nm (104).

5.7 Análises moleculares

5.7.1 Análise da expressão de proteínas por western blot

As amostras coletadas foram homogeneizadas em tampão de extração contendo (Tris- base 100 mM, SDS 10%, e os inibidores acima descritos). As amostras foram mantidas no gelo e rapidamente centrifugadas (3.000 rpm X 10 min) e mantidas a - 20°C. O sobrenadante foi utilizado para quantificar a concentração total de proteínas (107). Em seguida, cada amostra foi diluída em tampão Laemmli, na proporção de 1:4. Cada amostra contendo o Laemmli foi submetida a uma rotação (*spin*) de 30 segundos e o sobrenadante submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 8%)

no aparelho para minigel (*Mini-Protean*). Em cada gel foi aplicado como padrão um marcador de peso molecular com valores estabelecidos em: miosina (205-195 kDa), β -galactosidase (116 kDa), albumina bovina (80 kDa) e ovalbumina (49,5 kDa).

Immunoblotting: A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose utilizando-se um aparelho da *Bio-Rad* por aproximadamente 1h sob 120 volts. No tampão usado para realizar a transferência foi acrescentado SDS 0,1% para melhorar a eluição das proteínas de alto peso molecular. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi diminuída pela incubação destas com 10 ml de solução bloqueadora (leite desnatado Molico 5%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%) a 4°C *overnight* ou por 2h na temperatura ambiente. Estas membranas foram posteriormente incubadas com o anticorpo para, AT1 (1:1000), AT2 (1:2000) e ECA2 (1:1000) diluídos em solução bloqueadora (leite desnatado Molico 3%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%) e a 4°C *overnight*. Em seguida as mesmas foram lavadas três vezes, por dez minutos, com solução basal. As bandas existentes nas membranas incubadas foram visualizadas através do uso do Kit para detecção por quimioluminescência. O método de quimioluminescência consiste nos seguintes passos: após incubação da membrana com o anticorpo primário, a membrana foi novamente incubada por 1h com o anticorpo secundário marcado com peroxidase em solução bloqueadora (1:2000). Em seguida as membranas foram lavadas novamente três vezes com solução basal e incubadas com 1 ml de cada um dos dois reagentes do kit por 1 minuto, e a seguir os filmes de raio-X foram expostos às membranas. Para se medir a intensidade das bandas nas auto-radiografias, as figuras obtidas por escâner foram analisadas utilizando o programa de análise de densitometria óptica *Scion Image*, fornecido gratuitamente pela NIH (USA) via internet.

5.7.2 Determinação da expressão do gene da enzima conversora de angiotensina, da α e β miosina de cadeia pesada por reação de polimerase em cadeia em tempo real

A expressão dos genes da ECA e das isoformas de MCP no VE foram determinadas pela técnica de reação de polimerase em cadeia em tempo-real (real-time PCR) conforme descrito abaixo:

5.7.3 Extração do RNA total

Todo o procedimento foi realizado com a utilização de luvas, materiais e soluções autoclavadas reservadas para RNA, pela técnica de Chomczynski e Sacchi (108). As amostras de VE dos ratos foram mantidas no freezer -80°C. As amostras com aproximadamente 0,5 g, foram homogeneizadas em 5mL de TRIzol® Reagent (Invitrogen). A extração foi realizada conforme as instruções do fabricante. O TRIzol® Reagent, uma solução monofásica de fenol e guanidina isotilcianato corresponde a uma variação do método desenvolvido por Chomczynski e Sacchi. O RNA precipitado foi lavado com etanol 70% para eliminar resíduos de fenol e sal, e solubilizado em água tratada com DEPC. A concentração das amostras de RNA total foi determinada por espectrofotometria no comprimento de onda de 260nm. A integridade da amostra foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. O gel foi imerso em tampão TAE 1X e a eletroforese realizada a 100 Volts por aproximadamente 20 minutos. A qualidade das amostras foi avaliada pela análise da intensidade das bandas correspondentes às subunidades do RNA ribossomal 28S e 18S, onde a relação 28S/18S deverá ser aproximadamente 2. Amostras que apresentaram algum grau de degradação foram descartadas.

5.7.4 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foram utilizados 2 µg de RNA total, extraídos a partir de tecido cardíaco (VE) dos ratos. As amostras foram incubadas com 0,5 µg/mL de oligo dT12-18 a 65°C por 5 minutos, para se obter a primeira fita de cDNA. A transcrição reversa das amostras foi realizada em um volume total de 20 µL contendo 3U de RNAsin (PROMEGA, Madison, USA), 10 mM de dNTPs, 0,1 M de DTT, 1X tampão da enzima, e 2,5U de SuperScript Reverse Transcriptase II (Invitrogen, Brasil). Após incubação por 1 hora a 42°C, a temperatura foi elevada a 95°C por 5 minutos e as amostras rapidamente colocadas em gelo para desnaturação de híbridos RNA-cDNA formados e inativação da enzima utilizada na reação. O cDNA obtido foi estocado no freezer a -20°C até a realização da reação de RT-PCR.

5.7.5 Reação de polimerase em cadeia em tempo real

O real-time PCR foi feito pelo sistema da detecção do produto específico amplificado no equipamento ABI 7700 (Applied-Biosystems) na presença do composto fluorescente SYBR-Green I. A otimização da reação do real-time PCR foi feita conforme as instruções do fabricante (Applied-Biosystems, boletim do usuário nº2, aplicado ao protocolo SYBR-Green I), corrigido para volume final de 20 µl por reação. As condições de PCR foram padrão (protocolo do kit SYBR-Green I master mix) e todos os reagentes foram fornecidos pelo kit, inclusive a enzima polimerase AmpliTaq-Gold (Applied-Biosystems). Depois da otimização, os primers foram utilizados na concentração de 200 nM para a detecção e a quantificação relativa da expressão dos genes da ciclofilina (gene controle-interno). A expressão dos genes da ECA e das isoformas de MCP foram realizadas no ventrículo esquerdo dos ratos sedentários e treinados.

Gene	Sequência
Ciclofilina	F 5'AAT GCT GCA CCA AAC ACA AA3' R 5'CCT TCT TTC ACC TTC CCA AA 3'
β MCP	F 5' CAT CCC CAA TGA GAC GAA G 3' R 5' AGG CTC TTT CTG CTG GAC A 3'
α MCP	F 5' CGA GTC CCA GGT CAA CAA G 3' R 5' AGG CTC TTT CTG CTG GAC C 3'
ACE	F 5'CAG GAA CGT GGA ACT TGG A 3' R 5'CTT TGA CGC AAG CAT CAC C 3'

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados na construção dos primers para a reação em cadeia de polimerase em tempo real.

5.8 Análise estatística

Os dados foram representados em média $\pm$ EPM. Para a comparação entre os grupos utilizamos análise de variância (ANOVA de duas entradas) e teste de Bonferroni como *pos-hoc*. Foi adotado para todos os experimentos um $p \leq 0,05$ de significância.

6 RESULTADOS

6.1 Marcadores de treinamento físico aeróbio

Consumo de oxigênio de pico: Inicialmente, para mostrar que o protocolo de treinamento físico utilizado neste estudo foi efetivo, medimos o consumo de oxigênio de pico e a velocidade máxima de corrida dos animais, no final do período do treinamento físico. Ambos os grupos obesos tiveram um menor consumo de oxigênio pico, quando comparados com os grupos magros, entretanto, o grupo obeso treinado apresentou um aumento de 21% do consumo de oxigênio pico, quando comparado com o seu controle sedentário. Ainda, os grupos treinados atingiram uma velocidade maior quando comparados com os seus respectivos controles (GOTR=50%; GMTR=22%), o que sugere uma maior tolerância ao exercício (figura 2).

Frequência cardíaca: Outro dado que confirma a eficácia do treinamento é a bradicardia de repouso, verificamos que a frequência cardíaca de repouso apresentou uma diminuição de aproximadamente 12% para ambos os grupos treinados quando comparados com seus respectivos controles (figura 3).

Figura 2. Consumo de oxigênio de pico nos diferentes grupos. O consumo máximo de oxigênio após o período de treinamento físico foi realizado utilizando caixa metabólica conectada a um analisador de gases capaz de fornecer a concentração de oxigênio no interior da mesma. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM. para 5 ratos do grupo magro (GM), 5 ratos do grupo magro treinado (GMTR), 5 ratos do grupo obeso (GO), 5 ratos do grupo obeso treinado (GOTR). # $p < 0,05$ vs GO, GM e GMTR.

Figura 3. Frequência cardíaca após o período de treinamento físico. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM para 5 ratos do grupo magro (GM), 5 ratos do grupo magro treinado (GMTR), 5 ratos do grupo obeso (GO), 5 ratos do grupo obeso treinado (GOTR). * $p < 0,05$ vs GM, # $p < 0,05$ vs GO.

6.2 Medidas hemodinâmicas

Conforme discutido acima os grupos treinados apresentaram uma bradicardia de repouso, entretanto, em relação aos dados de pressão arterial sistólica (PAS) constatamos um aumento para ambos os grupos obesos conforme demonstrado na tabela 3.

Medidas Hemodinâmicas	GM	GMTR	GO	GOTR
FC (bpm)	437 $\pm$ 15	383 $\pm$ 11*	433 $\pm$ 21	383 $\pm$ 6#
PAS (mmHg)	115 $\pm$ 2	116 $\pm$ 1,1	124 $\pm$ 1,7*	127 $\pm$ 3,8*

Tabela 3. Efeitos da obesidade e do treinamento físico nas medidas hemodinâmicas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM para 5 ratos do grupo magro (GM), 5 ratos do grupo magro treinado (GMTR), 5 ratos do grupo obeso (GO), 5 ratos do grupo obeso treinado (GOTR). * $p < 0,05$ vs GM, # $p < 0,05$ vs GO.

6.3 Perfil metabólico

Uma vez que a obesidade está associada a alterações metabólicas e sabe-se que o TF aeróbio pode promover efeitos benéficos no metabolismo, analisamos o perfil metabólico dos animais, no final do protocolo de TF aeróbio.

