

GRAZIELA NEVES HAGIHARA

**RESPOSTA À ANGIOTENSINA II EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE
RESISTÊNCIA NA OBESIDADE: PARTICIPAÇÃO DAS MAPKs**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes

Coorientadora: Núbia de Souza Lobato

Versão original

São Paulo

2012

RESUMO

HAGIHARA GN. Resposta à angiotensina II em artérias mesentéricas de resistência na obesidade: participação das MAPKs. [Dissertação (Mestrado em Farmacologia)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2012.

Na obesidade há alteração da função vascular. Um dos mecanismos envolvidos nessa alteração é o aumento da ativação do sistema renina-angiotensina, comprometendo a resposta à angiotensina II (Ang II), que pode ativar as vias de sinalização intracelular das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Para investigar o papel da obesidade e das MAPKs na resposta à Ang II, utilizamos ratos Wistar que receberam injeção de glutamato monossódico (4,0g/Kg, s.c.) a partir do 2º ao 6º dia e vida e que foram analisados com 16 semanas. Esse tratamento foi eficaz em induzir a obesidade caracterizada por aumento do Índice de Lee, das gorduras periepídimal e retroperitoneal, sem alteração da massa magra (sóleo e EDL), além de induzir a hipertrigliceridemia, aumento das frações VLDL e LDL, sem alteração no colesterol total, HDL-colesterol e na pressão arterial sistólica. A resposta à Ang II foi estudada em artérias mesentéricas de resistência isoladas utilizando o miógrafo de arame. Os ratos obesos apresentaram menor resposta à Ang II quando comparados aos controles. Essa alteração foi dependente do endotélio e envolveu o receptor AT2 (ATR2), pois o seu antagonismo corrigiu a menor resposta nos obesos. A expressão proteica de AT1R não diferiu dos controles, enquanto os obesos apresentaram aumento da expressão de AT2R. A inibição da óxido nítrico sintase pelo L-NAME, corrigiu a menor resposta à Ang II em obesos, indicando que o NO participa da menor contração, o que foi confirmado pelo aumento da expressão basal da eNOS. A inibição da NADPH oxidase pela apocinina reduziu a contração à Ang II nos dois grupos estudados, mostrando que a alteração encontrada nos ratos obesos não envolve a participação das espécies reativas de oxigênio. A menor resposta à Ang II nos obesos envolve a via da ERK 1/2 que favorece a vasodilatação, pois a sua inibição corrigiu essa resposta. Demonstramos também que os ratos obesos já apresentam aumento da expressão de ERK1/2 no estado basal e que o estímulo de Ang II aumentou ainda mais a fosforilação dessa MAPK. Já as vias da JNK e p38 MAPKs estão envolvidas na manutenção da resposta contrátil à Ang II, pois a inibição de cada uma dessas vias diminuiu ainda

mais a contração nos obesos. A alteração parece ser específica, pois não foi observada diferença na resposta contrátil induzida por noradrenalina e cloreto de potássio. As MAPKs parecem não constituir o principal mecanismo pelo qual a Ang II e a noradrenalina promovem vasoconstrição nos controles, uma vez que a inibição de cada uma dessas três MAPKs não alterou a resposta contrátil a esses agentes. Portanto, concluímos que na obesidade, a resposta contrátil à Ang II é menor, como possível mecanismo adaptativo frente ao aumento da ativação do sistema renina angiotensina. Esse mecanismo envolve a participação do endotélio com maior liberação de NO, aumento do número de AT2R, e da fosforilação da eNOS e da ERK1/2. Essas vias favoreceriam a vasodilatação em ratos obesos, que se traduz em menor resposta contrátil à Ang II.

Palavras-chave: Obesidade. Angiotensina II. MAPKs.

ABSTRACT

HAGIHARA GN. Differential participation of MAPKs in angiotensin II-induced contraction in obesity. [Master thesis (Pharmacology)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2012.

