

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



ATPases de túbulos proximais renais ensaiadas “in vitro” na presença de Mg^{2+} e Ca^{2+} : relação com alterações na reabsorção de Na^{+} e água na hipertensão arterial associada à obesidade

Simone Alves Herdy Pinto

Duque de Caxias, 2022

Simone Alves Herdy Pinto

ATPases de túbulos proximais renais ensaiadas “in vitro” na presença de Mg^{2+} e Ca^{2+} : Relação com alterações na reabsorção de Na^+ e água na hipertensão arterial associada à obesidade

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (BIOTRANS) – UNIGRANRIO/INMETRO/UEZO, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biomédicas.

Orientadores: Adalberto Vieyra e Paulo André da Silva

Duque de Caxias, 2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE

UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS

P659a Pinto, Simone Alves Herdy.

ATPases de túbulos proximais renais ensaiadas "in vitro" na presença de Mg^{2+} e Ca^{2+} : Relação com alterações na reabsorção de Na^+ e água na hipertensão arterial associada à obesidade / Simone Alves Herdy Pinto. – Duque de Caxias, 2022.
116 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Biomedicina Translacional) – Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy", Escola de Ciências da Saúde, 2022.

"Orientadores: Prof. Dr. Adalberto Vieyra

Prof. Dr. Paulo André da Silva".

Referências: f. 92-111.

1. Biomedicina. 2. Dieta hiperlipídica. 3. Obesidade. 4. Hipertensão arterial. 5. Síndrome hepatocardiorenal. I. Vieyra, Adalberto. II. Silva, Paulo André da. III. Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy". IV. Título.

ATA DE DEFESA DE TESE

Às 13 horas, do dia 29 de setembro de 2022, o Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, realizou sessão de Defesa da Tese intitulada "ATPases de túbulo proximais renais ensaiadas "in vitro" na presença de Mg^{2+} e Ca^{2+} : relação com alterações na reabsorção de Na^{+} e água na hipertensão arterial associada à obesidade", de autoria de Simone Alves Herdy Pinto, aluna do Doutorado, sob orientação do Professor Adalberto Ramon Vieyra e do Professor Paulo André da Silva. A sessão foi aberta pelo Prof. Fábio da Silva de Azevedo Fortes, presidente da Comissão, que nos termos regimentais convocou os demais Membros da Comissão Examinadora: Prof. Pedro Hernan Cabello, Prof. Leonardo Marciel O. Pinto e Prof. Fernando de Azevedo C. Seara. Em seguida, passou à palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Após a apresentação, a candidata foi arguida pelos examinadores e suas respostas foram consideradas **SATISFATÓRIAS**.

O presidente declarou a doutoranda Simone Alves Herdy Pinto **APROVADA**, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biomédicas, de acordo como o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional do convênio tripartite entre UNIGRANRIO, INMETRO e UEZO. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão, em que foi lavrada a presente ata, que será assinada pelos Membros da Comissão Examinadora.

Duque de Caxias, 29 de setembro de 2022.



Prof. Dr. Fabio da Silva de Azevedo Fortes
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ
Presidente da Banca



Prof. Dr. Pedro Hernan Cabello
Universidade do Grande Rio - UNIGRANRIO



Prof. Dr. Leonardo Marciel O. Pinto
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ



Prof. Dr. Fernando de Azevedo C. Seara
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ



Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo
Coordenador Geral do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional
BIOTRANS

(i) Aprovado com Ressalvas e Modificações

Comentários:

Não se aplica.

Presidente:



Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus que foi o meu grande suporte nestes últimos anos. O Senhor é a minha força e o meu escudo; nele o meu coração confia, e dele recebo ajuda. Meu coração exulta de alegria, e com o meu cântico lhe darei graças (Salmos 28:7).

Agradeço ao meu querido e amado esposo Alfredo Pinto por todo suporte emocional, amizade, companheirismo, por me impulsionar, buscar sempre o melhor de mim e porque nunca permitiu que eu desistisse. Obrigada por me incentivar e compreender minhas ausências enquanto me dedicava à realização deste trabalho. Obrigada por ser tão incrível!

Agradeço aos meus pais Benjamim Herdy, Noredi Herdy e aos meus irmãos Marcelo, José Luiz e Luciana por todo amor, carinho e apoio. Em especial agradeço a minha Mãe; obrigada por me sustentar com suas orações, por suas renúncias e sacrifícios! você é minha inspiração e meu maior amor.

Agradeço aos meus avós José e Nilza Herdy (“in memoriam”), ao meu pai e aos meus tios por me proporcionarem o crescimento profissional enquanto gestores da UNIGRANRIO e por acreditarem no processo educacional como instrumento básico para qualidade de vida. Amo Vocês!

Agradeço ao Professor Adalberto Vieyra; que através do Laboratório de Físico-Química Biológica Aida Hassón-Voloch (LFQB-UFRJ) pode me presentear com seu suporte científico, financeiro, intelectual, estrutural, por me ensinar e pela paciência no processo de realização desta tese. Serei eternamente grata por sua dedicação. O Senhor é um exemplo para todos nós! Serei sempre sua grande admiradora!

Agradeço ao professor Paulo André pelo suporte científico, intelectual, agradeço também pela confiança, por me ensinar, pela paciência e por me ajuar sempre que o procurei.

Agradeço aos meus colegas de equipe do Laboratório de Físico-Química Biológica Aida Hassón-Voloch (LFQB-UFRJ), com as quais tive o prazer de conviver, por todo o suporte científico, intelectual e emocional que tanto cooperaram para o meu

crescimento profissional, por não deixarem de acreditar e sempre me impulsionarem a fazer dar certo esse projeto, mesmo quando tudo parecia desabar. Vocês foram demais!

Agradeço à minha querida amiga e parceira Gloria Sarmiento por sua cumplicidade, suporte técnico, científico, na realização dos experimentos e preparo de soluções que foram fundamentais para finalização deste trabalho. Você sempre me apoiou e estimulou! Serei eternamente grata.

Agradeço ao Danilo pela amizade, suporte técnico no preparo das soluções e suporte na realizações de alguns experimentos que foram fundamentais para finalização deste trabalho.

Agradeço meu amigo Amaury Acácio pela colaboração na síntese dos resultados, preparação de figuras e no processo de escrita. Você sempre esteve disposto a me dar suporte técnico e científico. Sua parceria e apoio foram fundamentais para a finalização deste trabalho.

Agradeço a amiga Thuany Crisóstomo pela ajuda na construção das figuras, experimentos, compartilhamento de trabalho, pelo suporte técnico, científico e por sua gentileza. Tenho certeza de que você brilhará mais e mais. Sou sua fã!

Agradeço ao amigo Humberto Muzi Filho por sua parceria, contribuição intelectual, por seu suporte técnico, científico e por me ajuar sempre que o procurei. Serei eternamente grata.

Agradeço a minha amiga Veruska Caetano por seu apoio, incentivo e suporte emocional nesta jornada. Também agradeço aos meus colegas (UNIGRANRIO) que de forma direta ou indireta fizeram parte da minha trajetória.

Agradeço aos membros da banca por aceitarem o convite de participar da finalização dessa etapa do trabalho.

“Por maior que seja, não há obstáculo que não possa ser superado com fé, esperança e persistência.”

Adaptado de Thomas S. Monson.

Resumo

A obesidade e suas comorbidades associadas constituem uma das pandemias do século XXI, esse fato é causado, em grande parte, pela ingestão de dietas ricas em lipídeos e hipercalóricas. Como resultado do acúmulo de gordura visceral, diferentes órgãos e sistemas são afetados, dentre eles está o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), que se encontra ativado em diversos órgãos e tecidos. O eixo do SRAA suprarregulado é o associado aos receptores de tipo 1 de angiotensina II (AT_1R). A hipótese central desta tese foi a de que com a obesidade e a suprarregulação do eixo $Ang\ II \rightarrow AT_1R$ ocorreriam alterações em ATPases de túbulos proximais estimuladas por Ca^{2+} e Mg^{2+} que levariam a um aumento da reabsorção de fluído, contribuindo para o aumento progressivo da pressão arterial com repercussões em outros órgãos. Para testar esta hipótese, ratos Wistar machos desmamados aos 21 dias de vida foram alimentados entre os 58 e 164 dias de vida com uma dieta hipercalórica, denominadas “high lipid” (HL) e uma “controle” (CTR). No dia 162 parte dos ratos passou a receber 4 doses orais de $Ang-(3-4)$ (80 mg/kg de massa corporal) para ativar o eixo $Ang\ II \rightarrow AT_2R$, eixo esse que antagoniza o $Ang\ II \rightarrow AT_1R$. Os ratos que receberam a dieta HL desenvolveram um acentuado sobrepeso de 25% e se tornaram hipertensos, com aumento do índice hepatorenal, revelando esteatose não alcoólica. Apresentaram também claros sinais de fibrose no interstício renal e no tecido muscular cardíaco. Com fragmentos do córtex renal externo, enriquecida de membrana plasmática de túbulos proximais, foi ensaiada a atividade ATPásica estimulada por Ca^{2+} e Mg^{2+} na qual se encontraram duas frações: uma sensível à tapsigargina (denominada SERCA) e outra resistente, atribuída majoritariamente à catálise pelas chamadas proteínas AAA+. Os ratos HL apresentaram inibição da SERCA nas diferentes condições, enquanto que a atividade das proteínas AAA+ aumentou somente na presença de 5 mM de $MgATP^{2-}$ e 20 μM de Ca^{2+} . Pode ser concluído que esta desincronia entre ATPases estimuladas por Ca^{2+} e Mg^{2+} leva a um aumento da amplitude e frequência de ondas de Ca^{2+} citosólico capazes de estimular a reabsorção proximal de Na^+ e água o que foi revelado pela significativa diminuição do clearance de Li^+ (~25%). A supressão das alterações nas ATPases renais estimuladas por Ca^{2+} e Mg^{2+} pela $Ang-(3-4)$, assim como a reversão da hipertensão arterial e da esteatose hepática, confirmaram que a administração crônica de uma dieta rica em lipídeos leva à suprarregulação do eixo Ang

II→AT₁R do SRAA mostrando-o como um dos mecanismos centrais de alterações em diferentes órgãos e tecidos. Finalmente, abriram novas vistas para o tratamento da síndrome hepatocardiorenal associada ao sobrepeso/obesidade.

Palavras chave: dieta hiperlipídica; ATPases estimuladas por Ca²⁺ e Mg²⁺; obesidade; hipertensão arterial; síndrome hepatocardiorenal; sistema renina-angiotensina-aldosterona; Ang-(3–4).

Abstract

Obesity and its associated comorbidities constitute one of the pandemics of the 21st century, this fact is largely caused by the intake of lipid-rich and hypercaloric diets. As a result of the accumulation of visceral fat, different organs and systems are affected, among them is the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), which is activated in several organs and tissues. The upregulated RAAS axis is associated with type 1 angiotensin II receptors (AT₁R). The central hypothesis of this thesis was that with obesity and upregulation of the Ang II→AT₁R axis, changes in proximal tubule ATPases stimulated by Ca²⁺ and Mg²⁺ would occur, which would lead to an increase in fluid reabsorption, contributing to a progressive increase in blood pressure. artery with repercussions in other organs. To test this hypothesis, male Wistar rats weaned at 21 days of age were fed between 58 and 164 days of life with a hypercaloric diet, called “high lipid” (HL) and a “control” (CTR). On day 162, part of the rats started to receive 4 oral doses of Ang-(3–4) (80 mg/kg of body mass) to activate the Ang II→AT₂R axis, which axis antagonizes Ang II→AT₁R. The rats that received the HL diet developed a marked overweight of 25% and became hypertensive, with an increase in the hepatorenal index, revealing non-alcoholic steatosis. They also showed clear signs of fibrosis in the renal interstitium and cardiac muscle tissue. With fragments of the external renal cortex, enriched with the plasma membrane of proximal tubules, the ATPase activity stimulated by Ca²⁺ and Mg²⁺ was tested, in which two fractions were found: one sensitive to thapsigargin (called SERCA) and the other resistant, mainly attributed to catalysis by the so-called AAA+ proteins. HL mice showed inhibition of SERCA under different conditions, while the activity of AAA+ proteins increased only in the presence of 5 mM MgATP²⁻ and 20 μM Ca²⁺. It can be concluded that this dyssynchrony between ATPases stimulated by Ca²⁺ and Mg²⁺ leads to an increase in the amplitude and frequency of cytosolic Ca²⁺ waves capable of stimulating the proximal reabsorption of Na⁺ and water, which was revealed by the significant decrease in Li⁺ clearance (~25 %). The suppression of changes in renal ATPases stimulated by Ca²⁺ and Mg²⁺ by Ang-(3–4), as well as the reversal of arterial hypertension and hepatic steatosis, confirmed that the chronic administration of a lipid-rich diet leads to the upregulation of the Ang axis II→AT₁R of the RAAS showing it as one of the central mechanisms of changes in different organs and tissues. Finally, they opened new vistas for the treatment of overweight/obesity-associated hepatocardiorenal syndrome.

Key words: hyperlipidic diet; obesity; arterial hypertension; ATPases stimulated by Ca^{2+} and Mg^{2+} ; increased proximal reabsorption of fluid; hepatocardiorenal syndrome; renin-angiotensin-aldosterone system; Ang-(3–4).

Lista de Ilustrações

Figura 1. Percentual da população mundial em estado de desnutrição e obesidade em 2016-----	22
Figura 2. Progressivo aumento de sobrepeso e obesidade no Brasil entre 2006 e 2016-----	24
Figura 3. Incidência do excesso de peso e obesidade segundo grupos de idades no Brasil-----	25
Figura 4. Mecanismos e processos que, a partir do aumento da gordura visceral, levam ao estabelecimento de hipertensão arterial-----	28
Figura 5. Diferenças morfológicas entre os quatro tipos de adipócitos-----	31
Figura 6. Mecanismos pró-hipertensivos associados à obesidade-----	32
Figura 7. Sistema renina-angiotensina-aldosterona-----	35
Figura 8 . Ilustração do néfron-----	38
Figura 9. Domínios das P-ATPases. -----	42
Figura 10. Estrutura terciária da SERCA-----	43
Figura 11. Catálise por proteínas AAA+-----	45
Figura 12. Linha do tempo de administração das dietas CTR e HL e de Ang-(3–4)----	52
Figura 13. Sobrepeso dos ratos HL depois de 106 dias de consumo da dieta hiperlipídica-----	54
Figura 14. A dieta HL provoca aumento do index hepatorrenal-----	59
Figura 15. Esquema mostrando as principais etapas de formação de colesterol no fígado e a formação e exportação de VLDL-----	60

Figura 16. Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Pressão Arterial Diastólica (PAD) de ratos alimentados com dieta CTR e de ratos submetidos a dieta HL -----62

Figura 17. Atividade ATPásica resistente à tapsigargina (TG) de células de túbulos proximais, ensaiada na presença de 0,1 mM de ATP e 20 μ M de Ca^{2+} livre, e 0,6 mM de Mg^{2+} livre-----65

Figura 18. Atividade ATPásica resistente à tapsigargina (TG) de células de túbulos proximais, ensaiada na presença de 0,1 mM de ATP e 20 μ M de Ca^{2+} livre, e 0,6 mM de Mg^{2+} livre-----67

Figura 19. Atividade da $(\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+})$ ATPase do retículo endoplasmático (SERCA) de células de túbulos proximais, ensaiada na combinação de 1,1 mM de ATP e 20 μ M de Ca^{2+} livre, com 0,6 mM de Mg^{2+} livre-----69

Figura 20. Atividade ATPásica resistente à tapsigargina (TG) de células de túbulos proximais, ensaiada na presença de 1,1 mM de ATP e 20 μ M de Ca^{2+} livre, e 0,6 mM de Mg^{2+} livre-----70

Figura 21. Atividade da $(\text{Ca}^{2+}+ \text{Mg}^{2+})$ ATPase do retículo endoplasmático (SERCA) de células de túbulos proximais, ensaiada na combinação de 5 mM de ATP e 20 μ M de Ca^{2+} livre, com 0,6 mM de Mg^{2+} livre-----72

Figura 22. Atividade ATPásica resistente à tapsigargina (TG) de células de túbulos proximais, ensaiada na combinação de 5 mM de ATP e 20 μ M de Ca^{2+} livre, com 0,6 mM de Mg^{2+} livre-----74

Figura 23. Atividade da $(\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+})$ ATPase do retículo endoplasmático (SERCA) de células de túbulos proximais, ensaiada na combinação de 5 mM de ATP e 100 μ M de Ca^{2+} livre, com 0,6 mM de Mg^{2+} livre-----76

Figura 24. Atividade ATPásica resistente à tapsigargina (TG) de células de túbulos proximais, ensaiada na combinação de 5 mM de ATP e 100 μ M de Ca^{2+} livre, com 0,6 mM de Mg^{2+} livre-----77

Figura 25. Comparação das atividades da SERCA com as da ATPase resistente à tapsigargina de túbulos proximais renais de ratos CTR e HL-----	79
Figura 26. Representação esquemática comparativa da magnitude dos picos e ondas de Ca^{2+} em células de túbulos proximais renais de ratos CTR e HL-----	80
Figura 27. Atividade da SERCA ensaiada em diferentes combinações de ATP e Ca^{2+} em ratos CTR e HL: efeito da administração de 4 doses orais de Ang-(3–4) -----	81
Figura 28. Atividade ATPásica resistente à tapsigargina (TG) ensaiada em diferentes combinações de ATP e Ca^{2+} em ratos que receberam veículo (água) ou 4 doses de Ang-(3–4)-----	84
Figura 29. Clearance de lítio-----	86
Figura 30. Concentração plasmática de creatinina em ratos CTR e HL-----	88
Figura 31. Proposta de reabsorção de Na^+ e água em túbulos proximais de ratos com sobrepeso e hipertensos-----	90

Lista de tabelas

Tabela 1. Composição das dietas controle (CTR) e high lipid (HL) -----	49
---	----

Lista de abreviaturas e siglas

AcCoA: Acetilcoenzima A

ADP: Adenosina Difosfato

Ang II : Angiotensina II

Ang-(3–4) : Angiotensina-(3–4)

ATGL: Lipase Adipocitária de Triglicerídeos

ATP: Adenosina Trifosfato

AT₁R : Receptor de Angiotensina II do Tipo 1

AT₂R : Receptor de Angiotensina II do Tipo 2

BM : Body mass

cAMP : Adenosina Monofosfato Cíclico

CDC : Centros de Controle e Prevenção de Doenças (USA)

CTR : Grupo Controle

ECA: Enzima Conversora da Angiotensina

EDTA : Ethylenediamine Tetraacetic Acid

HL : Grupo High Lipid

IMC : Índice de Massa Corporal

IL-6: Interleucina 6

LDL: Lipoproteínas de Baixa Densidade

MC : Massa Corporal

MR: Mineralocorticoides

MTTP: Proteína Microsomal de Transferência de Triglicerídeos

[Na⁺]_{pls} : Concentração de Sódio Plasmático

NHI : National Institutes of Health

OMS : Organização Mundial da Saúde

PAD : Pressão Arterial Diastólica

PAS : Pressão Arterial Sistólica

PIB : Produto Interno Bruto

PKA : Proteína Quinase A

PKC : Proteína Quinase C

PMCA: Ca^{2+} -ATPase da Membrana Plasmática

POMC: Próopiomelanocortina

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

SERCA: Ca^{2+} -ATPase de Retículo Sarcoendoplasmático

SHR : Ratos Espontaneamente Hipertensos

SRA : Sistema Renina Angiotensina

SRAA : Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

SNS: Sistema Nervoso Simpático

SUS : Sistema Único de Saúde

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa

UCP1: Proteína Desacopladora 1

VLDL: Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade

Sumário

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Visão global da obesidade	20
1.2. Quantificando o sobrepeso e a obesidade	26
1.3. Distribuição e tipos de tecido adiposo	26
1.4. As diferentes células do tecido adiposo e seu papel na obesidade	27
1.5. Alterações nas funções do tecido adiposo que coexistem com seu acúmulo e que repercutem em outros sistemas	30
1.6. O papel do SRAA na hipertensão associada ao excesso de peso	33
1.7. Néfron	37
1.8. Os papeis dos íons Mg^{2+} e Ca^{2+} em processos que dependem da energia liberada durante a hidrólise de ATP: as antigas e as novas ATPases	39
2. OBJETIVOS	46
2.1. Hipótese condutora	46
2.2. Objetivo Geral	46
2.3. Objetivos Específicos	47
3. MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1. Protocolo de experimentação com animais	48
3.2. Preparação da fração microssomal	50
3.3. Medida da pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e massa corporal, e processamento de amostras de urina e sangue	51
3.4. Determinação das atividades ATPásicas estimuladas por Mg^{2+} e Ca^{2+} na fração microssomal isolada de córtex corticis renal	51
3.5. Clearance de lítio	54
3.6. Análise de imagens ultrassonográficas	54
3.7. Análise estatística	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56

4.1. Fenótipo dos ratos com sobrepeso. Alterações renais, hepáticas e cardiovasculares -----	56
4.2. ATPases estimuladas por Mg^{2+} e Ca^{2+} em túbulos contornados proximais renais: modificações nas respostas a substratos como mecanismos moleculares subjacentes a alterações funcionais na síndrome hepatocardiorenal do sobrepeso?-----	63
4.3. As atividades da SERCA e das ATPase resistentes à tapsigargina são moduladas pelos dois eixos centrais do SRAA?-----	78
4.4. Clearance de lítio -----	83
4.5. As alterações tubulares proximais de processos de transporte -----	87
5. CONCLUSÕES-----	89
6. REFERÊNCIAS-----	92
ANEXO 1-----	112

1. Introdução.

1.1. Visão global da obesidade.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a obesidade é caracterizada pelo como um acúmulo excessivo de gordura que pode ser prejudicial à saúde (WHO, 2022). O sobrepeso e a obesidade, nas últimas décadas, alcançaram proporções alarmantes tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. De acordo com a Federação Mundial de obesidade, existem no mundo, nos dias atuais, aproximadamente 800 milhões de indivíduos com sobrepeso (www.worldobesity.org., 2020). A obesidade é um grande problema de saúde pública mundial, considerada já uma pandemia, com danos para a sociedade em geral e para os sistemas públicos de saúde em particular, por estar associada geralmente a diferentes comorbidades (ou a um conjunto delas) com altas taxas de morbimortalidade. O problema é, portanto, complexo e exige tanto estratégias preventivas quanto avanços no conhecimento de processos e mecanismos celulares e moleculares subjacentes (Swinburn *et al.*, 2019), na tentativa de controlar e tratar esse conjunto de patologias e suas complicações.

A obesidade se tornou uma pandemia que se disseminou entre homens e mulheres, alcançando todas as faixas etárias em diferentes grupos sociais, causando anualmente 2,8 milhões de mortes (www.worldobesity.org., 2020). A alta taxa de indivíduos obesos, e por conseguinte de suas comorbidades, se tornou um enorme problema de saúde pública mundial, com aumento significativo de gastos financeiros (Madruga *et al.*, 2016). Mais recentemente, as consequências adversas da obesidade passaram a ser consideradas conjuntamente com aquelas provocadas pela desnutrição e pelas mudanças climáticas, constituindo uma “Síndemia Global” (Swinburn *et al.*, 2019) com ocorrência simultânea em vastas regiões do planeta. Nos dois últimos anos, esta síndemia foi agravada com o advento da pandemia de Covid-19 por duas principais razões: (i) porque a má nutrição (obesidade e desnutrição) se associam às mudanças climáticas afetando às populações mais vulneráveis (Manzanedo & Manning, 2020; Botzen *et al.*, 2021); (ii) porque a própria obesidade passou a ser um fator de risco de desfechos graves e fatais nas infecções por SARS-CoV-2, isto é “uma pandemia dentro de outra pandemia” (Zakka *et al.*, 2021). Por outro lado, a síndemia se completa em diferentes regiões do mundo porque a desnutrição constitui também uma

pandemia, sobretudo entre os países subdesenvolvidos ou regiões conflitadas de países desenvolvidos (Malik *et al.*, 2013; Luzes *et al.*, 2020).

Recentemente um estudo realizado pela OMS indica que mais de um em cada três países de baixa e média renda enfrenta os dois problemas. A agência da ONU destaca que dietas de alta qualidade reduzem o risco de subnutrição em todas suas formas, mas que esta situação de alimentação adequada não é a que se encontra entre bilhões de habitantes do planeta (<https://news.un.org>). A Figura 1A mostra regiões com altas porcentagens de população subnutrida (ingesta de calorias insuficiente para satisfazer os requerimentos mínimos), especialmente na África e na Ásia, junto com a alta incidência de obesidade (alto índice de massa corporal¹) nos Estados Unidos da América, Arábia Saudita e muitos países da Europa (Figura 1B) (links nas respectivas legendas) (Luzes, 2020).

A obesidade é uma doença multifatorial. Para além da ingesta de calorias superiores ao seu gasto, são importantes a própria natureza das dietas, sedentarismo, fatores genéticos ainda não totalmente conhecidos, fatores epigenéticos que governam o apetite e a saciedade, microbiota e diferentes aspectos da cultura de diferentes sociedades (Romieu *et al.*, 2017). A incidência e as interações deste conjunto de fatores encontram-se fortemente acentuadas em populações com altos níveis de renda, especialmente porque estimula ingesta de dietas de qualidade inapropriada, as chamadas “Dietas Ocidentais”, com alto conteúdo de calorias, açúcares, gorduras e sal (Kopp, 2019). Estas dietas levam – estimulando diferentes mecanismos – à gênese de diferentes “Doenças da Civilização”, incluindo a obesidade (Kopp, 2019; Crisóstomo, 2021).

Projeta-se que, nos EUA, mais de 85% dos adultos terão sobrepeso ou obesidade em 2030 (Ward *et al.*, 2019). Todavia, apesar da prevalência de aumento da obesidade global na maior parte dos países desenvolvidos pareça ter alcançado estabilidade, a obesidade mórbida (Índice de Massa Corporal > 40 kg/m²; ver seção 1.2) em muitos desses países está aumentando, até mesmo entre as crianças. Adicionalmente, a prevalência da obesidade nos países em desenvolvimento

¹ Índice de massa corporal/IMC: massa corporal em kg dividida pela altura em metros elevada ao quadrado. Ver seção 1.2.

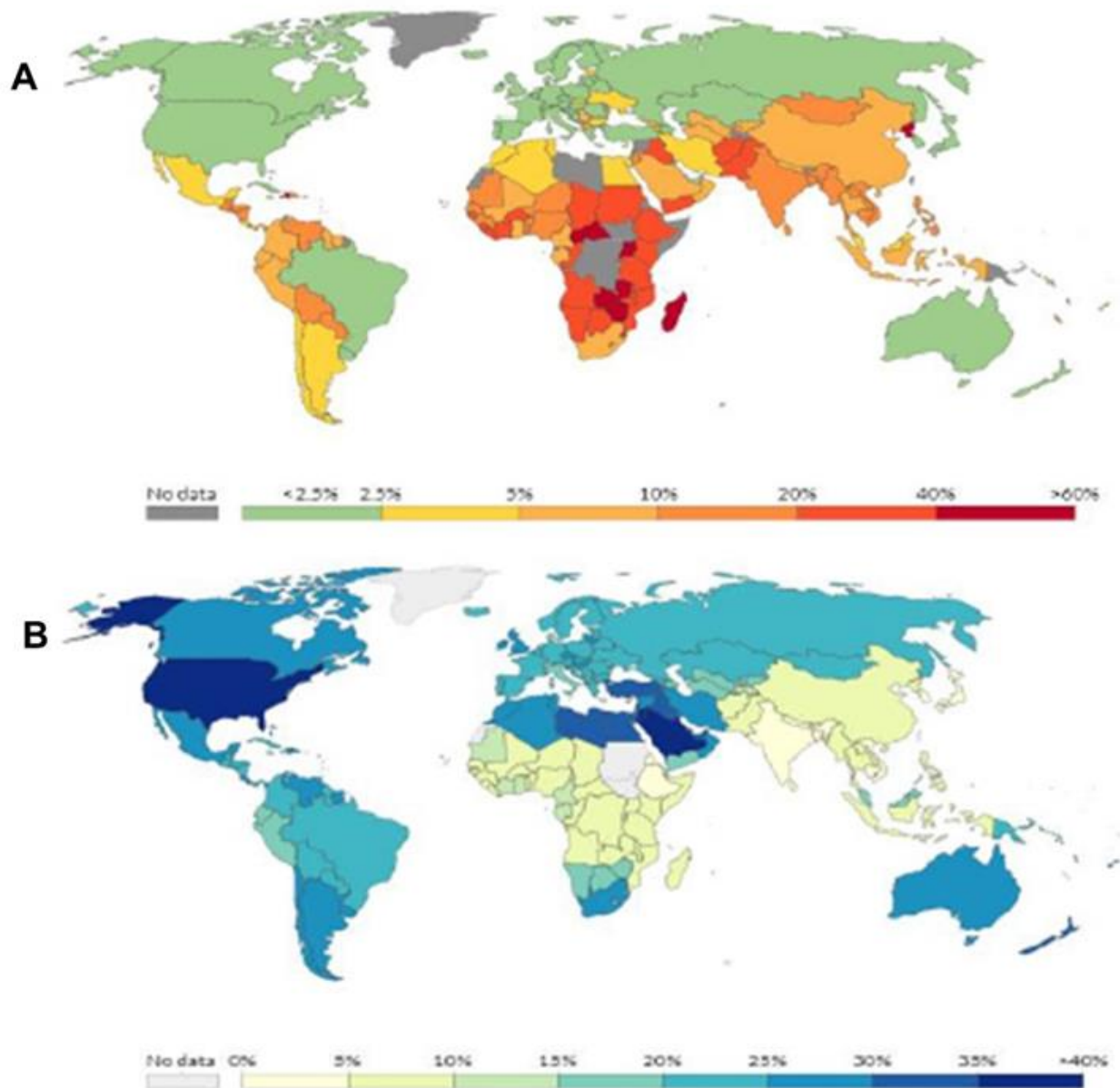


Figura 1. Percentual da população mundial em estado de desnutrição e obesidade em 2016. (A) Percentual da população com desnutrição. Imagem acessada em 31 de janeiro de 2022: <https://ourworldindata.org/hunger-and-undernourishment>. (B) População com sobrepeso e obesidade. Imagem acessada em 31 de janeiro de 2022: <http://www.ourworldindata.org/obesity>. A barra horizontal em ambos os painéis mostra a correspondência entre cores das imagens nos mapas e percentual da população em estado de desnutrição ou obesidade.

vem aumentando podendo alcançar os níveis dos EUA (Hruby & Hu, 2015). O aumento da obesidade em crianças será abordado posteriormente.

A tendência de aumento da porcentagem de indivíduos com sobrepeso ou obesos também aparece no Brasil. A taxa de indivíduos com sobrepeso ou obesos em idade adulta no país mais do que duplicou em 17 anos passando de 43% para 62%: de cada 4 adultos do País, 1 era obeso em 2019 (Pesquisa Nacional de Saúde divulgada pelo IBGE em parceria com o Ministério da Saúde):

(<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/29204-um-em-cada-quatro-adultos-do-pais-estava-obeso-em-2019>).

Como em outros países do mundo, o sobrepeso e a obesidade estão disseminados entre homens e mulheres, alcançando todas as faixas etárias e também em diferentes grupos sociais (www.worldobesity.org, 2020). Pouco tempo antes observou-se um acréscimo de 60% na prevalência de adultos obesos (homens e mulheres), mas saindo de 12% em 2006 para 19% em 2016 (Figura 2A) o que demonstra uma clara aceleração na expansão da obesidade no Brasil nos anos seguintes. De acordo com números do Ministério da Saúde, pessoas com sobrepeso correspondiam a mais da metade da população adulta brasileira (54%) Figura 2B). Estes índices são mais acentuados em pessoas com menos escolaridade e de baixa renda (ver link na legenda da Figura 2).

Quando se analisa a incidência de sobrepeso e obesidade no Brasil por faixas etárias, observa-se (Figura 3) que aproximadamente 7,4 milhões de pessoas entre 18 a 24 anos (33,7%) apresentavam excesso de peso em 2019. No grupo da faixa de idade entre 40 e 59 anos, esse índice aumenta para 70,3%, correspondendo a 39,5 milhões de pessoas, aumentando ainda mais com o avanço da faixa etária regredindo a partir de 60 anos.

Pelo impacto global na saúde da população, as estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica apresentadas pelo Ministério da Saúde em 2014 por orientação da Política Nacional de Alimentação e Nutrição apontam a obesidade como um dos maiores desafios de saúde pública. As diretrizes norteiam para a organização do cuidado irrestrito da pessoa com sobrepeso e obesidade, através de vigilância alimentar e nutricional, e acesso a alimentação adequada e saudável, com participação

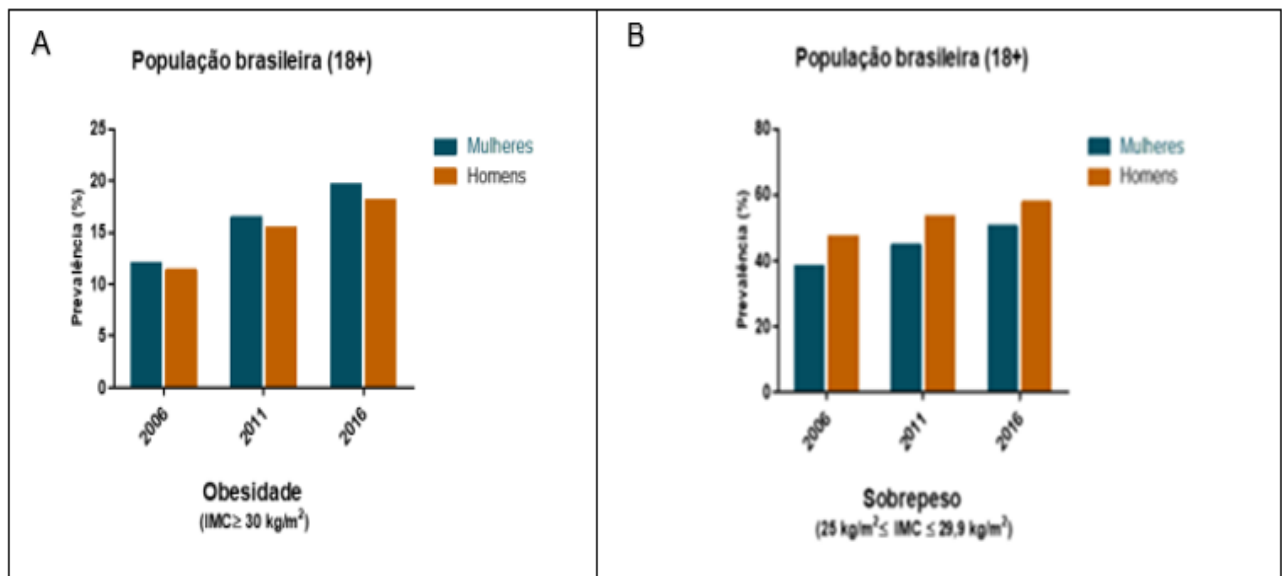


Figura 2. Progressivo aumento de sobrepeso e obesidade no Brasil entre 2006 e 2016. Dados divulgados pelo Ministério da Saúde do Brasil, referentes à pesquisa Vigitel no ano de 2016. Os gráficos A e B, mostram a incidência porcentual de obesidade e sobrepeso em mulheres e homens.