A tabela 4 mostra os dados de glicose, triglicérides, colesterol total, HDL e LDL circulantes. Como citado anteriormente, o modelo Zucker de obesidade é um excelente modelo para o estudo de doenças cardiovasculares, pois, apresenta distúrbios

metabólicos. Por outro lado, o exercício parece ser uma interessante ferramenta no auxílio da redução de fatores como o colesterol e triglicérides (109). Neste modelo de obesidade não foi verificada diferença entre os grupos para as medidas de glicose, enquanto que os grupos obesos apresentaram o colesterol total aumentado. Ainda, os grupos obesos apresentaram um aumento dos triglicérides e do LDL, bem como uma diminuição do HDL, entretanto, o exercício aeróbio diminuiu os valores de triglicérides e de LDL e aumentou o HDL, quando comparado com o grupo obeso sedentário.

Medidas metabólicas	GM	GMTR	GO	GOTR
Glicose (mg/dl)	122,65±6,52	123,26±8,96	133,66±5,03	141,54±6,58
Triglicérides (mg/dl)	38,68±2,89	33,88±4,03	235,4±6,70*	135,54±25,50*#
Colesterol (mg/dl)	62,79±3,08	65,14±4,78	127,71±7,36*	129,14±8,77*
HDL (mg/dl)	43,33±3,02	44,33±8,84	26,24±4,04*	37,23±1,72#
LDL (mg/dl)	11,73±2,41	14,03±2,77	74,36±4,25*	44,84±7,40#

Tabela 4. Efeitos da obesidade e do treinamento físico nos parâmetros metabólicos. Os resultados estão expressos como média ± EPM. para 5 ratos do grupo magro (GM), 5 ratos do grupo magro treinado (GMTR), 5 ratos do grupo obeso (GO), 5 ratos do grupo obeso treinado (GOTR). HDL (lipoproteína de alta densidade), LDL (lipoproteína de baixa densidade). *p < 0,05 vs GM. #p < 0,05 vs GO.

6.4 Parâmetros corporais

A tabela 5 demonstra os valores de Peso corporal (PC) inicial e final, do delta peso, do ventrículo esquerdo (VE) dividido pela tíbia (T), e da gordura visceral (GV). Os grupos obesos apresentaram um peso inicial significativamente maior (GO +45%; GOTR +52%), em relação ao grupo GM, contudo, os grupos magros e obesos não foram diferentes entre si. O mesmo comportamento foi verificado em relação ao peso final, (GO +59%; GOTR +53%). Entretanto quando comparado as médias do ganho de peso final menos o inicial (delta peso), pode-se perceber que o grupo GO teve um aumento de 107% em relação ao grupo GM, e 145% em relação ao grupo GOTR, enquanto que o grupo GOTR não foi diferente dos grupos GM e GMTR, demonstrando que o TF aeróbio preveniu um ganho acentuado do peso corporal no grupo GOTR.

Em relação ao peso do VE em relação ao comprimento da (T), verificamos um aumento significativo para os grupos GO e GOTR respectivamente (+37%; +19%), quando comparado com o grupo GM, por outro lado, o grupo obeso treinado teve uma redução de 13% do peso VE quando comparado ao grupo obeso sedentário. Já a gordura visceral teve um aumento de 750% para o grupo GO e 580% para o grupo

GOTR comparado com o grupo GM, enquanto que o treinamento reduziu a GV em 20% em relação ao grupo GOTR

Medidas corporais	GM	GMTR	GO	GOTR
PCI (g)	349,06±23,83	342,64±27,58	507,1±39,23*	532,95±33,88*
PCF (g)	378,7±30,00	383,4±27,93	600,92±38,28*	580,75±44,54*
DP (g)	45,65±12,1	40,76±10,17	93,82±29,05	38,14±24,44#
Razão VE/T (mg/mm)	1,94±0,12	1,8±0,09	2,65±0,12*	2,31±0,1*#
GV (g)	10,76±0,97	9,92±1,30	85,00±6,06*	68,25±2,36*#

Tabela 5. Efeitos da obesidade e do treinamento físico nas medidas corporais. Os resultados estão expressos como média ± EPM. PCI (peso corporal inicial), PCF (peso corporal final), DP (delta ganho de peso), VE/T (ventrículo esquerdo/tíbia), GV (gordura visceral), GM (grupo magro), GMTR (grupo magro treinado), GO (grupo obeso), GOTR (grupo obeso treinado). *p < 0,05 vs GM #p < 0,05 vs GO.

6.5 Marcadores de hipertrofia cardíaca

Para constatar se a hipertrofia do VE estava relacionada com uma HC patológica, analisamos marcadores gênicos cardíaco pela técnica de reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR). Conforme demonstrado na (figura 4a, b e c) abaixo, a obesidade não alterou a expressão da α miosina de cadeia pesada (α MCP) enquanto que aumentou a expressão da β miosina de cadeia pesada (β MCP) acarretando em uma diminuição da relação α/β MCP, enquanto que o TF aeróbio reverteu parcialmente essa alteração.

Figura 4a. Expressão gênica do mRNA da α miosina de cadeia pesada no ventrículo esquerdo. Os dados estão expressos como média ± EPM para 5 ratos do grupo magro (GM), 5 ratos do grupo magro treinado (GMTR), 5 ratos do grupo obeso (GO), 5 ratos do grupo obeso treinado (GOTR).

Figura 4b. Expressão gênica do mRNA da β miosina de cadeia pesada no ventrículo esquerdo. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM para 5 ratos do grupo magro (GM), 5 ratos do grupo magro treinado (GMTR), 5 ratos do grupo obeso (GO), 5 ratos do grupo obeso treinado (GOTR). * $p < 0,05$ vs GM.

Figura 4c. Expressão gênica do mRNA da relação α/β miosina de cadeia pesada no ventrículo esquerdo. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM para 5 ratos do grupo magro (GM), 5 ratos do grupo magro treinado (GMTR), 5 ratos do grupo obeso (GO), 5 ratos do grupo obeso treinado (GOTR). * $p < 0,05$ vs GM.

6.6 Função cardíaca

As alterações cardíacas morfológicas (peso do VE) e moleculares (expressão gênica da MCP) observadas acima podem levar a alterações funcionais, dessa forma, analisamos a função cardíaca através do ecocardiograma para um melhor entendimento das alterações cardíacas.

Os dados apresentados na tabela 6 mostram as análises da função sistólica, pela fração de ejeção e de encurtamento do VE. Nenhum dos grupos apresentou

diferenças para ambas as medidas, o que demonstra que a obesidade não acarretou prejuízos sistólicos. Entretanto, quando avaliada a função diastólica, pelo tempo de relaxamento isovolumétrico e pela relação do pico de onda (E) e pico de onda (A), (relação E/A), constatamos que o grupo obeso sedentário apresentou uma redução dessa relação (-36%), quando comparado com o grupo GM, o que indica um prejuízo diastólico. Ainda, foi verificado que o grupo obeso treinado reverteu esse prejuízo não sendo mais diferente dos grupos GM e GMTR, indicando um efeito benéfico do treinamento físico. Em nosso estudo, também encontramos um aumento da massa do ventrículo esquerdo no grupo GO (+26%), esses dados vieram de encontro com as análises da razão do VE/T (+37%), confirmando a HC nesse modelo de obesidade. Outro resultado interessante obtido pelo ecocardiograma foi o aumento do índice de performance miocárdica (IPM) em ambos os grupos treinados, o que corrobora com os dados de bradicardia e consumo de oxigênio como marcadores de treinamento como mais um marcador de treinamento.

Função cardíaca	GM	GMTR	GO	GOTR
<u>Função sistólica</u>				
Fej (%)	0,83±0,03	0,78±0,08	0,88±0,02	0,84±0,03
Fen (%)	0,45±0,02	0,42±0,08	0,52±0,03	0,48±0,03
<u>Função diastólica</u>				
Relação E/A (m/s)	2,4±0,11	2,14±0,26	1,54±0,26*	2,2±0,62#
TRIV (ms)	22±2,45	29,40±9,13	28±4,64	29,50±3,46
MVE (g)	0,98±0,04	1,17±0,03*	1,24±0,07*	1,02±0,12#
IPM	0.32±0.007	0.45±0.03*	0.39±0.01	0.49±0.02#

Tabela 6. Efeitos da obesidade e do treinamento físico na função cardíaca. Os resultados estão expressos como média ± EPM. Fej (fração de ejeção do ventrículo esquerdo), Fen (fração de encurtamento do ventrículo esquerdo), TRIV (tempo de relaxamento isovolumétrico), MVE (massa do ventrículo esquerdo), IPM (índice de performance miocárdica). GM (grupo magro), GMTR (grupo magro treinado), GO (grupo obeso), GOTR (grupo obeso treinado). *p < 0,05 vs GM, #p < 0,05 vs GO.

6.7 Atividade da enzima conversora de angiotensina sistêmica e cardíaca

Em nosso estudo não foi observada nenhuma alteração na ECA circulante quando comparado os grupos (GM x GO), embora, em alguns trabalhos tenha sido

observado diminuição da renina plasmática em ratos Zucker obesos (110), que é o passo anterior na cascata de formação da Ang II. Por outro lado, foi encontrado um aumento da atividade da ECA circulante no grupo magro treinado GMTR e uma tendência ao aumento no grupo gordo treinado GOTR, sugerindo um efeito do treinamento aeróbio independente da obesidade (Figura 5a).

Já em relação a ECA cardíaca, interessantemente, vimos que o grupo GO apresentou um aumento de 39% da ECA cardíaca, quando comparado com o grupo GM. Ainda, os resultados mostram um efeito benéfico do treinamento que trouxe a atividade da ECA cardíaca próximo a valores do grupo magro sedentário. Esse aumento local da ECA sugere que existe uma regulação do SRA local independente do sistêmico na obesidade (Figura 5b).

Figura 5a. Atividade da enzima conversora de angiotensina no soro. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM para 5 ratos do grupo magro (GM), 5 ratos do grupo magro treinado (GMTR), 5 ratos do grupo obeso (GO), 5 ratos do grupo obeso treinado (GOTR). * $p < 0,05$ vs GM.

Figura 5b. Atividade da enzima conversora de angiotensina no ventrículo esquerdo. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM para 5 ratos do grupo magro (GM), 4 ratos do grupo magro treinado (GMTR), 5 ratos do grupo obeso (GO), 5 ratos do grupo obeso treinado (GOTR). * $p < 0,05$ vs GM e GOTR.