Obesity is associated to vascular dysfunction. One of the mechanisms involved in this alteration is increased activation of the renin-angiotensin system, compromising the response to angiotensin II (Ang II), a vasoactive peptide that can activate the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) pathways. To investigate the role of obesity and MAPKs in vascular reactivity to Ang II, Wistar rats received monosodium glutamate injections (4.0g/kg, s.c.) from 2nd to 6th day after birth and were used at the age of 16 weeks. This treatment was effective in inducing obesity characterized by increased Lee's index, retroperitoneal and periepididymal fat with no change in lean body mass (soleus and EDL), and induced hypertriglyceridemia, increased VLDL and LDL fractions, with no change in total cholesterol, HDL-cholesterol and systolic blood pressure. The response to Ang II was analyzed in isolated mesenteric resistance arteries using a wire myography. The obese rats had lower response to Ang II when compared to controls. This alteration was endothelium-dependent and involved the AT2 receptor (AT2R) because the AT2R antagonism corrected the lower response. The AT1R protein expression did not differ from controls, while AT2R expression was increased in obese rats. Inhibition of nitric oxide synthase by L-NAME corrected the response to Ang II, indicating the participation of NO in the lower response, which was confirmed by the increased basal expression of eNOS. Inhibition of NADPH oxidase by apocynin reduced the contraction to Ang II in both groups, indicating that the alteration observed in obese rats did not involve the participation of reactive oxygen species. Because the inhibition of ERK1/2 corrected the Ang II response, we concluded that the lower response to Ang II involves ERK1/2 pathway that promotes vasodilatation. We have also demonstrated that obese rats have increased ERK1/2 expression in basal and Ang II stimulus. Since the inhibition of JNK and p38 MAPKs pathways decreased even more the Ang II response, we concluded that they are involved in maintenance of the contractile response to this agonist. The alterations were specific because there was no difference in the contractile response to norepinephrine and potassium chloride. The MAPKs appear not to be the main

mechanism by which Ang II and noradrenaline promote vasoconstriction in controls, since inhibition of each of three major MAPKs pathways did not alter the contractile response to these agents. Therefore, we concluded that in obesity, the lower contractile response to Ang II might be an adaptive mechanism against the increased activation of the renin-angiotensin system. This mechanism involves the participation of the endothelium through a greater release of NO, increased AT2R, eNOS and ERK1/2 expressions. These pathways would contribute to vasodilatation in obesity, which was expressed as a lower contractile response to Ang II.

Key words: Obesity. Angiotensin II. MAPKs.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

A obesidade e as doenças que surgem como consequência dela, tais como o diabetes tipo 2, a hipertensão e as doenças cardiovasculares, estão aumentando de modo significativo a mortalidade em todo o mundo (Wild et al., 2004). Estudos epidemiológicos demonstram que a prevalência de obesidade, principalmente entre indivíduos jovens, em países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil, aumentou significativamente em relação a países industrializados (Zimet et al., 2001). Adicionalmente, dados da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabolismo mostram que 18 milhões de brasileiros são obesos e cerca de 70 milhões apresentam sobrepeso. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (2005), nas últimas duas décadas, o número de indivíduos diabéticos aumentou dramaticamente de 30 para 177 milhões em todo o mundo.

Os mecanismos fisiopatológicos que levam ao desenvolvimento da obesidade estão apenas parcialmente elucidados. Sabe-se que ela surge como consequência do modo pelo qual o corpo regula a ingestão, o gasto e o estoque energético. Além disso, fatores biológicos, comportamentais e ambientais podem interagir e afetar o equilíbrio energético, contribuindo para o desenvolvimento da obesidade (Hill, 2006).

Na obesidade frequentemente detecta-se resistência à insulina e hiperinsulinemia compensatória (Quatanani, Lazar, 2007; Wilcox, 2005). A resistência à insulina pode ser definida como efeito diminuído da insulina sobre a captação, o metabolismo e o armazenamento de glicose, em virtude da redução da sensibilidade de tecidos periféricos à ação deste hormônio (Avogaro et al., 2005; Saltiel, Kahn, 2001). Nesta condição, a captação de glicose estimulada pela insulina encontra-se diminuída no músculo esquelético e no tecido adiposo, além de haver prejuízo na supressão da produção de glicose hepática (Greenfield, Campbell, 2004).

Estudos clínicos e experimentais sugerem a existência de uma relação causa-efeito entre obesidade e resistência à insulina, tendo em vista que ganho/perda de peso está intimamente correlacionado com diminuição/aumento da sensibilidade à insulina, respectivamente (Freidenberg et al., 1988). A resistência às ações da insulina na obesidade contribui para uma série de alterações metabólicas e

cardiovasculares, que favorecem o desenvolvimento de condições como o diabetes tipo 2 e a hipertensão arterial (Caballero, 2003).