Fonte:

https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2017_vigilancia_fatores_riscos.pdf.

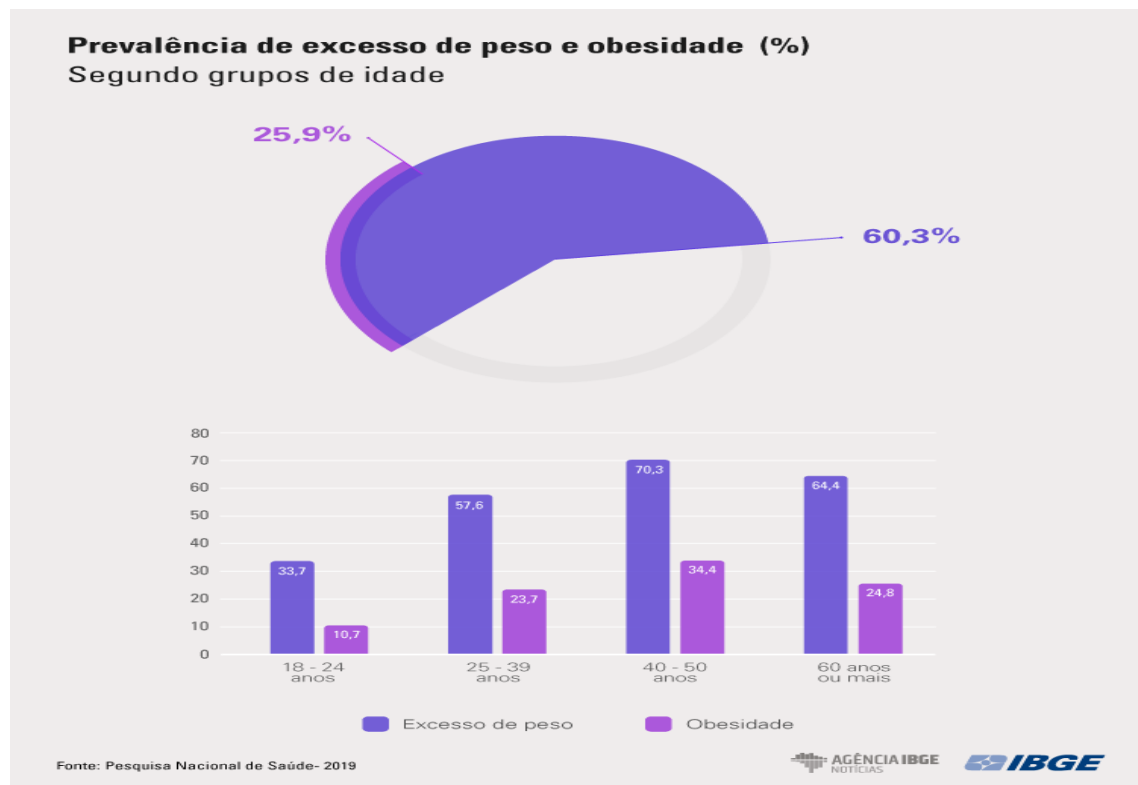


Figura 3. Incidência do excesso de peso e obesidade segundo grupos de idades no Brasil. Fonte: Pesquisa Nacional de Saúde 2019. Fonte: <https://agencia-denoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/29204-um-em-cada-quatro-adultos-do-pais-estava-obeso-em-2019> (acessado em 19 de julho de 2022).

educativa dos serviços de Saúde e macropolíticas que fortaleçam uma vida mais saudável (https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/estrategias_cuida_do_doenca_cronica_obesidade_cab38.pdf).

1.2. Quantificando o sobrepeso e a obesidade.

O diagnóstico de sobrepeso e obesidade é realizado a partir de um parâmetro denominado Índice de Massa Corporal (IMC), obtido a partir da relação entre massa corporal em kg e a estatura em metros elevada ao quadrado. O estado de obesidade é diagnosticado quando $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$ ou quando a massa corporal excede em 120% da massa corporal ideal (Zorena *et al.*, 2020) e, no extremo oposto, indivíduos com $IMC < 18,5 \text{ kg/m}^2$ podem ser considerados como tendo carência de peso ou desnutridos. Numa faixa intermediária, um $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2 \leq 30 \text{ kg/m}^2$ corresponde a um estado de sobrepeso.

Como mencionado acima, a incidência de obesidade cresce entre crianças em todo o mundo. Todavia, neste caso, a medida absoluta do IMC não é suficiente para definir a existência de obesidade (assim como tampouco de desnutrição). Devem ser definidos inicialmente o sexo e a faixa etária das crianças, analisando massa corporal e altura em determinadas regiões geográficas e populações, bem como a distribuição do IMC em percentis. Nos EUA, valores acima do 85º percentil definem o sobrepeso e acima do 95º percentil indicam obesidade (c.f. Hruby & Hu, 2016). Para crianças entre 0 e 59 meses a OMS e o Centro de Controle de Doenças dos USA (CDC), recomendam o uso de tabelas que levam em consideração a taxa de crescimento, de aumento de massa corporal e as características (especialmente predominância sobre outros alimentos) e duração do tempo de amamentação, havendo tabelas específicas para os 2 primeiros anos de vida (Grummer-Strawn *et al.*, 2009).

1.3. Distribuição e tipos de tecido adiposo.

Para além da caracterização do estado de obesidade a partir do valor do IMC, ela pode ser definida também como uma doença que cursa com aumento excessivo de tecido adiposo (Després & Lemieux, 2006), levando também em consideração sua distribuição/localização, seus aspectos histológicos e suas características bioquímicas.

Conforme o acúmulo/distribuição do tecido adiposo, a obesidade pode ser classificada em ginecoide e androide. Na primeira, o tecido adiposo acumula-se na

região gluteofemoral; na segunda, a maior parte do tecido adiposo se acumula na região abdominal. Esta classificação permite obter um fator que pode ser usado para o diagnóstico do grau de gravidade da obesidade e para o prognóstico de risco de desenvolvimento de outras co-morbidades. Trata-se da medida do contorno da cintura pélvica (circunferência), cujo aumento está relacionado com o aumento de gordura visceral na região abdominal e com o do risco de estabelecimento de uma síndrome metabólica (Després & Lemieux, 2006). Especial importância tem a gordura perirenal, que desempenha um papel importante na fisiopatogenia da hipertensão associada à obesidade por razões mecânicas (compressão) e hormonais (ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e do sistema nervoso simpático) (Hall *et al.*, 2015) (Figura 4).

1.4. As diferentes células do tecido adiposo e seu papel na obesidade.

O tecido adiposo é um tipo de tecido conjuntivo que apresenta várias características diferenciadas. Entre elas estão as de sintetizar e armazenar lipídeos (fonte de energia), proteger órgãos contra choques mecânicos, sustentar órgãos internos, ser isolante térmico, liberar adipocitocinas (que vão modular várias funções de diferentes órgãos e sistemas) (Prado *et al.*, 2013). Durante muito tempo, o armazenamento de energia foi considerado sua principal função. Entretanto, nas últimas décadas, foi mostrado que o tecido adiposo é complexo e dinâmico e que desempenha uma heterogeneidade de funções em níveis celulares, teciduais e sistêmicos (Prado *et al.*, 2013). É constituído predominantemente por células adiposas, ou adipócitos, envolvidas por uma lâmina basal e fibras reticulares (Ahima & Flier, 2000), cuja morfologia e composição são alteradas na obesidade (Luzes *et al.*, 2021). O conjunto do tecido adiposo de mamíferos foi chamado também de “órgão adiposo” organizado em multidepósitos, com dois principais acúmulos subcutâneos e um grande número de depósitos viscerais, como os existentes na cavidade abdominal (Giordano *et al.*, 2014).

Em relação aos aspectos histológicos, os adipócitos podem ser classificados em quatro tipos: (i) o adipócito branco, que apresenta uma única gotícula de gordura ocupando a maior parte do citosol com poucas mitocôndrias; (ii) o adipócito marrom que apresenta pequenas gotículas de gordura distribuídas por todo o citosol com uma grande quantidade de mitocôndrias (Virtanen *et al.*, 2009; Saely *et al.*, 2012;

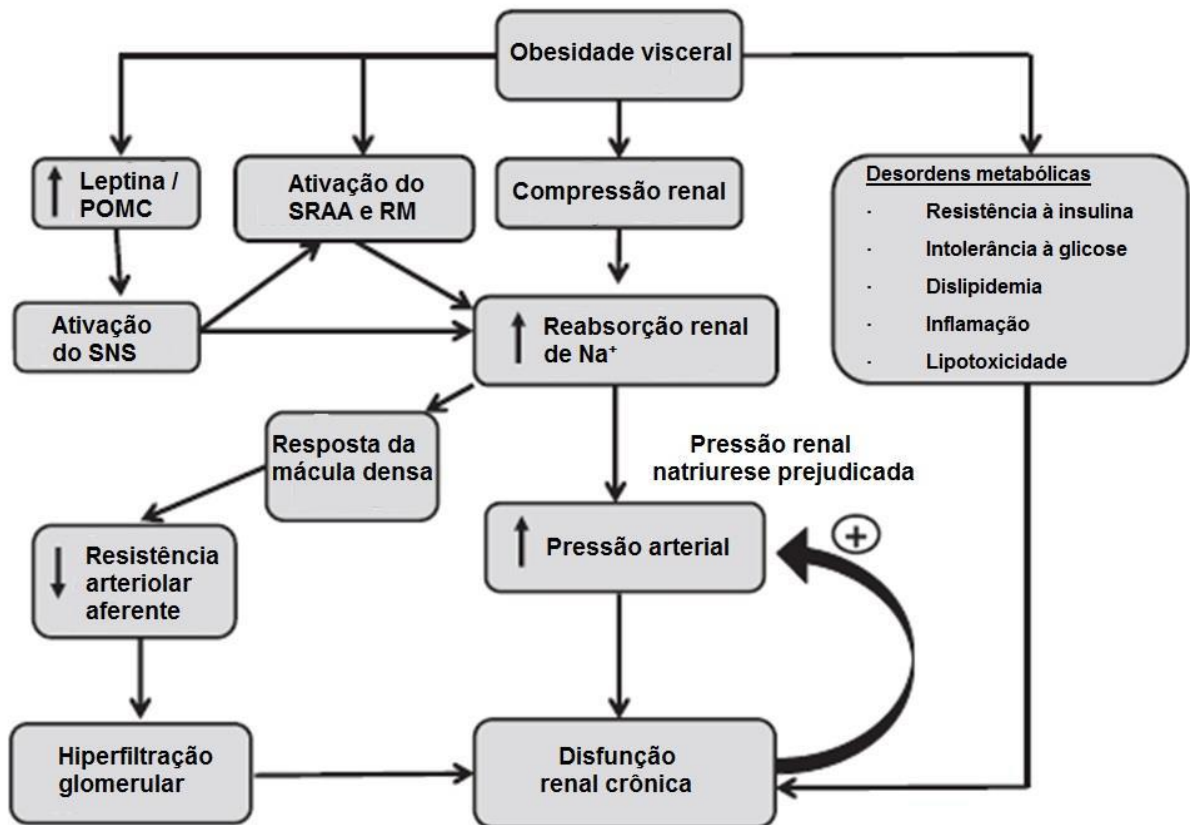


Figura 4. Mecanismos e processos que, a partir do aumento da gordura visceral, levam ao estabelecimento de hipertensão arterial. RM indica receptores de mineralocorticoides; POMC, próopiomelanocortina; SRAA, sistema renina angiotensina aldosterona e SNS, sistema nervoso simpático (modificado de Hall *et al.*, 2015). Reproduzido com permissão.

Adamczak & Wiecek, 2013); (iii) o adipócito bege, que possui características intermediárias entre as do branco e do marrom; (iv) o adipócito rosa (Wu *et al.*, 2013; Corrêa *et al.*, 2019) (Figura 5).

O tecido adiposo branco é aquele relacionado com as comorbidades derivadas da obesidade. Está localizado em grandes depósitos na região subcutânea abdominal, na região perirrenal e na região gluteofemoral, e é também encontrado em músculos, coração e mesentério (Kwok *et al.*, 2016). Esse tecido produz uma grande quantidade de adipocitocinas de ação local e sistêmica. Essas adipocitocinas desempenham diferentes funções, na modulação de processos inflamatórios, do apetite e da pressão arterial (Matsuzawa, 2006).

O tecido adiposo, especialmente aquele localizado em torno das vísceras, regula o metabolismo a partir da liberação de hormônios como a leptina e esteroides sexuais (testosterona e estrogênio), e de componentes do SRAA como angiotensinogênio (Wajchenberg, 2000). Os adipócitos, quando hipertrofiados, contribuem para o aparecimento de aterosclerose, hipertensão arterial, resistência insulínica e diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias, inflamação (no tecido adiposo e em outros órgãos) e lipotoxicidade. Esta última também frequentemente associada à resistência a catecolaminas, num complexo quadro que relaciona adiposidade, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (Reilly & Saltiel, 2017). Uma das principais adipocitocinas liberadas pelos adipócitos é a leptina, conhecida como hormônio da saciedade, que age modificando a ingesta energética, diminuindo o apetite e aumentando o gasto energético através da estimulação simpática. Assim, modulando o eixo hipotalâmico-hipofisário, a leptina regula mecanismos neuroendócrinos envolvidos no metabolismo energético (Myers *et al.*, 2008).

Indivíduos obesos apresentam tanto um aumento do tamanho quanto do número de adipócitos brancos (Cisternas, 2002; Romero & Zanesco, 2006). Entretanto, a quantidade de tecido adiposo não guarda uma relação exata com a produção de leptina, já que a diminuição de 10% do peso corporal leva à uma diminuição de mais de 50% nos níveis de leptina plasmática mostrando que, além da adiposidade corporal, outros fatores estão envolvidos na regulação de sua produção (Romero & Zanesco, 2006). A Figura 6 esquematiza a relação e o conjunto de eventos que, a partir do tecido

adiposo, constituem – com participação do SRAA – elementos fisiopatogênicos centrais na gênese da hipertensão associada à obesidade (Francischetti & Genelhu, 2007).

Os adipócitos do tecido marrom (Figura 5) são de tamanho menor, as gotas citoplasmáticas de gordura são menores e apresentam um elevado número de mitocôndrias, organelas relacionadas com a intensa utilização de glicose e lipídeos para a dissipação de calor como resultado do efeito de sua única proteína, a proteína desacoplador 1 (UCP1). Desempenham, portanto, um papel central na regulação da termogênese (Cannon & Nedergaard, 2004; Ricquier, 2005), função favorecida por sua distribuição multilocular (Giordano *et al.*, 2014). Os adipócitos bege apresentam características morfológicas intermediárias entre os brancos e os marrons (Figura 5) e, durante muito tempo, se aceitou que derivavam dos primeiros. Todavia, estudos de expressão gênica demonstraram que eles constituem células termogênicas especiais (II). Em relação aos adipócitos cor de rosa, eles também derivam de adipócitos brancos e são típicos da glândula mamária durante a gestação e a lactação, desempenhando uma função central tanto na alveologênese quanto na própria formação do leite (Giordano *et al.*, 2014).

1.5. Alterações nas funções do tecido adiposo que coexistem com seu acúmulo e que repercutem em outros sistemas.

O problema da obesidade e de suas comorbidades (especialmente a hipertensão arterial) não está unicamente no aumento do tecido adiposo. Desempenha um papel importante o desequilíbrio na liberação de adipocitocinas (Prado *et al.*, 2009) e a alteração de processos que estas modulam. Por exemplo, o aumento de secreção de leptina promove também o aumento da atividade simpática (Benatti & Lancha Junior, 2007) como também acima mencionado (Hall *et al.*, 2015) (Figura 4). Altos níveis de leptina provocam aumento do tônus simpático no tecido renal (com diminuição do fluxo sanguíneo) e também na glândula suprarrenal e no coração, ativação que somada levam ao aumento progressivo da retenção de Na⁺ que contribuem para o estabelecimento progressivo de hipertensão arterial (Marchi-Alves *et al.*, 2010). No hipotálamo, para além de efeitos na saciedade, as ações da leptina ao nível do núcleo ventromedial provocam ativação do sistema nervoso simpático como um todo, contri-

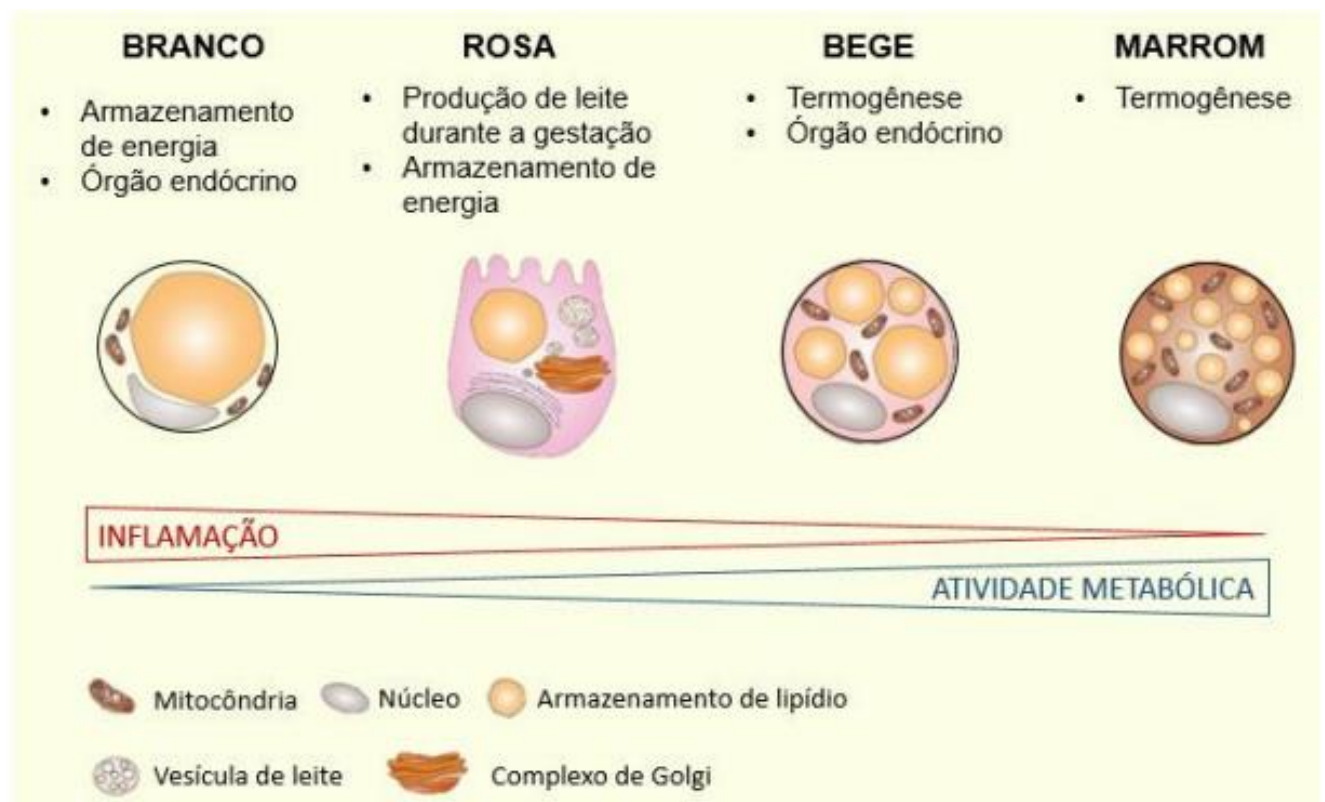


Figura 5. Diferenças morfológicas entre os quatro tipos de adipócitos (branco, bege, marrom e rosa). O painel da direita mostra componentes intracelulares cuja presença e abundância determinam a morfologia de cada tipo de adipócito. (Modificado de Corrêa *et al.*, 2019), com permissão.

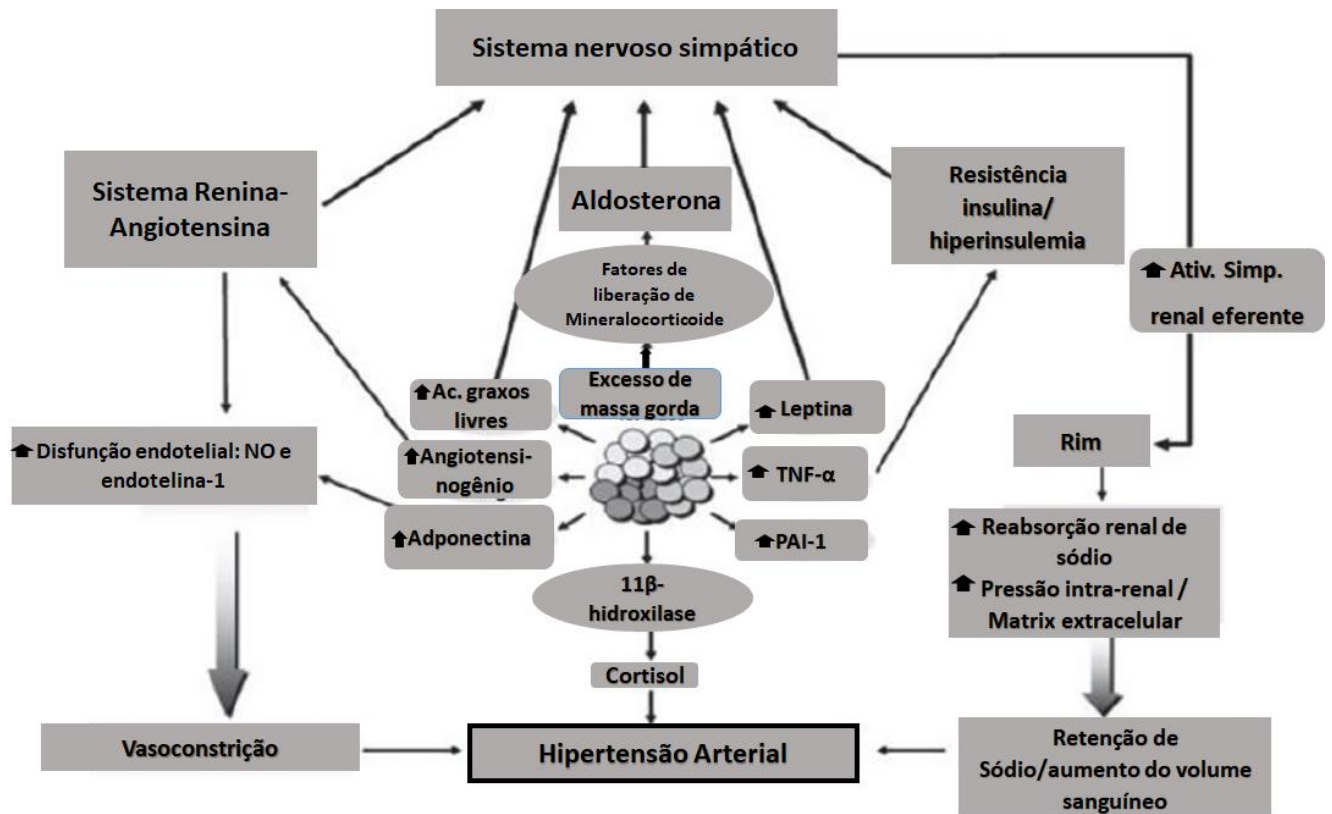


Figura 6. Mecanismos pró-hipertensivos associados à obesidade. Leptina, angiotensina e ácidos graxos livres aumentam a atividade simpática e hipotalâmica. A aldosterona pode aumentar a pressão arterial em quadros de obesidade, agindo sobre receptores de mineralocorticoides localizados no cérebro, rim e sistema vascular (Adaptado de Francischetti & Genelhu, 2007), reproduzido com permissão.

buindo para a gênese do quadro hipertensivo.

O SRAA também é afetado pela obesidade, estando diretamente relacionado ao estabelecimento da hipertensão arterial. Com o aumento da atividade simpática ocorre também o aumento da atividade do SRAA que vai estimular a reabsorção de Na^+ nos túbulos renais e a contração do músculo liso localizado nos vasos sanguíneos, respostas que resultam do estímulo do eixo Angiotensina II→receptores de angiotensina II do tipo 1 ($\text{Ang II} \rightarrow \text{AT}_1\text{R}$) (Figura 6) (Francischetti & Genelhu, 2007). A aldosterona é também um importante componente deste sistema contribuindo para o aumento da pressão arterial na obesidade a partir de sua ação em receptores para mineralocorticoides (MR) localizados no rim, no sistema vascular e no cérebro (Rahmouni *et al.*, 2005). Adicionalmente, o sobrepeso e a obesidade, especialmente a obesidade hipertrófica, estão frequentemente associadas com o aumento de níveis plasmáticos de aldosterona (Goodfriend *et al.*, 2004). Diferentes mecanismos são propostos para explicar a relação entre sobrepeso e aumento da aldosterona plasmática (Andrew *et al.*, 2005). Evidências sugerem que produtos secretados pelos adipócitos (leptina, IL-6, $\text{TNF-}\alpha$) estimulam a esteroidogênese em células adrenocorticais, aumentando significativamente a secreção de aldosterona (Ehrhart-Bornstein *et al.*, 2003).

1.6. O papel do SRAA na hipertensão associada ao excesso de peso.

O SRAA, esquematizado na Figura 7 (Holappa, 2020), é uma complexa rede com vários braços que envolvem diferentes moléculas, enzimas e vias. Destacaremos nesta tese, com foco no contexto da obesidade, o peptídeo central, a angiotensina II (Ang II) e os principais receptores desta, os receptores do tipo 1 e 2 (AT_1R e AT_2R). E, no mesmo contexto, peptídeos menores que antagonizam os efeitos de Ang II , com destaque para a Ang-(3-4) (Dias *et al.*, 2017), estudada em tese de doutorado do BIOTRANS defendida 2 anos atrás (Luzes, 2020; Luzes *et al.*, 2021).

Em obesos hipertensos é observado um aumento do angiotensinogênio circulante, da atividade plasmática da renina e da enzima conversora da angiotensina (ECA) (Umemura *et al.*, 1997), o que demonstra a existência de um SRAA hiperativo com produção aumentada de Ang II . Como a Ang II exerce papel autócrino, parácrino e endócrino modulando a reabsorção de íons – como Na^+ e Ca^{2+} – em túbulos renais (Axelband *et al.*, 2009a, 2009b, 2012; Silva *et al.*, 2014; Hall *et al.*, 2015), é evidente

que ela desempenha um papel central nos processos renais envolvidos na gênese de hipertensão arterial associada ao sobrepeso/obesidade, conjuntamente com o efeito vasoconstritor generalizado. O importante papel da Ang II na hipertensão associada à obesidade se tornou claro quase 30 anos atrás, quando se demonstrou que pacientes e cães obesos tratados com um inibidor da ECA, apresentavam menor retenção de Na^+ e redução da pressão arterial (Robles *et al.*, 1993; Reisin *et al.*, 1997).

Além dos efeitos clássicos da Ang II na reabsorção de íons em túbulos proximais renais e em outros órgãos, merecem destaque também os de outros peptídeos menores provenientes da proteólise da Ang II, como a Ang-(1–7), a Ang-(3–4) e outros, que ocorrem a partir da sua interação com os receptores AT_1R , AT_2R e Mas (Santos *et al.*, 2003; Axelband *et al.*, 2009a, 2009b, 2012; Dias *et al.*, 2014, 2017; Santos, 2014), ativando vias de sinalização celular com diferentes componentes e alvos, às vezes com efeitos antagônicos. Esta diversidade e estes antagonismos permitem caracterizar pelo menos 3 braços (eixos) interatuantes no SRAA: Ang II→ AT_1R , Ang II→ AT_2R e Ang-(1–7)→Mas (Santos *et al.*, 2003; Ferrario & Varagic, 2010), com a Ang-(3–4) exercendo um papel de ativador alostérico do eixo Ang II→ AT_2R (Axelband *et al.*, 2012).

Muita dessa diversidade de componentes, alvos e efeitos (Figura 7) se encontra ao nível de processos cardiovasculares e de transporte renal. Os AT_1R , quando estimulados por Ang II, ativam vias de sinalização que envolvem PKC (Rangel *et al.*, 2005), que aumentam a atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ e da $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ em túbulos proximais, como recentemente demonstrado na obesidade (Luzes *et al.*, 2021). A hiperatividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ de células tubulares renais encontrada *in vitro* é considerada indicadora da existência de aumento na reabsorção de Na^+ *in vivo* (Therien & Blostein, 2000) e, portanto de fluído, contribuindo desta forma para a expansão dos compartimentos líquidos do organismo. Com relação ao estímulo de AT_2R por Ang II, a maioria das ações descritas refletem um contrabalanço dos efeitos mediados por AT_1R (Miura *et al.*, 2010) e ocorrem com ativação da proteína kinase A (PKA) (za *et al.*, 2004). Todavia, há exemplos de efeitos que resultam da ativação de ambas classes de receptores, como a inibição da $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ de membrana plasmática de túbulos proximais, envolvendo mecanismos de heterodimerização↔dissociação de AT_1R e AT_2R , bem como interações entre as vias de PKC e PKA (Axelband *et al.*, 2009, 2012; Dias *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014).

O SRAA foi descrito durante quase um século como um sistema circulante, tendo Ang II (10 aminoácidos) como sua molécula central, formada a partir da proteólise limitada (remoção de 2 aminoácidos da região N-terminal) da Ang I numa reação catalisada pela ECA. E a Ang I considerada apenas como o substrato circulante para a formação de Ang II após a etapa inicial da clivagem do angiotensinogênio secretado pelo fígado pela renina secretada pelas células justaglomerulares renais (cf. Basso & Terragno, 2001). Assim, por muitos anos, a Ang II era a molécula circulante do SRAA capaz de modular variados processos em diferentes órgãos e tecidos (Ménard, 1993). Esta visão mudou pouco mais de 20 anos atrás, quando passou a ser demonstrada a existência de SRAA completos em diferentes órgãos e tecidos, denominados “SRAA locais” (Dzau, 1988; Gomez *et al.*, 1988; Resende & Mill, 2002; Martelli, 2010). Os componentes do SRAA mostrados na Figura 7 têm sido encontrados ao longo dos anos recentes na maioria dos órgãos e tecidos em condições fisiológicas e patológicas, com variada superposição entre ambos os sistemas (Campbell, 2014; Ferrario *et al.*, 2021).

Como exemplo, devido a essa síntese local, os níveis de Ang II são muito mais elevados no rim do que no plasma (Seikaly *et al.*, 1990; Navar *et al.*, 1994), sendo encontrados no líquido do túbulo proximal na faixa nanomolar (Braam *et al.*, 1993; Seikaly *et al.*, 1990; Hiranyachattada & Harris, 2004). No fluido luminal, a Ang II não é apenas derivada do filtrado, mas também é secretada no lúmen pelas células do túbulo proximal (Navar *et al.*, 1994). Alternativamente, o angiotensinogênio ou a Ang I podem ser secretados no túbulo proximal e convertidos em Ang II pela ECA da borda em escova (Navar *et al.*, 1994; Darby & Sernia, 1995; Lalouel *et al.*, 2001), indicando que os efeitos luminiais de Ang II são tão importantes quanto seus efeitos intersticiais. A Ang II, os AT₁R e os AT₂R também são expressos em outras estruturas do néfron, incluindo as membranas das células do túbulo proximal (Sharma *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999). A hiperatividade dos SRAA locais é considerada central em processos fisiopatológicos que culminam com hipertensão arterial, como demonstrado em nosso laboratório em ratos espontaneamente hipertensos (Dias *et al.*, 2014) e obesos (Luzes *et al.*, 2021).

Entre outras funções, no contexto desta tese, a Ang II local desempenha um papel central no transporte renal de Ca²⁺, um dos principais mensageiros celulares, tanto ao nível do seu transporte mediado pela Ca²⁺-ATPase do retículo endoplasmático (SERCA) (Ferrão *et al.*, 2010), quanto ao nível de sua parcela (10–20%) de transporte

transepitelial pela rota transcelular (Edwards & Bonny, 2018) que é mediado pela Ca^{2+} -ATPase da membrana basolateral (dependente também de Mg^{2+} ; ver adiante seção 1.8) (PMCA) (Vieyra *et al.*, 1986), que corresponde a aproximadamente 0,5% das proteínas residentes nesta membrana. Por sua vez, as flutuações de Ca^{2+} citossólico – picos e ondas que podem ser consideradas como resultantes da catálise combinada destas duas Ca^{2+} -ATPases – desempenham um relevante papel na regulação do transporte transtubular de fluído (Férraille & Doucet, 2001; Ferrão *et al.*, 2012; Capasso *et al.*, 2013).

1.7. Néfron.

O rim é um órgão central para a homeostasia dos compartimentos líquidos do organismo, visto que ele responde de maneira específica a alterações de volume e composição do meio interno, assegurando a preservação da integridade funcional dos diferentes tecidos, órgãos e sistemas do organismo (Guyton & Hall, 2002). Muitas dessas respostas são especificamente moduladas por hormônios produzidos pelo próprio rim ou advindos da corrente sanguínea (Katz & Lindheimer, 1977).