6.8 Expressão gênica da enzima conversora de angiotensina no ventrículo esquerdo

Para melhor entender o aumento da atividade da ECA cardíaca, analisamos sua expressão cardíaca gênica pelo método de PCR em tempo real. Os dados apresentados na figura 6a confirmam os resultados obtidos pela atividade da ECA cardíaca, além do mais, demonstram uma correlação entre os dados obtidos da expressão gênica e a atividade da ECA com um coeficiente de determinação de (0,61) e um $p < 0,001$ conforme demonstrado na figura 6b.

Figura 6a. Expressão gênica do mRNA da enzima conversora de angiotensina no ventrículo esquerdo. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM para 5 ratos do grupo magro (GM), 5 ratos do grupo magro treinado (GMTR), 5 ratos do grupo obeso (GO), 5 ratos do grupo obeso treinado (GOTR). * $p < 0,05$ vs GM, # $p < 0,05$ vs GO.

Figura 6b. Correlação do mRNA da enzima conversora de angiotensina cardíaca pela atividade da enzima conversora de angiotensina cardíaca.

6.9 Atividade da enzima conversora de angiotensina do tipo 2 no ventrículo esquerdo

Conforme demonstrado na figura 7a e b, o treinamento aeróbio aumentou tanto a atividade (GMTR +24%; GOTR +30%) quanto a concentração proteica por western blot (GMTR +67%; GOTR +46%) da ECA-2 para ambos os grupos, independentemente da obesidade o que sugere um efeito benéfico do treinamento sob a atividade da ECA-2 cardíaca, podendo contribuir na melhora funcional do coração do obeso. Em adição, encontramos em nossos resultados uma correlação significativa entre a atividade e a expressão gênica da ECA-2 com ($r^2=0,28$) com um valor de ($p<0,01$), como mostrado na Figura 7c. Esse aumento da ECA-2 pode aumentar a degradação da Ang II local cardíaca (vasoconstritor) e aumentar a formação da Ang (1-7) (vasodilatador). Assim, estes efeitos podem aumentar a circulação coronariana e contribuir na melhora da função cardíaca do animal obeso.

Figura 7a. Atividade da enzima conversora de angiotensina do tipo 2 no ventrículo esquerdo. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM para 5 ratos do grupo magro (GM), 4 ratos do grupo magro treinado (GMTR), 5 ratos do grupo obeso (GO), 5 ratos do grupo obeso treinado (GOTR). $p < 0,05$ vs GM. # $p < 0,05$ vs GO.

Figura 7b. Expressão proteica da enzima conversora de angiotensina do tipo 2 no ventrículo esquerdo. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM para 5 ratos do grupo magro (GM), 5 ratos do grupo magro treinado (GMTR), 5 ratos do grupo obeso (GO), 5 ratos do grupo obeso treinado (GOTR). * $p < 0,05$ vs GM. # $p < 0,05$ vs GO.

Figura 7c. Correlação da atividade da enzima conversora de angiotensina do tipo 2 no ventrículo esquerdo pela sua expressão proteica no ventrículo esquerdo.

6.10 Concentração de angiotensina II plasmática e no ventrículo esquerdo

As figuras 8a e b, mostram a concentração de Ang II no plasma e no VE respectivamente. Interessantemente, encontramos uma menor concentração de Ang II plasmática para ambos os grupos obesos. De fato, alguns estudos demonstram uma diminuição da atividade da renina plasmática enquanto que o Agt parece não estar alterado em ratos Zucker.

Já em relação a Ang II cardíaca, encontramos um aumento de 91% com a obesidade enquanto que o treinamento no grupo GOTR reverteu esse aumento. Esses

dados em conjunto com a atividade e expressão gênica da ECA demonstram que o SRA está aumentado no coração de ratos obesos e que o treinamento atua de forma benéfica na obesidade, trazendo tanto a ECA quanto a Ang II para valores semelhantes a normalidade.

Figura 8a. Concentração de angiotensina II plasmática. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM para 5 ratos do grupo magro (GM), 5 ratos do grupo magro treinado (GMTR), 5 ratos do grupo obeso (GO), 5 ratos do grupo obeso treinado (GOTR). *p < 0,05 vs GM.

Figura 8b. Concentração de angiotensina II no ventrículo esquerdo. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM para 5 ratos do grupo magro (GM), 5 ratos do grupo magro treinado (GMTR), 5 ratos do grupo obeso (GO), 5 ratos do grupo obeso treinado (GOTR). *p < 0,05 vs GM, #p < 0,05 vs GO.

6.11 Receptor de angiotensina II no ventrículo esquerdo do tipo 1 e do tipo 2

Os receptores de Ang II do tipo 1 (AT1), e do tipo 2 (AT2) são os principais receptores do SRA, entre seus efeitos temos o controle da massa cardíaca que se dá principalmente devido um aumento do tamanho do miócito ou do conteúdo de colágeno. Dessa forma, devido a importância desses receptores, analisamos a expressão proteica

de ambos pela técnica de Western blot. Em relação ao AT1, não foram encontradas diferenças significativas em nenhum dos grupos estudados (figura 9a). Por outro lado, encontramos em nosso estudo um aumento da expressão proteica dos receptores AT2 para o grupo obeso (GO +50%), enquanto que o grupo GOTR não diferiu do grupo GM, demonstrando um efeito do TF aeróbio sob esse receptor (Figura 9b).

Figura 9a. Expressão proteica do receptor de angiotensina do tipo 1 no ventrículo esquerdo. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM para 5 ratos do grupo magro (GM), 5 ratos do grupo magro treinado (GMTR), 5 ratos do grupo obeso (GO), 5 ratos do grupo obeso treinado (GOTR).

Figura 9b. Expressão proteica do receptor de angiotensina do tipo 2 no ventrículo esquerdo. Os dados estão expressos como média $\pm$ EPM para 5 ratos do grupo magro (GM), 5 ratos do grupo magro treinado (GMTR), 5 ratos do grupo obeso (GO), 5 ratos do grupo obeso treinado (GOTR). $p < 0,05$ vs GM. # $p < 0,05$ vs GO.

7 DISCUSSÃO

A obesidade é uma doença crônica que tem como consequência várias patologias associadas, sendo o coração um dos principais órgãos afetados por ela. Dentre os problemas cardíacos gerados pela obesidade temos a hipertrofia e a disfunção cardíaca. Os mecanismos responsáveis por essas alterações são complexos e ainda não foram completamente elucidados e envolvem alterações endócrinas, metabólicas e do sistema nervoso central.

Em nosso estudo demonstramos pela primeira vez que a obesidade altera a regulação de alguns dos componentes do SRA sistêmico e cardíaco e de forma independente um do outro, ainda, vimos que o treinamento físico aeróbico atua de forma benéfica nos componentes do SRA, revertendo as alterações causadas pela obesidade demonstrando ser uma importante estratégia no combate de doenças cardíacas relacionadas a obesidade.

7.1 Marcadores de treinamento físico aeróbico

Tanto o consumo de oxigênio máximo quanto a FC de repouso são medidas que indicam o nível de condicionamento aeróbico e também servem como marcadores de treinamento, além disso, são parâmetros que estão diretamente associados a taxa de mortalidade e a doenças cardiovasculares em pacientes obesos (111, 112). Nesse sentido o TF aeróbico de natação é uma interessante estratégia para melhorar a qualidade de vida do obeso melhorando sua condição física através de um aumento do consumo de oxigênio e reduzindo sua FC de repouso.

Tanto a bradicardia de repouso como o aumento do consumo de oxigênio de pico já são adaptações fisiológicas bem conhecidas com o treinamento aeróbico. (113, 114). A bradicardia pode ocorrer por três principais mecanismos: aumento do tônus vagal cardíaco, diminuição do tônus simpático cardíaco e alteração na atividade do nodo sino atrial. No entanto, os mecanismos responsáveis pela queda da FC em repouso parecem estar relacionados ao tipo e intensidade de treinamento, e a existência de alguma patologia associada. Ratos treinados em natação têm uma bradicardia de repouso devido a um aumento do tônus vagal cardíaco (98), enquanto que em ratos hipertensos a diminuição da FC em repouso ocorre por uma redução do tônus simpático cardíaco ocasionado pela hipertensão (115). Dessa forma, parece que

em situações patológicas, o exercício atua corrigindo a disfunção adquirida pela doença.

A obesidade, semelhante a hipertensão também leva a um aumento do tônus simpático, e esse aumento pode ser reduzido pelo exercício aeróbio (49), o que poderia levar a uma diminuição da FC cardíaca em repouso em obesos, podendo em parte explicar a queda da FC de repouso no nosso grupo obeso treinado.

Portanto, juntando os dados acima expostos, sugere-se que a redução da FC de repouso em nosso grupo obeso tenha sido tanto por uma alteração no tônus simpático como ocorre em casos patológicos quanto por uma alteração do tônus vagal devido ao treinamento de natação, enquanto que para o grupo magro possivelmente ocorreu uma alteração apenas no tônus vagal.

Já o aumento do consumo de oxigênio de pico com o treinamento aeróbio ocorre devido a vários fatores como: aumento da capilarização, aumento da diferença arteriovenosa e aumento do débito cardíaco durante o exercício.

Demonstramos em nosso estudo que ambos os grupos obesos quando comparados com os grupos magros, obtiveram um menor consumo de oxigênio de pico e que embora se tenha visto um aumento do consumo no grupo magro treinado, apenas o grupo obeso treinado apresentou uma diferença significativa nesse parâmetro.

Em termos absolutos, a obesidade geralmente leva a um aumento do consumo de oxigênio tanto em repouso quanto durante a realização de um exercício (116). Contudo, devido ao fato de o TA possuir um metabolismo menor quando comparado com outros tecidos, o obeso apresenta um consumo menor quando relativizado pela sua massa corporal (116). Em adição, indivíduos obesos apresentam um aumento acentuado do consumo de oxigênio com o exercício devido a alta demanda metabólica exigida durante a atividade física (116), o que justifica nosso aumento acentuado do consumo no grupo obeso treinado.