1.2 Disfunção vascular na obesidade

A função vascular também sofre alterações decorrentes da obesidade (Fruhbeck, 2004). Estudos sugerem que o acúmulo de tecido adiposo branco nesta condição, com aumento da liberação de citocinas, de substratos e de hormônios na circulação, pode ter participação importante no processo de disfunção vascular (Fernández-Sánchez, 2011). O papel da resistência à insulina nas alterações da resposta vascular também foi demonstrado em estudos clínicos onde se verificou que indivíduos obesos com resistência à insulina apresentam redução de 40 a 50% da vasodilatação dependente de endotélio quando comparados ao grupo controle (Larson et al, 1984). Adicionalmente, a capacidade da insulina de aumentar a vasodilatação dependente de endotélio por modulação da produção ou liberação de óxido nítrico (NO) encontrava-se notadamente prejudicada nestes indivíduos, indicando que a obesidade e a resistência à insulina, independentemente de outros fatores de risco, podem contribuir para alterar a função endotelial (Steinberg et al., 1996; Chen et al., 2003).

As células endoteliais vasculares representam papel importante na manutenção da homeostase vascular. Além de proporcionar uma barreira física entre o lúmen e a parede do vaso, o endotélio regula ativamente o tônus vascular basal e a reatividade vascular em condições fisiológicas, respondendo a forças mecânicas e a mediadores neuro-humorais, além de liberar uma variedade de fatores contráteis e relaxantes. Frente a estímulos específicos, as células endoteliais podem liberar fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs), como também fatores contráteis derivados do endotélio (EDCFs). Os EDRFs incluem o NO, a prostaciclina (PGI₂) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Os EDCFs compreendem a angiotensina II (Ang II), a endotelina-1 (ET-1), espécies reativas de oxigênio (EROs) e os prostanoídes vasoconstritores (Furchgott, Vanhoutte, 1989). Em condições fisiológicas, o tônus vascular é garantido pelo equilíbrio exercido por estes fatores. O desequilíbrio na produção e/ou liberação desses fatores, com aumento de EDCFs e/ou diminuição dos EDRFs, é uma das características da disfunção endotelial (Mather et al., 2002).

Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar a disfunção endotelial presente na obesidade, como alterações na geração e/ou liberação dos mediadores envolvidos no relaxamento (Steinberg et al., 1996; Sánchez et al., 2010), especialmente o NO, e na contração vascular, como os produtos do ácido araquidônico (Mather et al., 2002). Estudos demonstram também o papel importante do estresse oxidativo, sendo este considerado o principal mecanismo pelo qual a resistência à insulina causa disfunção endotelial na obesidade. No estresse oxidativo há aumento da geração de EROs como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Fernández-Sánchez et al., 2011). Em um estudo clínico a diminuição da resposta vasodilatadora dependente do endotélio em indivíduos obesos foi atribuída, ao menos em parte, ao estresse oxidativo, pois a infusão de vitamina C, um antioxidante, melhorou a resposta à acetilcolina (ACh), um agente vasodilatador dependente de endotélio (Perticone et al., 2001). Estudos experimentais também demonstram que a obesidade é acompanhada de diminuição da vasodilatação dependente de NO, que pode ocorrer devido ao aumento da produção de (EROs), como o ($O_2^{\cdot-}$), que inativa o NO (Schiffrin et al., 2008).

Estudo recente realizado em nosso laboratório demonstrou que a obesidade promove aumento da resposta contrátil induzida por agonista adrenérgico e redução da resposta vasodilatadora dependente de endotélio no leito arteriolar mesentérico. Essas alterações estão relacionadas com redução da produção de NO, aumento da geração de EROs e redução da razão PGI_2/TXA_2 no leito arteriolar mesentérico (Lobato, et al., 2011).