O rim exerce um papel essencial na manutenção do equilíbrio eletrolítico e hídrico corporal e na regulação da pressão arterial, através de processos que ocorrem nos diferentes segmentos dos néfrons (Zhuo & Li, 2013). O néfron é a unidade funcional dos rins, responsável pelos processos de filtração, reabsorção e secreção. Cada rim humano contém cerca de um milhão de néfrons (Guyton & Hall, 2002). Esta estrutura é formada por glomérulo, um emaranhado de capilares envolvidos pela cápsula de Bowman e continua com um extenso segmento tubular, formado por uma única camada de células epiteliais, até chegar ao ureter. Cada segmento tubular apresenta um tipo de célula epitelial diferente resultando numa função característica e específica de transporte de solutos e água (Guyton & Hall, 2002). Estes segmentos são divididos, de acordo com o tipo celular predominante (do ponto de vista estrutural e funcional), em túbulo proximal, alça de Henle, túbulo distal e ducto coletor (Figura 8), com subdivisões como as descritas para as partes contornada e reta do túbulo proximal, da alça de Henle e do túbulo distal.

A reabsorção e a secreção dos vários solutos através do epitélio renal são feitas

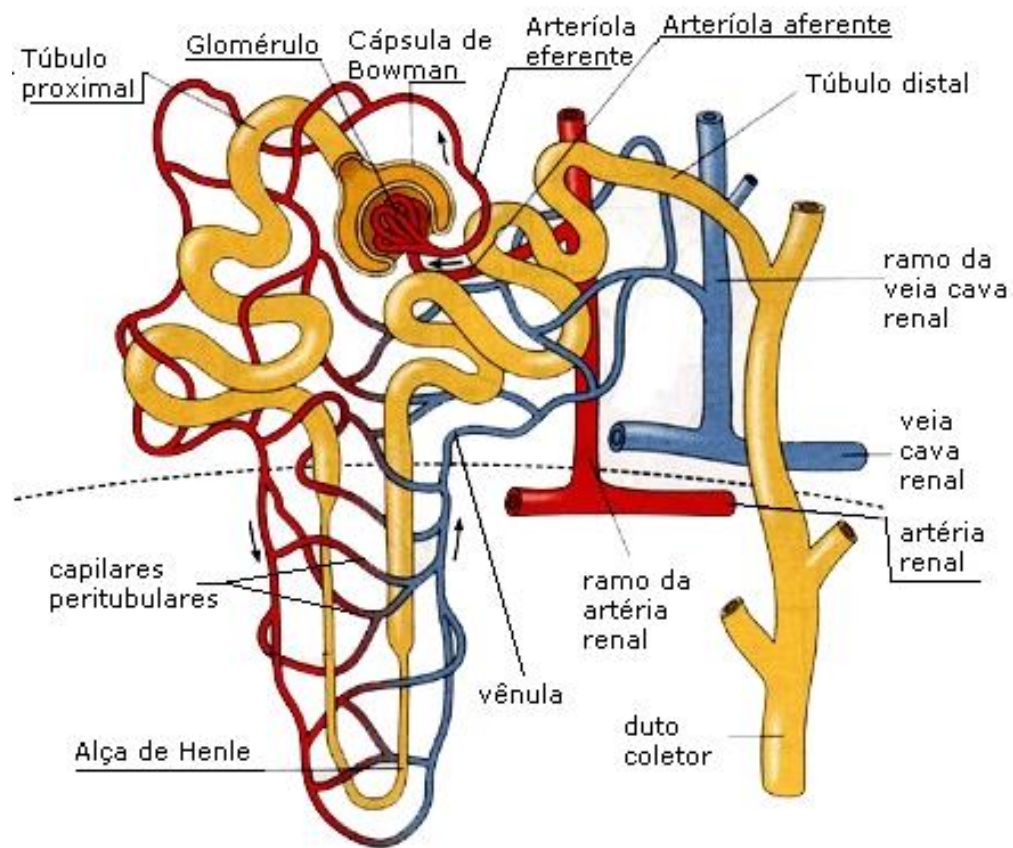


Figura 8. Ilustração do néfron. O néfron é composto pelo glomérulo, o túbulo proximal (segmento que fornecerá as membranas estudadas nesta tese), a alça de Henle e os segmentos distais (túbulo distal e duto coletor). Cada rim é composto por mais de 1 milhão de néfrons (pouco mais de 1,2 milhões nos rins humanos). Figura retirada do website: <https://www.infoescola.com/anatomia-humana/nefron/> (acessada em 19 de julho de 2022).

por mecanismos específicos, passivos ou ativos, localizados nas membranas luminal e basolateral das células tubulares. Todos os sistemas de transporte são interdependentes (Aires, 2018); por isso, as células dos túbulos renais apresentam canais iônicos, carreadores, trocadores, cotransportadores e ATPases para realizar o transporte dos diversos solutos.

No túbulo proximal (segmento do néfron que será focado nesta Tese), ocorre uma alta reabsorção de solutos filtrados que, na sua maior parte, estão interligados à reabsorção do Na^+ , como a glicose e os diferentes aminoácidos. Há também uma importante secreção de H^+ , funcionalmente acoplada à reabsorção de HCO_3^- . Aproximadamente dois terços da carga de Na^+ filtrada é reabsorvida neste segmento do néfron através das vias transcelular e paracelular. O transporte transcelular de Na^+ é ativo e mediado pela $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ sensível à ouabaína e pela $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ resistente à ouabaína, que localizadas na membrana basolateral (Aires, 2018).

1.8. Os papéis dos íons Mg^{2+} e Ca^{2+} em processos que dependem da energia liberada durante a hidrólise de ATP: as antigas e as novas ATPases.

Recebem o nome de ATPases as enzimas que catalisam a hidrólise de ATP (uma reação química exergônica), acoplando-a a variados processos endergônicos celulares. Desde a descoberta da $(\text{Na}^++\text{K}^+)\text{ATPase}$ (Skou, 1957) e da $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ do retículo sarcoplasmático (Hasselbach & Makinose, 1962), e durante várias décadas, as ATPases foram consideradas maquinarias moleculares de transporte de íons, num espectro que incluía espécies variadas, desde H^+ (como espécie única ou em troca por K^+) até metais pesados como o Cu^{2+} , passando por fosfolipídeos (Asano *et al.*, 1992; Dunbar & Kaplan, 2001; Lowe *et al.*, 2004; Tsuda & Toyoshima, 2009; Vitavska *et al.*, 2011; Tadini-Buoninsegni *et al.*, 2019). Diversas também na sua estrutura, na organização supramolecular e nos mecanismos de catálise, as ATPases apresentam duas propriedades em comum e relacionadas: o íon Mg^{2+} é requerido durante a catálise, e o verdadeiro substrato é o complexo MgATP com diferentes estequiometrias e cargas, dependendo essencialmente do pH do meio que governa a proporção de espécies da molécula de ATP com cargas elétricas diferentes (Clausen *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2009). Para além de participar da catálise de processos de hidrólise mediados por ATPases formando um complexo com a molécula de ATP, sítios de

ligação de Mg^{2+} livre também foram demonstrados em estudos estruturais (Laursen *et al.*, 2008) e cinéticos (Brooker & Slayman, 1982).

Central no presente trabalho de tese é a Ca^{2+} -ATPase que se encontra na membrana do retículo endoplasmático (retículo sarcoplasmático em células musculares), conhecida através da abreviação SERCA. Ela transporta 2 Ca^{2+} do citoplasma para o lúmen reticular em troca por 2 H^+ em cada ciclo de hidrólise de uma molécula de ATP, pertencendo à família das P-ATPases, *i.e.* as ATPases que formam um intermediário fosforilado transitório durante a catálise (de Meis, 2012), resultado da ligação covalente entre um conservado resíduo de ácido aspártico e a fosforila γ -terminal transferida pela molécula de ATP. A atividade desta ATPase, tanto em células musculares quanto não musculares (como as dos túbulos renais) é inibida especificamente, de maneira não competitiva, pela tapsigargina, um sesquiterpeno isolado das raízes e frutos da planta mediterrânea *Thapsia garganica*. Esta propriedade permite, em frações celulares contendo diferentes ATPases transportadoras e não transportadoras, definir operacionalmente a atividade da SERCA como aquela atividade ATPásica que é *“inibida por tapsigargina na presença de concentrações micromolares de Ca^{2+} livre e de $MgCl_2$ em concentrações suficientes para que todo o ATP se encontre na forma de complexo $MgATP$ coexistindo com concentrações submilimolares de Mg^{2+} livre”*.

A SERCA está constituída por uma única cadeia polipeptídica de ~100 kDa, na qual é possível distinguir 10 domínios transmembrana (4 deles envolvidos na ligação, transporte e liberação dos íons Ca^{2+}) e 3 grandes domínios citossólicos com papéis bem definidos na catálise. São estes o domínio *N* de ligação do nucleotídeo (complexo $MgATP$); o domínio *P* de fosforilação por ATP que contem o resíduo de ácido aspártico que se autofosforila na altamente conservada sequência DKTGT; e o domínio atuador *A* responsável pela atividade fosfatásica que cliva a ligação acilfosfato levando à liberação do ortofosfato (P_i) (Kühlbrandt, 2004). Neste último domínio, a sequência TGE coordena a molécula de água (Clausen *et al.*, 2004). O correto enovelamento da proteína, o posicionamento relativo dos domínios funcionais de maneira apropriada na estrutura tridimensional, e a sequência coordenada dos movimentos intramoleculares de longo alcance que permitem mudanças nesse posicionamento constituem requisitos fundamentais para a catálise. A Figura 9 (esquematiza estes domínios e seus

movimentos durante a catálise para uma P-ATPase – que podem ser aplicados à SERCA – onde X^+ e Y^+ representam as espécies iônicas contratransportadas (Ca^{2+} e H^+ neste caso) (Kühlbrandt, 2004). A Figura 10 (Aguayo-Ortiz & Espinoza-Fonseca, 2020) mostra, nos seus 3 painéis, a estrutura terciária da SERCA, os domínios de ligação dos íons Ca^{2+} e o ciclo de catálise descrito inicialmente para a $(Na^+ + K^+)ATPase$ e conhecido como ciclo de Post-Albers (Post *et al.*, 1960; Albers, 1967), refinado para a SERCA por de Meis ao longo de quase 40 anos (ver por exemplo Carvalho *et al.*, 1976; de Meis, 2012).

Para além das ATPases transportadoras, outro conjunto de ATPases passou, nos últimos anos, a ser reconhecido em praticamente todos os organismos: o das chamadas “*ATPases Associated with Diverse Cellular Activities*” (no original na língua inglesa) ou proteínas AAA+, mais de 200 em seres humanos (Ye *et al.*, 2021). Em comum com as ATPases transportadoras, (i) elas acoplam a hidrólise exergônica do ATP com processos altamente endergônicos, (ii) têm o íon Mg^{2+} como cofator obrigatório. Como grande diferença, os processos que energizam são os mais diversos, embora todos ou quase todos eles estejam relacionados com processos de remodelamento de substratos em diferentes compartimentos intracelulares como mitocôndrias e retículo endoplasmático, garantindo o “controle da qualidade de proteínas” (Puchades *et al.*, 2020). Na base do seu mecanismo molecular de catálise encontra-se a conversão da energia da ligação química da molécula de ATP em forças mecânicas intracelulares capazes de modificar, por exemplo, o enovelamento de proteínas ou de remover moléculas de membranas (Puchades *et al.*, 2020; Ye *et al.*, 2021). Três processos podem servir de exemplo no contexto desta tese. Primeiro, a antiga observação de Lafont *et al.* (1994), mostrando a dinâmica do transporte intraepitelial de vesículas entre as membranas apical e basolateral e vice-versa. Segundo, a observação mais recente (Liu & Ye, 2012) de que estes motores moleculares, representados pelas proteínas AAA+, são os que controlam que somente proteínas adequadamente enoveladas emigrem do retículo endoplasmático ou se insiram na membrana desta organela. Como outro exemplo de catálise por um integrante desta superfamília de ATPases mencionamos a chaperona molecular Hsp104. Esta desempenha, com sua atividade de desgregase, um papel central na homeostasia subcelular, resolubilizando ou remodelando agregados proteicos (Sathyanayanan *et al.*, 2020). Torna-se evidente que a apropriada catálise pela SERCA

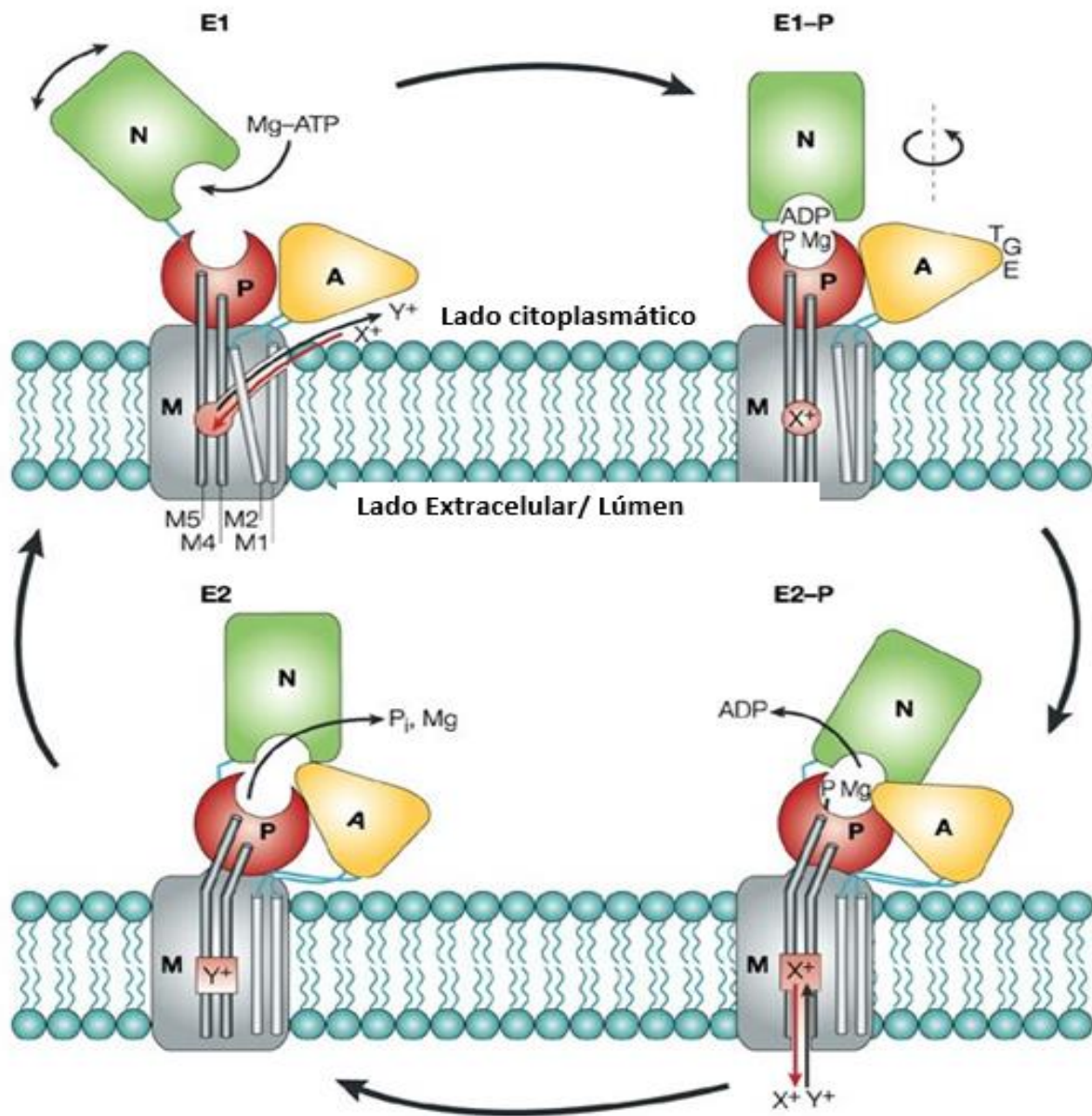


Figura 9. Domínios das P-ATPases. Representação esquemática dos domínios funcionais de P-ATPases, de suas mudanças conformacionais e de seus movimentos durante a catálise. Para abreviações, ver texto. Modificado de Kühlbrandt (2004), com permissão. Adaptada de Valverde (2007).

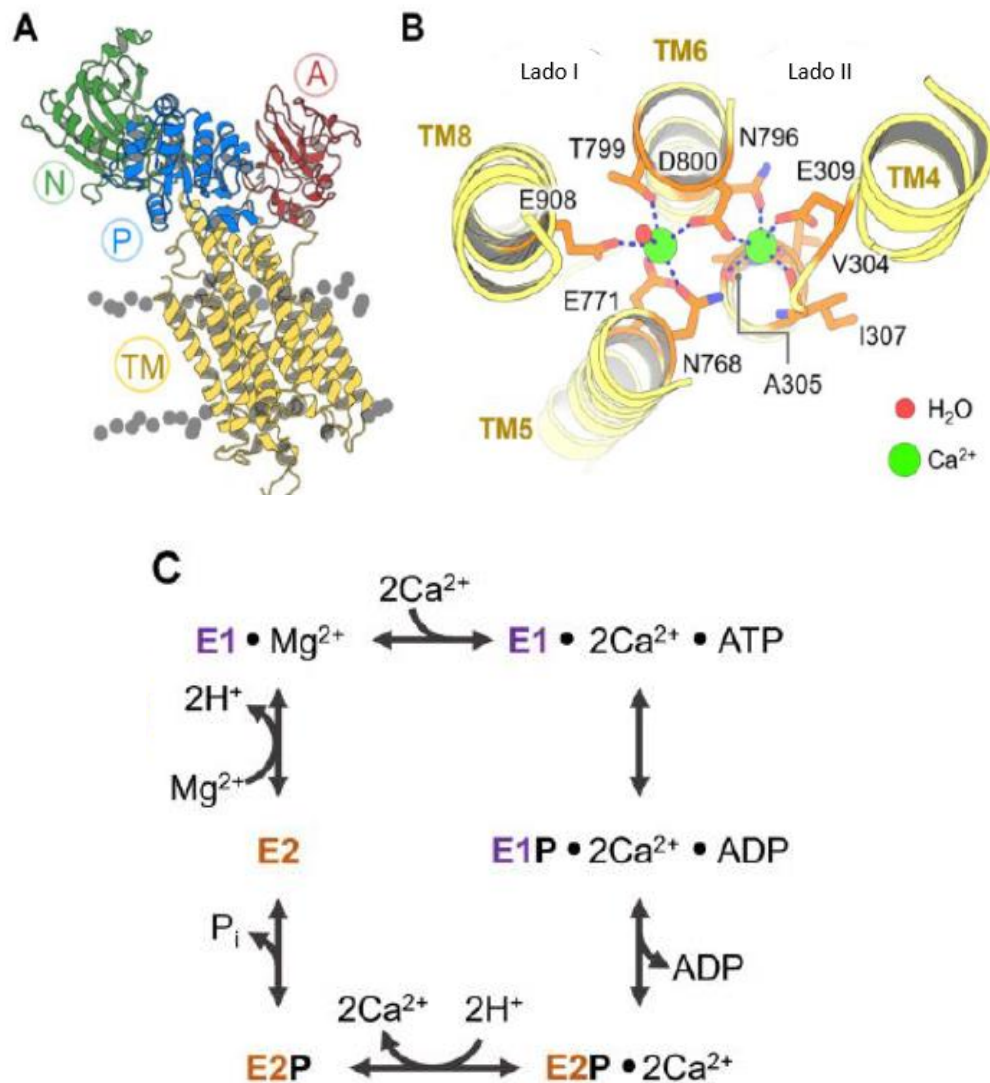


Figura 10. Estrutura terciária da SERCA. **A:** Os domínios transmembrana (TM), N, P e A estão identificados em cores diferentes. **B:** Ligação dos íons Ca^{2+} (círculos verdes) mostrando aminoácidos chave nos quatro domínios TM e coordenação de uma molécula de água (círculo vermelho). **C:** Modelo proposto para a sequência de reações no ciclo catalítico da SERCA. O ciclo se inicia com a ligação com alta afinidade, pelo lado citossólico, dos 2 Ca^{2+} na conformação E_1 da ATPase já com o ATP ligado ($\text{E}_1\text{.ATP}$). Os Ca^{2+} são ocluídos após formação do intermediário de alta energia $2\text{CaE}_1\sim\text{P}$ que a seguir transita para a conformação de baixa energia $2\text{CaE}_2\sim\text{P}$ com diminuição da afinidade da enzima pelo Ca^{2+} que, exposto para o lúmen do retículo, se dissocia da ATPase na etapa seguinte. O intermediário fosforilado de baixa energia $\text{E}_2\sim\text{P}$ é hidrolisado na etapa seguinte, com liberação de P_i para o citosol. A enzima defosforilada E_2 liga ATP com baixa afinidade no domínio N transitando para a conformação $\text{E}_1\text{.ATP}$, reiniciando-se assim o ciclo. Reproduzido de Aguayo-Ortiz & Espinoza-Fonseca (2020) (com permissão).

ilustrada nas Figuras 9 e 10 depende da existência de um “controle de qualidade” (Puchades *et al.*, 2020) que assegure um adequado enovelamento e uma adequada inserção desta ATPase transportadora na membrana do retículo.

Ao longo desses mais de 30 anos, os mecanismos subjacentes às atividades tão diversas das proteínas da superfamília AAA+ permaneceram pouco conhecidos e controversos (Puchades *et al.*, 2020). Mas os recentes avanços da criomicroscopia eletrônica (Cressey & Callaway, 2017), permitindo a determinação de estruturas com alta resolução de proteínas AAA+ durante o processamento/remodelamento de substratos tornaram possível propor mecanismos centrais de catálise para ATPases dos diferentes grupos da superfamília estudadas com esta abordagem (I, II, grupo da protease mitocondrial AAA+ e grupo do proteasoma citossólico AAA+) (Puchades *et al.*, 2020) (Figura 11A). Mais recentemente, a análise de resultados obtidos com a mesma abordagem permitiu propor um mecanismo simplificado de catálise com etapas cinéticas e componentes que seriam comuns a todas as proteínas AAA+, tomando como modelo o ciclo proposto para a Hsp104 acima mencionado (Ye *et al.*, 2021) (Figura 11B). Em ambos os modelos desempenham um papel central as sequências de aminoácidos com estruturas tridimensionais altamente conservadas, conhecidas como domínios A e B de Walker (Walker *et al.*, 1982). Com localizações intracelulares diferentes e com substratos também diferentes, as etapas de ligação de ATP, hidrólise de ATP e liberação de ADP, envolvendo os diferentes protômeros do hexágono (Figura 11A), seriam semelhantes. No caso específico da Hsp104 ATPase, a acentuada diferença entre as velocidades de hidrólise de ATP e dissociação de ADP (Figura 11B) permitiu detectar um possível mecanismo de autoajuste de forças variáveis de translocação (no estado “aberto” ao nível do NBD1; “fechado” no NBD2) que seriam específicas para esta AAA+ (Ye *et al.*, 2021). Especificidades nos mecanismos de catálise de uma reação comum ($\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$) poderiam assim explicar sua adequação a tão diferentes processos biológicos.

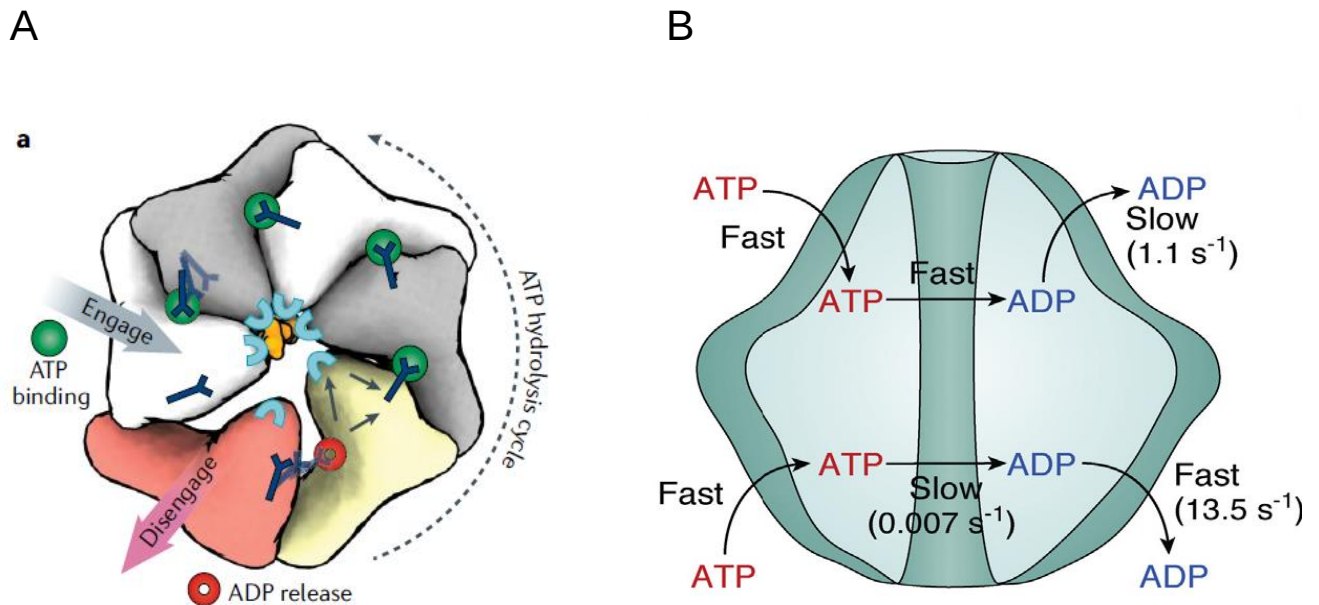


Figura 11. Catálise por proteínas AAA+. **A: Ciclo de hidrólise de ATP por uma proteína AAA+.** Representação da estrutura hexamérica com o poro (canal) central onde se liga o substrato específico (representado em amarelo). Após a ligação do ATP ocorre o processo de empacotamento hidrofóbico intersubunidades (“engajamento”) que permite a transmissão de interações alostéricas entre as subunidades (setas finas) e a interação sucessiva do ATP com elas em sentido anti-horário (nos protômeros brancos e cinzas) até que a hidrólise ocorre (protômero amarelo) e o ADP se dissocia (protômero rosa), levando a um processo denominado “desengajamento” e ao enfraquecimento do contato intersubunidades com liberação do correspondente produto e reinício do ciclo. A figura mostra os resíduos de arginina (forquilha azuis) e os elementos constituintes do poro central (“pore loop 1” em azul claro). Os resíduos de arginina desempenham um papel central no mecanismo de desestabilização da fosforila γ -terminal do ATP e, portanto, na catálise. Os “pore loops 1” são regiões conservadas do poro que permitem interações alostéricas entre o substrato e as subunidades da AAA+, com um aminoácido aromático (fenilalanina, triptofano, tirosina) desempenhando um papel central na mediação destas interações. Pela perspectiva do esquema, não são aparentes os “pore loops 2”, ricos em resíduos carregados positivamente. Reproduzido de Puchades *et al.* (2020), com permissão. **B:** Diferentes propriedades cinéticas de diferentes domínios de ligação de nucleotídeos (NBD) na AAA+ Hsp104 ATPase. A imagem corresponde a um protômero que apresenta o segmento Walker A do NBD1 na parte superior e o segmento Walker A do NBD2 na parte inferior. O modelo, construído com base em resultados de troca hidrogênio-deutério analisados por espectrometria de massas, mostra que a ligação de ATP em ambos os domínios é rápida (lado esquerdo da figura). Todavia, a hidrólise é rápida ao nível do NBD1 (parte superior no meio da figura) e lenta ao nível do NBD2 (parte inferior no meio da figura). A dissociação do ADP é lenta a partir do NBD1 e rápida a partir do NBD2 (lado direito da imagem). Reproduzido de Ye *et al.* (2021), com permissão.

2. Objetivos.

2.1. Hipótese condutora.

As frações microssomais enriquecidas de membranas, isoladas do *cortex corticis* renal, *i.e.* de túbulos contornados proximais (Whittembury & Proverbio, 1970), apresentam uma alta atividade ATPásica estimulada por concentrações submilimolares e milimolares de MgCl_2 (Vieyra *et al.*, 1986), na presença de altas concentrações de ouabaína (para inibir a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$), furosemida (para inibir a Na^+ -ATPase resistente à ouabaína) e de azida sódica (NaN_3 , para inibir a F_0F_1 -ATP-sintase mitocondrial funcionando no modo reverso). Concentrações micromolares de Ca^{2+} provocam um pequeno estímulo da atividade Mg^{2+} -dependente quando a fração se enriquece de membrana basolateral (atividade que corresponde à denominada Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática, PMCA) (Coelho-Sampaio *et al.*, 1990; Axelband *et al.*, 2009a, b; 2012), indicando que a porcentagem desta atividade constitui apenas uma pequena parcela daquela total medida apenas na presença de Mg^{2+} . Este conjunto de observações, junto com a demonstração de alto fluxo de vesículas intracelulares entre as membranas apical e basolateral modulado por proteínas AAA+ (Lafont *et al.*, 1994), nos levou a formular a hipótese de que, ao menos em grande parte, essa alta atividade Mg^{2+} -ATPásica em túbulos proximais na presença de tapsigargina, poderia corresponder à expressão do funcionamento de um conjunto de proteínas AAA+. Hipótese que se complementa propondo que essa atividade: (a) poderia ser afetada, junto com a da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ e da Na^+ -ATPase de túbulos proximais, como resultado da suprarregulação do eixo $\text{Ang II} \rightarrow \text{AT}_1\text{R}$ local associada ao sobrepeso/obesidade (recentemente descrita pelo laboratório (Luzes *et al.*, 2021)); (b) poderia coexistir também com alterações na atividade da SERCA sensível à tapsigargina, repercutindo nas flutuações citossólicas de Ca^{2+} que modulam a reabsorção proximal de Na^+ ; (c) se constituir, por fim, num dos fatores etiopatogênico centrais da hipertensão associada ao sobrepeso/obesidade (Luzes *et al.*, 2021).

2.2. Objetivo Geral.

Investigar a existência de possíveis modificações induzidas pelo sobrepeso/obesidade em ATPases estimuladas por Mg^{2+} e Ca^{2+} (SERCA, AAA+) presentes em preparações de membrana plasmática de túbulos proximais renais contendo uma proporção residual constante de retículo endoplasmático, lisossomos e

mitocôndrias. A segunda vertente do objetivo geral é a de investigar a possível associação destas alterações no transporte transepitelial de fluído (Na^+ e água), em ratos com sobrepeso e hipertensos que apresentam o SRAA tissular renal suprarregulado.

2.3. Objetivos Específicos.

2.3.1. Avaliar “*in vitro*” modificações na atividade de ATPases ensaiadas na presença de Mg^{2+} e Ca^{2+} , isoladas de túbulos proximais renais de ratos com sobrepeso/obesos e hipertensos submetidos a dieta hiperlipídica, ensaios a serem realizados na ausência e na presença de tapsigargina, o inibidor da SERCA.

2.3.2. Comparar os efeitos de variações nas concentrações de ATP, Mg^{2+} e Ca^{2+} em diferentes combinações, na atividade ATPásica medida na ausência e na presença de tapsigargina.

2.3.3. Estudar a modulação pela Ang-(3–4) da atividade ensaiada na presença de Mg^{2+} e Ca^{2+} na ausência de tapsigargina.

2.3.4. Estudar a modulação pela Ang-(3–4) da atividade ensaiada na presença de Mg^{2+} e Ca^{2+} na presença de tapsigargina, visando obter informações sobre sua influência específica na SERCA.

2.3.5. Investigar alterações “*in vivo*” da reabsorção proximal de fluído em ratos com sobrepeso, correlacionando-as com as possíveis modificações das ATPases de túbulos proximais ensaiadas “*in vitro*” na presença de diferentes concentrações de ATP, Mg^{2+} e Ca^{2+} .

3. Materiais e Métodos.

3.1. Protocolos de experimentação com animais.

Para o desenvolvimento deste projeto foram utilizados ratos Wistar machos, criados no Biotério de Doenças Negligenciadas e Desnutrição do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ Universidade Federal do Rio de Janeiro. Depois do nascimento foram separados em grupos de 8 para cada mãe para que todos tivessem acesso nutricional o mais parecido possível (Light *et al.*, 1998). Todos os machos foram preservados e, se necessário, o número máximo de 8 animais foi completado com fêmeas. No dia 21 de vida foi realizado o desmame e os animais passaram a receber uma dieta comercial padrão para roedores (Neovia), e foram hospedados em gaiolas contendo no máximo 5 animais até o dia 57 de vida. Foram mantidos a temperatura constante ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$), no ciclo padrão claro/escuro (12 h/12 h). No dia 57 foram divididos em dois grupos: (i) controle (CTR; passando a receber a dieta comercial que será descrita na Tabela 1) e (ii) aquele que passou a receber uma dieta rica em lipídeos (HL, abreviação da denominação em língua inglesa). Os animais foram submetidos às intervenções nutricionais diferenciadas do dia 58 até o dia 164 de vida. O tempo em que os ratos receberam as dietas CTR ou HL foi definido com o objetivo de cobrir um período de vida que, em humanos, corresponde ao período de 10 anos entre a infância e o final da adolescência (Quinn, 2005). A metodologia de conversão usada para comparar idade de ratos e idade humana foi considerada apropriada para estudos de alterações no desenvolvimento de ratos obesos (Romannova *et al.*, 2004).