Em conclusão, nossos resultados comprovam a eficácia do nosso protocolo de treinamento e demonstram um efeito benéfico do exercício, uma vez que estudos correlacionam a FC de repouso e o consumo máximo de oxigênio com doenças cardiovasculares e a taxa de mortalidade.

7.2 Medidas hemodinâmicas

Ambos os grupos obesos em nosso projeto apresentaram um aumento da PAS, no entanto, segundo as Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, para que um indivíduo seja considerado hipertenso ele deve possuir uma PAS ≥ 140 mmHg, indicando que de acordo com as diretrizes, nossos grupos obesos embora estatisticamente diferentes dos grupos magros não se enquadram como hipertensos. Além disso, não existe um consenso na literatura no que diz respeito ao aumento da PAS no modelo de obesidade Zucker, alguns autores encontraram aumentos moderados de PAS (21) enquanto que, outros não detectaram diferenças (22), essas controvérsias surgem devido a diferenças nos tipos de medidas realizadas e idades dos animais.

Vimos também, que o treinamento não levou a alterações da PAS em nosso estudo. Embora, esse tenha sido um dado inesperado em nosso protocolo, alguns autores demonstram que o treinamento físico aeróbio possui efeito hipotensor mais acentuado em casos que já se possui uma hipertensão pré-estabelecida (117), o que poderia justificar a ausência de alterações nos grupos obesos, uma vez que acreditamos que os mesmos não possuem um quadro hipertensivo.

7.3 Perfil metabólico

A obesidade, tanto em humanos quanto em animais, ocasiona distúrbios metabólicos advindos do excesso de tecido adiposo como hiperinsulinemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia (118). O modelo Zucker de obesidade é bem caracterizado na literatura como um animal que possui diversas alterações metabólicas, como as acima citadas (21, 22). Com o intuito de comparar e confirmar nosso modelo de obesidade com os dados da literatura, e uma vez que se sabe que a obesidade está associada a alterações metabólicas e que o treinamento físico pode promover efeitos benéficos sob o metabolismo, analisamos o perfil metabólico dos animais, no final do protocolo de treinamento físico.

O rato Zucker, é um modelo de obesidade que não apresenta diabetes mellitus franca, entretanto, esse modelo geralmente apresenta um aumento na insulina circulante com ausência de alterações da glicemia (119), o que caracteriza um quadro de resistência a insulina. Semelhante a literatura, não encontramos diferença nos níveis de glicose plasmática em nenhum dos grupos estudados, entretanto não podemos

descartar uma possível resistência a insulina no grupo obeso uma vez que a insulina não foi mensurada.

Por outro lado, vimos um aumento dos triglicérides para o grupo obeso, enquanto que o grupo GOTR apresentou uma queda dos mesmos quando comparado com o grupo GO. Os triglicérides são moléculas de lipídios estocadas principalmente nas células de gordura, sendo comum encontrar um aumento dessas moléculas circulantes em obesos (120), devido ao grande acúmulo de TA na obesidade. A taxa de acúmulo dos triglicérides é regulada por enzimas (hormônio lipase sensível, lipase lipoproteica e a monoacilglicerolipase), que auxiliam na sua degradação (121). Diferentemente, o treinamento aeróbio além de auxiliar na diminuição do peso corporal, que por sua vez diminui a quantidade de células adiposas, aumenta a atividade das enzimas acima citadas (47). Ainda, o exercício moderado utiliza dos triglicérides intramuscular, e circulante como substrato energético (122, 123), contribuindo para uma menor taxa de acúmulo de triglicérides justificando a diminuição do triglicérides circulante encontrado no grupo obeso treinado.

Além dos triglicérides, temos outras moléculas proteicas de características lipídicas como o colesterol e suas frações (LDL e HDL). Ambos os grupos obesos em nosso estudo apresentaram um aumento do colesterol total. De fato, alguns estudos com o treinamento aeróbio demonstram que se o treinamento não estiver acompanhado de uma dieta alimentar ou perda de peso os níveis de colesterol total não se alteram (124). Nosso grupo GOTR apresentou um ganho de peso atenuado em relação ao grupo obeso, porém, não vimos uma perda de peso, além disso, nenhuma modificação foi feita na dieta dos grupos o que poderia explicar a ausência de diminuição do colesterol total em nosso modelo. Inversamente, vários estudos tem demonstrado que o treinamento aeróbio possui um efeito independente da dieta no aumento do HDL e na diminuição do LDL (125-128), como observado em nosso grupo GOTR. Esse aumento do HDL e diminuição do LDL no grupo GOTR são de grande importância, pois diminui a deposição de moléculas de colesterol nas paredes dos vasos, que por sua vez leva a um melhor prognóstico para doenças cardíacas.

Em conclusão, os dados metabólicos de nosso estudo vêm de encontro com a literatura e confirmam que nosso modelo experimental de obesidade possui alterações metabólicas. Além disso, o grupo obeso treinado apresentou uma redução significativa dos triglicérides bem como alteração no perfil das frações do colesterol demonstrando

um efeito benéfico do treinamento em reverter os danos metabólicos causados pela obesidade.

7.4 Parâmetros corporais

O aumento do peso bem como da gordura corporal levam a um fenótipo de obesidade e são excelentes parâmetros para determinar o desenvolvimento da obesidade. Por outro lado, o exercício aeróbio é uma ótima ferramenta no combate do ganho de peso e gordura corporal, ocasionando um maior gasto energético diário trazendo benefícios na queima de gordura (45). Além disso, o exercício aumenta a atividade simpática para o TA branco, dessa forma aumentando seu metabolismo (129).

O exercício também atua na prevenção da perda de massa magra (44), esse efeito é muito importante, pois, previne a queda do metabolismo de repouso com a perda de peso, auxiliando em uma manutenção de peso após sua perda. Contudo, dados na literatura demonstram que o exercício por si só não possui efeito pronunciado na perda de peso corporal, é necessário que se faça uma dieta alimentar em conjunto (130). Walberg e colaboradores, corroboram com os estudos acima citados, demonstraram que o treinamento de natação por si só apenas previne um ganho acentuado do peso e da gordura corporal, enquanto que a associação com a dieta foi mais eficiente na redução desses parâmetros em ratos Zucker obesos (131). Em nosso protocolo não adotamos dieta alimentar o que pode ter contribuído na ausência da perda de peso, entretanto, vimos que o treinamento foi eficaz em prevenir o ganho acentuado de peso e de gordura corporal, dados esses que estão de acordo com a literatura.

Portanto, os dados de peso corporal demonstraram que o modelo genético Zucker possui alterações significativas no peso corporal, levando a um fenótipo de obesidade, sendo um modelo interessante para se estudar a fisiopatologia da obesidade. Podemos também constatar que o aumento do peso corporal foi devido ao acúmulo do TA, sobretudo na região visceral. Ainda, vimos que o treinamento físico aeróbio foi uma ferramenta terapêutica eficaz na prevenção do ganho de peso corporal, atuando na redução do TA visceral.

7.5 Marcadores de hipertrofia cardíaca

Como demonstrado em nossos resultados, a obesidade levou a um aumento da massa do VE tanto pelo peso do VE corrigido pela tíbia quanto pelo ecocardiograma. Entretanto, esses parâmetros não deixam claro quanto ao tipo de hipertrofia desenvolvida. Dessa forma, com o intuito de melhor entender o aumento da massa cardíaca, analisamos a expressão de dois marcadores de HC. Foi constatado em nosso estudo que a obesidade levou a uma diminuição da relação α/β MCP, essa alteração foi em virtude de um aumento da expressão da β MCP.

Sabe-se que alguns aspectos relacionados com a resposta hipertrófica patológica são semelhantes às etapas do desenvolvimento do coração durante o período fetal ou perinatal, sendo, por isso, denominadas de “reprogramação fetal”. Em animais experimentais com HC patológica são observados padrões de expressão gênica característicos do período fetal, como o aparecimento da α -actina esquelética e do fator natriurético atrial (ANF). Além da re-expressão da alfa actina esquelética (α -actina) ocorre também mudança na expressão de beta miosina de cadeia pesada (β -MCP) (132).

No coração humano há maior expressão de β -MCP do que de α -MCP (132). Já em ratos, ocorre o inverso, maior expressão de α -MCP que de β -MCP (132). Na hipertrofia cardíaca patológica, em ratos, ocorre uma alteração no padrão de expressão com aumento da expressão da β -MCP (132). Mais especificamente em ratos Zucker obesos, encontra-se um aumento da expressão da β -MCP sem alterações da α -MCP (133), sendo consistente com os nossos resultados. Estas alterações na composição das proteínas contráteis do coração determina alterações na capacidade contrátil do miocárdio, o que pode levar à diminuição na velocidade de encurtamento dos sarcômeros observada no miocárdio hipertrofiado (134, 135).

Em conclusão, os presentes dados sugerem que a obesidade nesse modelo levou ao desenvolvimento de um fenótipo cardíaco patológico, enquanto que o exercício preveniu essas alterações moleculares, as quais podem levar a alterações estruturais e funcionais cardíacas. Desta forma, estas alterações moleculares podem estar relacionadas com a HC e a disfunção ventricular observada no grupo obeso, a qual foi prevenida pelo TF.

7.6 Hipertrofia e função cardíaca

A obesidade está associada a alterações cardíacas tanto em humanos quanto em modelos de animais. Dentre as principais alterações temos o aumento da massa ventricular, da câmara atrial, prejuízos sub-clínicos das funções diastólica e sistólica (30). A obesidade leva a uma hipertrofia ventricular independente de outros fatores de risco acarretando em um pior prognóstico, o que pode levar ao desenvolvimento de uma insuficiência cardíaca (32, 136). A hipertrofia cardíaca tem sido observada na maioria dos modelos animais, entretanto, parecem existir algumas diferenças em relação à idade, tempo de dieta e espécie. Alguns autores demonstraram que 14 semanas de dieta em ratos Sprague-Dawley não altera a massa ventricular, enquanto que sete semanas de ração hiperlipídica para ratos Wistar foi suficiente para gerar uma hipertrofia ventricular (26, 28). Em estudos com ratos Zucker obesos tem se observado um aumento da massa cardíaca, quando comparado com o seu controle magro (74). Em nosso modelo também encontramos um aumento da massa cardíaca tanto pelo peso do VE quanto pela massa medida por ecocardiograma, além disso, como discutido acima, vimos uma alteração da expressão das isoformas de MCP. Essas alterações possivelmente contribuíram no desenvolvimento da disfunção diastólica encontrada em nosso grupo obeso sedentário.