1.3 Resposta à angiotensina II na obesidade

Um fator que pode levar à resistência à insulina e hipertensão na obesidade é o aumento da ativação do sistema renina-angiotensina (SRA). O SRA é um dos principais sistemas regulatórios da pressão arterial, da perfusão tecidual e do volume sanguíneo. Simplificadamente, o angiotensinogênio é clivado pela protease renina em angiotensina I, que por sua vez é convertida pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em Ang II (Metha, Griendling, 2006). A Ang II é um dos principais peptídeos efetores desse sistema e possui a maioria de suas ações conhecidas desencadeada pela ligação ao receptor AT1, um receptor acoplado à proteína G que, uma vez ativado, pode estimular múltiplas vias intracelulares de transdução do sinal, levando a diversas ações biológicas. A ativação do receptor

AT1 estimula a fosfolipase C, induzindo a formação de trifosfato de inositol e diacilglicerol, o que promove aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} , levando à ativação da proteína quinase C (PKC) e da adenilil-ciclase (Lee et al., 1993). A ligação da Ang II ao receptor AT1 pode também ativar uma via de sinalização mediada por tirosina-quinases (Fleming et al., 2006). Uma série de tirosina-quinases pode ser ativada a partir da ligação da Ang II ao receptor AT1. Essas tirosina-quinases regulam vias efetoras intracelulares, incluindo a PLC-gama e ativadores de transcrição (STATs) (Carvalho-Filho et al., 2007).

Além do receptor AT1, a Ang II pode ativar o receptor AT2, e sua ativação está relacionada a diversos mecanismos de sinalização intracelular, tais como a ativação de proteínas fosfatases, ativação do sistema NO/cGMP, estimulação da fosfolipase A2 e na regulação negativa de diversas respostas iniciadas pela ativação do receptor AT1 (Fleming et al., 2006; Steckelings et al., 2005).

A Ang II influencia a pressão sanguínea atuando em múltiplas vias. Sua ação em diversos territórios vasculares e em diferentes tecidos pode levar ao aumento do volume extracelular e dos níveis pressóricos. A Ang II promove vasoconstrição de arteríolas renais e sistêmicas, contribuindo para o aumento da resistência periférica e da pressão arterial. A ativação de receptores de Ang II no sistema nervoso central também contribui para o aumento da pressão arterial, por aumentar a descarga simpática para o coração e para o sistema vascular, aumentando o débito cardíaco e a resistência periférica total (Touys, Schiffrin, 2000).

Além de atuar sobre o sistema vascular, a ativação do receptor AT1 pela Ang II estimula a produção de aldosterona pela zona glomerulosa no córtex da glândula adrenal. A aldosterona é um hormônio esteroide que promove aumento da reabsorção de sódio e água nos túbulos distais e nos ductos coletores do rim, contribuindo para a elevação da pressão arterial (Siddiqui, Hussain, 2007).

A importância do SRA na obesidade foi sugerida em estudos demonstrando que este sistema está ativado em indivíduos obesos apesar do estado de expansão de volume e retenção de sódio. Demonstrou-se que indivíduos com índice de massa corporal (IMC) maior do que 31 Kg/m^2 apresentam níveis de ECA elevados em tecidos, como os vasos e os rins (Barton et al., 2003). O próprio acúmulo de gordura visceral na obesidade pode contribuir para este quadro em virtude da compressão mecânica renal associada à expansão de tecido adiposo, fator determinante para a maior reabsorção de sódio nos segmentos proximais do néfron promovendo

ativação da mácula densa, no sentido de preservar o fluxo plasmático renal e a taxa de filtração glomerular. Esse mecanismo leva à retenção hidrossalina e à elevação dos níveis pressóricos (Rahmouni et al., 2005).

O metabolismo também pode sofrer influências da Ang II. Estudos recentes demonstraram a presença de diversos constituintes do SRA no tecido adiposo e em adipócitos isolados. Além disso, estudos demonstram que a Ang II potencializa os efeitos inibitórios de ácidos graxos não esterificados sobre a captação de glicose mediada pela insulina e que o bloqueio sistêmico do SRA melhora a sensibilidade à insulina em indivíduos obesos que apresentam hipertensão arterial (Kurtz et al., 2004).

Elevados níveis plasmáticos e aumento da expressão de angiotensinogênio no tecido adiposo têm sido verificados na obesidade (Formiguera, Cantón, 2004). Esses fatores contribuem para o aumento da produção local de Ang II nesses pacientes. Estudos experimentais demonstraram que o angiotensinogênio produzido pelo tecido adiposo pode atuar localmente, estimulando a diferenciação de adipócitos locais, além de ser liberado na corrente sanguínea. Isso reforça a hipótese de que os altos níveis de angiotensinogênio em pacientes obesos podem ocorrer como consequência do aumento da massa de tecido adiposo. Adicionalmente, a ativação sistêmica e tecidual do SRA na obesidade pode potencializar o aumento da reabsorção renal de sódio e o desvio da pressão de natriurese contribuindo para a elevação da pressão arterial (Carvalho-Filho et al., 2007).