No dia 161 (103^o de experimentação) os animais foram separados aleatoriamente para um primeiro dia de aclimação, agrupados entre aqueles que receberam veículo (água) por gavagem ou 4 doses (80 mg/kg de massa corporal) de Ang-(3–4), gerando-se assim os grupos adicionais: (iii) CTR+Ang-(3–4) e (iv) HL+Ang-(3–4). Os 4 grupos foram individualizados em gaiolas metabólicas para medidas de clearance de Li^{+} e da concentração de creatinina plasmática, fazendo-se ainda o último registro de pressão arterial sistólica (PAS). No dia 164 de vida (106^o de experimentação) foram sacrificados, removendo-se os rins para a obtenção de uma fração microssomal enriquecida de membrana plasmática, contendo 3–5% de mitocôndrias, uma percentagem semelhante de lisossomos, e 8–10% de retículo endoplasmático (Vieyra *et al.*, 1986). Todos os procedimentos envolvendo animais

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

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

*g/100 g de massa seca de ração; **mequiv Na⁺/100 g de ração; ***durante duas diferentes criações. O conteúdo energético foi calculado a partir da composição percentual de carboidratos, lipídeos e proteínas de cada dieta, empregando os valores calóricos médios de 4 kcal/g para carboidratos, 9 kcal/g para lipídeos e 4 kcal/g para proteínas. Modificado de Luzes *et al.* (2021).

foram propostos de acordo com as recomendações sobre o uso de animais em experimentação conforme The Guide for Care and Use of Laboratory Animals (DHHS publicação nº 85–23/NIH revista em 1996, Office of Science and Health Reports, Bethesda, MD) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (protocolo nº 101/16), local onde foram realizados os experimentos. Estes foram organizados atendendo ainda o conjunto de diretrizes incluídas em ARRIVE 2.0 (Percie du Sert *et al.*, 2020).

O grupo CTR, como mencionado acima, teve acesso livre a uma ração contendo 385 kcal/100 g de ração (10% de calorias derivadas de gordura). O grupo HL recebeu uma ração hipercalórica contendo 574 kcal/100 g de ração com 70% destas calorias provenientes de lipídeos (Tabela 1). A ração CTR e a ração HL foram fornecidas pela empresa PRAG Soluções. Ambos os grupos tiveram livre acesso a água filtrada durante toda a criação. Semanalmente tiveram aferida a pressão arterial de cauda e registrada a evolução da massa corporal.

3.2. Preparação da fração microssomal.

Logo após de removidos, os rins foram depositados dentro de uma solução gelada contendo sacarose 250 mM, Hepes-Tris 10 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM, PMSF 1 mM e 0,15 mg/ml de inibidor de tripsina tipo II-S (Sigma-Aldrich). Foram primeiramente cortados com bisturi para obtenção de cortes longitudinais e depois secções finas de aproximadamente 0,5 mm de espessura usando um micrótomo Stadie-Riggs, separando cuidadosamente o *cortex corticis* (segmento mais externo do córtex) com uma tesoura de cirurgia ocular. Após homogeneização utilizando um homogeneizador Potter-Elvehjem na velocidade de 1.700 rpm durante min (operação repetida cinco vezes com intervalos de 1 min), as amostras foram centrifugadas a $1.000 \times g$ por 15 min a 4°C (rotor JA-20, Beckman) para retirada de células não rompidas, núcleos e pequenas frações de tecido não homogeneizado. O sobrenadante foi centrifugado a $15.000 \times g$ por 20 min a 4°C (rotor JA-20, Beckman) para retirada da maior parte das mitocôndrias, permitindo a recuperação final da porcentagem acima mencionada. O sobrenadante foi centrifugado a $35.000 \times g$ a 4°C (rotor 70 Ti, Beckman) e o sedimento foi ressuspensionado em uma solução de sacarose 250 mM. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951). O controle da presença residual de

organelas utilizando marcadores enzimáticos foi realizado como descrito previamente (Vieyra *et al.*, 1986).

3.3. Medida da pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e massa corporal, e processamento de amostras de urina e sangue.

A pressão arterial sistólica (PAS) e a pressão arterial diastólica foram registradas semanalmente por meio de pletismografia de cauda, utilizando o pletismógrafo V3.0 (Insight). Os animais foram colocados em contensores, sem utilização de anestésico, e deixados em um período de aclimação de 10 min em temperatura de 30–32°C. Três medidas foram obtidas com aproximadamente 5 min de intervalo sendo utilizada como valor para análise a média destas medidas. Os animais que foram individualizados em gaiolas metabólicas permaneceram nestas durante um período de aclimação inicial de ~5 h, e a primeira medida de PAS foi realizada 24 h antes de receberem a primeira dose de Ang-(3–4) e depois a cada 12 h, também imediatamente antes de receberem o peptídeo (ou água). A massa corporal foi aferida com uma balança digital (Balnet). Nos momentos que antecedem às medidas, os ratos foram aclimatados em uma câmara térmica (30–32°C) por 5 a 10 min, e os registros somente realizados com os animais sem movimentação.

Amostras de urina dos ratos em gaiolas metabólicas foram coletadas a cada 24 h e armazenadas a -20°C. Amostras de sangue foram coletadas após decapitação utilizando tubos contendo EDTA.Tris suficiente para uma concentração 2,5 mM. Após centrifugação a $17.000 \times g$ durante 5 min, o plasma era armazenado a -20°C. As concentrações de creatinina foram determinadas utilizando um kit comercial (Bioclin) e as de Li^+ por fotometria de chama.

3.4. Determinação das atividades ATPásicas estimuladas por Mg^{2+} e Ca^{2+} na fração microssomal isolada de córtex corticis renal.

Os ensaios de atividade ATPásica (volume de 0,5 ml a 37°C) foram realizados em meios contendo TrisHCl 50 mM (pH 7,0), sacarose 160 mM, NaN_3 10 mM, ouabaína 0,2 mM, EGTA.Tris 1 mM e as concentrações de ATP indicadas nas legendas das figuras. As concentrações de MgCl_2 foram ajustadas para que o nucleotídeo estivesse totalmente na forma de complexos MgATP e, em todas as condições, a concentração de Mg^{2+} livre fosse ~0,6 mM. As concentrações de CaCl_2 e MgCl_2 foram ajustadas para

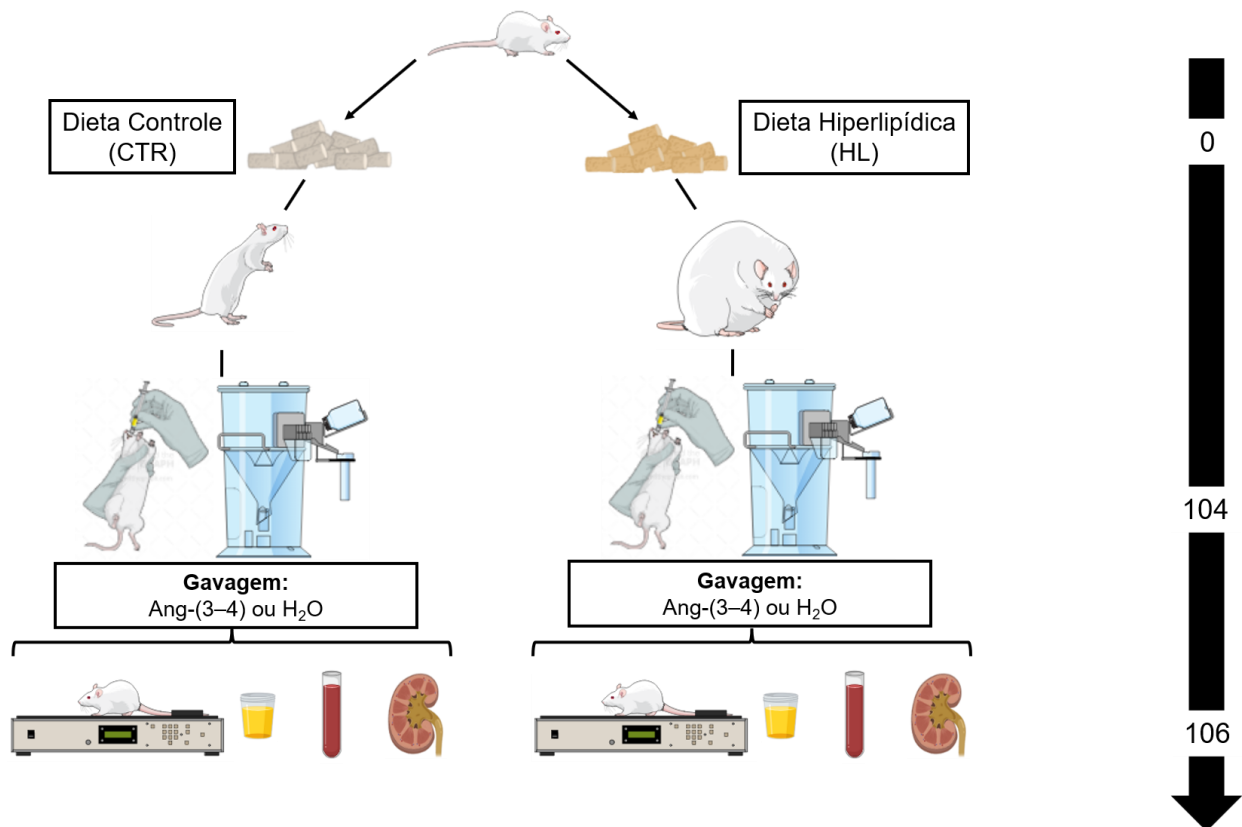


Figura 12. Linha do tempo de administração das dietas CTR e HL e de Ang-(3-4). O esquema apresenta os quatro grupos experimentais: CTR, HL, CTR + Ang-(3-4) e HL + Ang-(3-4). A barra grossa da direita da figura mostra os dias de administração destas dietas até as operações envolvendo os ratos albergados nas gaiolas metabólicas (representada pela figura em azul claro), determinações de PAS e PAD (ratos no pletismógrafo). preparação de frações microssomais renais e coleta de urina (recipiente amarelo) e sangue (tubo com conteúdo vermelho). Adaptado de Luzes et al. (2020).

que as concentrações de Ca^{2+} livre fossem 20 μM ou 100 μM nas combinações com MgATP também descritas em cada figura (ver parágrafo seguinte). A concentração final de proteína microsomal foi de 0,05 mg/ml, pré-incubada – empregando uma alíquota concentrada – durante 20 min a temperatura ambiente na ausência ou na presença de tapsigargina, inibidor da SERCA, também concentrada (quantidade suficiente para uma concentração final de 1 μM no ensaio). A reação era iniciada adicionando ATP e parada 15 min depois acrescentando 0,5 ml de uma suspensão de carvão ativado em HCl 1 N. Após centrifugação durante 10 min $13.000 \times g$, era retirada uma alíquota de 0,5 ml do sobrenadante, imediatamente misturado com o “reagente de cor” contendo molibdato de amônio, H_2SO_4 e FeSO_4 (Tausky & Shorr, 1953) para, depois de 20 min a temperatura ambiente, quantificar a absorbância a 660 nm. A atividade ATPásica ($\text{nmol P}_i \text{ liberado} \times (\text{mg de proteína})^{-1} \times \text{min}^{-1}$) era calculada utilizando uma curva padrão contendo 20–160 nmoles de PiK num volume igual ao do sobrenadante recuperado após de parada a reação. Em alguns ensaios foi utilizada Ang-(3–4) para avaliar, respectivamente, a influência da inibição e ativação dos eixos $\text{Ang II} \rightarrow \text{AT}_1\text{R}$ e $\text{Ang II} \rightarrow \text{AT}_2\text{R}$ do SRAA. A atividade da SERCA correspondeu à parcela da atividade ATPásica total inibida pela tapsigargina. A parcela da atividade total remanescente (resistente à tapsigargina) foi considerada como uma atividade Mg-dependente associada a proteínas AAA+.

A atividade ATPásica (sensível e resistente à tapsigargina no mesmo ensaio) foi medida nas seguintes combinações de concentrações de ATP (na quase totalidade formando complexos com Mg^{2+} onde a forma predominante a pH 7,0 é MgATP^{2-}) e Ca^{2+} (livre): 0,1, 1,1 e 5 mM de ATP; 20 e 100 μM de Ca^{2+} . A concentração de Mg^{2+} (livre) foi mantida em $\sim 0,6$ mM. As concentrações totais de CaCl_2 e MgCl_2 , necessárias para obter as concentrações desejadas de Ca^{2+} e Mg^{2+} foram calculadas utilizando um programa de computador que leva em consideração as diferentes espécies (e as constantes de associação) envolvidas nos equilíbrios entre EGTA, Ca^{2+} , ATP, Mg^{2+} , H^+ e K^+ , assim como a influência da força iônica na constante de associação para o complexo CaEGTA (Sorenson *et al.*, 1980; Sorenson *et al.*, 1990; Assunção-Miranda *et al.*, 2005). Embora o meio não tivesse K^+ adicionado, a concentração contaminante deste cátion foi estimada em 5 mM, com base em determinações prévias usando fotometria de chama. O racional para a utilização das combinações 20 μM de Ca^{2+} +

0,1 mM de ATP, 20 μM de Ca^{2+} 1,1 mM de ATP e 20 μM de Ca^{2+} + 5 mM de ATP foi o de empregar concentrações de Ca^{2+} que, ao longo do ciclo de catálise (Figura 10C), o sítio (domínio) de ligação de Ca^{2+} (Figura 10B) na SERCA alterne (cicle) sucessivamente entre os estados de alta e baixa afinidade. Assim, ele seria ocupado pelo íon no estado de alta e sua dissociação no estado de baixa afinidade. Em relação ao ATP, foram escolhidas concentrações destinadas a permitir a ocupação progressiva do domínio N da SERCA (Figura 9) em estado de baixa afinidade para acelerar a transição $\text{E}_2 + \text{ATP} \rightarrow \text{E}_1 \cdot \text{ATP}$ (Figura 10C). A combinação 100 μM de Ca^{2+} + 5 mM de ATP foi escolhida para investigar o efeito de uma dissociação lenta do Ca^{2+} do seu sítio em estado de baixa afinidade, sem que a transição $\text{E}_2 + \text{ATP} \rightarrow \text{E}_1 \cdot \text{ATP}$ fosse o passo limitante da reação. A concentração de Mg^{2+} livre foi escolhida com base nos dados cinéticos para esta espécie no trabalho de Brooker & Slayman (1982). O racional do desenho experimental em relação às concentrações de espécies para a medida da atividade ATPásica resistente à tapsigargina foi o de investigar o efeito das mesmas variações de espécies iônicas nas proteínas AAA+ em túbulos proximais de animais CTR e HL.

3.5. Clearance de lítio.

O clearance de lítio é considerado um parâmetro que permite avaliar a reabsorção de Na^+ (e fluído) nos túbulos proximais (Thomsen, 1984). Para análise do clearance de lítio foi seguido o protocolo descrito por Costa-Silva *et al.* (2009). Os animais receberam LiCl por gavagem (0,0025 g/100 g MC), após 100 dias de administração das dietas diferenciadas e foram colocados em gaiolas metabólicas por 90 min. Após este tempo receberam H_2O por gavagem (3 ml/100 g MC) e foram novamente recolocados nas gaiolas e, 30 min depois, receberem novamente H_2O (2 ml/100 g MC). Durante 12 h os animais receberam H_2O e não receberam comida e, após este período, foram anestesiados com isoflurano, o sangue foi coletado e as concentrações de Li^+ na urina e no sangue foram determinadas por fotometria de chama.

3.6. Análise de imagens ultrassonográficas.

O texto a seguir reproduz aquele encontrado em Crisóstomo *et al.* (2022). Após 106 dias de exposição às dietas diferenciadas os ratos foram anestesiados com isoflurano e as imagens foram obtidos com o aparelho de ultrassonografia de alta resolução de 20–70 MHz Vevo® 2100 instalado no CENABIO (FUJIFILM VisualSonics)

(Marshall *et al.*, 2012). Foram capturadas imagens da região retroperitoneal superior direita e do lobo direito do fígado, transformadas no formato JPG com 100% de qualidade. O índice hepatorenal foi calculado a partir do tamanho médio das imagens e do brilho em pixels dos dois órgãos, utilizando o software Imagem J (versão 1.4.3.67).

3.7. Análise estatística.

Os resultados estão expressos como médias $\pm$ EPM. Para analisar as diferenças entre as médias de 2 grupos foi realizado o teste *t* de Student e a comparação entre as médias de mais de 2 grupos foi realizada utilizando ANOVA 1 fator, seguida do teste de Bonferroni para pares selecionados. Em todas as análises foi considerado estatisticamente significativo um $P < 0,05$. Os valores de *P* são mostrados nas figuras ou mencionados no texto. Eventuais “outliers” foram removidos quando seus valores diferiam daquele resultante de média ± 3 EPM.

4. Resultados e Discussão.

4.1. Fenótipo dos ratos com sobrepeso. Alterações renais, hepáticas e cardiovasculares: papel dos eixos Ang II→AT₁R e Ang II→AT₂R.

O fenótipo dos ratos alimentados com a dieta HL está caracterizado pelo sobrepeso e pela hipertensão arterial sistólica e diastólica. A Figura 13 mostra que ratos que não tinham diferença de massa corporal aos 57 dias de idade (dia zero de exposição às dietas diferenciadas) evoluíram de forma quantitativamente diferente nos 106 dias seguintes. Aqueles que foram alimentados com a dieta HL apresentaram uma massa corporal 23% maior que aqueles alimentados com a dieta CTR. Este significativo sobrepeso pode ser atribuído a um aumento da massa de gordura visceral na cavidade abdominal, incluindo a existente na região perirenal como recentemente demonstrado em nosso laboratório (Luzes, 2020; Luzes *et al.*, 2021). Do ponto de vista bioquímico, este acúmulo resulta na liberação anormalmente alta de adiponectina e adipocinas inflamatórias como TNF- α , com ativação consequente do sistema nervoso simpático e do SRRA e o estabelecimento progressivo de uma síndrome metabólica (Figura 6), caracterizada por dislipidemia e resistência à insulina (Francischetti & Genelhu, 2007; Luzes, 2020; Luzes *et al.*, 2021). Mais recentemente, demonstramos (Crisóstomo, 2021; Crisóstomo *et al.*, 2022) (ver Anexo 1) um aspecto até então não descrito – até onde chega nosso conhecimento – desta desregulação metabólica resultante da administração prolongada de uma dieta rica em lipídeos. Trata-se do acúmulo considerável de gordura no parênquima hepático (Figura 14) (Crisóstomo, 2021; Crisóstomo *et al.*, 2022), ou seja uma esteatose não alcoólica, a mais frequente doença hepática em todo o mundo (Younossi *et al.*, 2016).

Se as observações anteriores, como as resumidas nas Figuras 4 (Hall *et al.*, 2015) e 6 (Francischetti & Genelhu, 2007), apresentam as evidências que mostram suprarregulação do SRRA resultante do sobrepeso/obesidade com acúmulo de gordura visceral, a Figura 14 contribui com uma observação inédita acerca do efeito da hiperatividade do SRAA no metabolismo lipídico: o da estimulação da hidroximetil-glutaril-CoA sintase (e da etapa comprometida da síntese de colesterol a partir de AcCoA) (Bloch, 1965), possivelmente através de mudanças do estado de fosforilação regulatória das enzimas envolvidas nas diferentes etapas da biossíntese de colesterol

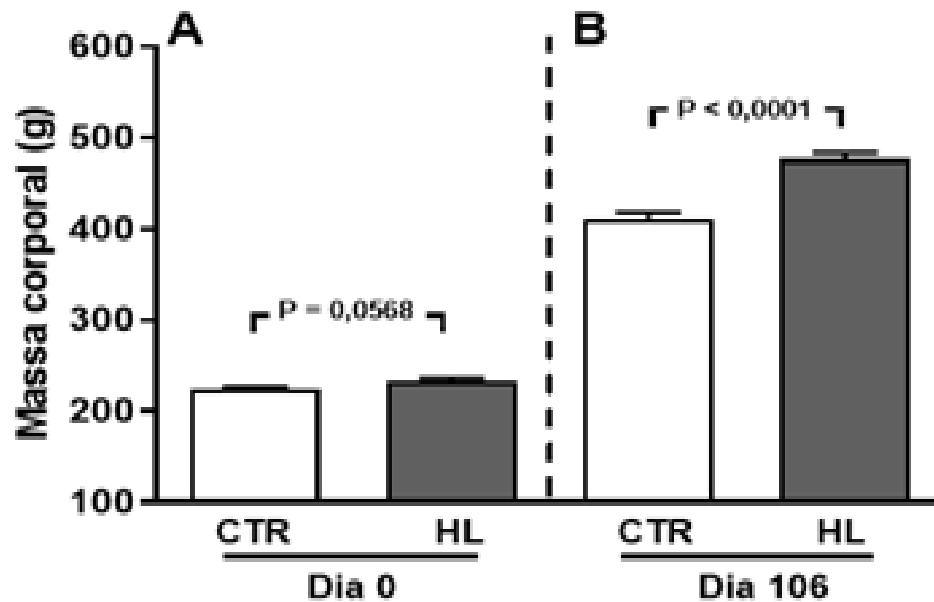


Figura 13. Sobrepeso dos ratos HL depois de 106 dias de consumo da dieta hiperlipídica. **A** e **B**: Massa corporal dos ratos dos grupos CTR e HL (como indicado na *abscissa*) antes e depois da exposição às dietas diferenciadas. A diferença indicada sobre as barras (média $\pm$ EPM, $n = 40$ em cada grupo) foi avaliada pelo teste t de Student não pareado. Modificado de Luzes *et al.* (2021) e Crisóstomo *et al.* (2022), com permissão.

(Scallen, 1983). A ativação da etapa comprometida da via de síntese de colesterol no fígado pode assim fazer parte de um desequilíbrio entre uma acentuada incorporação de AcCoA dos lipídeos da dieta HL, com uma aumentada formação e diminuída exportação de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (Wilson *et al.*, 2016). Na esteatose hepática não alcoólica, a formação e maturação de VLDL no retículo endoplasmático está comprometida como resultado da infraregulação da expressão da Apolipoproteína B100 (apoB100) e da enzima denominada proteína microsomal de transferência de triglicerídeos (MTTP) (Ipsen *et al.*, 2018). A relevância patológica deste desequilíbrio decorre de um aumento da oxidação de lipídeos nas mitocôndrias e nos peroxissomos, com aumento da formação de ROS e início de uma cascata acentuada de dano oxidativo nos hepatócitos (Wilson *et al.*, 2016). Também, esse intenso acúmulo de gordura no parênquima hepático como resultado da ingesta prolongada de uma dieta hiperlipídica que teria como mecanismo molecular central a diminuição da exportação de VLDL, traz luz para uma observação ainda não completamente explicada em nosso laboratório pouco mais de um ano atrás: os ratos com sobrepeso alimentados com a dieta HL apresentavam uma síndrome metabólica com acentuada diminuição dos triglicerídeos plasmáticos (Luzes, 2020; Luzes *et al.*, 2021).

Se há evidências acerca da diminuição da exportação de VLDL na esteatose hepática (Wilson *et al.*, 2016), o aumento na produção de LDL – que possuem um conteúdo mais alto de colesterol (Gotto, 1990; Choi, 2011) – também pode ser proposto, bem como a existência do transtorno bioquímico primário representado por uma suprarregulação da AcCoA carboxilase, enzima que catalisa a formação de malonil-CoA a partir de AcCoA, etapa comprometida na síntese de ácidos graxos (Gregolin *et al.*, 1966). Esta alteração poderia ser também acompanhada por uma acentuada incorporação de triglicerídeos nas VLDL – que transportam mais triglicerídeos que as LDL – contribuindo para o aumento da esteatose. Novamente, alterações em fosforilações regulatórias (Katsurada *et al.*, 1990) poderiam ser afetadas pelo sobrepeso/obesidade, constituindo-se em mecanismos moleculares chave para as alterações estruturais mostradas na Figura 14. A Figura 15, ilustra um conjunto de alterações que culminam com a esteatose hepática não alcoólica, mostrando apenas a participação do colesterol e da proteína B-100 e apontando para o processo central de

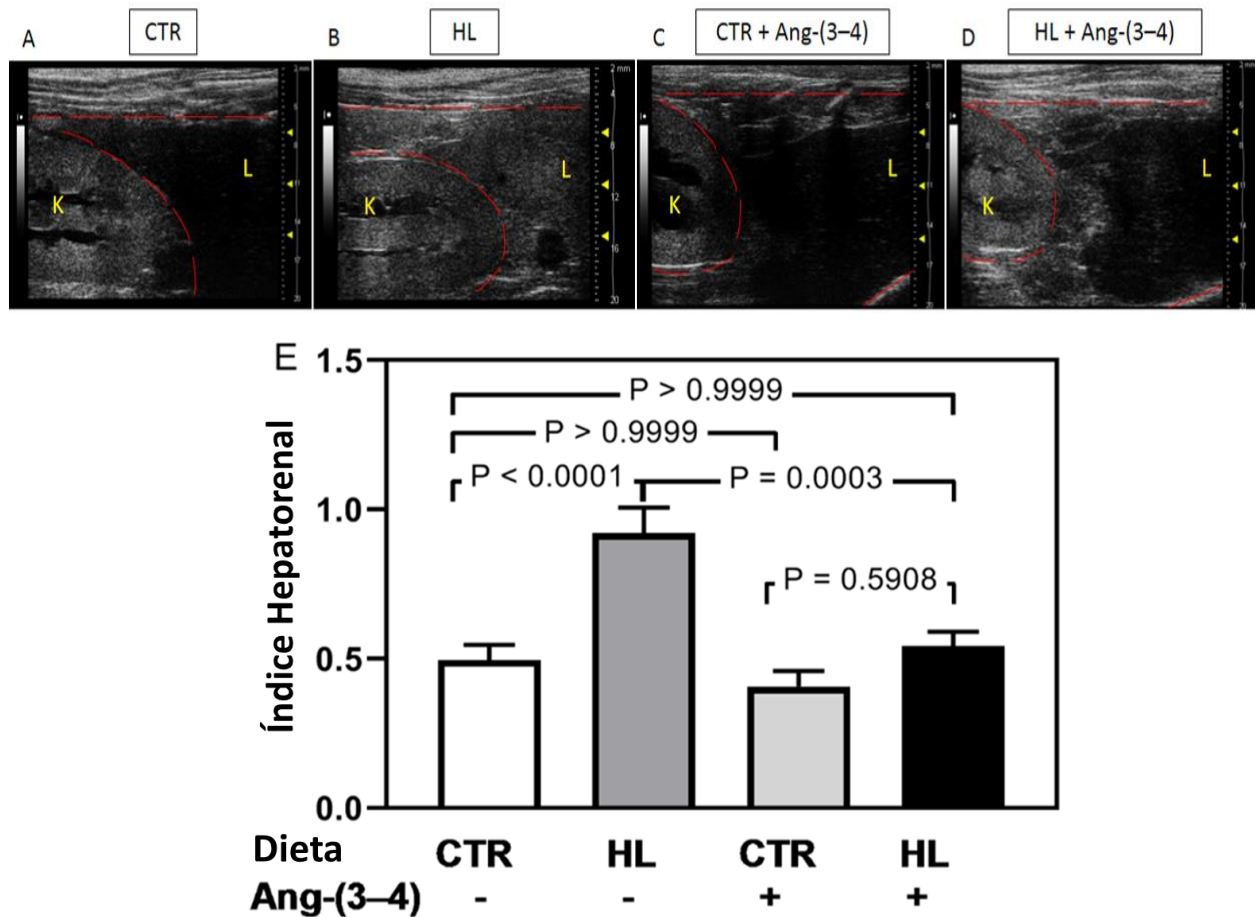


Figura 14. A dieta HL provoca aumento do index hepatorrenal (brilho médio do fígado dividido pelo brilho médio do rim). As imagens representativas mostram a ultrassonografia abdominal de ratos que receberam as dietas CTR e HL (A e B, respectivamente) após 106 dias, e a dos animais CTR e HL que foram tratados com Ang-(3-4), (C e D, respectivamente). Os órgãos estão identificados por suas letras iniciais em inglês: K (rim) e L (fígado). Os gráficos foram construídos a partir dos pixels quantificados no fígado e no cortex do rim, nas áreas delimitadas pelos traços vermelhos nos ratos CTR (n = 17), HL (n = 12), CTR+Ang-(3-4) (n = 12), HL+Ang-(3-4) (n = 14) como descrito na *abscissa* (E). As diferenças foram analisadas usando ANOVA 1 fator seguida do teste de Bonferroni para os pares avaliados (valores de P indicados dentro do painel). Adaptada de Crisóstomo *et al.* (2022), com permissão. Ver Anexo 1.

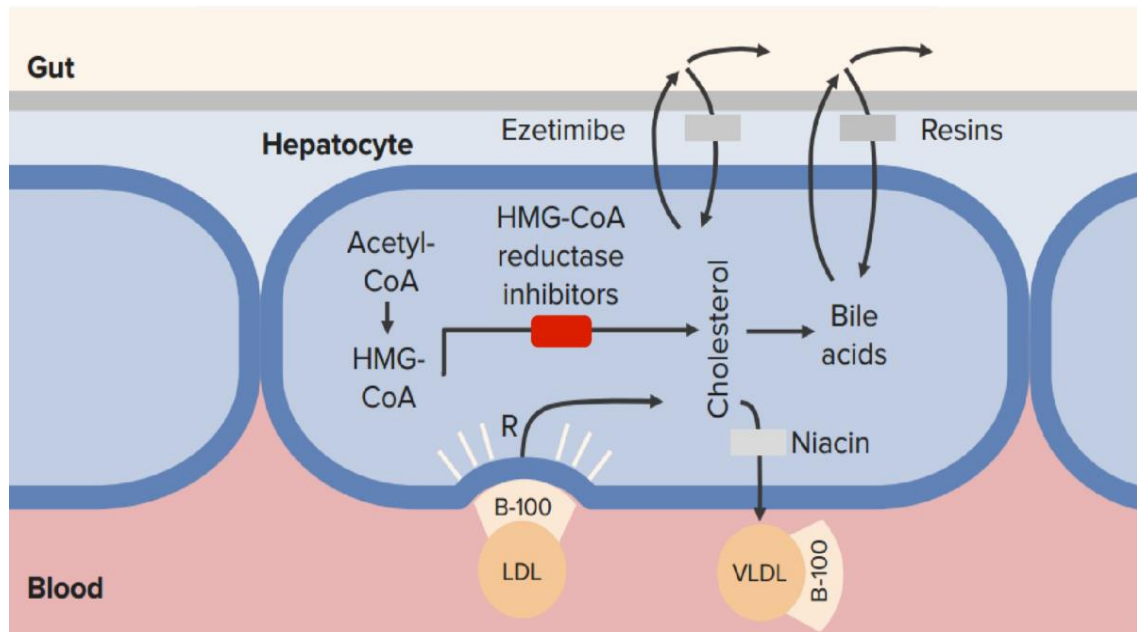


Figura 15. Esquema mostrando as principais etapas de formação de colesterol no fígado e a formação e exportação de VLDL. O bloqueio da formação de VLDL, benéfico em condições de uma alimentação balanceada e saudável, pode levar à esteatose quando há excesso da oferta de AcCoA (como resultado da ingestão de uma dieta hiperlipídica, por exemplo), coexistindo com ativação da reação catalisada pela HMG-CoA. Retirado de <https://www.lecturio.com/pt/concepts/estatinas/>. Não é considerado o conteúdo de triglicerídeos.

diminuição da exportação de VLDL, cujas propriedades são diferentes em indivíduos magros, com sobrepeso e obesos (Mittendorfer *et al.*, 2016).

A hipótese de que o intenso acúmulo lipídico no tecido hepático resulta da rápida reversão do quadro após da estimulação do eixo Ang II→AT₂R quando os ratos receberam oralmente Ang-(3–4) (Figura 14), o ativador alostérico deste segundo eixo por aumentar acentuadamente a afinidade dos AT₂R por Ang II (Axelband *et al.*, 2012). Assim, os efeitos lipolíticos observados na Figura 14, possivelmente mediados pela ativação do eixo Ang II→AT₁R do SRAA intra-hepático encontra suporte na completa e estimulação do eixo Ang II→AT₂R levando à ativação simultânea de uma lipase adipocitária de triglicerídeos (ATGL) por PKA (Pagnon *et al.*, 2012) e de uma lipase hormônio sensível (HSL) (Reynisdottir *et al.*, 1994), cujos defeitos desempenham um papel central em alterações celulares relacionadas com a obesidade (Languin *et al.*, 2005). Como mencionado na Introdução, Ang-(3–4) antagoniza, através da via de sinalização que envolve AT₂R e cAMP/PKA, os efeitos de Ang II mediados por AT₁R (Axelband *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2014).

O outro componente do fenótipo dos ratos com sobrepeso alimentados cronicamente com a dieta HL é a hipertensão arterial estabelecida paulatinamente ao longo dos 106 dias da administração dessa dieta (Figura 16). Aumentaram tanto a pressão sistólica (PAS) (Figura 16A) quanto a diastólica (PAD) (Figura 16B) e, em ambos os casos, os aumentos foram revertidos pela administração de Ang-(3–4), sem qualquer efeito nos ratos alimentados com a dieta CTR. Este par de observações permite concluir que, no segundo fenótipo dos ratos com sobrepeso, o seu quadro hipertensivo presente em todos os animais: (i) é decorrente da ativação do eixo Ang II→AT₁R do SRAA, e (ii) que o efeito da Ang-(3–4) somente ocorre quando existe um quadro pró-hipertensivo, caracterizado por aumento da atividade do SRAA circulante e local (Dias *et al.*, 2014). Neste ponto é importante discutir que a pletismografia de cauda não é considerada confiável para a medida da PAD em roedores (Joles, 2019), especialmente quando se trata de determinações individuais isoladas. Todavia, o método é considerado apropriado quando se trata de acompanhamento da evolução da PAD numa mesma população por um longo período (Feng *et al.*, 2008; Cabral *et al.*, 2019), como é caso dos ratos investigados nesta Tese.