A disfunção diastólica é um quadro muito observado na obesidade, sua causa pode ser multifatorial, entretanto alguns autores sugerem que o acúmulo de lipídios cardíaco pode ser sua principal causa (137, 138). O acúmulo de fibrose pode ser outra causa de prejuízos na função cardíaca, dados com ratos Zucker obesos demonstram aumento da fibrose cardíaca bem como um aumento de lipídios (73, 139). Tanto a fibrose quanto o aumento de lipídios cardíaco estão correlacionados com o SRA, uma vez que estudos que fizeram o uso de bloqueadores do sistema demonstram uma diminuição desses parâmetros (73).

Em nosso estudo, não utilizamos bloqueadores do SRA, entretanto, vimos que o exercício reduziu vários dos componentes do SRA o que pode ter contribuído para uma melhora da função diastólica encontrada em nosso grupo GOTR. É também possível que a diminuição da massa cardíaca observada nesse grupo tenha contribuído para uma melhora na função, pois, essa redução da massa cardíaca pode ter sido devido a uma redução da gordura ou fibrose cardíaca muito encontrada nesse modelo de obesidade.

7.7 Componentes do sistema renina angiotensina sistêmico

Como já observado por vários estudos, o SRA está presente em vários tecidos, dentre eles, o cardíaco. Em adição, o SRA local pode ser regulado de maneira independente do sistêmico. Nesse sentido, com o objetivo de melhor entender a regulação do SRA sistêmico e sua influência no SRA cardíaco, medimos a ECA que é uma enzima chave na formação de Ang II, e a Ang II que é o principal peptídeo do sistema.

Os estudos que mediram a atividade da ECA circulante na obesidade são em sua maioria com humanos. A obesidade em humanos está na maioria dos casos associada com o aumento da atividade da ECA bem como da atividade da renina e da concentração de Agt (140-142). Entretanto, quando se trata de modelo animal, parece existir algumas controvérsias quanto a regulação dos componentes do SRA. Alguns estudos encontram alterações (81), outros não (143). Por outro lado, estudos com o modelo de obesidade Zucker observaram uma diminuição da atividade da renina plasmática, enquanto que o Agt não se modifica (81, 110, 144, 145), essa baixa atividade da renina juntamente com a ausência de alterações para o Agt talvez expliquem a ausência de modificações da atividade da ECA em ambos os grupos obesos em nosso trabalho. Até o presente momento desconhecemos trabalhos com Zucker que tenham mensurado a atividade da ECA no soro, contudo, o fato da ECA sistêmica não estar alterada não descarta a hipótese de outros componentes do sistema estarem modificados, uma vez que existem outras vias de formação da Ang II independente da ECA (146, 147)

Contudo, embora a ECA não tenha apresentado diferença, encontramos para ambos os grupos obesos uma menor concentração de Ang II circulante. Nós não sabemos os mecanismos que levaram a uma queda da Ang II sem uma modificação da ECA. Uma possível explicação pode estar relacionada aos baixos níveis de atividade da renina plasmática constatado nesse modelo de obesidade (81, 110, 144, 145). Sabe-se também que ratos obesos possuem altos níveis de Ang II no tecido adiposo, o que poderia ser um possível mecanismo para uma diminuição da Ang II circulante (148). Por último, Stepp e colaboradores (149), observaram que ratos Zucker obesos possuem uma maior sensibilidade vascular a Ang II, o que poderia contribuir para uma menor concentração de Ang II circulante em nosso estudo.

7.8 Componentes do sistema renina angiotensina cardíaco

Conforme citado anteriormente, o SRA cardíaco pode ser regulado independente do circulante, e o aumento de alguns de seus componentes pode ser deletério ao coração. Existem evidências da participação da ECA em modelos de obesidade, tanto experimental quanto clínico, que demonstram que a inibição da ECA pode diminuir a massa cardíaca, além disso, ratos Zucker obesos apresentam uma melhora do metabolismo de glicose com inibidores de ECA (74). Outro benefício encontrado em ratos Zucker obesos com inibidores de ECA foi uma melhora na densidade capilar cardíaca. Tem-se sugerido que um dos principais mecanismos pelo qual a ECA prejudica a formação de novos vasos é pela degradação da bradicinina. A bradicinina atua principalmente na formação de vasos via VEGF. De fato, esse estudo demonstrou aumento de VEGF quando a ECA foi inibida por perindropil (75).

Além disso, um recente estudo que mediu a atividade da ECA cardíaca em ratos Zucker obesos constatou um aumento da sua atividade quando comparado com o grupo magro, dados esse que estão em concordância com o aumento da atividade da ECA cardíaca encontrado em nosso grupo obeso sedentário (150). Esses achados confirmam os estudos anteriores com o uso de inibidores da ECA e ajudam na elucidação da regulação do sistema (73).

O aumento da ECA cardíaca foi reduzido pelo treinamento aeróbio como demonstrado no grupo GOTR. Até o momento desconhecemos estudos com o SRA cardíaco em obesos treinados. Pesquisas com outras patologias cardíacas como a insuficiência cardíaca demonstram uma diminuição da atividade da ECA com o exercício, com uma conseqüente melhora do quadro patológico (151). Corroborando com esses dados, um recente estudo em nosso laboratório demonstrou que o treinamento de natação reduziu os níveis de ECA e Ang II cardíaca em ratos Wistar saudáveis. Portanto, parece que o exercício atua sob o SRA cardíaco tanto em condições normais quanto em situações patológicas em que a ECA está aumentada, dessa forma sendo benéfico ao coração.

Além disso, observamos que o treinamento também reverteu os aumentos de concentração de Ang II e expressão proteica de AT2 cardíaco ocasionado pela obesidade em nosso grupo sedentário. Os receptores AT2 são principalmente expresso no desenvolvimento fetal, no entanto, esses também podem aumentar sua expressão em algumas patologias na fase adulta para contrabalancear os efeitos deletérios do

AT1. Interessantemente, parece que o aumento da sua expressão é tecido e modelo dependente. Estudos com modelos de animais obesos demonstram o aumento da expressão do AT2 em alguns tecidos como o tecido adiposo e renal. Recentes evidências demonstram a participação do AT2 tanto na diferenciação de adipócitos quanto na hipertrofia do tecido adiposo em obesos. Em adição modelo de camundongos nocaute para o receptor AT2 apresentaram uma diminuição do tecido adiposo e da lipogênese, quando comparado com seus respectivos controles (152). Em ratos Zucker obesos, modelo semelhante ao nosso, foi encontrado um aumento da expressão de receptores AT2 renal, e o bloqueio desse receptor com um antagonista específico gerou um aumento da pressão arterial sistêmica sugerindo a participação do AT2 no controle da pressão arterial nesse modelo (153).

No que diz respeito aos efeitos dos receptores AT2 especificamente no coração, alguns estudos demonstram um aumento da expressão de AT2 em patologias como insuficiência cardíaca e HC. Sugere-se que esse aumento do AT2 em casos de HC seja para estimular vias apoptóticas na tentativa de contrabalancear os efeitos deletérios do AT1(154). No entanto, existem algumas controvérsias em relação ao AT2 quando se trata de hipertrofia cardíaca. Estudos sugerem que o AT2 estimula, inibe ou não altera a HC. Interessantemente, em um recente estudo, foi demonstrado que não só o AT2 participa da HC, mas que também essa hipertrofia via AT2 é independente de Ang II, sugerindo um papel constitutivo do AT2 no desenvolvimento da HC (66). Além disso, já está bem estabelecido na literatura que ratos Zucker obesos possuem alterações metabólicas no coração que por sua vez leva a um aumento da apoptose cardíaca independente da HC (155).

Nesse sentido, esses resultados sugerem que o aumento do AT2 em nosso modelo pode ter ocorrido por três principais motivos: contrabalancear os efeitos deletérios do aumento da ECA e da Ang II promover HC e aumentar a sinalização apoptótica.

Finalmente, vimos que além dos efeitos benéficos do treinamento aeróbio em reverter a ECA a Ang II e o AT2, nosso protocolo de natação levou a um aumento da ECA-2 nos grupos treinados tanto obeso quanto o magro, sugerindo um efeito do exercício por si só em aumentar a ECA-2.

A ECA-2 é uma metaloprotease de 805 aminoácidos que apresenta homologia considerável com a ECA. Atua, porém, como uma carboxipeptidase e não como uma

dipeptidilcarboxipeptidase à semelhança da ECA, exibindo atividades bioquímicas muito distintas da ECA, convertendo a Ang I em Ang 1-9 (156), que pode ser convertida pela ECA em Ang 1-7. Outra ação da ECA-2 é a hidrólise da Ang II, com remoção de um aminoácido, produzindo, a partir daí, a Ang 1-7 (62).

A ação catalítica da ECA-2 tem eficiência aproximadamente 500 vezes maior quando o substrato é a Ang II, em comparação à sua ação sobre a Ang I. Além disso, a ECA-2 é 10 a 600 vezes mais eficiente que a prolil endopeptidase e a prolil-carboxipeptidase, respectivamente, para gerar Ang (1-7) a partir da Ang II (157).

Este novo capítulo da história do SRA, claramente configura um segundo braço do SRA, do qual emergem a ECA-2 e a Ang (1-7). A ECA-2, por gerar um vasodilatador, que é a Ang (1-7), e por hidrolisar a Ang II contrabalanceia os efeitos vasopressores da ECA1 mediados pela Ang II.

Portanto, fica claro que o aumento da ECA-2 com o treinamento leva a uma atenuação dos efeitos deletérios da obesidade, uma vez que a ECA-2 contrabalanceia os efeitos da Ang II desta forma pode aumentar a degradação da Ang II local cardíaca (vasoconstritor) e aumentar a formação da Ang (1-7) (vasodilatador). Assim, estes efeitos podem aumentar a circulação coronariana e contribuir na melhora da função cardíaca do animal obeso.