Alterações na resposta mediada pela Ang II no sistema vascular têm sido descritas por diversos autores em modelos animais de obesidade, assim como em humanos (Siddiqui, Hussain, 2007). Porém, estudos de reatividade vascular em modelos experimentais de obesidade são conflitantes no que se refere aos efeitos da Ang II. Estudos avaliando a resposta à Ang II em aorta de ratos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica (Ghatta, Ramarao, 2004) e em ratos Zucker (Nishimatsu et al., 2005), um modelo genético de obesidade e resistência à insulina, relataram aumento da resposta vasoconstritora à Ang II quando comparados aos controles. Por outro lado, estudos anteriores não demonstraram aumento da resposta à Ang II em anéis de aorta de ratos Zucker (Harker et al., 1993). Essas informações indicam que não há um consenso quanto à alteração da resposta

vasoconstritora à Ang II na obesidade e que mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos nessa patologia.

1.4 Participação das MAPKs na obesidade

A ligação da Ang II aos seus receptores ativa diversas vias sinalizações intracelulares que regulam seus efeitos fisiológicos. Dentre elas destacamos as vias de sinalização constituídas por proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (Metha, Griendling, 2006).

Dados de estudos recentes indicam que na obesidade há ativação de MAPKs em tecidos que regulam a homeostase energética, como o fígado, o músculo esquelético e o tecido adiposo. Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessa alteração incluem aumento da produção de ácidos graxos livres e de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo branco (Hirosumi et al., 2002).

O sistema de sinalização intracelular que envolve a cascata das MAPKs é representado principalmente por três grupos: quinases reguladas por sinalização extracelular (ERKs), quinases do terminal c-jun (JNKs), e p38 MAPKs. Essas proteínas incluem quinases de serina/treonina, que são reguladas por cascatas de fosforilação organizadas em grupos específicos. Diversos ativadores situados nos passos iniciais da cascata respondem a estímulo extracelular. Este, por sua vez, deflagra a cascata por meio da ativação de proteínas quinases, que promovem a fosforilação de proteínas específicas. Essas proteínas, uma vez ativadas, fosforilam as MAPKs. As MAPKs atuam, então, em vários alvos situados em passos mais avançados da cascata, que afetam, por sua vez, processos relacionados a eventos adaptativos, tais como expressão gênica, diferenciação, metabolismo e apoptose (Seger, Krebs, 1995; Sprague, Khalil, 2009).

As ações das MAPKs são estreitamente integradas em condições fisiológicas. A ativação da p38 MAPK está relacionada com cardioproteção (Muslin et al., 2008). A via da MAPK é também importante para as ações proliferativas da insulina. Na vasculatura, essa via medeia não somente o crescimento celular, mas também a capacidade migratória das células endoteliais, do músculo liso vascular e dos monócitos. Além disso, ela parece mediar a expressão de um fator pró-trombótico, pró-fibrótico, o inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1), em resposta a diversos estímulos. Estudos demonstraram que a JNK regula negativamente a sinalização da insulina contribuindo para o desenvolvimento de resistência aos

efeitos desse hormônio (Hirosumi et al., 2002), ao passo que a p38 MAPK está implicada na regulação positiva do gasto energético (Puigserver et al., 2001).

As MAPKs representam também papel importante na regulação da contração do músculo liso vascular. Demonstrou-se que a noradrenalina (NA) e a ET-1 ativam a p38 MAPK em artérias mesentéricas de resistência de ratos. Porém, apenas a contração induzida pela NA depende da ativação da p38 MAPK, demonstrando que os mecanismos de ativação da p38 MAPK diferem entre estes dois agonistas (Ohanian et al., 2001). O papel da p38 MAPK na contração induzida pela Ang II em aorta de ratos também já foi demonstrado, assim como a participação das EROs e a sensibilização do aparato contrátil também medeiam esse efeito (Zhou et al. 2010). Além da p38 MAPK, a ativação da ERK possui também papel importante na contração vascular mediada pela Ang II (Touyz et al., 1999).