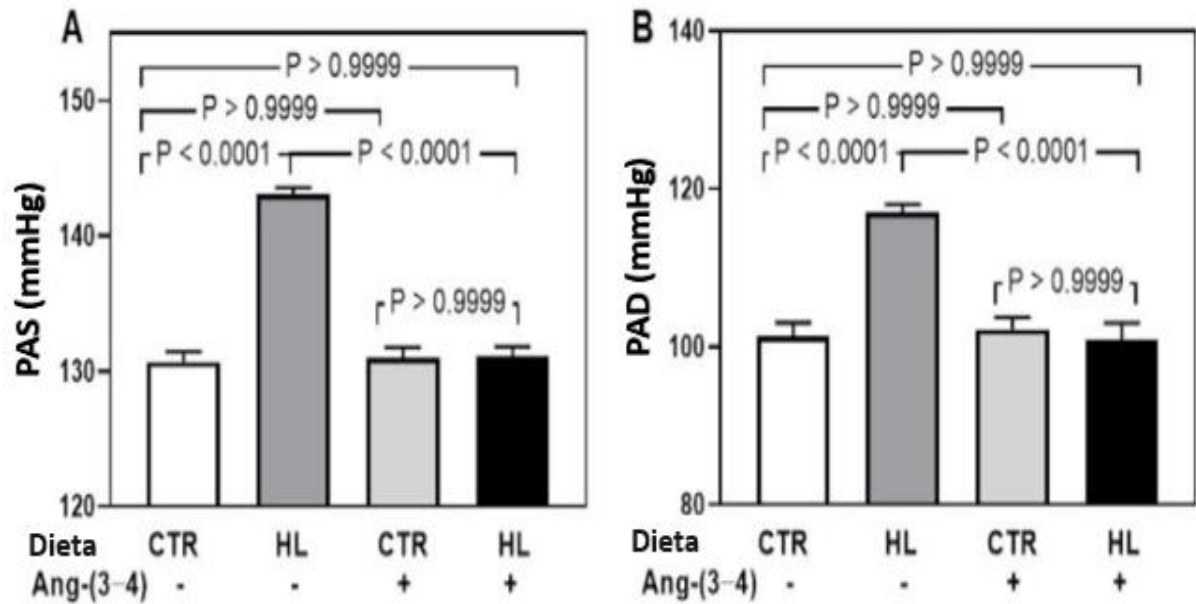


Figura 16. Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Pressão Arterial Diastólica (PAD) de ratos alimentados com dieta CTR e de ratos submetidos a dieta HL durante 106 dias. Resposta à administração de Ang-(3-4). **A:** SBP. **B:** DBP. As barras indicam médias $\pm$ EPM. CTR: $n = 17$; HL: $n = 12$; CTR+Ang-(3-4): $n = 13$; HL+Ang-(3-4): $n = 14$. As diferenças foram avaliadas empregando ANOVA 1 fator seguida de teste de Bonferroni. Os valores de P são indicados nos painéis. Adaptada de Crisóstomo et al. (2022), com permissão. Ver Anexo 1.

Como mencionado anteriormente, é possível postular uma associação entre aumento da gordura visceral – incluindo aquela da região perirrenal – com a ativação do SRAA, claramente não restrita àquele de um único órgão, como é o caso acima descrito para o fígado, nem tampouco à suprarregulação apenas ao SRAA circulante no seu eixo Ang II→AT₁R. Em termos de mecanismos subjacentes ao aumento da PAS (Figura 15A), pode ser possível que alterações generalizadas do tecido adiposo perivascular – equivalente ao tecido adiposo visceral (Costa *et al.*, 2018) – contribuam para um aumento do tônus vascular (Maenhaut & Van De Voorde, 2011) e da rigidez (diminuição da distensibilidade) da aorta e das artérias mesentéricas (Resnick *et al.*, 1997), através da secreção aumentada de citocinas e adipocinas (Costa *et al.*, 2018), como propusemos recentemente (Crisóstomo *et al.*, 2022) (ver Anexo 1). A hipertensão diastólica, por sua vez, é provavelmente devida ao aumento do conteúdo de sal da dieta HL (Tabela 1), como ocorre de modo geral nas chamadas “Dietas Ocidentais” (Kopp, 2019), em combinação com alteração na densidade de Na⁺ (relação entre a ingesta de Na⁺ e a de calorias) e com a suprarregulação das ATPases renais transportadoras de Na⁺ (Luzes *et al.*, 2021).

As alterações estruturais fibróticas renais e cardíacas encontradas nos ratos com sobrepeso (Crisóstomo *et al.*, 2022), as alterações funcionais do ventrículo esquerdo (Crisóstomo, 2021), a hiperatividade do eixo Ang II→AT₁R encontrada nos rins com suprarregulação das duas ATPases transportadoras em túbulos contornados proximais (Luzes *et al.*, 2021) e a hiperatividade do mesmo eixo no fígado levando à esteatose não alcoólica (Figura 14), somadas às alterações cardiovasculares que culminam com hipertensão arterial sistólica e diastólica (Figura 15), permitem descrever – pela primeira vez até onde chega nosso conhecimento – uma síndrome hepatocardiorenal associada ao sobrepeso por ingestão prolongada de uma “Dieta Ocidental” (Kopp, 2019). Assim, o emergente conceito de síndrome hepatocardiorenal em patologia (Kazory & Ronco, 2019), pode ser aplicado às alterações encontradas no fígado, no sistema cardiovascular e nos rins, nos quadros de sobrepeso/obesidade resultantes da ingesta de dietas ricas em lipídeos.

4.2. ATPases estimuladas por Mg²⁺ e Ca²⁺ em túbulos contornados proximais renais: modificações nas respostas a substratos como mecanismos moleculares

subjacentes a alterações funcionais na síndrome hepatocardiorenal do sobrepeso?

A hipótese condutora da presente Tese – capítulo de uma história mais ampla construída no Laboratório – é que a homeostasia do Ca^{2+} intracelular em túbulos proximais, em decorrência de respostas alteradas aos substratos da SERCA, associadas por sua vez à perda do “controle de qualidade” por parte de proteínas AAA+, constituiria um dos mecanismos subjacentes a alterações renais – ou parte delas – no sobrepeso causado pela ingestão prolongada de uma dieta hiperlipídica. A Figura 17 compara atividades da SERCA na fração microssomal ensaiada na presença de 0,1 mM de ATP total (concentração semelhante na forma do complexo MgATP^{2-}) (Sorenson *et al.*, 1980, 1990) e de 20 μM de Ca^{2+} livre, na presença de 0,6 mM de Mg^{2+} livre. Este primeiro ensaio de atividade ATPásica da SERCA sensível à tapsigargina teve como objetivo explorar a resposta da enzima aos seus substratos no ramal do ciclo nas subconformações E_1 (Figura 10C), quando ocorre a autofosforilação da SERCA saturando por ATP o domínio N (Figura 10B) no seu estado de baixa afinidade, conjuntamente com a ocupação dos sítios de Ca^{2+} voltados para a face citosólica da enzima e com os sítios para Mg^{2+} livre desta P-ATPase (Escobales & Canessa, 1985).

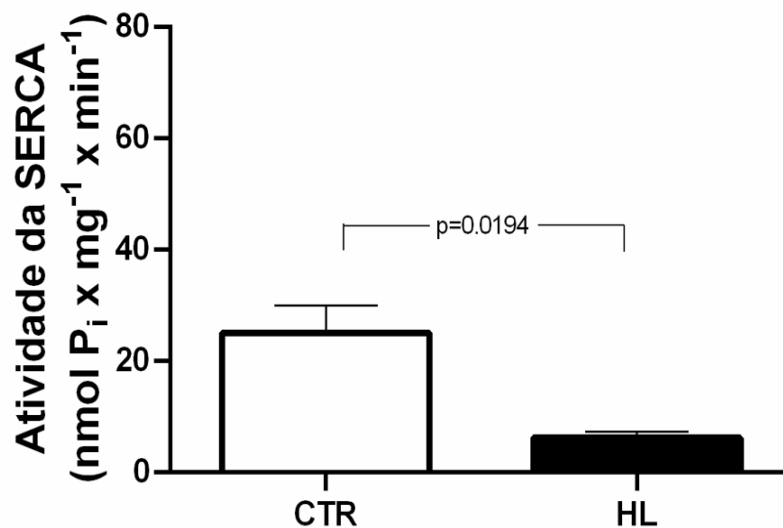
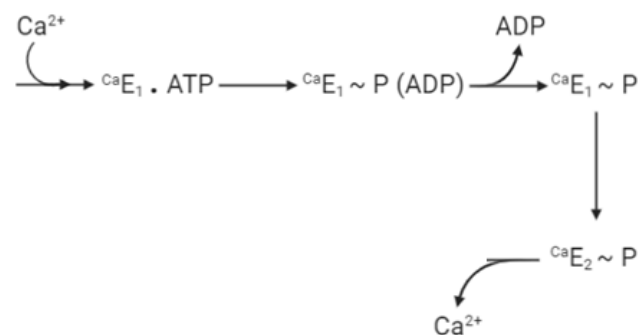


Figura 17. Atividade da $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})\text{ATPase}$ do retículo endoplasmático (SERCA) de células de túbulos proximais, ensaiada na presença de 0,1 mM de ATP, 20 μM de Ca^{2+} livre e ~0,6 mM de Mg^{2+} livre. Para outros componentes do meio de reação e descrição do ensaio ver texto (seção 3.4). A atividade foi calculada pela diferença entre as atividades na ausência e na presença de 1 μM de tapsigargina medidas em paralelo com a mesma preparação de membranas. As dietas estão indicadas na *abscissa*. As barras representam médias $\pm$ EPM ($n = 3$ experimentos com diferentes preparações de membranas nos 2 grupos), comparadas empregando teste t de Student não pareado. Valor de P indicado na figura.

também ocupados para a ativação deste ramal. Enquanto no grupo CTR a atividade foi de $25,1 \pm 4,9 \text{ nmol P}_i \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$, a do grupo HL diminuiu para $6,2 \pm 1,1 \text{ nmol P}_i \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$, indicando que o sobrepeso decorrente da ingestão prolongada da dieta hiperlipídica provocou alterações moleculares na SERCA de túbulos proximais renais que diminuíram a velocidade das etapas que envolvem ligação dos íons Ca^{2+} nos domínios *TM*, a ligação do ATP no domínio *N*, a fosforilação do ácido aspártico no domínio *P* e, conseqüentemente, impedindo ou afetando a oclusão destes íons. Impedir o afetar a oclusão implica em impedir ou afetar sua passagem para o lumen do retículo na etapa seguinte, com aumento da amplitude e da intensidade das ondas e picos de Ca^{2+} citosólico (Misquitta *et al.*, 1999), *i.e.* da concentração de Ca^{2+} citosólico. Este fenômeno de aumento do Ca^{2+} citosólico pode ser ainda potencializado pela indução da chamada “indução por Ca^{2+} da liberação de Ca^{2+} (do retículo endoplasmático)” (Endo, 2007). O esquema a seguir, retirado da Figura 10C mostra as etapas iniciais do ciclo de catálise da SERCA afetadas pela ingestão crônica da dieta hiperlipídica, que impactam a Ca^{2+} -ATPase na conformação E_1 .



Como se encontra a atividade global dependente de Ca^{2+} e Mg^{2+} catalisada pelas proteínas AAA+, nestas concentrações de ATP, Ca^{2+} e Mg^{2+} que revelaram a inibição da atividade da SERCA na conformação E_1 nos túbulos proximais em ratos com sobrepeso? A Figura 18 mostra que a as atividades do grupo CTR ($101,0 \pm 4,4 \text{ nmol P}_i \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) não foi significativamente diferente da encontrada no grupo HL ($107,3 \pm 3,7 \text{ nmol P}_i \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$), sugerindo que o conjunto dessas atividades de localização e funções diferentes não são modificadas quando a velocidade é lenta, limitada pela baixa concentração de ATP (Puchades *et al.*, 2020; Ye *et al.*, 2021). Uma concentração de ATP tão baixa não se encontra em condições fisiológicas, mas são as

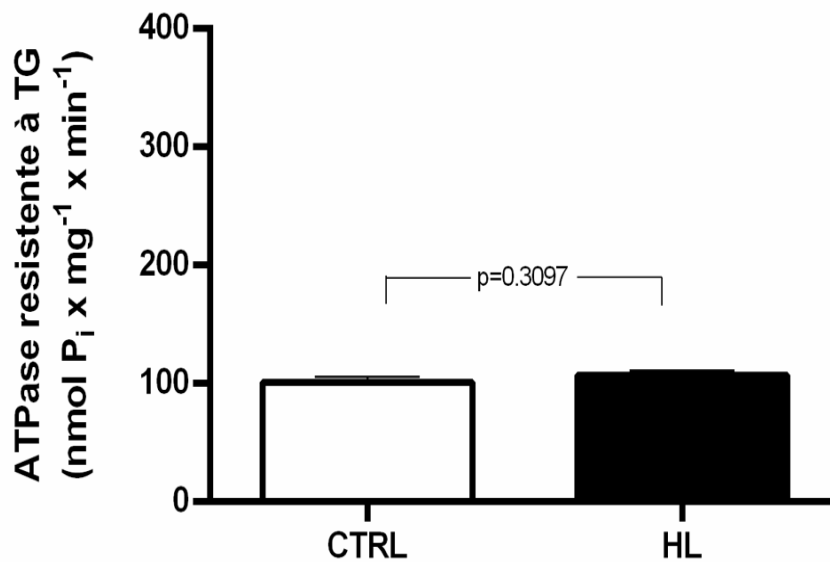


Figura 18. Atividade ATPásica resistente à tapsigargina (TG) de células de túbulos proximais, ensaiada na presença de 0,1 mM de ATP, 20 μ M de Ca^{2+} livre, e 0,6 mM de Mg^{2+} livre. Para outros componentes do meio de reação e descrição do ensaio ver texto (seção 3.4). As dietas estão indicadas na *abscissa*. A atividade foi calculada a partir da diferença entre a atividade total sem tapsigargina e a obtida na presença de 1 μ M de tapsigargina em experimentos realizados em paralelo empregando a mesma preparação de membranas. As barras representam médias $\pm$ EPM ($n = 5$ experimentos nos 2 grupos, realizados com diferentes preparações de membranas), comparadas empregando teste t de Student não pareado. Valor de P indicado na figura.

que resultam da interrupção da circulação, como ocorre nos quadros de lesão renal aguda por isquemia (Sung *et al.*, 2017), uma patologia altamente frequente e extremamente grave, especialmente em unidades de terapia intensiva (Neyra & Leaf, 2018; Pieretti *et al.*, 2020). Esta diminuição da concentração de ATP poderia resultar da inibição da atividade da F_0F_1 -ATP sintase por Ca^{2+} , como mostrado em nosso laboratório pouco mais de 30 anos atrás (Vercesi *et al.*, 1990). A combinação dos resultados mostrados nas Figuras 17 e 18 revela um dos possíveis mecanismos que, mediados pela elevação do Ca^{2+} citosólico resultante de alterações na SERCA e de seu funcionamento nas etapas do ciclo de catálise na conformação E_1 , podem agravar episódios de lesão renal aguda isquêmica no sobrepeso e na obesidade. Primeiro, porque as alterações na SERCA levam a um aumento da concentração de Ca^{2+} citosólico; segundo porque as proteínas AAA+ não parecem cumprir seu papel no “controle de qualidade” (Puchades *et al.*, 2020). Em anos recentes, estudos em humanos mostraram que a obesidade pode ser considerada um fator de risco na lesão renal aguda em pacientes críticos (Danziger *et al.* 2016; Schiffil & Lang, 2017).

O ensaio seguinte de SERCA foi realizado empregando uma concentração de Ca^{2+} livre também suficiente para saturar os sítios em estado de alta afinidade (20 μ M), e uma concentração de ATP dez vezes mais alta que nos experimentos mostrados na Figura 17, para que o nucleotídeo possa ocupar parcialmente o seu domínio de ligação N em estado de baixa afinidade (Figuras 10 e 11C). Os valores obtidos (Figura 19) foram $37,3 \pm 9,8$ e $35,4 \pm 7,0$ nmol $P_i \times mg^{-1} \times min^{-1}$ para os grupos CTR e HL, respectivamente. A aceleração da transição $E_2 \rightarrow E_1$ levou à duplicação da atividade no ratos CTR e, muito mais, nos ratos HL fazendo com que a diferença entre os grupos desaparecesse. Este resultado indica que as alterações provocadas pela dieta HL na velocidade das etapas catalisadas pela SERCA na conformação E_1 (Figura 17) podem ser compensadas quando a enzima funciona com o domínio N parcialmente ocupado, permitindo ainda hipotetizar que esta compensação ocorreria mediante comunicações intramoleculares de longo alcance (Inesi *et al.*, 1992) a partir deste domínio quando este estiver parcialmente saturado por ATP.

Quando se analisa a atividade resistente à tapsigargina, atribuída ao conjunto de proteínas AAA+ presentes na fração microssomal, as atividades dos ratos CTR e HL

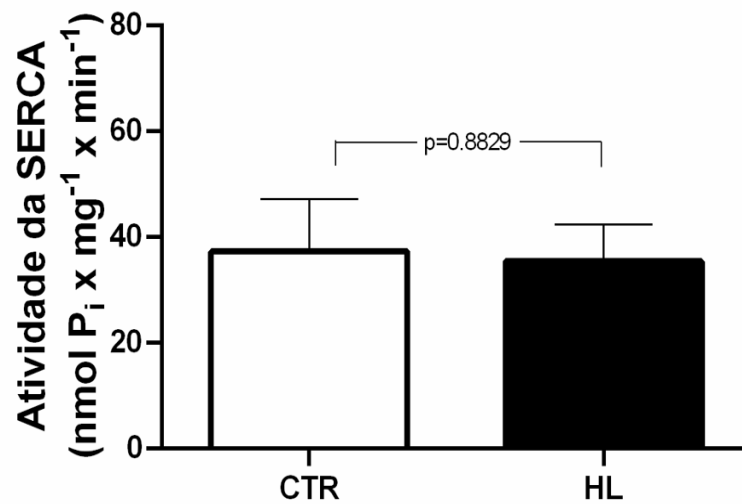


Figura 19. Atividade da (Ca²⁺+Mg²⁺)ATPase do retículo endoplasmático (SERCA) de células de túbulos proximais, ensaiada na combinação de 1,1 mM de ATP e 20 µM de Ca²⁺ livre, com 0,6 mM de Mg²⁺ livre. Para outros componentes do meio de reação e descrição do ensaio ver texto (seção 3.4) e legenda da Figura 17. As dietas estão indicadas na *abscissa*. As barras representam médias ± EPM (n = 6 e 5 nos grupos CTR e HL, respectivamente), comparadas empregando teste *t* de Student não pareado. Valor de P indicado na figura.

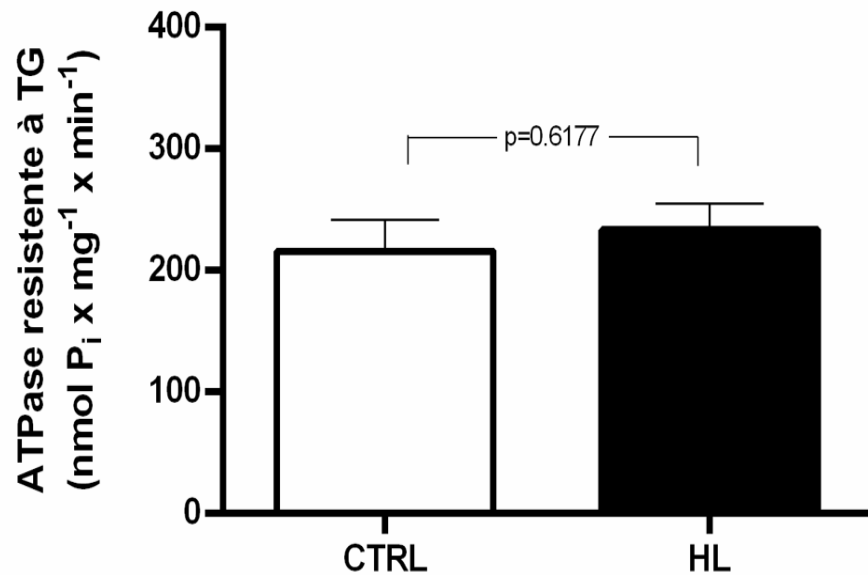
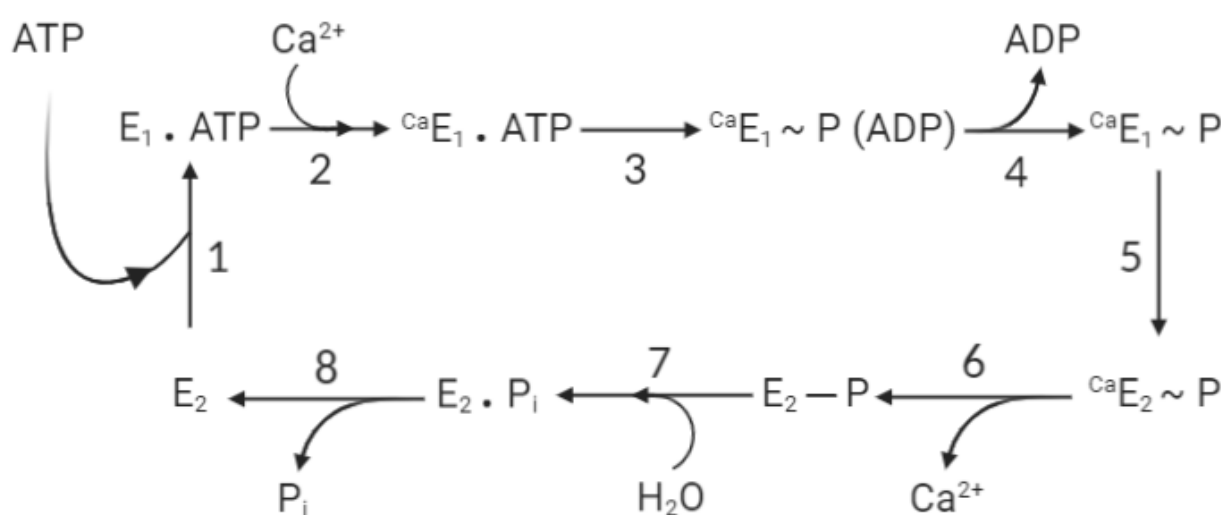


Figura 20. Atividade ATPásica resistente à tapsigargina (TG) de células de túbulos proximais, ensaiada na presença de 1,1 mM de ATP e 20 μ M de Ca^{2+} livre, e 0,6 mM de Mg^{2+} livre. Para outros componentes do meio de reação e descrição do ensaio ver texto (seção 3.4) e na legenda da Figura 18. As dietas estão indicadas na *abscissa*. A atividade foi calculada a partir da diferença entre a atividade total sem tapsigargina e a obtida na presença de tapsigargina. As barras representam médias $\pm$ EPM ($n = 5$ nos 2 grupos), comparadas empregando teste t de Student não pareado. Valor de P indicado na figura.

aumenta para $216,0 \pm 25,5$ e $233,4 \pm 21,9$ nmol $P_i \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$, respectivamente (Figura 20), não se encontrando diferenças entre ambos. Poderia ser postulado então, que o “desengajamento” proposto no ciclo de catálise apresentado no esquema da Figura 11 à medida que aumenta a interação do ATP com os protômeros, seria suficiente para compensar eventuais alterações provocadas pelo sobrepeso neste conjunto de enzimas. Neste caso específico, não se trataria de comunicações intramoleculares de longo alcance dentro de uma mesma molécula de ATPase e sim de interações próximas, portanto de curto alcance, entre subunidades de uma proteína polimérica.

A seguinte pergunta do trabalho foi: haveria influência do sobrepeso na atividade da SERCA, quando esta funciona em condições que assegurem uma velocidade máxima, *i.e.* ensaiada em altas concentrações de ATP que saturariam o domínio *N* em estado de baixa afinidade acelerando a transição $E_2 \rightarrow E_1$? A concentração de ATP escolhida foi 5 mM, alta o suficiente para que a saturação ocorra em diferentes P-ATPases (Lewis *et al.*, 2012) e o passo limitante da reação global seja liberado. A concentração de Ca^{2+} livre foi ainda mantida em 20 μM , suficiente também para saturação do domínio representado pelos segmentos transmembrana que compõem o domínio *M* (Figura 9). Com o passo limitante $E_2 \rightarrow E_1$ liberado (passo 1 do esquema seguinte), o ciclo de hidrólise de ATP teria, normalmente, condições de operar em condições de velocidade máxima.



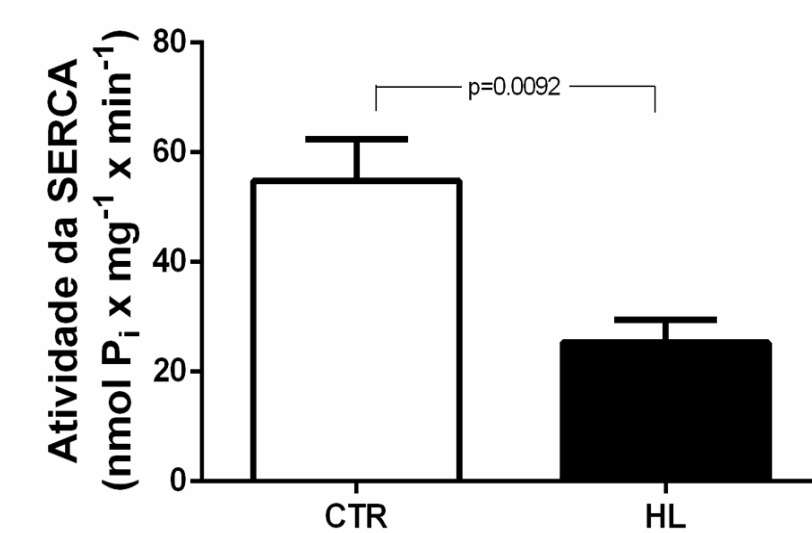


Figura 21. Atividade da (Ca²⁺+Mg²⁺)ATPase do retículo endoplasmático (SERCA) de células de túbulos proximais, ensaiada na combinação de 5 mM de ATP e 20 μM de Ca²⁺ livre, com ~0,6 mM de Mg²⁺ livre. Para outros componentes do meio de reação e descrição do ensaio ver texto (seção 3.4) e na legenda da Figura 17. As dietas estão indicadas na *abscissa*. As barras representam médias ± EPM (n = 6 nos 2 grupos), comparadas empregando teste *t* de Student não pareado. Valor de P indicado na figura.

A Figura 21 mostra uma forte inibição da atividade da SERCA de ratos HL quando o ensaio é realizado nas condições mencionadas no parágrafo anterior. Enquanto a atividade nos ratos CTR foi $54,8 \pm 7,6 \text{ nmol P}_i \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$, a dos ratos com sobrepeso foi $25,3 \pm 7,6 \text{ nmol P}_i \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$, resultados que mostram um comportamento totalmente diferente quando o ATP do meio aumenta de 1,1 para 5 mM. Este aumento de concentração provocou um aumento de atividade de 30% no grupo CTR e, em contraste, uma diminuição de 40% nos ratos HL. A indução de inibição por excesso de substrato parece ser então uma característica provocada por modificações estruturais resultantes do sobrepeso que, novamente, teriam como consequência aumentos na concentração do Ca^{2+} citosólico e estímulo de diferentes processos dependentes de variações deste. No contexto desta tese, a reabsorção nos túbulos proximais do fluído ultrafiltrado nos glomérulos (Férraille & Doucet, 2001; Capasso *et al.*, 2013) seria um exemplo destes processos, ponto que será retomado mais adiante.

A figura seguinte mostra os resultados obtidos nas mesmas condições para a atividade resistente à tapsigargina (Figura 22). Encontrou-se uma diferença significativa entre a atividade do grupo CTR ($236,8 \pm 9,5 \text{ nmol P}_i \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) e a do grupo HL ($297,0 \pm 21,9 \text{ nmol P}_i \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$). Embora esta diferença seja pequena (20%), ela revela que, com o ciclo de catálise acelerado (Figura 11A), a administração da dieta hiperlipídica foi capaz de induzir um processo compensatório do “controle de qualidade” de substratos de alguma das proteínas AAA+ possivelmente envolvidas, que poderia residir no próprio retículo endoplasmático (Puchades *et al.*, 2020), envolvendo a própria SERCA.

O experimento seguinte destinou-se a abordar a questão: a dieta HL é capaz de introduzir alterações na SERCA, capazes de modificar a dissociação dos íons Ca^{2+} no lumen do retículo? (Figura 11C; esquema do ciclo apresentado no texto acima). A dissociação do Ca^{2+} do intermediário $^{2\text{Ca}}\text{E}_2\text{-P}$ (passo 6 no ciclo apresentado no texto) ocorre quando se eleva a concentração de Ca^{2+} no lumen reticular, provocando a chamada “back inhibition” (Inesi & de Meis, 1989), que implica na diminuição da velocidade do ciclo de catálise como um todo. As concentrações escolhidas para este ensaio foram: 5 mM de ATP e 100 μM de Ca^{2+} livre, com 0,6 mM de Mg^{2+} livre. A concentração de ATP foi mantida como na condição anterior para preservar o estímulo

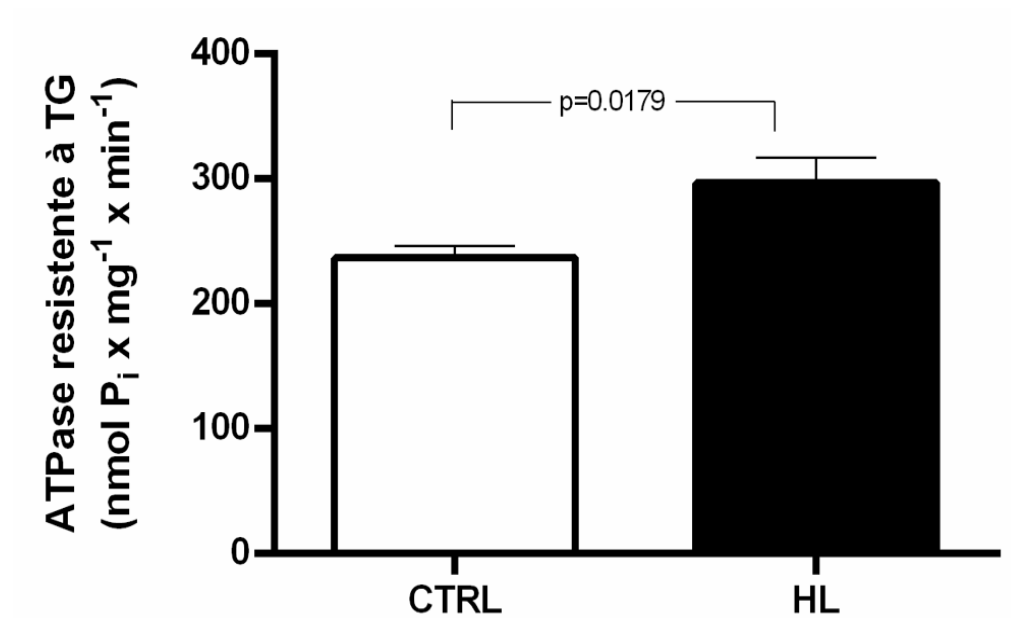


Figura 22. Atividade ATPásica resistente à tapsigargina (TG) de células de túbulos proximais, ensaiada na combinação de 5 mM de ATP e 20 μ M de Ca^{2+} livre, com 0,6 mM de Mg^{2+} livre. Para outros componentes do meio de reação e descrição do ensaio ver texto (seção 3.4) e na legenda da Figura 18. As dietas estão indicadas na *abscissa*. As barras representam médias $\pm$ EPM ($n = 6$ no grupo CTR e 5 no grupo HL), comparadas empregando teste t de Student não pareado. Valor de P indicado na figura.

da velocidade de transição $E_2 \rightarrow E_1$. A de Ca^{2+} , alta o suficiente para inibir a dissociação do íon, mas não tão alta como para promover a reversão parcial ou completa da etapa 5 nas ATPases transportadoras de Ca^{2+} de modo geral em diferentes membranas biológicas (passo do ciclo no texto acima) (Carvalho *et al.*, 1976; Vieyra *et al.*, 1991; Vieyra *et al.*, 2004). A de Mg^{2+} livre continuando $\sim 0,6$ mM, para permitir a ocupação dos sítios descritos para esta espécie na sua forma livre (Figura 23).

Na Figura 23 observa-se que a atividade da SERCA do grupo CTR nestas condições foi $25,6 \pm 6,2$ nmol $P_i \times mg^{-1} \times min^{-1}$, ou seja houve uma “back inhibition” de pouco mais de 50%. Como a dos ratos com sobrepeso foi $18,6 \pm 2,9$ nmol $P_i \times mg^{-1} \times min^{-1}$ e não houve diferença em relação ao grupo HL, pode ser concluído que as mudanças na catálise observadas para as etapas em E_1 (ligação dos íons $Ca^{2+} \rightarrow$ aumento da afinidade por ATP no domínio $N \rightarrow$ fosforilação no domínio $P \rightarrow$ oclusão dos íons Ca^{2+}) não afetaram o passo de transferência dos íons Ca^{2+} do domínio M . Este resultado, conjuntamente com o da Figura 21, sugere ainda que as alterações provocadas pelo sobrepeso na SERCA de túbulos proximais ocorrem na passagem do ciclo de E_2 para E_1 e nos passos que ocorrem nesta última conformação, não afetando aqueles passos catalisados pela primeira: dissociação do Ca^{2+} no lúmen do retículo a partir de $^{2Ca}E_2-P$, coordenação da molécula de água pela sequência TGE (Clausen *et al.*, 2004) do domínio A (Kühlbrandt, 2004), hidrólise da fosfoenzima E_2-P e liberação do P_i formado para o citosol.

A Figura 24 corresponde aos resultados obtidos para atividade resistente à tapsigargina nas mesmas condições que na Figura 23. Os valores de atividade atribuíveis à catálise por proteínas AAA+ foram de $256,2 \pm 39,3$ nmol $P_i \times mg^{-1} \times min^{-1}$ (CTR) e $302,3 \pm 8,4$ nmol $P_i \times mg^{-1} \times min^{-1}$ (HL). Dois pontos merecem destaque frente a estes valores: (i) a mudança da concentração de Ca^{2+} não modifica a atividade, indicando que ela não sofre “back inhibition”, circunstância já previsível analisando o modelo de catálise apresentado na Figura 11; (ii) a catálise não é afetada pelo sobrepeso, quando ensaiada nestas condições.