8 CONCLUSÕES

Em conclusão, primeiramente, nossos dados demonstram que a obesidade levou a um quadro de prejuízos metabólicos, que foram acompanhados de uma HC patológica e disfunção cardíaca, bem como o aumento de alguns dos componentes do SRA. Ainda, vimos que o aumento do SRA foi independente do sistêmico, uma vez que os resultados foram opostos.

Por último, vimos que o treinamento aeróbio de natação reverteu os prejuízos metabólicos, e cardíacos ocasionados pela obesidade. Em adição, nosso protocolo de exercício reverteu o aumento da ECA, Ang II e do AT2 bem como aumentou a ECA-2 cardíaca. Esses dados demonstram que o exercício cronicamente é uma terapêutica interessante no combate as alterações metabólicas e moleculares cardíacas causadas pela obesidade.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser. 2000;894:i-xii, 1-253.
2. Huxley R, Mendis S, Zheleznyakov E, Reddy S, Chan J. Body mass index, waist circumference and waist:hip ratio as predictors of cardiovascular risk-a review of the literature. *Eur J Clin Nutr*. 2009 Aug 5.
3. Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA*. 2006 Apr 5;295(13):1549-55.
4. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Johnson CL. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *Jama*. 2002 Oct 9;288(14):1723-7.
5. Deitel M. Overweight and obesity worldwide now estimated to involve 1.7 billion people. *Obes Surg*. 2003 Jun;13(3):329-30.
6. Abrantes MM, Lamounier JA, Colosimo EA. [Overweight and obesity prevalence in Northeast and Southeast Regions of Brazil]. *Rev Assoc Med Bras*. 2003 Apr-Jun;49(2):162-6.
7. Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes (Lond)*. 2008 Sep;32(9):1431-7.
8. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*. 1997 Jun 26;387(6636):903-8.
9. Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet*. 1998 Jun;19(2):155-7.
10. Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG, O'Rahilly S. A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet*. 1998 Oct;20(2):111-2.
11. Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ, et al. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet*. 1996 May;13(1):18-9.
12. Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, et al. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)*. 2006 Apr;14(4):529-644.
13. Sweeney G. Leptin signalling. *Cell Signal*. 2002 Aug;14(8):655-63.
14. Booth FW, Chakravarthy MV, Spangenburg EE. Exercise and gene expression: physiological regulation of the human genome through physical activity. *J Physiol*. 2002 Sep 1;543(Pt 2):399-411.

15. Ravussin E, Valencia ME, Esparza J, Bennett PH, Schulz LO. Effects of a traditional lifestyle on obesity in Pima Indians. *Diabetes Care*. 1994 Sep;17(9):1067-74.
16. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994 Dec 1;372(6505):425-32.
17. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995 Dec 29;83(7):1263-71.
18. Mantzoros CS, Frederich RC, Qu D, Lowell BB, Maratos-Flier E, Flier JS. Severe leptin resistance in brown fat-deficient uncoupling protein promoter-driven diphtheria toxin A mice despite suppression of hypothalamic neuropeptide Y and circulating corticosterone concentrations. *Diabetes*. 1998 Feb;47(2):230-8.
19. Zucker TF, Zucker LM. Fat accretion and growth in the rat. *J Nutr*. 1963 May;80:6-19.
20. Takaya K, Ogawa Y, Isse N, Okazaki T, Satoh N, Masuzaki H, et al. Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs--identification of a missense mutation in Zucker fatty (fa/fa) rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Aug 5;225(1):75-83.
21. Schonfeld G, Felski C, Howald MA. Characterization of the plasma lipoproteins of the genetically obese hyperlipoproteinemic Zucker fatty rat. *J Lipid Res*. 1974 Sep;15(5):457-64.
22. Di Nardo F, Burattini R, Cogo CE, Faelli E, Ruggeri P. Age-related analysis of insulin resistance, body weight and arterial pressure in the Zucker fatty rat. *Exp Physiol*. 2009 Jan;94(1):162-8.
23. Paulson DJ, Tahiliani AG. Cardiovascular abnormalities associated with human and rodent obesity. *Life Sci*. 1992;51(20):1557-69.
24. Okere IC, Chess DJ, McElfresh TA, Johnson J, Rennison J, Ernsberger P, et al. High-fat diet prevents cardiac hypertrophy and improves contractile function in the hypertensive dahl salt-sensitive rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005 Oct;32(10):825-31.
25. Okere IC, Chandler MP, McElfresh TA, Rennison JH, Sharov V, Sabbah HN, et al. Differential effects of saturated and unsaturated fatty acid diets on cardiomyocyte apoptosis, adipose distribution, and serum leptin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Jul;291(1):H38-44.
26. Ouwens DM, Boer C, Fodor M, de Galan P, Heine RJ, Maassen JA, et al. Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. *Diabetologia*. 2005 Jun;48(6):1229-37.

27. Relling DP, Esberg LB, Fang CX, Johnson WT, Murphy EJ, Carlson EC, et al. High-fat diet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of Foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis. *J Hypertens*. 2006 Mar;24(3):549-61.
28. Carroll JF, Zenebe WJ, Strange TB. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension*. 2006 Jul;48(1):65-72.
29. Murphy NF, MacIntyre K, Stewart S, Hart CL, Hole D, McMurray JJ. Long-term cardiovascular consequences of obesity: 20-year follow-up of more than 15 000 middle-aged men and women (the Renfrew-Paisley study). *Eur Heart J*. 2006 Jan;27(1):96-106.
30. Abel ED, Litwin SE, Sweeney G. Cardiac remodeling in obesity. *Physiol Rev*. 2008 Apr;88(2):389-419.
31. Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PW, Benjamin EJ, Larson MG, et al. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med*. 2002 Aug 1;347(5):305-13.
32. Avelar E, Cloward TV, Walker JM, Farney RJ, Strong M, Pendleton RC, et al. Left ventricular hypertrophy in severe obesity: interactions among blood pressure, nocturnal hypoxemia, and body mass. *Hypertension*. 2007 Jan;49(1):34-9.
33. de Simone G, Devereux RB, Roman MJ, Alderman MH, Laragh JH. Relation of obesity and gender to left ventricular hypertrophy in normotensive and hypertensive adults. *Hypertension*. 1994 May;23(5):600-6.
34. McMullen JR, Jennings GL. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007 Apr;34(4):255-62.
35. Negrao CE, Trombetta IC, Batalha LT, Ribeiro MM, Rondon MU, Tinucci T, et al. Muscle metaboreflex control is diminished in normotensive obese women. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Aug;281(2):H469-75.
36. Negrao CE, Rondon MU, Tinucci T, Alves MJ, Roveda F, Braga AM, et al. Abnormal neurovascular control during exercise is linked to heart failure severity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Mar;280(3):H1286-92.
37. Strazzullo P, Galletti F. Impact of the renin-angiotensin system on lipid and carbohydrate metabolism. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2004 May;13(3):325-32.
38. Wong C, Marwick TH. Obesity cardiomyopathy: pathogenesis and pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007 Aug;4(8):436-43.
39. Coort SL, Hasselbaink DM, Koonen DP, Willems J, Coumans WA, Chabowski A, et al. Enhanced sarcolemmal FAT/CD36 content and triacylglycerol storage in cardiac myocytes from obese Zucker rats. *Diabetes*. 2004 Jul;53(7):1655-63.

40. Boudina S, Sena S, O'Neill BT, Tathireddy P, Young ME, Abel ED. Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. *Circulation*. 2005 Oct 25;112(17):2686-95.
41. Luo JD, Zhang GS, Chen MS. Leptin and cardiovascular diseases. *Timely Top Med Cardiovasc Dis*. 2005;9:E34.
42. Rahmouni K, Haynes WG. Leptin and the cardiovascular system. *Recent Prog Horm Res*. 2004;59:225-44.
43. Lu MC, Tzang BS, Kuo WW, Wu FL, Chen YS, Tsai CH, et al. More activated cardiac mitochondrial-dependent apoptotic pathway in obese Zucker rats. *Obesity (Silver Spring)*. 2007 Nov;15(11):2634-42.
44. Kempen KP, Saris WH, Westerterp KR. Energy balance during an 8-wk energy-restricted diet with and without exercise in obese women. *Am J Clin Nutr*. 1995 Oct;62(4):722-9.
45. Ohkawara K, Tanaka S, Miyachi M, Ishikawa-Takata K, Tabata I. A dose-response relation between aerobic exercise and visceral fat reduction: systematic review of clinical trials. *Int J Obes (Lond)*. 2007 Dec;31(12):1786-97.
46. Crampes F, Beauville M, Riviere D, Garrigues M. Effect of physical training in humans on the response of isolated fat cells to epinephrine. *J Appl Physiol*. 1986 Jul;61(1):25-9.
47. De Glisezinski I, Crampes F, Harant I, Berlan M, Hejnova J, Langin D, et al. Endurance training changes in lipolytic responsiveness of obese adipose tissue. *Am J Physiol*. 1998 Dec;275(6 Pt 1):E951-6.
48. Pronk NP, Wing RR. Physical activity and long-term maintenance of weight loss. *Obes Res*. 1994 Nov;2(6):587-99.
49. Trombetta IC, Batalha LT, Rondon MU, Laterza MC, Kuniyoshi FH, Gowdak MM, et al. Weight loss improves neurovascular and muscle metaboreflex control in obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Sep;285(3):H974-82.
50. Ribeiro MM, Silva AG, Santos NS, Guazzelle I, Matos LN, Trombetta IC, et al. Diet and exercise training restore blood pressure and vasodilatory responses during physiological maneuvers in obese children. *Circulation*. 2005 Apr 19;111(15):1915-23.
51. Sowers JR, Nyby M, Stern N, Beck F, Baron S, Catania R, et al. Blood pressure and hormone changes associated with weight reduction in the obese. *Hypertension*. 1982 Sep-Oct;4(5):686-91.
52. Gollisch KS, Brandauer J, Jessen N, Toyoda T, Nayer A, Hirshman MF, et al. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Aug;297(2):E495-504.