A participação das MAPKs na disfunção vascular presente em condições como a hipertensão tem sido proposta. Assim, demonstrou-se que a ativação da p38 MAPK possui papel importante no aumento da vasoconstrição induzida pela ET-1 em ratos espontaneamente hipertensos. Essa alteração é independente da fosforilação de proteínas da cadeia leve de miosina (Kwon et al., 2004). Em outro estudo demonstrou-se que o aumento da reatividade vascular à felinefrina, um agonista α 1-adrenérgico, em aorta de ratos hipertensos DOCA-sal é mediado pela ativação da ERK1/2 (Giachini et al., 2010).

Embora alguns estudos tenham sido realizados no sentido de avaliar os efeitos da obesidade sobre a resposta contrátil à Ang II, não há um consenso quanto à participação e ao papel desempenhado pelas MAPKs nestas alterações.

6 CONCLUSÃO

- Ratos obesos com 16 semanas apresentam menor resposta vasoconstritora à Ang II, sugerindo mecanismo compensatório para o possível aumento da ativação do SRA;
- A alteração contrátil à Ang II nos ratos obesos é dependente do endotélio e específica a este agente pois não houve alteração na contração à NA e ao KCl;
- Os ratos obesos não apresentaram alteração no número de receptores do tipo AT1, entretanto, eles apresentaram maior quantidade de receptores do tipo AT2, promovendo respostas que favorecem a vasodilatação, que no nosso trabalho é demonstrado pela diminuição da resposta à Ang II;
- A hiporreatividade à Ang II está relacionada à maior liberação NO;
- As EROs participam da resposta contrátil à Ang II nos dois grupos estudados, entretanto, parecem não contribuir para a menor resposta à Ang II em ratos obesos;
- A via da ERK1/2 parece favorecer mecanismos de relaxamento nos ratos obesos, estando associada à maior fosforilação da eNOS e, desta forma, ao aumento do NO e conseqüente menor contração à Ang II; enquanto que as vias da JNK e p38 MAPK atuam na manutenção da vasoconstrição a esse agente;
- O maior número de receptores AT2 e a maior fosforilação da ERK 1/2 são fatores que se somam para resultar na diminuição da resposta à Ang II.
- As MAPKs não constituem o principal mecanismo de contração vascular nos ratos controles;

REFERÊNCIAS*

- Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 2000;11:327-32.
- Avogaro A, Kreutzenberg SV. Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity. *Clin Chim Acta.* 2005;360:9-26.
- Barton M, Carmona R, Ortmann J, et al. Obesity-associated activation of angiotensin and endothelin in the cardiovascular system. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35:826-37.
- Caballero AE. Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. *Obes Res.* 2003;11:1278-89.
- Carvalho-Filho MA, Carvalheira JC, Velloso LA, et al. Cross-talk das vias de sinalização de insulina e angiotensina II: implicações com a associação entre diabetes mellitus e hipertensão arterial e doença cardiovascular. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2007;51/2:195-203.
- Chen H, Montagnani M, Funahashi T, et al. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells, *J Biol Chem.* 2003;278:45021-6.
- Contreras C, et al. Preserved insulin vasorelaxation and up-regulation of the Akt/eNOS pathway in coronary arteries from insulin resistant obese Zucker rats. *Atherosclerosis.* 2011;217(2):331-9.
- Dinh DT, et al. Angiotensin receptors: distribution, signaling and function. *Clinical Science.* 2001;100:481-92.
- Doronzo G, Viretto M, Russo I, et al. Nitric oxide activates PI3-K and MAPK signaling pathways in human and rat vascular smooth muscle cells: influence of insulin resistance and oxidative stress. *Atherosclerosis.* 2011;216(1):44-53.
- Dulloo AG, Young JB. Effects of monosodium glutamate and gold thioglucose on dietary regulation of sympathetic nervous system activity in rodents. *Metabolism.* 1991;40(2):113-21.
- Fernández-Sánchez A, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci.* 2011;12:3117-32.
- Fleming I, Kohlstedt K, Busse R. The tissue renin– angiotensin system and intracellular signalling. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2006;15:8–13.
- Formiguera X, Cantón A. Obesity: epidemiology and clinical aspects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2004;18(6):1125-46.