A partir das descrições das Figuras 17 a 24 foi tornando-se claro que a administração crônica de uma dieta hipercalórica e hiperlipídica a ratos em idade juvenil leva a alterações que desincronizam a SERCA de um conjunto de ATPases estimuladas por $MgCl_2$ (formando o complexo $MgATP^{2-}$ coexistindo com uma

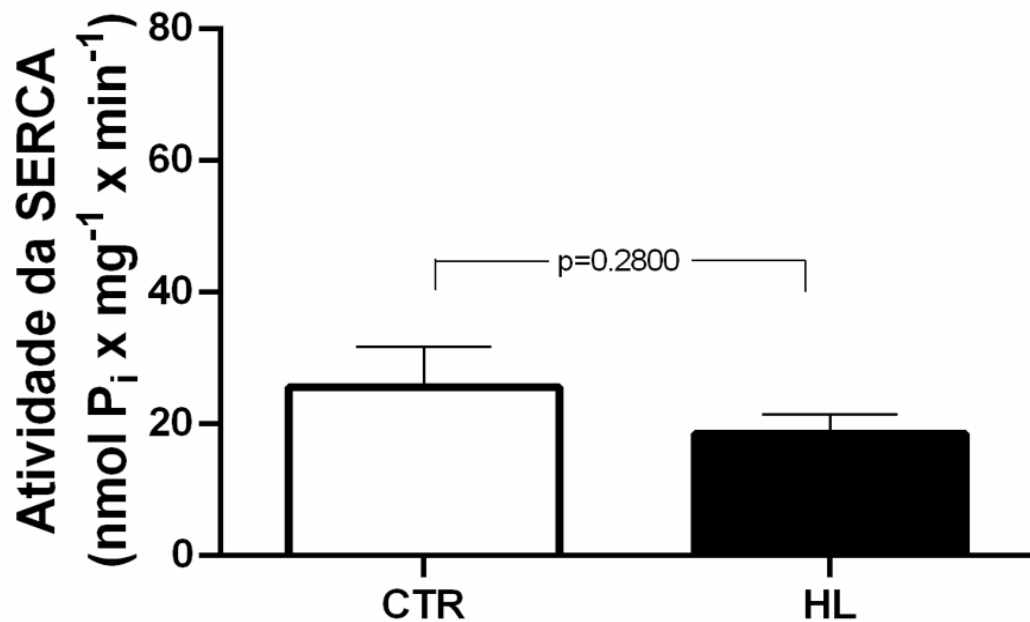


Figura 23. Atividade da $(\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+})$ ATPase do retículo endoplasmático (SERCA) de células de túbulos proximais, ensaiada na combinação de 5 mM de ATP e 100 μM de Ca^{2+} livre, com 0,6 mM de Mg^{2+} livre. Para outros componentes do meio de reação e descrição do ensaio ver texto (seção 3.4) e na legenda da Figura 17. As dietas estão indicadas na *abscissa*. As barras representam médias $\pm$ EPM ($n = 4$ e 6 nos grupos CTR e HL, respectivamente), comparadas empregando teste t de Student não pareado. Valor de P indicado na figura.

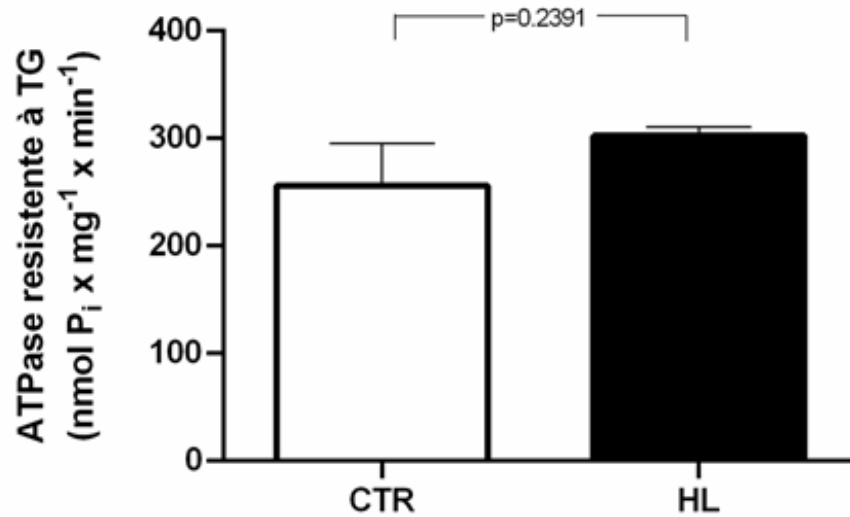


Figura 24. Atividade ATPásica resistente à tapsigargina (TG) de células de túbulos proximais, ensaiada na combinação de 5 mM de ATP e 100 μ M de Ca^{2+} livre, com 0,6 mM de Mg^{2+} livre. Para outros componentes do meio de reação e descrição do ensaio ver texto (seção 3.4) e na legenda da Figura 18. As dietas estão indicadas na *abscissa*. As barras representam médias $\pm$ EPM ($n = 4$ no grupo CTR e 6 no grupo HL), comparadas empregando teste *t* de Student não pareado. Valor de P indicado na figura.

concentração fixa de Mg^{2+} livre), criando condições que levam a aumentos da concentração de Ca^{2+} citosólico em células de túbulos proximais renais. A Figura 25, nos seus direntes painéis, compara as atividades ensaiadas nas diferentes combinações de concentrações de ATP e Ca^{2+} . Ela permite ainda uma visualização mais clara, comparando os painéis A e C do impacto da dieta hiperlipídica em passos da catálise pela SERCA que envolvem a o reinício do ciclo na conformação E_1 . A comparação dos painéis A e C permite concluir que a acentuada infraregulação da atividade da SERCA nos ratos HL teria como resultado uma maior duração dos picos e das ondas de Ca^{2+} no citosol, uma vez que está diminuída a capacidade de bombeio do cation para o lumen do retículo. Capacidade diminuída em duas concentrações de ATP. Aquela encontrada em condições fisiológicas (faixa milimolar) e naquelas em que a obesidade é uma séria comorbidade em lesões renais agudas (Danziger *et al.* 2016; Schiffil & Lang, 2017) (submilimolares). A Figura 26 representa graficamente a diferença proposta para a magnitude dos picos e das ondas de Ca^{2+} citosólico em túbulos renais de ratos CTR e HL.

4.3. As atividades da SERCA e das ATPase resistentes à tapsigargina são moduladas pelos dois eixos centrais do SRAA? As respostas são diferentes em ratos CTR e HL? As respostas são também moduladas pelas combinações de ATP ($MgATP^{2-}$) e Ca^{2+} ?

Nas seções 1.5 e 1.6 foram introduzidos informações e conceitos relacionados com os papéis sistêmico e teciduais do SRAA no sobrepeso e na obesidade. Retomaremos o tema formulando inicialmente as 3 perguntas da presente seção 4.3.

O possível papel um eixo Ang II→AT₁R hiperativado no tecido cortical renal foi investigado analisando a resposta à administração oral de Ang-(3–4) que antagoniza diferentes efeitos da Ang II em condições fisiológicas e patológicas (Axelband *et al.*, 2009a, 2009b; Dias *et al.*, 2014; 2017), atuando como um estimulador alostérico da ligação de Ang II a AT₂R (Axelband *et al.*, 2012).

As respostas à administração oral de 4 doses orais de Ang-(3–4) (80 mg/kg massa corporal) das atividades da SERCA e da resistente à tapsigargina de túbulos proximais de ratos CTR e HL, ensaiadas em diferentes combinações de ATP e Ca^{2+} , são apresentadas nas Figuras 27 e 28, respectivamente. Mantendo fixa a concentração de Ca^{2+} em 20 μ M e a do ATP na mais baixa (0,1 mM) e na mais alta (5 mM) (Figura

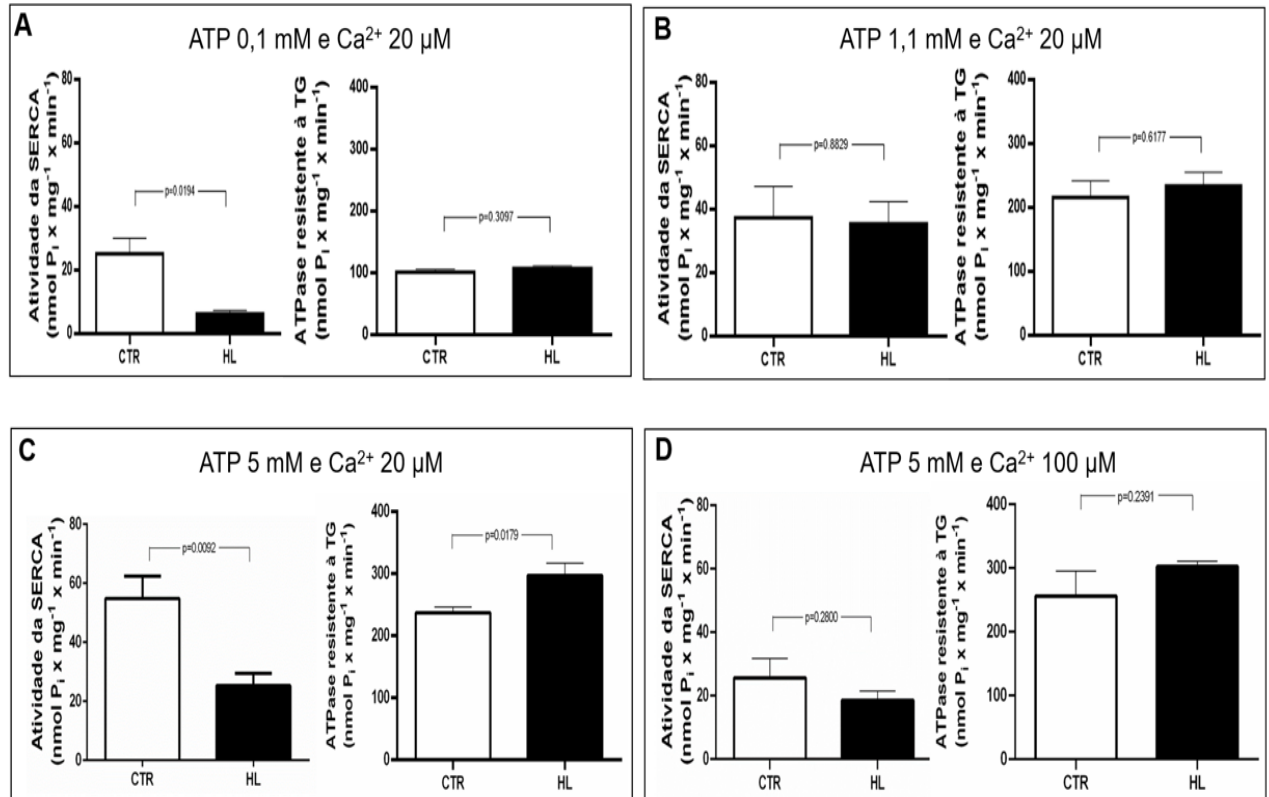


Figura 25. Comparação das atividades da SERCA com as da ATPase resistente à tapsigargina de túbulos proximais renais de ratos CTR e HL, rerepresentadas nas diferentes combinações de ATP e Ca^{2+} indicadas nos respectivos painéis (sempre com $\sim 0,6$ mM de Mg^{2+}). Comparações estatísticas são as indicadas nas Figuras 17 a 24. Demais condições, como descrito na seção 3.4 e nas legendas das Figuras 17 e 18.

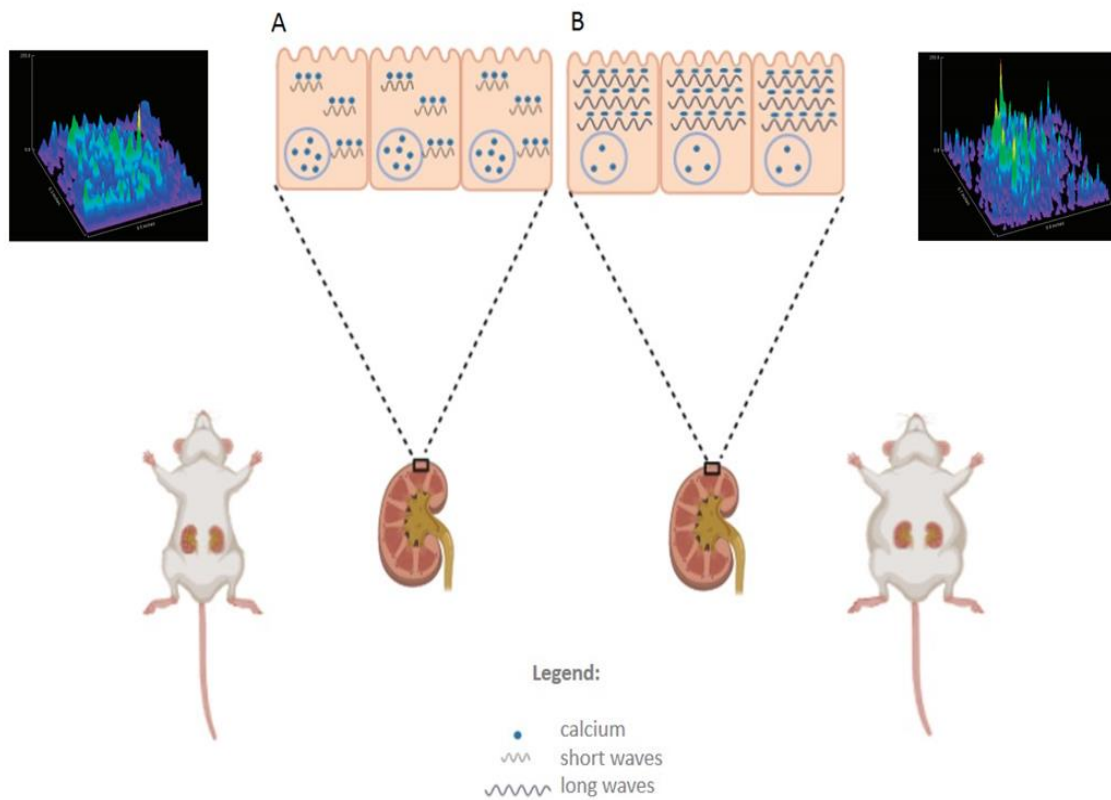


Figura 26. Representação esquemática comparativa da magnitude dos picos e ondas de Ca^{2+} em células de túbulos proximais renais de ratos CTR (**A**) e HL (**B**). As imagens fluorescentes que ilustram a proposta dessincronia entre a atividade da SERCA e da atividade ATPásica resistente à tapsigargina AAA+, levando a um aumento das oscilações de Ca^{2+} citosólico, foram adaptadas de Ferrão *et al.* (2012).

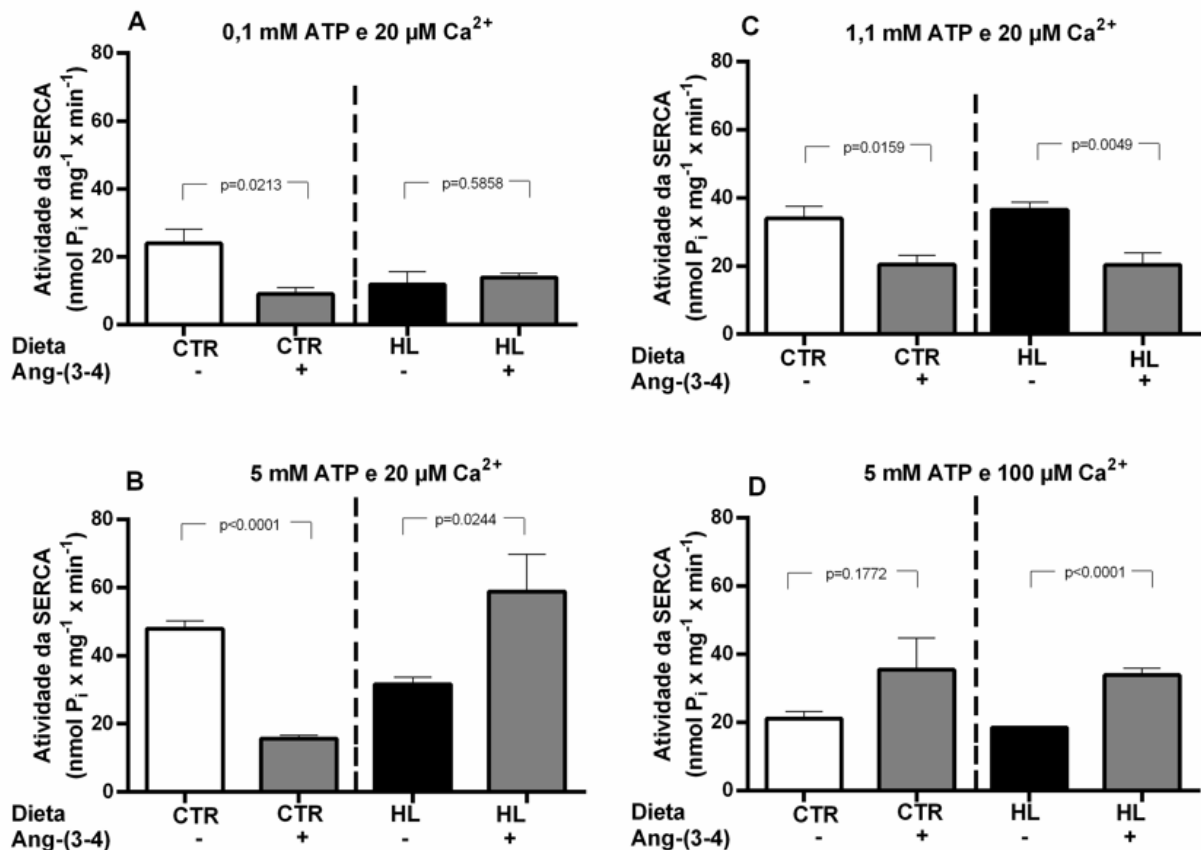


Figura 27. Atividade da SERCA ensaiada em diferentes combinações de ATP e Ca^{2+} (~0,6 mM de Mg^{2+} em todos os casos) em ratos CTR e HL: efeito da administração de 4 doses orais de Ang-(3-4) (80 mg/kg de massa corporal cada). Entre parêntesis correspondem estão indicados os números de experimentos realizados com diferentes preparações de membranas na sequência: CTR, CTR+Ang-(3-4), HL, HL+Ang-(3-4). **A:** ATP 0,1 mM e Ca^{2+} 20 μ M (n = 5, n = 4, n = 5, n = 7). **B:** ATP 5 mM e Ca^{2+} 20 μ M (n = 6, n = 6, n = 6, n = 6). **C:** ATP 1,1 mM e Ca^{2+} 20 μ M (n = 6, n = 5, n = 5, n = 6). **D:** ATP 5,0 mM e Ca^{2+} 100 μ M (n = 4, n = 5, n = 6, n = 5). Os valores de atividade correspondem à diferença entre a atividade medida na ausência e na presença de tapsigargina, empregando a mesma preparação de membrana. Outras condições de ensaio como descrito na seção 3.4. As linhas verticais tracejadas permitem visualizar separadamente os efeitos da Ang-(3-4) em ratos alimentados com cada uma das dietas, na atividade da SERCA nas diferentes combinações de ATP e Ca^{2+} acima detalhadas. Os resultados estão expressos em médias $\pm$ EPM. As diferenças (valores de P dentro de cada lado da linha tracejada de cada painel) foram avaliadas empregando o test *t* de Student não pareado.

27A e Figura 27B, parte esquerda dos respectivos painéis), se observa inibição percentualmente comparável (60%) pela Ang-(3–4) no grupo CTR ensaiado com baixo e alto ATP, mostrando que o eixo Ang II→AT₁R está envolvido na ativação da SERCA de células de túbulos contornados de ratos, uma conclusão que se soma à formulada com a utilização de células LLCPK1 em nosso laboratório uma década atrás (Ferrão *et al.*, 2012). No caso dos ratos com sobrepeso, não se observou resposta com baixo ATP (Figura 27A, lado direito) e um estímulo de 100% com 5 mM (Figura 27B, lado direito), o que permite recuperar a atividade encontrada no grupo CTR (compare 1^a e 4^a barras na Figura 27B; $t = 1,08$, $P = 0,3101$). Tomadas em conjunto, estas observações são fortemente indicativas de que a administração crônica de uma dieta hiperlipídica modifica a estrutura do domínio *N* da SERCA (Kühlbrandt, 2004) e, conseqüentemente, as propriedades de catálise da enzima, a homeostasia do Ca²⁺ citosólico e as propriedades de transporte através deste epitélio em concentrações. O acentuado estímulo pela Ang-(3–4) com alto ATP continua a dar suporte à proposta original de que este peptídeo atua, especialmente, naquilo que poucos anos atrás denominamos “microambiente pró-hipertensivo” (Dias *et al.*, 2014).

A observação da Figura 27C (lado esquerdo) permite concluir que, no caso dos ratos CTR, a resposta inibitória exercida pela Ang-(3–4) na SERCA ocorre também com concentrações intermediárias de ATP, na presença de concentrações de Ca²⁺ suficientes para saturar os sítios de ligação do metal *TM* em estado de alta afinidade (Aguayo-Ortiz Espinoza-Fonseca, 2020). Somando este resultado aos mostrados nas Figuras 27A e 27B (também lado esquerdo) pode ser concluído que a modulação inibitória exercida pela Ang-(3–4) na atividade da SERCA de ratos CTR ocorre cobrindo o espectro total de concentrações de nucleotídeo, com simultâneas condições ótimas de Ca²⁺ para acelerar os ciclos de transporte do citosol para o lúmen do retículo. Quando se aumenta a concentração de Ca²⁺ para 100 μM (Figura 27D, lado esquerdo) de modo a inibir parcialmente a dissociação do íon da subconformação ²CaE₂–P o efeito se inverte, sugerindo que a ativação do eixo Ang II→AT₂R pela Ang-(3–4) (e a concomitante inibição do eixo Ang II→AT₁R) seria um mecanismo fisiológico de controle da transição ²CaE₁–P→²CaE₂–P que dependeria do grau de ocupação dos sítios *TM* pelos íons Ca²⁺. No caso dos ratos HL observou-se que numa concentração intermediária de ATP e baixo Ca²⁺ (Figura 27C, lado direito) ou com uma concentração

alta de ATP e também alta de Ca^{2+} (Figura 27D, lado direito), a resposta à Ang-(3–4) foi semelhante à encontrada nos ratos CTR – além de serem também semelhantes na ausência de Ang-(3–4) (Figuras 19 e 23; ver também para uma melhor visualização comparativa os painéis B e D da Figura 25). Estas semelhanças permitem propor que modificações induzidas pelo sobrepeso e a obesidade da SERCA de túbulos proximais poderiam ser compensadas por combinações específicas de ATP e Ca^{2+} e, portanto, com os graus de ocupação dos domínios *N* e *TM*.

A Figura 28 apresenta os efeitos da administração de Ang-(3–4) na atividade ATPásica resistente à tapsigargina nas 4 concentrações de ATP (e, portanto, de MgATP^{2-}) utilizadas para investigar os efeitos das mudanças no balanço da sinalização nos eixos Ang II→AT₂R e Ang II→AT₁R provocados pela Ang-(3–4) na SERCA. Os resultados podem ser resumidos como se segue. *(i)* Em ratos CTR o efeito foi bifásico, com uma estimulação intensa entre 0,1 e 1,1 mM de ATP que desaparece na presença de 5 mM de ATP (Figuras 28A, 28C e 28B, respectivamente; painéis da esquerda); *(ii)* na mais baixa concentração de ATP observou-se um estímulo pela Ang-(3–4) somente no grupo CTR; *(iii)* em ratos HL observou-se estímulo somente na concentração intermediária de 1,1 mM, seguida de inibição acentuada na presença de 5 mM ATP (Figuras 28A, 28C e 28B, respectivamente; painéis da direita), inclusive para níveis menores que os encontrados em ratos CTR ($t = 2,40$; $P = 0,037$). Estas 3 observações sugerem que o sobrepeso e a obesidade levaria a alterações estruturais dos segmentos Walker A dos NBD1 e NBD2 (Figura 11) que mudam a atividade global atribuída a ATPases AAA+. A comparação entre os painéis B e D da Figura 28 permite ainda comprovar que o Ca^{2+} – a diferença do encontrado com a SERCA – não muda a atividade mediada pelo conjunto de proteínas AAA+ representada pela fração resistente à tapsigargina. E embora exista a limitação neste trabalho decorrente do desconhecimento da identidade da(s) proteína(s) deste conjunto, os resultados permitem concluir que ela(s) pode(m) ser modulada(s) pelo balanço de sinalizações entre os eixos Ang II→AT₁R e Ang II→AT₂R do SRAA, não descrito até o presente momento – até onde chega nosso conhecimento – em termos do “controle de qualidade” (Puchades *et al.*, 2020) do enovelamento e inserção de proteínas na respectiva membrana, como seria o caso da SERCA.

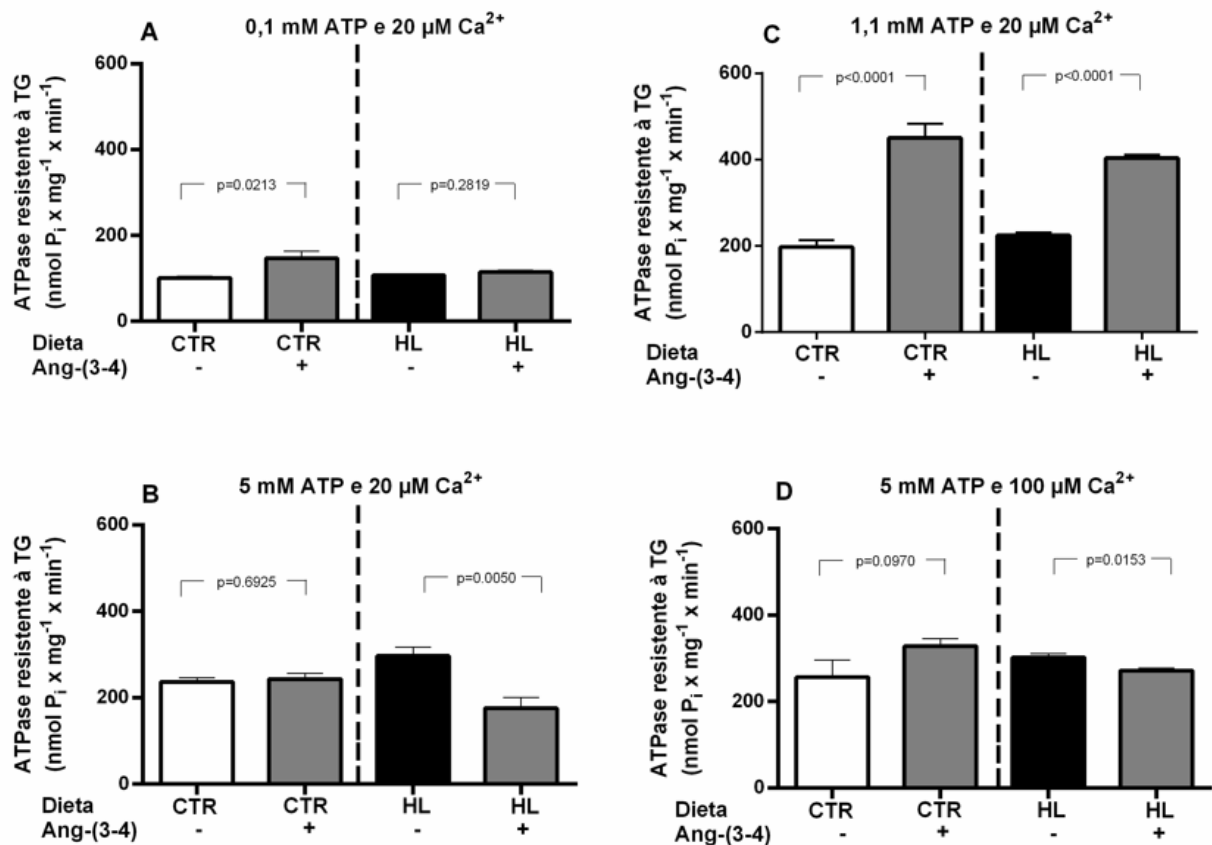


Figura 28. Atividade ATPásica resistente à tapsigargina (TG) ensaiada em diferentes combinações de ATP e Ca^{2+} em ratos que receberam veículo (água) ou 4 doses de Ang-(3–4) (80 mg/kg de massa corporal). Entre parêntesis correspondem estão indicados os números de experimentos realizados com diferentes preparações de membranas na sequência: CTR, CTR+Ang-(3–4), HL, HL+Ang-(3–4). **A:** ATP 0,1 mM e Ca^{2+} 20 μ M (n = 5, n = 4, n = 5, n = 7). **B:** ATP 5 mM e Ca^{2+} 20 μ M (n = 6, n = 6, n = 6, n = 6). **C:** ATP 1,1 mM e Ca^{2+} 20 μ M (n = 6, n = 6, n = 5, n = 6). **D:** ATP 5,0 mM e Ca^{2+} 100 μ M (n = 4, n = 5, n = 6, n = 5). Os valores de atividade foram calculados diminuindo a atividade sensível à tapsigargina da atividade total medida empregando a mesma preparação de membranas. Outras condições de ensaio como descrito na seção 3.4. As linhas verticais tracejadas permitem visualizar separadamente os efeitos da Ang-(3–4) em ratos alimentados com cada uma das dietas, na atividade ATPásica resistente à TG nas diferentes combinações de ATP e Ca^{2+} acima detalhadas. Os resultados estão expressos em médias $\pm$ EPM. As diferenças (valores de P dentro de cada lado da linha tracejada de cada painel) foram avaliadas empregando o test t de Student não pareado.

4.4. Clearance de lítio: avaliação “*in vivo*” da reabsorção isosmótica de fluído através do epitélio tubular proximal em ratos com sobrepeso e hipertensos.

Recentes observações de nosso Laboratório mostraram suprarregulação das ATPases transportadoras de Na^+ de túbulos proximais de ratos com sobrepeso e hipertensos, associada à hiperatividade do SRAA local (Luzes *et al.*, 2021). E embora os resultados apresentados e discutidos na seção anterior sejam robustos para sustentar a hipótese de que flutuações de Ca^{2+} citosólico moduladas por ATP e Ca^{2+} possam estar associadas a um aumento da reabsorção de fluído através do epitélio tubular proximal, o aumento de atividade “*in vitro*” de ATPases transportadoras “*per se*” não significa necessariamente aumento da capacidade de transporte iônico “*in vivo*”, uma vez que elas podem estar desacopladas na preparação de membranas (Suzuki & Kawakita, 1993; Silberberg *et al.*, 2021).

Uma vez que o íon Li^+ é reabsorvido de maneira isosmótica nos túbulos proximais da mesma forma que o Na^+ e a água (portanto, de fluído) e não é reabsorvido ou secretado em outros segmentos do néfron (Thomsen, 1984; Whiting, 1999), o clearance de Li^+ permite avaliar “*in vivo*” a reabsorção proximal de fluído, assim como a oferta do fluído ultrafiltrado para o segmento descendente da alça de Henle. Ainda, a partir da estimativa da oferta de fluído para segmentos distais podem ser preditos os sinais mediados pelo Na^+ para a mácula densa e, portanto, para os SRAA circulante e local; por exemplo, uma oferta diminuída de fluído servirá de estímulo para a secreção de renina (Figura 7; Holappa *et al.*, 2020).

A diminuição do clearance de lítio nos ratos hipertensos com sobrepeso (Figura 29) indica que estes reabsorvem mais Na^+ (e mais água) nos túbulos proximais. Até onde chega o nosso conhecimento é a primeira evidência “*in vivo*” de aumento da reabsorção proximal de fluído nos segmentos proximais do néfron na hipertensão associada à obesidade/sobrepeso e confirma a hipótese formulada a partir, como já mencionado, dos resultados obtidos “*in vitro*” (suprarregulação das ATPases transportadoras de Na^+) (Luzes *et al.*, 2021). Além de sua contribuição para a expansão do compartimento extracelular (incluindo o compartimento intravascular) e para o aumento da pressão arterial diastólica e média, a reabsorção aumentada de Na^+ acompanhada de balanço positivo do íon (ingestão de Na^+ na alimentação - excreção

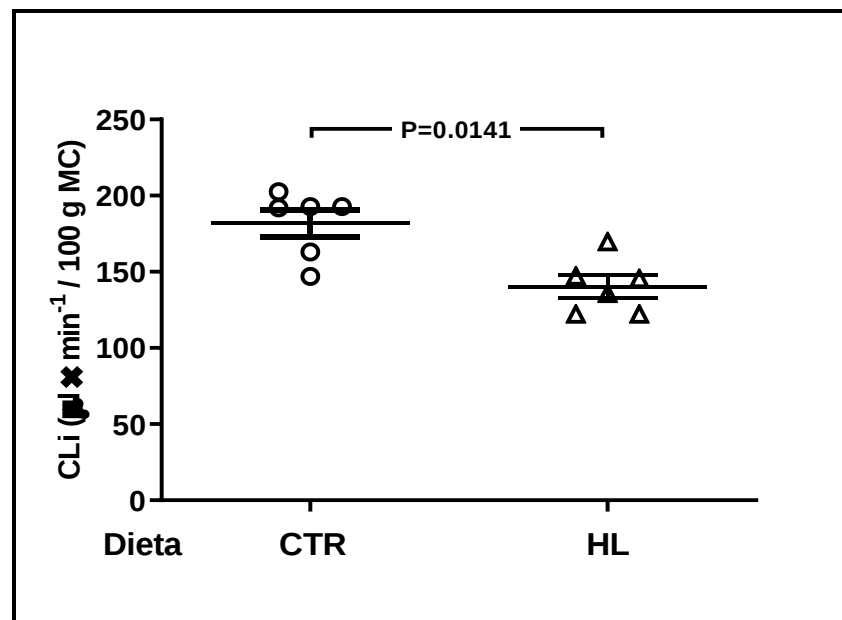


Figura 29. Clearance de lítio em ratos que receberam as dietas CTR ou HL como indicado na *abscissa*. O clearance de lítio foi medido como descrito na seção 3.5. As médias foram comparadas empregando o teste *t* de Student não pareado. Valor de *P* indicado na figura.

urinária de Na^+ ; Figura 7D em Luzes *et al.* (2021)) da suporte à hipótese formulada (Luzes *et al.*, 2021) de que, na obesidade e no sobrepeso, haveria uma acumulação progressiva de Na^+ em compartimentos osmoticamente silenciosos (Titze *et al.*, 2014) como a parede dos grandes vasos, contribuindo para a diminuição de sua distensibilidade e para o aumento da pressão arterial sistólica (Luzes *et al.*, 2021; Crisóstomo *et al.*, 2022).