53. Berggren JR, Boyle KE, Chapman WH, Houmard JA. Skeletal muscle lipid oxidation and obesity: influence of weight loss and exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008 Apr;294(4):E726-32.
54. Carroll JF, Kyser CK. Exercise training in obesity lowers blood pressure independent of weight change. *Med Sci Sports Exerc.* 2002 Apr;34(4):596-601.
55. Goodpaster BH, Thaete FL, Simoneau JA, Kelley DE. Subcutaneous abdominal fat and thigh muscle composition predict insulin sensitivity independently of visceral fat. *Diabetes.* 1997 Oct;46(10):1579-85.
56. Menard J. Anthology of the renin-angiotensin system: a one hundred reference approach to angiotensin II antagonists. *J Hypertens Suppl.* 1993 Apr;11(3):S3-11.
57. Basso N, Terragno NA. History about the discovery of the renin-angiotensin system. *Hypertension.* 2001 Dec 1;38(6):1246-9.
58. Inagami T. A memorial to Robert Tiegerstedt: the centennial of renin discovery. *Hypertension.* 1998 Dec;32(6):953-7.
59. Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res.* 1993 Sep;73(3):413-23.
60. Varagic J, Trask AJ, Jessup JA, Chappell MC, Ferrario CM. New angiotensins. *J Mol Med.* 2008 Jun;86(6):663-71.
61. Nguyen G, Delarue F, Berrou J, Rondeau E, Sraer JD. Specific receptor binding of renin on human mesangial cells in culture increases plasminogen activator inhibitor-1 antigen. *Kidney International.* 1996 Dec;50(6):1897-903.
62. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature.* 2002 Jun 20;417(6891):822-8.
63. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circulation Research.* 2000 Sep 1;87(5):E1-9.
64. Goodman G, Gilman N. *As bases farmacológicas da terapêutica.* Décima ed.: MacGraw-Hill; 2003.
65. Dzau VJ, Re R. Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine. A paradigm shift? *Circulation.* 1994 Jan;89(1):493-8.
66. D'Amore A, Black MJ, Thomas WG. The angiotensin II type 2 receptor causes constitutive growth of cardiomyocytes and does not antagonize angiotensin II type 1 receptor-mediated hypertrophy. *Hypertension.* 2005 Dec;46(6):1347-54.
67. Wagenaar LJ, Voors AA, Buikema H, van Gilst WH. Angiotensin receptors in the cardiovascular system. *Can J Cardiol.* 2002 Dec;18(12):1331-9.

68. Santos RA, Ferreira AJ, Simoes ESAC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol*. 2008 May;93(5):519-27.
69. Paul M, Wagner J, Dzau VJ. Gene expression of the renin-angiotensin system in human tissues. Quantitative analysis by the polymerase chain reaction. *J Clin Invest*. 1993 May;91(5):2058-64.
70. Booz GW, Baker KM. Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension*. 1996 Oct;28(4):635-40.
71. De Mello WC, Danser AH. Angiotensin II and the heart : on the intracrine renin-angiotensin system. *Hypertension*. 2000 Jun;35(6):1183-8.
72. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*. 2006 Jul;86(3):747-803.
73. Toblli JE, Cao G, Rivas C, DeRosa G, Domecq P. Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces lipid deposits in myocardium and improves left ventricular function of obese Zucker rats. *Obesity (Silver Spring)*. 2006 Sep;14(9):1586-95.
74. Duarte J, Martinez A, Bermejo A, Vera B, Gamez MJ, Cabo P, et al. Cardiovascular effects of captopril and enalapril in obese Zucker rats. *Eur J Pharmacol*. 1999 Jan 22;365(2-3):225-32.
75. Toblli JE, Cao G, DeRosa G, Di Gennaro F, Forcada P. Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiogenesis in myocardium of obese Zucker rats. *Am J Hypertens*. 2004 Feb;17(2):172-80.
76. Fischer-Posovszky P, Wabitsch M, Hochberg Z. Endocrinology of adipose tissue - an update. *Horm Metab Res*. 2007 May;39(5):314-21.
77. Van Harmelen V, Ariapart P, Hoffstedt J, Lundkvist I, Bringman S, Arner P. Increased adipose angiotensinogen gene expression in human obesity. *Obes Res*. 2000 Jul;8(4):337-41.
78. Giacchetti G, Faloia E, Mariniello B, Sardu C, Gatti C, Camilloni MA, et al. Overexpression of the renin-angiotensin system in human visceral adipose tissue in normal and overweight subjects. *Am J Hypertens*. 2002 May;15(5):381-8.
79. Engeli S, Negrel R, Sharma AM. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension*. 2000 Jun;35(6):1270-7.
80. Massiera F, Bloch-Faure M, Ceiler D, Murakami K, Fukamizu A, Gasc JM, et al. Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *Faseb J*. 2001 Dec;15(14):2727-9.
81. Harker CT, O'Donnell MP, Kasiske BL, Keane WF, Katz SA. The renin-angiotensin system in the type II diabetic obese Zucker rat. *J Am Soc Nephrol*. 1993 Dec;4(6):1354-61.

82. Yonemochi H, Yasunaga S, Teshima Y, Iwao T, Akiyoshi K, Nakagawa M, et al. Mechanism of beta-adrenergic receptor upregulation induced by ACE inhibition in cultured neonatal rat cardiac myocytes: roles of bradykinin and protein kinase C. *Circulation*. [Dallas]. 1998 Jun 9;97(22):2268-73.
83. Levi R, Silver RB, Mackins CJ, Seyedi N, Koyama M. Activation of a renin-angiotensin system in ischemic cardiac sympathetic nerve endings and its association with norepinephrine release. *International Immunopharmacology*. [Bethesda]. 2002 Dec;2(13-14):1965-73.
84. Eschenhagen T, Mende U, Diederich M, Nose M, Schmitz W, Scholz H, et al. Long term beta-adrenoceptor-mediated up-regulation of Gi alpha and G(o) alpha mRNA levels and pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding proteins in rat heart. *Molecular Pharmacology*. [Bethesda]. 1992 Nov;42(5):773-83.
85. Rowell LB. Ideas about control of skeletal and cardiac muscle blood flow (1876-2003): cycles of revision and new vision. *J Appl Physiol*. 2004 Jul;97(1):384-92.
86. Bozovic L, Castenfors J. Effect of ganglionic blocking on plasma renin activity in exercising and pain-stressed rats. *Acta Physiol Scand*. 1967 Jul-Aug;70(3):290-2.
87. Stebbins CL, Symons JD. Role of angiotensin II in hemodynamic responses to dynamic exercise in miniswine. *J Appl Physiol*. 1995 Jan;78(1):185-90.
88. Costill DL, Branam G, Fink W, Nelson R. Exercise induced sodium conservation: changes in plasma renin and aldosterone. *Med Sci Sports*. 1976 Winter;8(4):209-13.
89. Warren JH, Lewis W, Wraa CE, Stebbins CL. Central and peripheral effects of angiotensin II on the cardiovascular response to exercise. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2001 Nov;38(5):693-705.
90. Wilson KM, Fregly MJ. Angiotensin II-induced hypothermia in rats. *J Appl Physiol*. 1985 Feb;58(2):534-43.
91. Leite LH, Lacerda AC, Marubayashi U, Coimbra CC. Central angiotensin AT1-receptor blockade affects thermoregulation and running performance in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006 Sep;291(3):R603-7.
92. Convertino VA, Keil LC, Greenleaf JE. Plasma volume, renin, and vasopressin responses to graded exercise after training. *J Appl Physiol*. 1983 Feb;54(2):508-14.
93. Melin B, Eclache JP, Geelen G, Annat G, Allevard AM, Jarsaillon E, et al. Plasma AVP, neurophysin, renin activity, and aldosterone during submaximal exercise performed until exhaustion in trained and untrained men. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1980;44(2):141-51.
94. Geyssant A, Geelen G, Denis C, Allevard AM, Vincent M, Jarsaillon E, et al. Plasma vasopressin, renin activity, and aldosterone: effect of exercise and training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1981;46(1):21-30.

95. Hespel P, Lijnen P, Van Hoof R, Fagard R, Goossens W, Lissens W, et al. Effects of physical endurance training on the plasma renin-angiotensin-aldosterone system in normal man. *J Endocrinol.* 1988 Mar;116(3):443-9.
96. Williams AG, Rayson MP, Jubb M, World M, Woods DR, Hayward M, et al. The ACE gene and muscle performance. *Nature.* 2000 Feb 10;403(6770):614.
97. Jones A, Woods DR. Skeletal muscle RAS and exercise performance. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003 Jun;35(6):855-66.
98. Medeiros A, Oliveira EM, Gianolla R, Casarini DE, Negrao CE, Brum PC. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2004 Dec;37(12):1909-17.
99. Brooks GA, White TP. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol.* 1978 Dec;45(6):1009-15.
100. O'Rourke RA, Hanrath P, Henry WN, Hugenholtz PG, Pisa Z, Roelandt J, et al. [Report of the Joint Committee of the International Society and Federation of Cardiology and the World Health Organization on the recommendation for the standardization of quantitation of M-mode echocardiography]. *Arch Inst Cardiol Mex.* 1984 Jul-Aug;54(4):405-9.
101. Schiller NB, Shah PM, Crawford M, DeMaria A, Devereux R, Feigenbaum H, et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr.* 1989 Sep-Oct;2(5):358-67.
102. Litwin SE, Katz SE, Morgan JP, Douglas PS. Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation.* 1994 Jan;89(1):345-54.
103. Alves MF, Araujo MC, Juliano MA, Oliveira EM, Krieger JE, Casarini DE, et al. A continuous fluorescent assay for the determination of plasma and tissue angiotensin I-converting enzyme activity. *Braz J Med Biol Res.* 2005 Jun;38(6):861-8.
104. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
105. Huang L, Sexton DJ, Skogerson K, Devlin M, Smith R, Sanyal I, et al. Novel peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme 2. *J Biol Chem.* 2003 May 2;278(18):15532-40.
106. Ocaranza MP, Godoy I, Jalil JE, Varas M, Collantes P, Pinto M, et al. Enalapril attenuates downregulation of Angiotensin-converting enzyme 2 in the late phase of ventricular dysfunction in myocardial infarcted rat. *Hypertension.* 2006 Oct;48(4):572-8.

107. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976 May 7;72:248-54.
108. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9.
109. Venables MC, Jeukendrup AE. Endurance training and obesity: effect on substrate metabolism and insulin sensitivity. *Med Sci Sports Exerc*. 2008 Mar;40(3):495-502.
110. Fredersdorf S, Thumann C, Ulucan C, Griesse DP, Luchner A, Riegger GA, et al. Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovasc Pathol*. 2004 Jan-Feb;13(1):11-9.
111. Akbartabartoori M, Lean ME, Hankey CR. The associations between current recommendation for physical activity and cardiovascular risks associated with obesity. *Eur J Clin Nutr*. 2008 Jan;62(1):1-9.
112. Katzmarzyk PT, Church TS, Janssen I, Ross R, Blair SN. Metabolic syndrome, obesity, and mortality: impact of cardiorespiratory fitness. *Diabetes Care*. 2005 Feb;28(2):391-7.
113. De Angelis KL, Oliveira AR, Werner A, Bock P, Bello-Klein A, Fernandes TG, et al. Exercise training in aging: hemodynamic, metabolic, and oxidative stress evaluations. *Hypertension*. 1997 Sep;30(3 Pt 2):767-71.
114. Trapp EG, Chisholm DJ, Freund J, Boutcher SH. The effects of high-intensity intermittent exercise training on fat loss and fasting insulin levels of young women. *Int J Obes (Lond)*. 2008 Apr;32(4):684-91.
115. Gava NS, Veras-Silva AS, Negrao CE, Krieger EM. Low-intensity exercise training attenuates cardiac beta-adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1995 Dec;26(6 Pt 2):1129-33.
116. Sood A. Altered resting and exercise respiratory physiology in obesity. *Clin Chest Med*. 2009 Sep;30(3):445-54, vii.
117. Fagard RH. Exercise is good for your blood pressure: effects of endurance training and resistance training. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006 Sep;33(9):853-6.
118. Howard BV, Ruotolo G, Robbins DC. Obesity and dyslipidemia. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2003 Dec;32(4):855-67.
119. Bruce CR, Lee JS, Hawley JA. Postexercise muscle glycogen resynthesis in obese insulin-resistant Zucker rats. *J Appl Physiol*. 2001 Oct;91(4):1512-9.
120. Yuan G, Al-Shali KZ, Hegele RA. Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. *CMAJ*. 2007 Apr 10;176(8):1113-20.

121. Miles JM, Nelson RH. Contribution of triglyceride-rich lipoproteins to plasma free fatty acids. *Horm Metab Res*. 2007 Oct;39(10):726-9.
122. van Loon LJ. Use of intramuscular triacylglycerol as a substrate source during exercise in humans. *J Appl Physiol*. 2004 Oct;97(4):1170-87.
123. Helge JW, Watt PW, Richter EA, Rennie MJ, Kiens B. Fat utilization during exercise: adaptation to a fat-rich diet increases utilization of plasma fatty acids and very low density lipoprotein-triacylglycerol in humans. *J Physiol*. 2001 Dec 15;537(Pt 3):1009-20.
124. Thompson PD, Yurgalevitch SM, Flynn MM, Zmuda JM, Spannaus-Martin D, Saritelli A, et al. Effect of prolonged exercise training without weight loss on high-density lipoprotein metabolism in overweight men. *Metabolism*. 1997 Feb;46(2):217-23.
125. Williams PT, Krauss RM, Vranizan KM, Wood PD. Changes in lipoprotein subfractions during diet-induced and exercise-induced weight loss in moderately overweight men. *Circulation*. 1990 Apr;81(4):1293-304.
126. Wood PD, Stefanick ML, Williams PT, Haskell WL. The effects on plasma lipoproteins of a prudent weight-reducing diet, with or without exercise, in overweight men and women. *N Engl J Med*. 1991 Aug 15;325(7):461-6.
127. Sopko G, Leon AS, Jacobs DR, Jr., Foster N, Moy J, Kuba K, et al. The effects of exercise and weight loss on plasma lipids in young obese men. *Metabolism*. 1985 Mar;34(3):227-36.
128. Szapary PO, Bloedon LT, Foster GD. Physical activity and its effects on lipids. *Curr Cardiol Rep*. 2003 Nov;5(6):488-92.
129. Bulow J. Physical activity and adipose tissue metabolism. *Scand J Med Sci Sports*. 2004 Apr;14(2):72-3.
130. Skender ML, Goodrick GK, Del Junco DJ, Reeves RS, Darnell L, Gotto AM, et al. Comparison of 2-year weight loss trends in behavioral treatments of obesity: diet, exercise, and combination interventions. *J Am Diet Assoc*. 1996 Apr;96(4):342-6.
131. Walberg JL, Mole PA, Stern JS. Effect of swim training on development of obesity in the genetically obese rat. *Am J Physiol*. 1982 Mar;242(3):R204-11.
132. Gupta MP. Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2007 Oct;43(4):388-403.
133. Golfman LS, Wilson CR, Sharma S, Burgmaier M, Young ME, Guthrie PH, et al. Activation of PPARgamma enhances myocardial glucose oxidation and improves contractile function in isolated working hearts of ZDF rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005 Aug;289(2):E328-36.

134. Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Jan;85(2):339-43.
135. Swynghedauw B. Phenotypic plasticity of adult myocardium: molecular mechanisms. *J Exp Biol*. 2006 Jun;209(Pt 12):2320-7.
136. Berkalp B, Cesur V, Corapcioglu D, Erol C, Baskal N. Obesity and left ventricular diastolic dysfunction. *Int J Cardiol*. 1995 Nov 10;52(1):23-6.
137. Christoffersen C, Bollano E, Lindegaard ML, Bartels ED, Goetze JP, Andersen CB, et al. Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice. *Endocrinology*. 2003 Aug;144(8):3483-90.
138. Semeniuk LM, Kryski AJ, Severson DL. Echocardiographic assessment of cardiac function in diabetic db/db and transgenic db/db-hGLUT4 mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Sep;283(3):H976-82.
139. Toblli JE, Cao G, DeRosa G, Forcada P. Reduced cardiac expression of plasminogen activator inhibitor 1 and transforming growth factor beta1 in obese Zucker rats by perindopril. *Heart*. 2005 Jan;91(1):80-6.
140. Harp JB, Henry SA, DiGirolamo M. Dietary weight loss decreases serum angiotensin-converting enzyme activity in obese adults. *Obes Res*. 2002 Oct;10(10):985-90.
141. Engeli S, Bohnke J, Gorzelniak K, Janke J, Schling P, Bader M, et al. Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension*. 2005 Mar;45(3):356-62.
142. Umemura S, Nyui N, Tamura K, Hibi K, Yamaguchi S, Nakamaru M, et al. Plasma angiotensinogen concentrations in obese patients. *Am J Hypertens*. 1997 Jun;10(6):629-33.
143. Crandall DL, Herzlinger HE, Saunders BD, Armellino DC, Kral JG. Distribution of angiotensin II receptors in rat and human adipocytes. *J Lipid Res*. 1994 Aug;35(8):1378-85.
144. Crary GS, Swan SK, O'Donnell MP, Kasiske BL, Katz SA, Keane WF. The angiotensin II receptor antagonist losartan reduces blood pressure but not renal injury in obese Zucker rats. *J Am Soc Nephrol*. 1995 Oct;6(4):1295-9.
145. Alonso-Galicia M, Brands MW, Zappe DH, Hall JE. Hypertension in obese Zucker rats. Role of angiotensin II and adrenergic activity. *Hypertension*. 1996 Dec;28(6):1047-54.
146. Arakawa K, Urata H. Hypothesis regarding the pathophysiological role of alternative pathways of angiotensin II formation in atherosclerosis. *Hypertension*. 2000 Oct;36(4):638-41.

147. Urata H, Ganten D. Cardiac angiotensin II formation: the angiotensin-I converting enzyme and human chymase. *Eur Heart J*. 1993 Nov;14 Suppl I:177-82.
148. Munoz MC, Giani JF, Dominici FP, Turyn D, Toblli JE. Long-term treatment with an angiotensin II receptor blocker decreases adipocyte size and improves insulin signaling in obese Zucker rats. *J Hypertens*. 2009 Dec;27(12):2409-20.
149. Stepp DW, Boesen EI, Sullivan JC, Mintz JD, Hair CD, Pollock DM. Obesity augments vasoconstrictor reactivity to angiotensin II in the renal circulation of the Zucker rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Oct;293(4):H2537-42.
150. Adam A, Leclair P, Montpas N, Koumbadinga GA, Bachelard H, Marceau F. Altered cardiac bradykinin metabolism in experimental diabetes caused by the variations of angiotensin-converting enzyme and other peptidases. *Neuropeptides*. Apr;44(2):69-75.
151. Pereira MG, Ferreira JC, Bueno CR, Jr., Mattos KC, Rosa KT, Irigoyen MC, et al. Exercise training reduces cardiac angiotensin II levels and prevents cardiac dysfunction in a genetic model of sympathetic hyperactivity-induced heart failure in mice. *Eur J Appl Physiol*. 2009 Apr;105(6):843-50.
152. Yvan-Charvet L, Massiera F, Lamande N, Ailhaud G, Teboul M, Moustaid-Moussa N, et al. Deficiency of angiotensin type 2 receptor rescues obesity but not hypertension induced by overexpression of angiotensinogen in adipose tissue. *Endocrinology*. 2009 Mar;150(3):1421-8.
153. Siddiqui AH, Ali Q, Hussain T. Protective role of angiotensin II subtype 2 receptor in blood pressure increase in obese Zucker rats. *Hypertension*. 2009 Feb;53(2):256-61.
154. Suzuki J, Iwai M, Nakagami H, Wu L, Chen R, Sugaya T, et al. Role of angiotensin II-regulated apoptosis through distinct AT1 and AT2 receptors in neointimal formation. *Circulation*. 2002 Aug 13;106(7):847-53.
155. Peterson JM, Bryner RW, Sindler A, Frisbee JC, Alway SE. Mitochondrial Apoptotic Signaling Is Elevated in Cardiac but Not Skeletal Muscle in the Obese Zucker Rat and Is Reduced with Aerobic Exercise. *J Appl Physiol*. 2008 Oct 2.
156. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res*. 2000 Sep 1;87(5):E1-9.
157. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 2002 Apr 26;277(17):14838-43.