4.5. As alterações tubulares proximais de processos de transporte iônico estão acompanhadas de lesões glomerulares?

As evidências apresentadas apontam para um forte comprometimento tubular proximal na obesidade/sobrepeso (Luzes *et al.*, 2021; esta Tese) que, acompanhado de lesões cardiovasculares e hepáticas, nos permitiram demonstrar o estabelecimento de uma síndrome hepatocardiorenal em ratos (Crisóstomo *et al.*, 2022) como resultado da alimentação prolongada com uma ração representativa das chamadas “dietas ocidentais” (Kopp, 2019). Todavia, no caminho da doença renal crônica de diferentes etiologias as lesões tubulares se acompanham de lesões vasculares e intersticiais (Woroniecki & Schnaper, 2009; López-Novoa *et al.*, 2011), sendo que as primeiras são consideradas as “forças motrizes” das outras (Liu *et al.*, 2018). Assim a pergunta final do presente trabalho neste momento foi: a obesidade/sobrepeso – pelo menos nos ratos adultos jovens estudados nesta Tese – leva a alterações vasculares significativas que comprometeriam a filtração glomerular levando, por exemplo, a um aumento da concentração plasmática de creatinina? Como a Figura 30 mostra que não há diferença entre as concentrações plasmáticas de creatinina de ratos CTR e HL, é possível postular que as lesões tubulares proximais provocadas pela obesidade/sobrepeso ainda não se encontram acompanhadas por lesões vasculares glomerulares. Entretanto, é possível também postular que em ratos envelhecidos alimentados por mais tempo com a mesma ou com uma dieta similar, estas lesões venham a ocorrer uma vez que o envelhecimento leva a uma deterioração progressiva da função renal com elevação progressiva dos níveis de creatinina plasmática (Tonelli & Riella, 2014).

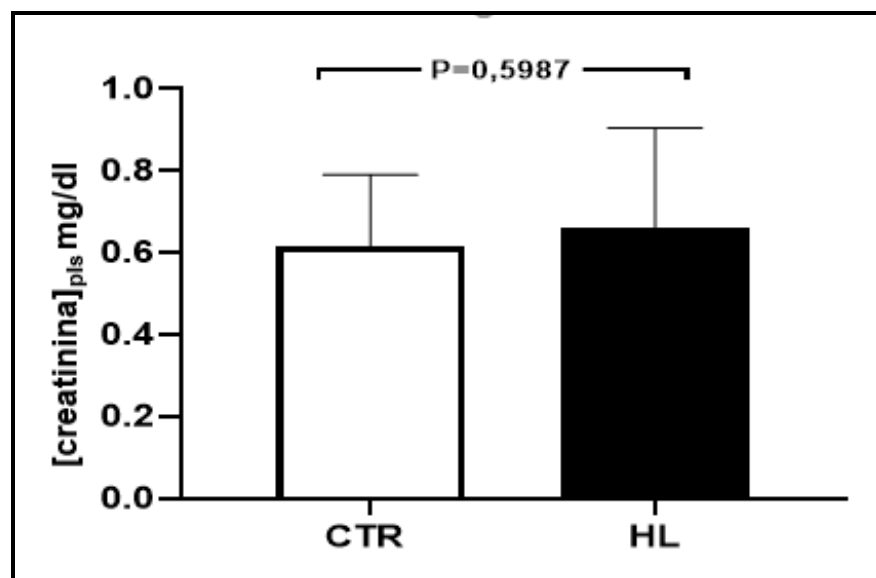


Figura 30. Concentração plasmática de creatinina em ratos alimentados com as dietas CTR e HL como indicado na *abscissa*. Determinação como indicado na seção 3.3. As barras representam médias $\pm$ EPM comparadas empregando o teste *t* de Student não pareado ($n = 13$ e 12 ratos nos grupos CTR e HL, respectivamente). Valor de P indicado na figura.

5. Conclusões.

A Figura 31 ilustra e resume as principais alterações em túbulos renais proximais provocadas pela obesidade/sobrepeso decorrente da administração por tempo prolongado de uma dieta rica em lipídeos, responsável pelos eventos/alterações descritos a seguir.

5.1. O sobrepeso/obesidade de ratos jovens alimentados cronicamente com uma dieta rica em lipídeos e que apresentam acúmulo de gordura visceral repercute no rim, no sistema cardiovascular e no fígado levando a uma síndrome hepatocardiorenal.

5.2. No sistema cardiovascular, a manifestação mais evidente do sobrepeso/obesidade é o estabelecimento progressivo de hipertensão arterial sistólica e diastólica.

5.3. A hipertensão sistólica pode ser atribuída a um acúmulo progressivo de Na^+ em compartimentos osmoticamente silenciosos como a parede dos grandes vasos, que teriam assim sua distensibilidade comprometida.

5.4. A hipertensão diastólica resulta de uma expansão lenta e progressiva de compartimento intravascular (e do compartimento extracelular como um todo) como resultado do aumento da reabsorção proximal de fluído evidenciada pelo clearance de lítio.

5.5. O aumento da reabsorção proximal de fluído resulta de aumento da concentração de Ca^{2+} citosólico (aumento da intensidade de picos e da duração e magnitude de ondas) em função da dessincronia das atividades da SERCA e daquele conjunto de atividades resistentes à tapsigargina.

5.6. A atividade resistente à tapsigargina representa um conjunto de atividades mediadas por ATPases reguladoras do tipo AAA+ presentes em diferentes estruturas membranares das células tubulares, incluindo as de organelas como o próprio retículo endoplasmático.

5.7. Alterações do entorno lipídico associado ao sobrepeso/obesidade seriam responsáveis – ao menos em parte – pelas alterações na catálise pela SERCA e pelas ATPases AAA+ em diferentes concentrações de ATP e Ca^{2+} e em diferentes etapas dos correspondentes ciclos de catálise.

5.8. As alterações locais provocadas pelo aumento da gordura visceral e do metabolismo adipocitário resultam em ativação do eixo $\text{Ang II} \rightarrow \text{AT}_1\text{R}$ no rim, assim

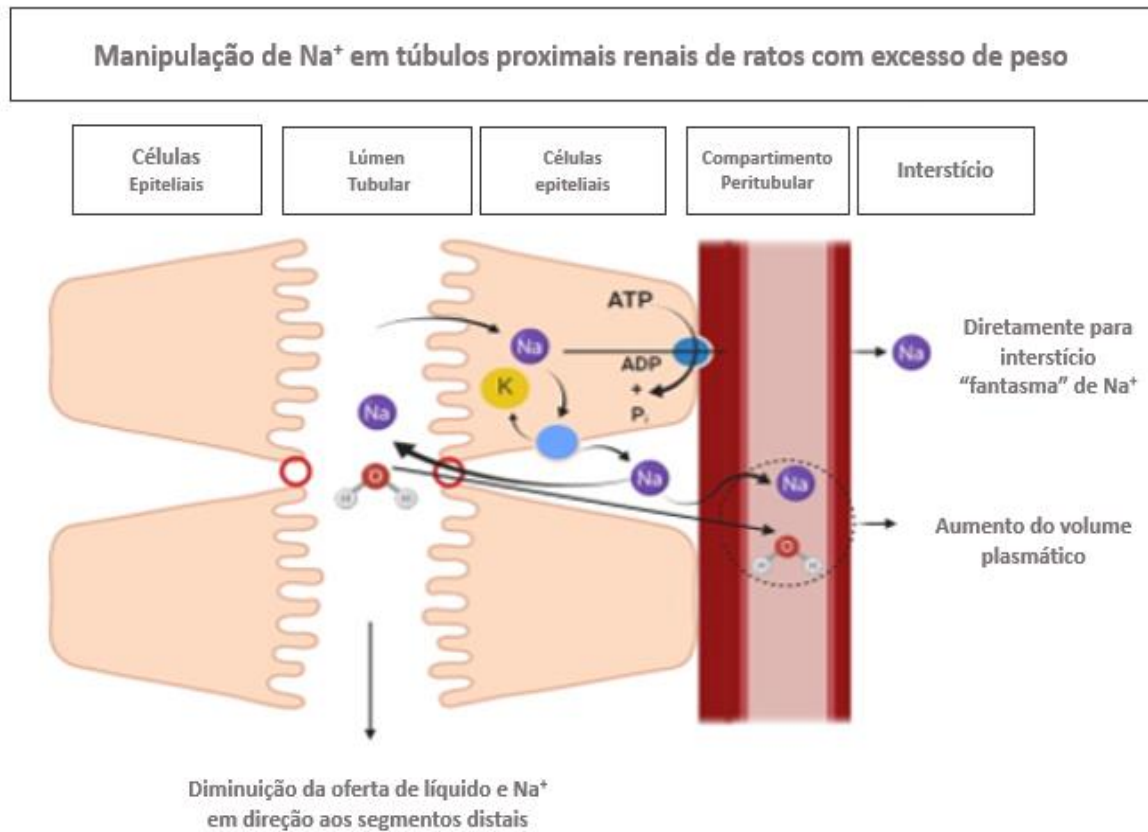


Figura 31. Proposta de reabsorção de Na^+ e água em túbulos proximais de ratos com sobrepeso e hipertensos, com uma parcela retornando ao lúmen como resultado de um fluxo retrógrado a partir do interespaço. A figura mostra também uma parcela pequena de Na^+ , aquele que é transportado pela Na^+ -ATPase resistente à ouabaína, que é transportado sem água (Dias *et al.*, 2014), diretamente para um compartimento “fantasma” (Titze *et al.*, 2014). A hiperatividade sistêmica desta ATPase poderia ser responsável pelo acúmulo osmoticamente silencioso do Na^+ em outros tecidos e órgãos.

como no fígado e em diferentes estruturas de sistema cardiovascular, levando às alterações descritas nesta Tese e em Luzes *et al.* (2021) e Crisóstomo *et al.* (2022).

4.9. A hiperatividade do eixo Ang II→AT₁R no sobrepeso/obesidade se sobrepõe à do Ang II→AT₂R, processo que desregula o SRAA em diferentes órgãos e tecidos.

4.10. A possibilidade de administração oral de Ang-(3–4) abre novas vistas para o tratamento – ou pelo menos para a melhora – de alterações provocadas pelo sobrepeso/obesidade em diferentes órgãos e tecidos.

6. Referências

- Albers RW. The (sodium plus potassium)-transport ATPase. In: Martonosi A (eds). The enzymes of biological membranes. Springer, Boston, MA. pp. 283–301, 1976.
- Andrew R, Westerbacka J, Wahren J, Yki-Järvinen H, Walker BR. The contribution of visceral adipose tissue to splanchnic cortisol production in healthy humans. *Diabetes* 54: 1364–1370, 2005.
- Adamczak M, Wiecek A. The adipose tissue as an endocrine organ. *Semin Nephrol* 33: 2–13, 2013.
- Aguayo-Ortiz R, Espinoza-Fonseca LM. Linking biochemical and structural states of SERCA: Achievements, challenges, and new opportunities. *Int J Mol Sci* 21: 4146, 2020.
- Aires MM. *Fisiologia*, 5ª edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2018.
- Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 11: 327–332, 2000.
- Asano S, Kamiya S, Takeguchi N. The energy transduction mechanism is different among P-type ion-transporting ATPases. Acetyl phosphate causes uncoupling between hydrolysis and ion transport in H^+, K^+ -ATPase. *J Biol Chem* 267: 6590–6595, 1992.
- Ashton NJ, Janelidze S, Al Khleifat A, Leuzy A, Van der Ende EL, Karikari TK, *et al.* A multicentre validation study of the diagnostic value of plasma neurofilament light. *Nat Commun* 12: 1–12, 2021.
- Axelband F, Dias J, Miranda F, Ferrão FM, Reis RI, Costa-Neto CM, *et al.* Ang-(3–4) suppresses inhibition of renal plasma membrane calcium pump by Ang II. *Regul Pept* 155: 81–90, 2009a.

- Axelband F, Dias J, Miranda F, Ferrão FM, Reis RI, Costa-Neto CM, *et al.* A scrutiny of the biochemical pathways from Ang II to Ang-(3–4) in renal basolateral membranes. *Regul Pept* 158: 47–56, 2009b.
- Axelband F, Dias J, Miranda F, Ferrão FM, Reis RI, Costa-Neto CM, Lara LS *et al.* Angiotensin-(3-4) counteracts the Angiotensin II inhibitory action on renal Ca^{2+} -ATPase through a cAMP/PKA pathway. *Regul Pept* 177: 27–34, 2012.
- Braam B, Mitchell KD, Fox J, Navar LG. Proximal tubular secretion of angiotensin II in rats. *Am J Physiol* 264: 891–898, 1993.
- Basso N, Terragno NA. History about the discovery of the renin-angiotensin system. *Hypertension*. 38: 1246–1249, 2001.
- Bloch K. The biological synthesis of cholesterol. *Science* 150: 19–28, 1965.
- Brooker RJ, Slayman CW. Inhibition of the plasma membrane $[\text{H}^+]$ -ATPase of *Neurospora crassa* by N-ethylmaleimide. Protection by nucleotides. *J Biol Chem* 257: 12051–12055, 1982.
- Botzen W, Duijndam S, van Beukering P. Lessons for climate policy from behavioral biases towards COVID-19 and climate change risks. *World Dev* 137: 105214, . 2021.
- Cabral EV, Vieira LD, Sant'Helena BRM, Ribeiro VS, Farias JS, Aires RS, *et al.* Alpha-Tocopherol during lactation and after weaning alters the programming effect of prenatal high salt intake on cardiac and renal functions of adult male offspring. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 46:1151–1165, 2019.
- Campbell DJ. Clinical relevance of local renin angiotensin systems. *Front Endocrinol* 5: 113, 2014.

- Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Ver* 84: 277–359, 2004.
- Capasso G, Geibel PJ, Damiano S, Jaeger P, Richards WG, Geibel JP. The calcium sensing receptor modulates fluid reabsorption and acid secretion in the proximal tubule. *Kidney Int* 84: 277–284, 2013.
- Carvalho CA, Santos MS. Effect of heat treatment on the ATPase activity of various sarcoplasmic reticulum preparations. *Experientia* 32: 428–430, 1976.
- Chand, DH, & Valentini, RP (Eds.). *Clinician's Manual of Pediatric Nephrology*. World Scientific, 2011.
- Choi SH, Ginsberg HN. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 22: 353–63, 2011.
- Cisternas, JR. Fisiologia do tecido adiposo e leptina. In: *Tratado de fisiologia aplicado à nutrição..* Robe Editorial, São Paulo. Cap. 50: 805–817b. 2002.
- Clausen JD, Vilsen B, McIntosh DB, Einholm AP, Andersen JP. Glutamate-183 in the conserved TGES motif of domain A of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase assists in catalysis of E2/E2P partial reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101: 2776–2781, 2004.
- Corrêa LH, Heyn GS, Magalhaes KG. The Impact of the Adipose Organ Plasticity on Inflammation and Cancer Progression. *Cells*, v. 8, p. 662, 2019.
- Costa RM, Neves KB, Tostes RC, Lobato NS. Perivascular adipose tissue as a relevant fat depot for cardiovascular risk in obesity. *Front Physiol* 9: 253, 2018.
- Costa-Silva JH, Silva PA, Pedi N, Luzardo R, Einicker-Lamas M, Lara LS, Bezerra AM, *et al*. Chronic undernutrition alters renal active Na^{+} transport in young rats:

potential hidden basis for pathophysiological alterations in adulthood? *Eur J Nutr.* 48: 437–445, 2009.

Cressey D, Callaway E. Cryo-electron microscopy wins chemistry Nobel. *Nature* 550: 167, 2017.

Crisóstomo T. Alterações estruturais, funcionais e moleculares do ventrículo esquerdo de ratos que receberam uma dieta hiperlipídica: influência do antagonismo do eixo Ang II/AT1R por Angiotensina-(3–4). Dissertação de Mestrado, IBqM/UFRJ. Rio de Janeiro, 229 pp. 2021.

Crisóstomo T, Pardal MAE, Herdy SA, Muzi-Filho H, Mello DB, Takiya CM, *et al.* Liver steatosis, cardiac and renal fibrosis, and hypertension in overweight rats: Angiotensin-(3–4) -sensitive hepatocardiorenal syndrome. *Metabol Open* 14: 100176, 2022.

Danziger J, Chen KP, Lee J, Feng M, Mark RG, Celi LA, Mukamal KJ. Obesity, acute kidney injury, and mortality in critical illness. *Crit Care Med* 44: 328–334, 2016.

Darby IA, Sernia C. In situ hybridization and immunohistochemistry of renal angiotensinogen in neonatal and adult rat kidneys. *Cell Tissue Res* 281: 197–206, 1995.

de Meis L, Carvalho MG. On the sidedness of membrane phosphorylation by Pi and ATP synthesis during reversal of the Ca²⁺ pump of sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biol Chem* 287: 16987–17005, 2012.

De Mello WC. Intracellular angiotensin II regulates the inward calcium current in cardiac myocytes. *Hypertension* 32: 976–982, 1998.

Després JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature.* 444: 881–887, 2006.

- De Souza AM, Lopes AG, Pizzino CP, Fossari RN, Miguel NC, Cardozo FP, *et al.* Angiotensin II and angiotensin-(1–7) inhibit the inner cortex Na⁺-ATPase activity through AT₂ receptor. *Regul Pept* 120: 167–175, 2004.
- Dias J, Axelband F, Lara LS, Muzi-Filho H, Vieyra A. Is angiotensin-(3–4) (Val-Tyr), the shortest angiotensin II-derived peptide, opening new vistas on the renin-angiotensin system? *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 18: 1470320316689338, 2017.
- Dias J, Ferrão FM, Axelband F, Carmona AK, Lara LS, Vieyra A. ANG-(3–4) inhibits renal Na⁺-ATPase in hypertensive rats through a mechanism that involves dissociation of ANG II receptors, heterodimers, and PKA. *Am J Physiol Renal Physiol* 306: 855–863, 2014.
- Dunbar LA, Caplan MJ. Ion pumps in polarized cells: sorting and regulation of the Na⁺, K⁺- and H⁺, K⁺-ATPases. *J Biol Chem* 276: 29617–29620, 2001.
- Dzau VJ. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation*. 77: 14–13, 1988.
- Edwards A, Bonny O. A model of calcium transport and regulation in the proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 315: 942–953, 2018.
- Ehrhart-Bornstein M, Lamounier-Zepter V, Schraven A, Langenbach J, Willenberg HS, Barthel A, *et al.* Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14211–14216, 2003.
- Endo M. Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum. *Adv Exp Med Biol* 592: 275–285, 2007.
- Escobales N, Canessa M. Ca²⁺-activated Na⁺ fluxes in human red cells. Amiloride sensitivity. *J Biol Chem* 260:11914–11923, 1985.

- Feng M, Whitesall S, Zhang Y, Beibel M, D'Alecy L, DiPetrillo K. Validation of volume-pressure recording tail-cuff blood pressure measurements. *Am J Hypertens* 21:1288–1291, 2008.
- Ferrario CM, Varagic J. The ANG-(1–7)/ACE2/Mas axis in the regulation of nephron function. *Am J Physiol Renal Physiol* 298: 1297–1305, 2010.
- Ferrario CM, Groban L, Wang H, Cheng CP, VonCannon JL, Wright KN, *et al.* The angiotensin-(1–12) /chymase axis as an alternate component of the tissue renin angiotensin system. *Mol Cell Endocrinol* 529: 111119, 2021.
- Férraille E, Doucet A. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol Ver* 81: 345–418, 2001.
- Ferrão FM, Lara LS, Axelband F, Dias J, Carmona AK, Reis RI, *et al.* Exposure of luminal membranes of LLC-PK1 cells to ANG II induces dimerization of AT1/AT2 receptors to activate SERCA and to promote Ca^{2+} mobilization. *Am J Physiol Renal Physiol* 302: 875–883, 2012.
- Francischetti EA, Genelhu VA. Obesity-hypertension: an ongoing pandemic. *Int J Clin Pract* 61: 269–280, 2007.
- Giordano S, Victorzon M, Stormi T, Suominen E. Desire for body contouring surgery after bariatric surgery: do body mass index and weight loss matter? *Aesthet Surg J*;34: 96–105, 2014.
- Gippini A, Mato A, Pazos R, Suarez B, Vila B, Gayoso P, *et al.* Effect of long-term strength training on glucose metabolism. Implications for individual impact of high lean mass and high fat mass on relationship between BMI and insulin sensitivity. *J Endocrinol Invest* 25: 520–525, 2002.
- Gomez-Villafuertes R, Torres B, Barrio J, Savignac M, Gabellini N, Rizzato F, *et al.* Downstream regulatory element antagonist modulator regulates Ca^{2+}

homeostasis and viability in cerebellar neurons. *J Neurosci* 25: 10822–10830, 2005.

Goodfriend TL, Calhoun DA. Resistant hypertension, obesity, sleep apnea, and aldosterone: theory and therapy. *Hypertension* 43: 518–524, 2004.

Gotto AM Jr. Interrelationship of triglycerides with lipoproteins and high-density lipoproteins. *Am J Cardiol* 66: 20–23, 1990.

Grummer-Strawn LM, Reinold C, Krebs NF; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Use of World Health Organization and CDC growth charts for children aged 0-59 months in the United States. *MMWR Recomm Rep* 59: 1–15, 2010.

Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiologia médica*. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

Hall JE, do Carmo JM, da Silva AA, Wang Z, Hall ME. Obesity-induced hypertension: Interaction of neurohumoral and renal mechanisms. *Circ Res* 13: 991–1006, 2015.

Kühlbrandt W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 282–295, 2004.

Hiranyachattada S, Harris PJ. Regulation of renal proximal fluid uptake by luminal and peritubular angiotensin II. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 5: 89–92, 2004.

Holappa M, Vapaatalo H, Vaajanen A. Local ocular renin-angiotensin-aldosterone system: any connection with intraocular pressure? A comprehensive review. *Ann Med* 52: 191–206, 2020.

Hruby A, Hu FB. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics* 33: 673–689, 2015.

- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2020. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/29204-um-em-cada-quatro-adultos-do-pais-estava-obeso-em-2019>. Acessado em: 16 de fevereiro de 2021.
- Inesi G, de Meis L. Regulation of steady state filling in sarcoplasmic reticulum. Roles of back-inhibition, leakage, and slippage of the calcium pump. *J Biol Chem* 264: 5929–5936, 1989.
- Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Life Sci* 75: 3313–3327, 2018.
- Joles JA. Measuring systolic and diastolic blood pressure in rodents. *Kidney Int* 96: 1424–1425, 2019.
- Katsurada A, Iritani N, Fukuda H, Matsumura Y, Nishimoto N, Noguchi T, Tanaka T. Effects of nutrients and hormones on transcriptional and post-transcriptional regulation of acetyl-CoA carboxylase in rat liver. *Eur J Biochem* 190: 435–441, 1990.
- Kopp W. How western diet and lifestyle drive the pandemic of obesity and civilization diseases. *Diabetes Metab Syndr Obes* 12: 2221–2236, 2019.
- Gregolin C, Ryder E, Kleinschmidt AK, Warner RC, Lane MD. Molecular characteristics of liver acetyl CoA carboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 56: 148–155, 1966.
- Gronberg C, Hu Q, Mahato DR, Longhin E, Salustros N, Duelli A, *et al*. Structure and ion-release mechanism of PIB-4-type ATPases. *Elife* 10: 73124, 2021.
- Kazory A, Ronco C. Hepatorenal syndrome or hepatocardiorenal syndrome: Revisiting basic concepts in view of emerging data. *Cardiorenal Med* 9: 1–7, 2019.

- Kwok KH, Lam KS, Xu A. Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. *Exp Mol Med* 48 : 215, 2016.
- Kühlbrandt W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 282–295, 2004.
- Lafont F, Burkhardt JK, Simons K. Involvement of microtubule motors in basolateral and apical transport in kidney cells. *Nature* 372: 801–803, 1994.
- Lalouel JM, Rohrwasser A, Terreros D, Morgan T, Ward K. Angiotensinogen in essential hypertension: from genetics to nephrology. *J Am Soc Nephrol* 12: 606–615.
- Langin D, Dicker A, Tavernier G, Hoffstedt J, Mairal A, Rydén M, *et al.* Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes* 54: 3190–3197.
- Laursen M, Bublitz M, Moncoq K, Olesen C, Moller JV, Young HS, *et al.* Cyclopiazonic acid is complexed to a divalent metal ion when bound to the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J Biol Chem* 284: 13513–13518, 2009.
- Light KE, Kane CJ, Pierce DR, Jenkins D, Ge Y, Brown G, *et al.* Intragastric intubation: important aspects of the model for administration of ethanol to rat pups during the postnatal period. *Alcohol Clin Exp Res* 22: 1600–1606, 1998.
- Liu C, Bai Y, Chen Y, Wang Y, Sottejeau Y, Liu L, *et al.* Reduction of Na/K-ATPase potentiates marinobufagenin-induced cardiac dysfunction and myocyte apoptosis. *J Biol Chem* 287:16390–16398, 2012.
- Liu C, Yang CX, Chen XR, Liu BX, Li Y, Wang XZ, Sun W, *et al.* Alamandine attenuates hypertension and cardiac hypertrophy in hypertensive rats. *Amino Acids*. 50: 1071–1081, 2018.

- López-Novoa JM, Rodríguez-Peña AB, Ortiz A, Martínez-Salgado C, López Hernández FJ. Etiopathology of chronic tubular, glomerular and renovascular nephropathies: clinical implications. *J Transl Med* 9: 13, 2011.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275, 1951.
- Lowe D.A, Husom A.D, Ferrington D.A, Thompson L.V. Myofibrillar myosin ATPase activity in hindlimb muscles from young and aged rats. *Mech Ageing Dev* 125: 619–627, 2004.
- Luzes, R. Alterações nas ATPases transportadoras de Na⁺ em células de túbulos proximais renais de ratos obesos: envolvimento de vias relacionadas à Angiotensina II e à Angiotensina-(3–4)? Tese de Doutorado, Programa de Biomedicina Translacional-BIOTRANS, UNIGRANRIO/INMETRO/UEZO, Duque de Caxias. 112 pp, 2020.
- Luzes R, Crisóstomo T, Silva PA, Lack R, de Abreu VG, Francischetti EA, et al. Angiotensin-(3–4) normalizes blood pressure, decreases Na⁺ and energy intake, but preserves urinary Na⁺ excretion in overweight hypertensive rats. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1867: 166012, 2021.
- Madrugá JG, Moraes SF, Scherer AF. Positive association between waist-to-height ratio and hypertension in adolescents. *Rev Port Cardiol* 35:479–484.
- Maenhaut N, Van de Voorde J. Regulation of vascular tone by adipocytes. *BMC Med* 9: 25, 2011.
- Malik VS, Willett WC, Hu FB. Global obesity: trends, risk factors and policy implications. *Nat Rev Endocrinol* 9: 13–27, 2013.
- Manzanedo RD, Manning P. COVID-19: Lessons for the climate change emergency. *Sci Total Environ* 742: 140563, 2020.

- Marchi-Alves LM, Yagui CM, Rodrigues CS, Mazzo A, Rangel EML, *et al.* Obesidade infantil ontem e hoje: importância da avaliação antropométrica pelo enfermeiro. Escola Anna Nery 15: 238–244, 2011.
- Marshall RH, Eissa M, Bluth EI, Gulotta PM, Davis NK. Hepatorenal index as an accurate, simple, and effective tool in screening for steatosis. A.J.R Am J Roentgenol 199: 997–1002, 2012.
- Martellia, A. Sistema renina angiotensina aldosterona e homeostase cardiovascular. Journal of Health Sciences 12: 4, 2010.
- Matsuzawa Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. FEBS Lett 580: 2917–2921, 2006.
- Ménard J. Anthology of the renin-angiotensin system: a one hundred reference approach to angiotensin II antagonists. J Hypertens Suppl 11: 3–11, 1993.
- Misquitta C.M, Mack D.P, Grover A.K. Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} (SERCA)-pumps: link to heart beats and calcium waves. Cell Calcium. 25: 277–290, 1999.
- Mittendorfer B, Yoshino M, Patterson BW, Klein S. VLDL Triglyceride kinetics in lean, overweight, and obese men and women. J Clin Endocrinol Metab 101: 4151–4160, 2016.
- Miura S, Matsuo Y, Kiya Y, Karnik SS, Saku K. Molecular mechanisms of the antagonistic action between AT1 and AT2 receptors. Biochem Biophys Res Commun 391: 85–90, 2010.
- Myers M.G Jr. Metabolic sensing and regulation by the hypothalamus. Am J Physiol Endocrinol Metab 294: 809, 2008.
- Ministério da Saúde (MS). Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico, Vigitel 2017. Ministério da Saúde Brasília.

Disponível

em:

http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2017_vigilancia_fatores_riscos.pdf. Acessado em: 3 de fevereiro de 2022.

Navar LG, Lewis L, Hymel A, Braam B, Mitchell KD. Tubular fluid concentrations and kidney contents of angiotensins I and II in anesthetized rats. *J Am Soc Nephrol*. 5: 1153–1158, 1994.

Neyra JA, Leaf DE. Risk prediction models for acute kidney injury in critically ill patients: opus in progressu. *Nephron* 140: 99–104, 2018.

Organizações das Nações Unidas (ONU). OMS: incidência de obesidade e subnutrição reflete mudanças nos sistemas alimentares. Disponível em: <https://news.un.org/pt/story/2019/12/1698021#:~:text=Novo%20estudo%20indica%20que%20mais,a%20subnutri%C3%A7%C3%A3o%20e%20a%20obesidade>. Acessado em: 3 de fevereiro de 2022.

Pagnon J, Matzaris M, Stark R, Meex RC, Macaulay SL, Brown W, *et al*. Identification and functional characterization of protein kinase A phosphorylation sites in the major lipolytic protein, adipose triglyceride lipase. *Endocrinology* 153: 4278–4289, 2012.

Pesquisa Nacional de Saúde (PNS): Atenção primária à saúde e informações antropométricas. Brasil, 2020. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101758.pdf>. Acessado em 16 de fevereiro de 2022.

Pieretti JC, Junho CVC, Carneiro-Ramos MS, Seabra AB. H₂S- and NO-releasing gasotransmitter platform: A crosstalk signaling pathway in the treatment of acute kidney injury. *Pharmacol Res* 161: 105121, 2020.

- Post RL, Merritt CR, Kinsolving CR, Albright CD. Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte. *J. Biol. Chem* 235: 1796–1802, 1960.
- Puchades C, Sandate CR, Lander GC. The molecular principles governing the activity and functional diversity of AAA+ proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21: 43–58, 2020.
- Prado WLD, Lofrano MC, Oyama LM, & Dâmaso AR. Obesity and inflammatory adipokines: practical implications for exercise prescription. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* 15: 378–383, 2013.
- Prado NJ, Ferder L, Manucha W, Diez ER. Anti-Inflammatory effects of melatonin in obesity and hypertension. *Curr Hypertens Rep* 20: 45, 2018.
- Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition* 21: 775–777, 2005.
- Rangel LB, Caruso-Neves C, Lara LS, Lopes AG. Angiotensin II stimulates renal proximal tubule Na⁺-ATPase activity through the activation of protein kinase C. *Biochim Biophys Acta* 1564: 310–316, 2002.
- Rahmouni K, Correia ML, Haynes WG, Mark AL. Obesity-associated hypertension: new insights into mechanisms. *Hypertension* 45: 9–14, 2005.
- Reilly SM, Saltiel AR. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat Rev Endocrinol* 13: 633–643, 2017.
- Reisin E, Weir MR, Falkner B, Hutchinson HG, Anzalone DA, Tuck ML. Lisinopril versus hydrochlorothiazide in obese hypertensive patients: a multicenter placebo-controlled trial. Treatment in obese patients with hypertension (TROPY) Study Group. *Hypertension* 1: 140–145, 1997.

- Resnick LM, Militianu D, Cunnings AJ, Pipe JG, Evelhoch JL, Soulen RL. Direct magnetic resonance determination of aortic distensibility in essential hypertension: relation to age, abdominal visceral fat, and in situ intracellular free magnesium. *Hypertension* 3: 654–659, 1997.
- Resende MMD, & Mill, JG. Vias alternativas de produção de angiotensina II e sua importância em condições fisiológicas ou fisiopatológicas. *Arq Bras Cardiol* 78: 425–431, 2002.
- Reynisdottir S, Ellerfeldt K, Wahrenberg H, Lithell H, Arner P. Multiple lipolysis defects in the insulin resistance (metabolic) syndrome. *J Clin Invest* 93: 2590–2599, 1994.
- Rianto F, Hoang T, Revoori R, Sparks MA. Angiotensin receptors in the kidney and vasculature in hypertension and kidney disease. *Mol Cell Endocrinol* 529: 111259, 2021.
- Ricquier D. Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure. *Proc Nutr Soc* 64: 47–52, 2005.
- Robles RG, Villa E, Santirso R, Martínez J, Ruilope LM, *et al.* Effects of captopril on sympathetic activity, lipid and carbohydrate metabolism in a model of obesity-induced hypertension in dogs. *Am J Hypertens* 6: 1009–1015, 1993.
- Romanova IV, Ramos EJ, Xu Y, Quinn R, Chen C, George ZM, *et al.* Neurobiologic changes in the hypothalamus associated with weight loss after gastric bypass. *J Am Coll Surg* 199: 887–895, 2004.
- Romero CEM, & Zanesco A. The role of leptin and ghrelin on the genesis of obesity. *Revista de Nutrição* 19: 85–91, 2006.

- Romieu I, Dossus L, Barquera S, Blotti re HM, Franks PW, Gunter M, *et al.* IARC working group on energy balance and obesity. Energy balance and obesity: what are the main drivers? *Cancer Causes Control* 28: 247–258, 2017.
- Saely CH, Geiger K, Drexel H. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology* 58: 15–23, 2012.
- Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I, *et al.* Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8258–8263, 2003.
- Santos RA, Ferreira AJ, Sim es & Silva AC. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1–7)-Mas axis. *Exp Physiol* 93: 519–527, 2008.
- Santos SH, Giani JF, Burghi V, Miquet JG, Qadri F, Braga JF, *et al.* Oral administration of angiotensin-(1–7) ameliorates type 2 diabetes in rats. *J Mol Med (Berl)*, 92: 255–265, 2014.
- Scallen TJ, Sanghvi A. Regulation of three key enzymes in cholesterol metabolism by phosphorylation/dephosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 2477–2480, 1983.
- Seikaly MG, Arant BS Jr, Seney FD Jr. Endogenous angiotensin concentrations in specific intrarenal fluid compartments of the rat. *J Clin Invest* 86: 1352–1357, 1990.
- Silberberg JM, Corey RA, Hielkema L, Stock C, Stansfeld PJ, Paulino C, H nelt I. Deciphering ion transport and ATPase coupling in the intersubunit tunnel of KdpFABC. *Nat Commun* 12: 5098, 2021.
- Silva PA, Monnerat-Cahli G, Pereira-Ac cio A, Luzardo R, Sampaio LS, Luna-Leite MA, *et al.* Mechanisms involving Ang II and MAPK/ERK1/2 signaling pathways

- underlie cardiac and renal alterations during chronic undernutrition. *PLoS One* 9: 100410, 2014.
- Schiffl H, Lang SM. Obesity, acute kidney injury and outcome of critical illness. *Int Urol Nephrol* 49:461–466, 2017.
- Sharma K, Considine RV. The Ob protein (leptin) and the kidney. *Kidney Int* 53: 1483–1487, 1998.
- Sathyanarayanan U, Musa M, Bou Dib P, Raimundo N, Milosevic I, Krisko A. ATP hydrolysis by yeast Hsp104 determines protein aggregate dissolution and size in vivo. *Nat Commun* 11: 5226, 2020.
- Shin Y, Davis JH, Brau RR, Martin A, Kenniston JA, Baker TA, Sauer RT, Lang MJ. Single-molecule denaturation and degradation of proteins by the AAA+ ClpXP protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 19340–19345, 2009.
- Skou JC. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *J Am Soc Nephrol* 9: 2170–2177, 1998.
- Sorenson MM, Coelho HS, Reuben JP. Caffeine inhibition of calcium accumulation by the sarcoplasmic reticulum in mammalian skinned fibers. *J Membr Biol*. 90: 219–30, 1986.
- Sung PH, Chiang HJ, Wallace CG, Yang CC, Chen YT, Chen KH, *et al.* Exendin-4-assisted adipose derived mesenchymal stem cell therapy protects renal function against co-existing acute kidney ischemia-reperfusion injury and severe sepsis syndrome in rat. *Am J Transl Res* 9: 3167–3183, 2017.
- Suzuki T, Kawakita M. Uncoupling of ATP splitting from Ca^{2+} -transport in Ca^{2+} -transporting ATPase of the sarcoplasmic reticulum as a result of modification by N-(3-pyrene)maleimide: activation of a channel with a specificity for alkaline earth metal ions. *J Biochem* 114: 203–209, 1993.

- Swinburn BA, Kraak VI, Allender S, Atkins VJ, Baker PI, Bogard JR, *et al.* The Global Syndemic of Obesity, Undernutrition, and Climate Change: The Lancet Commission report. *Lancet* 393: 791–846, 2019.
- Tadini-Buoninsegni F, Mikkelsen SA, Mogensen LS, Molday RS, Andersen JP. Phosphatidylserine flipping by the P₄-ATPase ATP8A₂ is electrogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116: 16332–16337, 2019.
- Taussky HH, Shorr E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J Biol Chem* 202: 675–685, 1953.
- Therien AG, Blostein R. Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: 541–566, 2000.
- Thomsen K, & Schou, M. Lithium clearance: a new research area. *Physiology* 1: 126–128, 1986.
- Tonelli M, Riella M. Chronic kidney disease and the aging population. *J Bras Nefrol.* 36: 1–5, 2014.
- Tsuda T, Toyoshima C. Nucleotide recognition by CopA, a Cu⁺-transporting P-type ATPase. *EMBO J* 12: 1782–1791, 2009.
- Titze J, Dahlmann A, Lerchl K, Kopp C, Rakova N, Schröder A, & Luft FC. Spooky sodium balance. *Kidney Int* 85: 759–767, 2014.
- Umemura S, Nyui N, Tamura K, Hibi K, Yamaguchi S, Nakamaru M, *et al.* Plasma angiotensinogen concentrations in obese patients. *Am J Hypertens.* 10: 629–633, 1997.
- Valverde RRHF. Comunicação intracelular de longo alcance entre domínios de fosforilação regulatória e catalítica em Ccc2p, a Cu(I)-ATPase de levedura: papel

dual da proteína cinase A (PKA). Tese de Doutorado, Programa de Ciências Biológicas (Biofísica), IBCCF/UFRJ. Rio de Janeiro, 146 pp, 2007.

Vercesi AE, Hermes-Lima M, Meyer-Fernandes JR, Vieyra A. Calcium inhibition of the ATP in equilibrium with [32P] Pi exchange and of net ATP synthesis catalyzed by bovine submitochondrial particles. *Biochim Biophys Acta* 1020: 101–106, 1990.

Vieyra A, Nachbin L, de Dios-Abad E, Goldfeld M, Meyer-Fernandes JR, de Moraes L. Comparison between calcium transport and adenosine triphosphatase activity in membrane vesicles derived from rabbit kidney proximal tubules. *J Biol Chem* 261: 4247–4255, 1986.

Vieyra A, Caruso-Neves C, Meyer-Fernandes JR. ATP in equilibrium with 32Pi exchange catalyzed by plasma membrane Ca^{2+} -ATPase from kidney proximal tubules. *J Biol Chem* 266: 10324–10330, 1991.

Vieyra A, Scofano HM, Guimarães-Motta H, Tume RK, de Meis L. Transient state kinetic studies of phosphorylation by ATP and Pi of the calcium-dependent ATPase from sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 568: 437–445, 1979.

Vieyra A, Mintz E, Lowe J, & Guillain F. Ca^{2+} binding to sarcoplasmic reticulum ATPase phosphorylated by Pi reveals four thapsigargin-sensitive Ca^{2+} sites in the presence of ADP. *Biochim Biophys Acta* 1667: 103–113, 2004.

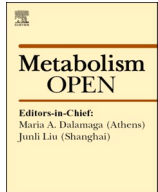
Virtanen KA, Lidell E, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, *et al.* Functional brown adipose tissue in healthy adults *N Engl J Med* 360: 1518–1525, 2009.

Vitavska O, Huss M, Albertmelcher A, Bockelmann S, Nardmann C, Tabke K, *et al.* Vacuolar H^{+} -ATPases: intra- and intermolecular interactions. *Eur J Cell Biol* 90: 688–695, 2011.

- Ward ZJ, Bleich SN, Cradock AL, Barrett JL, Giles CM, Flax C, *et al.* Projected U.S. State-Level Prevalence of Adult Obesity and Severe Obesity. *N Engl J Med* 381: 2440–2450, 2019.
- Wajchenberg BL. Tecido adiposo como glândula endócrina. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 44: 13–20, 2000.
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1: 945–951, 1982.
- Wang ZQ, Millatt LJ, Heiderstadt NT, Siragy HM, Johns RA, & Carey RM. Differential regulation of renal angiotensin subtype AT1A and AT2 receptor protein in rats with angiotensin-dependent hypertension. *Hypertension* 33: 96–101, 1999.
- Whiting PH. The use of lithium clearance measurements as an estimate of glomerulo-tubular function. *Ren Fail* 21: 421–426, 1999.
- Wilson CG, Tran JL, Erion DM, Vera NB, Febbraio M, Weiss EJ. Hepatocyte-specific disruption of CD36 attenuates fatty liver and improves insulin sensitivity in HFD-fed mice. *Endocrinology* 157: 570–585, 2016.
- World Obesity. Prevalence of Obesity: The epidemic of obesity is now recognised as one of the most important public health problems facing the world today. Adult obesity is more common globally than under-nutrition. Disponível em: <https://www.worldobesity.org/about/about-obesity/prevalence-of-obesity>. Acessado em 3 de fevereiro de 2022.
- Woroniecki RP, Schnaper HW. Progression of glomerular and tubular disease in pediatrics. *Semin Nephrol* 29: 412–424, 2009.
- Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev* 27: 234–250, 2013.

- Ye X, Mayne L, Englander SW. A conserved strategy for structure change and energy transduction in Hsp104 and other AAA+ protein motors. *J Biol Chem* 297: 101066, 2021.
- Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 64: 73–84, 2016.
- Zakka K, Chidambaram S, Mansour S, Mahawar K, Salminen P, Almino R, *et al.* SARS-CoV-2 and Obesity: "CoVesity"-a pandemic within a pandemic. *Obes Surg* 31: 1745–1754, 2021.
- Zorena K, Jachimowicz-Duda O, Ślęzak D, Robakowska M, Mrugacz M. Adipokines and obesity. Potential link to metabolic disorders and chronic complications. *Int J Mol Sci* 21: 3570, 2020.

ANEXO 1



Liver steatosis, cardiac and renal fibrosis, and hypertension in overweight rats: Angiotensin-(3–4)-sensitive hepatocardiorenal syndrome

Thuany Crisóstomo^{a,b}, Marco A.E. Pardal^c, Simone A. Herdy^d, Humberto Muzi-Filho^{b,c},
Debora B. Mello^b, Christina M. Takiya^c, Rafael Luzes^{c,d}, Adalberto Vieyra^{b,c,d,*}

^a Leopoldo de Meis Institute of Medical Biochemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^b National Center of Structural Biology and Bioimaging/CENABIO, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^c Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^d Graduate Program in Translational Biomedicine/BIOTRANS, University of Grande Rio, Duque de Caxias, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Hyperlipidic diet
Overweight rats
Arterial hypertension
Cardiac and renal fibrosis
Non-alcoholic liver steatosis
Hepatocardiorenal syndrome

ABSTRACT

Overweight/obesity is a growing pandemic that affects many organs and tissues. We have investigated whether a high-lipid diet provokes an imbalance between type 1 and type 2 angiotensin II (Ang II) receptors signaling, leading to liver alterations associated with cardiovascular and kidney disturbances. Chronic administration of a high-lipid diet can provoke hepatocardiorenal syndrome resulting from activation of the Ang II→type 1 receptor axis, which is entirely counteracted by Ang-(3–4), the allosteric enhancer of the Ang II→type 2 receptor pathway.

1. Introduction

We recently communicated [1] that young rats chronically given a hypercaloric diet in which 70% of calories come from lipids (a “Western diet” [2]) developed overweight with increased visceral fat (perirenal and epididymal), hypertension, exacerbated active Na^+ reabsorption in kidney proximal tubule cells, and highly positive Na^+ balance [1]. We proposed that the cardiovascular and renal alterations resulted from hyperactivation of angiotensin II type 1 receptor (AT_1R) signaling (the Ang II→ AT_1R axis of the renin-angiotensin-aldosterone system/RAAS), which was counteracted by administration of Ang-(3–4) (Val-Tyr), the shortest renin-angiotensin-derived peptide. Ang-(3–4) antagonizes several effects of Ang II in physiological and pathological conditions [3]. One of the mechanisms for the counteracting effect is the allosteric enhancing of Ang II binding to type 2 receptors by Ang-(3–4) [4], i.e., the activation of the Ang II→ AT_2R axis of RAAS. Facing the concomitant cardiac and renal alterations, we initially proposed that the overweight resulting from chronic administration of a high-lipid (HL) diet culminates with a secondary type V cardiorenal syndrome. In this type, a systemic pathology (such as for overweight/obesity) simultaneously affects the heart and the kidney [5].

We carried out further studies in heart, kidney, and liver in adult rats, given the hyperlipidic diet from a juvenile age. The purpose was to

investigate whether or not overweight/obesity provokes early structural lesions in these organs, in addition to the vascular and renal functional alterations. The driving ideas for the present study came from the central role that the visceral fat has in the activation of the Ang II→ AT_1R axis of RAAS [6] and from the hypothesis that being overweight/obese could provoke concomitant heart, kidney, and liver structural alterations as the result of upregulation of Ang II→ AT_1R signaling. The stimulus of proinflammatory cytokines by the visceral fat contributes to generalized inflammation and lipotoxicity [7,8].

2. Methods

2.1. Ethical considerations

The study was approved by the Committee for Ethical Use of Animals in Experimentation at the Federal University of Rio de Janeiro (protocol 075/19), and was carried out following the ARRIVE guidelines for preclinical animal studies.

2.2. Diets and animal groups

The animals were bred, maintained and studied in the Vivarium for Neglected Diseases and Malnutrition of the Carlos Chagas Filho Institute

* Corresponding author. Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

E-mail address: avieyra@biof.ufrj.br (A. Vieyra).

<https://doi.org/10.1016/j.metop.2022.100176>

Received 12 January 2022; Received in revised form 11 March 2022; Accepted 11 March 2022

Available online 18 March 2022

2589-9368/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

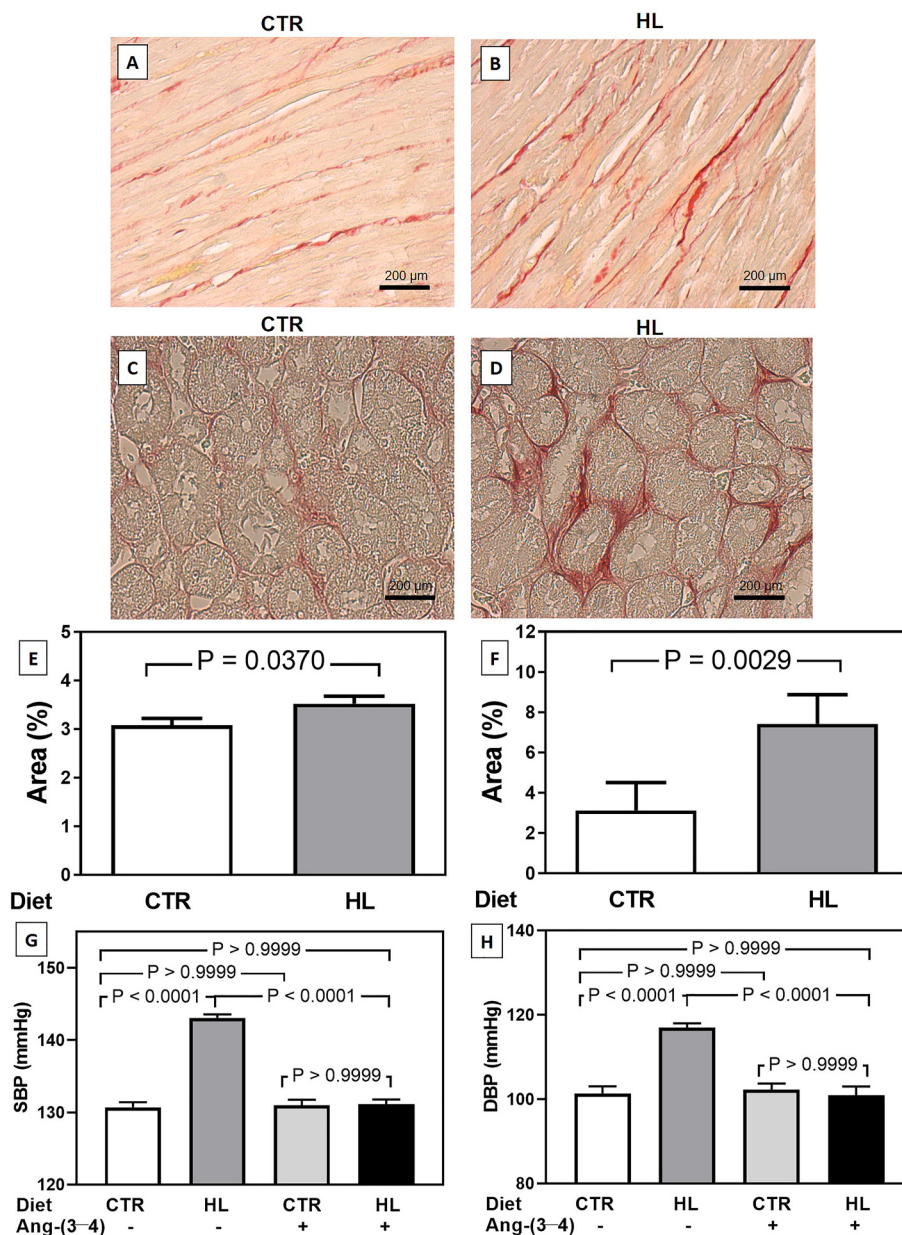


Fig. 1. Picrosirius staining of the left ventricle and renal cortex, and systolic blood pressure in rats given control (CTR) and high-lipid content (HL) diets. (A, B) Representative images from left ventricular tissue. (C, D) Representative images from renal cortical tissue. (E, F) Graphical representation of the surface areas of the collagen network as stained by picrosirius red in cardiac and renal tissues, respectively. Left ventricle CTR: $n = 4$ rats; total analysed areas = 40. Left ventricle HL: $n = 5$ rats; total analysed areas = 50. Renal cortex CTR: $n = 4$ rats; total analysed areas = 40. Renal cortex HL: $n = 5$ rats; total analysed areas = 50. Differences were assessed using unpaired Student's t -test. P values are indicated within the panels. (G) Systolic blood pressure of CTR and HL rats aged 164 days that received or not Ang-(3-4) between days 162 and 164 of age. (H) Diastolic blood pressure of the same rats. Values are mean $\pm$ SEM. Differences were assessed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test for selected pairs. P values are indicated within the panel. CTR: $n = 17$; HL: $n = 12$; CTR + Ang-(3-4): $n = 13$; HL + Ang-(3-4): $n = 14$. The animals were the same immediately used for ultrasound studies (see Fig. 2). In one rat from this ensemble, liver position relative to kidney did not allow recording of adequate images. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

at Federal University of Rio de Janeiro. Male Wistar rats received ad libitum filtered water and a commercial diet for rodents (CTR) or a hyperlipidic diet (HL) (PRAG Solutions, São Paulo, Brazil) from 58 to 164 days of age. At day 162 part of the animals received 4 doses by gavage, at 12 h intervals, of vehicle (water) or Ang-(3-4) (80 mg/kg) (Aminotech, Diadema, Brazil), giving the groups CTR, HL, CTR + Ang-(3-4) and HL + Ang-(3-4). The total number of animals in this study was 65. A random number table was used to allocate the rats to the different groups and a single observer (M.A.E.P.) was aware of the group allocation in the different experiments. The same observer controlled the order of treatments and measurements.

2.3. Histological analysis of collagen deposits in heart and kidney

Small fragments of left ventricle near the apex and of renal cortex (~50 mg) were removed immediately after euthanasia at day 164, suspended in 4% paraformaldehyde (w/v) for 24 h, embedded in paraffin and then cut in slices 4 μ m thick. After staining with Picrosirius Red, the images were obtained using an Eclipse microscope (Nikon,

Tokyo, Japan) coupled to an Evolution camera (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA) and quantified using the ImageJ software (1.4.3.67 version) from the ratio, in each area, of red pixels/total pixels.

2.4. Blood pressure determinations

Blood pressure was measured by pletismography (model V3.0 Insight, Ribeirão Preto, Brazil) in rats aged 164 days, as previously described [1].

2.5. Recording of ultrasound images

Rats (aged 164 days) were anesthetized with isoflurane. Images were obtained with the high-resolution ultrasound Vevo® 2100 (FUJIFILM VisualSonics, Toronto, Canada) coupled to a 20–70 MHz as described by Marshall et al. [9] with slight modifications. Briefly, images were recorded from the right upper retroperitoneal region and the right liver lobe delimited by the circle tool of the system. After transforming the images to the JPEG format, the hepatorenal index was

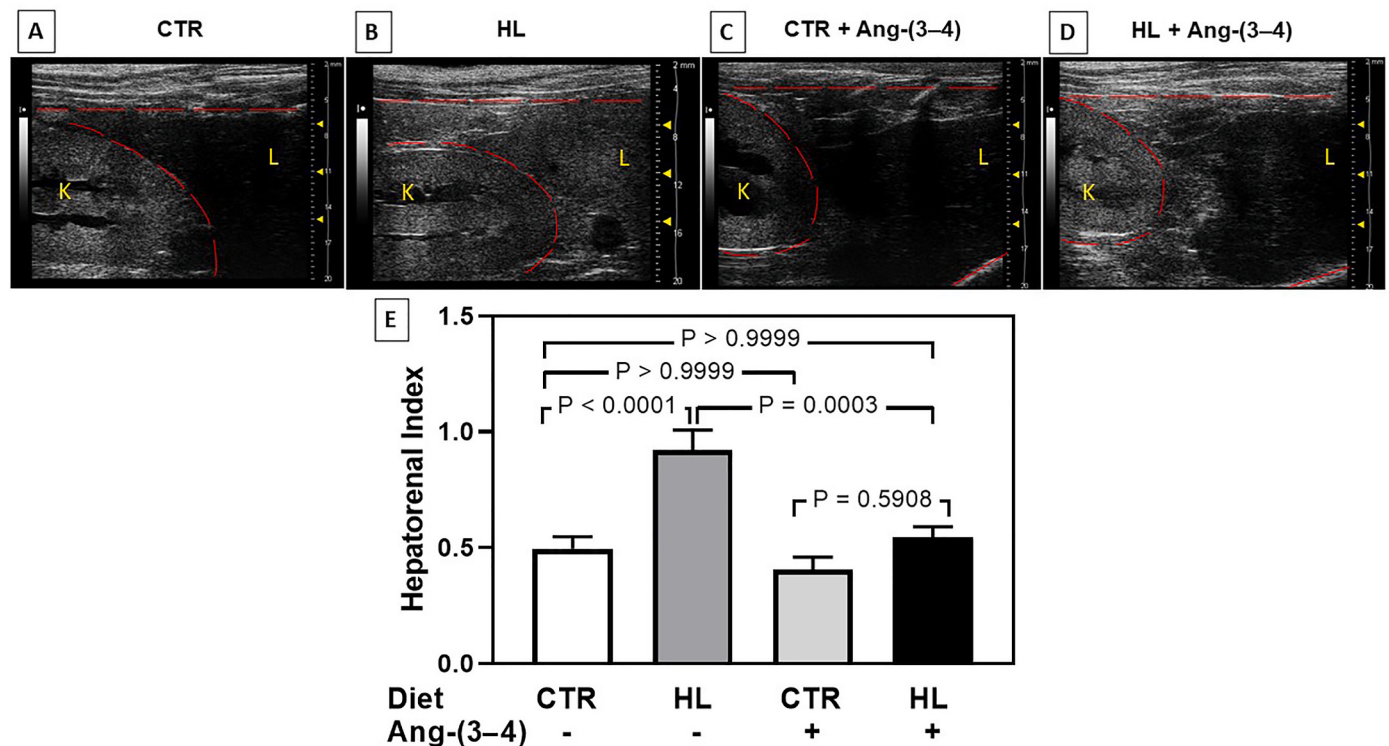


Fig. 2. Hepatorenal index (mean hepatic brightness/mean renal brightness) in rats given control (CTR) and high-lipid content (HL) diets: effect of Ang-(3-4). (A, B, C, D) Representative abdominal ultrasound images from CTR, HL, CTR + Ang-(3-4), and HL + Ang-(3-4) rats, respectively. Ang-(3-4) was administered as described in the text. The organs are identified by their initial letters L (liver) and K (kidney), and the images were processed as described in the text. (E) Graphic representation of the pixels densities in CTR (n = 17), HL (n = 12), CTR + Ang-(3-4) (n = 12), and HL + Ang-(3-4) (n = 14) rats. Values are mean $\pm$ SEM. Using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test for selected pairs assessed differences. P values are indicated within the panel.

calculated from the mean brightness and size in pixels from the two organs using the software ImageJ (1.4.3.67 version).

2.6. Statistical analysis

The samples size was calculated according to Ref. [10]. The samples followed a normal distribution. Using unpaired Student's *t*-test compared two means. Four means were compared by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test for selected pairs.

3. Results

Body mass and blood pressure were the primary outcome as in a previous study [1]. The body mass of rats that received the HL lipid diet was higher than that of CTR at 162 days of age: 506 ± 16 g vs. 458 ± 15 g. These 10% increase in body mass indicates that they are in the middle of the way between overweight (6%) and obesity (13%) [11], with possible cardiovascular and renal comorbidities resulting from the adiposity-associated generalized inflammation [7,8]. Fig. 1A and B presents representative Picrosirius Red stained images from the left ventricle of CTR and HL rats, respectively; Fig. 1C and D presents those from the kidney cortex (CTR and HL groups, respectively). The quantification (Fig. 1E and F) demonstrates that the two organs from HL rats present augmented collagen deposits, which are more accentuated in renal tissue. Fig. 1G reveals that the HL rats developed systolic hypertension, which completely normalized after one day receiving four oral doses of Ang-(3-4). The blood pressure of CTR rats remained unmodified after Ang-(3-4). Since the high Na^+ content of "Western diets" [2] could contribute to the development of diastolic hypertension, we also investigated whether this was the case with rats receiving the HL diet. Fig. 1H demonstrates that overweight rats also developed Ang-(3-4)-sensitive diastolic hypertension.

The hepatorenal index is shown in Fig. 2. Comparing the representative images from panels A and B demonstrate an accentuated increase of brightness in the liver (L) from the HL rats, without change in the brightness of kidney (K). The increase reached 100%, as shown in the bargraph presented in Fig. 2E (compare the left pair of columns), revealing the presence of steatosis, which structural correlation is the percentage increase of fat deposits. Biochemically, it corresponds to ectopic deposits of triglycerides. The lesions regressed rapidly (Fig. 2C, D, and E) in rats that received Ang-(3-4); the hepatic brightness returned to the levels found in CTR rats, which were not modified by Ang-(3-4).

4. Discussion

The scenario of fibrosis shown in Fig. 1 reveals previous and early increased production and release of proinflammatory cytokines [12]. The production of the hepatic Fetuin-A also increases and, therefore, the inhibition of the insulin cascade and the release of inflammatory cytokines [13]. At the same time, Fetuin-A allows saturated fatty acid to stimulate the type 4 Toll-like receptors (TLR4) of macrophages [13], thus accelerating the conversion of type M2 macrophages toward the M1 phenotype [14]. At the renal sinus fat level, Fetuin-A promotes the transition from a "protector" profile to a "lesional" one, propagating and amplifying the release of proinflammatory cytokines [14]. Increased proinflammatory activity at the level of renal sinus could also be responsible for the more intense fibrosis in the renal cortex than in the left ventricle (Fig. 1A–F).

We previously demonstrated that activation of TLR4 is a central mechanism in the genesis of inflammatory cardiac lesions after acute renal injury [15], an example of type III cardiorenal syndrome [5]. Since Fetuin-A also alters the cardiac metabolism [14] and the overweight/obesity of rats receiving the HL diet is associated with hypertension and

RAAS-mediated molecular alterations in renal Na⁺-transporting ATPases [1], the data from Figs. 1 and 2 allows us to propose that the Western diet HL can lead to a hepatocardiorenal syndrome, an emerging concept in pathology [16]. In terms of mechanisms of systolic blood pressure alterations, it is possible that alterations of the perivascular adipose tissue – the equivalent to the visceral adipose tissue – contributes to increased vascular tonus [17] and stiffness [18] in the aorta and mesenteric arteries through increased secretion of cytokines and adipokines [19]. Diastolic hypertension could probably be due to the higher Na⁺ content of the HL diet – when compared to the CTR diet – in combination with upregulated renal Na⁺-transporting ATPases [1].

The complete and faster regression of steatosis after administration of Ang-(3–4) also entails accentuated, rapid, and continuous lipolysis, probably resulting from the activation of both the adipose triglyceride lipase (ATGL) by cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA) [20] and the hormone-sensitive lipase (HSL) by catecholamines [21], whose defects play a central role in obesity [22]. We propose that the activated cyclic AMP-dependent protein kinase coupled to the upregulated Ang II→AT₂R axis [4] and these lipases antagonize the Ang II→AT₁R→protein kinase C proinflammatory and antilipolytic signaling axis.

5. Conclusion

In summary, the observations communicated here provide valuable evidence regarding a hepatocardiorenal syndrome [15] induced by chronic administration of a diet with a high-lipid content, in which abnormal upregulation of the Ang-(3–4)-sensitive Ang II→AT₁R axis of RAAS culminates with connected cardiac and renal fibrosis, liver steatosis, arterial hypertension, and augmented renal Na⁺ reabsorption [1] as the prominent pathological disturbances.

Financial support

This work is supported by Brazilian Research Council/CNPq (grant 440544/2018-1), Rio de Janeiro State Foundation/FAPERJ (grants E–26/210.890/2019, E–26/201.909/2020 and E–26/200.866/2021), and the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education/CAPES (grants 88887.320213/2019-00 and 88887.623346/2021–00).

CRedit authorship contribution statement

Thuany Crisóstomo: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Marco A.E. Pardal:** Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Simone A. Herdy:** Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Humberto Muzi-Filho:** Conceptualization, Formal analysis, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Debora B. Mello:** Conceptualization, Formal analysis, Investigation. **Christina M. Takiya:** Conceptualization, Formal analysis. **Rafael Luzes:** Conceptualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Adalberto Vieyra:** Conceptualization, Formal analysis, Writing – original draft, Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] Luzes R, Crisóstomo T, Silva PA, Iack R, de Abreu VG, Francischetti EA, Vieyra A. Angiotensin-(3–4) normalizes blood pressure, decreases Na⁺ and energy intake, but preserves urinary Na⁺ excretion in overweight hypertensive rats. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Basis Dis* 2021;1867:166012. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2020.166012>.
- [2] Kopp W. How western diet and lifestyle drive the pandemic of obesity and civilization diseases. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2019;12:2221–36. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S216791>.
- [3] Dias J, Axelband F, Lara LS, Muzi-Filho H, Vieyra A. Is angiotensin-(3–4) (Val-Tyr), the shortest angiotensin II-derived peptide, opening new vistas on the renin-angiotensin system? *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst JRAAS* 2017;18. <https://doi.org/10.1177/1470320316689338>.
- [4] Axelband F, Dias J, Miranda F, Ferrão FM, Reis RI, Costa-Neto CM, et al. Angiotensin-(3–4) counteracts the Angiotensin II inhibitory action on renal Ca²⁺-ATPase through a cAMP/PKA pathway. *Regul Pept* 2012;177:27–34. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2012.04.004>.
- [5] Ronco C, Ronco F. Cardio-renal syndromes: a systematic approach for consensus definition and classification. *Heart Fail Rev* 2012;17:151–60. <https://doi.org/10.1007/s10741-010-9224-0>.
- [6] Hall JE, do Carmo JM, da Silva AA, Wang Z, Hall ME. Obesity-induced hypertension: interaction of neuro-humoral and renal mechanisms. *Circ Res* 2015;116:991–1006. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305697>.
- [7] Garbarino J, Sturley S. Saturated with fat: new perspectives on lipotoxicity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009;12:110–6. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32832828ee>.
- [8] Loria P, Lonardo A, Anania F. Liver and diabetes. A vicious circle. *Hepatol Res* 2013;43:51–64. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2012.01031.x>.
- [9] Marshall RH, Eissa M, Bluth EI, Gulotta PM, Davis NK. Hepatorenal index as an accurate, simple, and effective tool in screening for steatosis. *AJR Am J Roentgenol* 2012;199:997–1002. <https://doi.org/10.2214/AJR.11.6677>.
- [10] Dell RB, Holleran S, Ramakrishnan R. Sample size determination. *ILAR J* 2002;43:207–13. <https://doi.org/10.1093/ilar.43.4.207>.
- [11] Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Nascimento AF, Luvizotto RAM, Sugidaki MM, Campos DHS, da Silva DCT, et al. Classification of different degrees of adiposity in sedentary rats. *Braz J Med Biol Res* 2016;49:e5028. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20155028>.
- [12] Borthwick LA, Wynnn TA, Fisher AJ. Cytokine mediated tissue fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 2013;1832:1049–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2012.09.014>.
- [13] Pal D, Dasgupta S, Kundu R, Maitra S, Das G, Mukhopadhyay S, et al. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat Med* 2012;18:1279–85. <https://doi.org/10.1038/nm.2851>.
- [14] Trepanowski JF, Mey J, Varady KA. Fetuin-A: a novel link between obesity and related complications. *Int J Obes* 2015;39:734–41. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.203>.
- [15] Trentin-Sonoda M, da Silva RC, Kmit FV, Abrahão MV, Monnerat Cahli G, Brasil GV, et al. Knockout of toll-like receptors 2 and 4 prevents renal ischemia-reperfusion-induced cardiac hypertrophy in mice. *PLoS One* 2015;10:e0139350. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139350>.
- [16] Kazory A, Ronco C. Hepatorenal syndrome or hepatocardiorenal syndrome: revisiting basic concepts in view of emerging data. *Cardiorenal Med* 2019;9:1–7. <https://doi.org/10.1159/000492791>.
- [17] Maenhaut N, Van De Voorde J. Regulation of vascular tone by adipocytes. *BMC Med* 2011;9:25. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-25>.
- [18] Resnick LM, Militianu D, Cummings AJ, Pipe JG, Evelhoch JL, Soulen RL. Direct magnetic resonance determination of aortic distensibility in essential hypertension: relation to age, abnormal visceral fat, and in situ intracellular free magnesium. *Hypertension* 1997;30:654–9. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.30.3.654>.
- [19] Costa RM, Neves KB, Tostes RC, Lobato NS. Perivascular adipose tissue as a relevant fat depot for cardiovascular risk in obesity. *Front Physiol* 2018;9:253. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00253>.
- [20] Pagnon J, Matzaris M, Stark R, Meex RC, Macaulay SL, Brown W, et al. Identification and functional characterization of protein kinase A phosphorylation sites in the major lipolytic protein, adipose triglyceride lipase. *Endocrinology* 2012;153:4278–89. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1127>.
- [21] Reynisdottir S, Wahrenberg H, Carlström K, Rössner S, Arner P. Catecholamine resistance in fat cells of women with upper-body obesity due to decreased expression of beta₂-adrenoceptors. *Diabetologia* 1994;37:428–35. <https://doi.org/10.1007/BF00408482>.
- [22] Langin D, Dicker A, Tavernier G, Hoffstedt J, Mairal A, Rydén M, et al. Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes* 2005;54:3190–7. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.11.3190>.