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to *Miomedical Journal*: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Franco Mdo C, Akamine EH, Di Marco GS, et al. NADPH oxidase and enhanced superoxide generation in intrauterine undernourished rats: involvement of the renin-angiotensin system. *Cardiovasc Res.* 2003;1(3):767-75.

Franco Mdo C, Akamine EH, Rebouças N, et al. Long-term effects of intrauterine malnutrition on vascular function in female offspring: implications of oxidative stress. *Life Sci.* 2007;80(8):709-15.

Freidenberg GR, Reichart D, Olefsky JM, Henry RR. Reversibility of defective adipocyte insulin receptor kinase activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Effect of weight loss. *J Clin Invest.* 1988;82(4):1398-406.

Fruhbeck G. The adipose tissue as a source of vasoactive factors. *Curr Med Chem.* 2004;2:197-208.

Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 1989;3(9):2007-18.

Ghatta S, Ramarao P. Increased contractile responses to 5-Hydroxytryptamine and Angiotensin II in high fat diet fed rat thoracic aorta. *Lipids Health Dis.* 2004;2:3-19.

Giachini FR, Sullivan JC, Lima VV, Carneiro FS, Fortes ZB, Pollock DM, Carvalho MHC, Webb RC, Tostes RC. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation, via downregulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, mediates sex differences in desoxycorticosterone acetate-salt hypertension vascular reactivity. *Hypertension.* 2010;55:172-9.

Greenfield J, Campbell L. Insulin resistance and obesity. *Clin Derm.* 2004;22(4):289-95.

Harker CT, O'Donnell MP, Kasiske BL, Keane WF, Katz SA. The renin-angiotensin system in the type II diabetic obese Zucker rat. *J Am Soc Nephrol.* 1993;4:1354-61.

Harte AL et al. Insulin increases angiotensinogen expression in human abdominal subcutaneous adipocytes. *Diabetes Obes Metab.* 2003;5(6):462-7.

Hill JO. Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective. *Endocr Rev.* 2006;27(7):750-61.

Hirata AE, et al. Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose. *Braz J Med Biol Res.* 1997;30:671-4.

Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.* 2002;21:420(6913):333-6.

Houben AJ et al. Perivascular fat and the microcirculation: relevance to insulin resistance, diabetes and cardiovascular disease. *Curr Cardiovasc Risc Rep.* 2012;6:80-90.

Isenovic ER, Jacobs DB, Kedees MH, et al. Angiotensin II regulation of the Na⁺ pump involves the phosphatidylinositol-3 kinase and p42/44 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology*. 2004;145(3):1151-60.

Jiang F, et al. NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular response, stress tolerance, and tissue repair. *Am Soc Pharmacol Exp Therap*. 2011;63:218-42.

Jones EM, Vinh A, McCarthy CA, et al. AT₂ receptors: functional relevance in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther*. 2008;120(3):292-316.

Jonk AM, Houben AJ, de Jongh RT, et al. Microvascular dysfunction in obesity: a potential mechanism in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance and hypertension. *Physiology*. 2007;22:252-60.

Juul B, Aalkjaer C, Mulvany MJ. Responses of femoral resistance vessels to angiotensin in vitro. *Eur. J. Pharmacol*. 1987;135(1):61-8.

Kloet AD, et al. The renin angiotensin system and metabolic syndrome. 2010;100(5):525-34.

Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000;404(6778):635-43.

Korkmaz B, et al. Extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) contributes to endotoxin-induced hyporeactivity via nitric oxide and protacyclin production in rat aorta. *Pharmacology*. 2006;78(3):123-8.

Kurtz TW, Pravenec M. Antidiabetic mechanisms of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonists: beyond the renin-angiotensin system. *J Hypertens*. 2004;22:2253-61.

Kwon S, Fang LH, Kim B, et al. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Regulates Vasoconstriction in Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2004;95(2):267-72.

Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:181-9.

Larson B, Svardsudd K, Welin L, et al. Abdominal adipose tissue distribution, obesity, and risk of cardiovascular disease and death: 13 year follow up of participants in the study of men born in 1913. *Br Med J*. 1984;288:1401-4.

Lassègue B et al., Angiotensin down-regulates the vascular smooth muscle AT₁ receptor by transcriptional and post-transcriptional mechanisms: evidence for homologous and heterologous regulation. *Mol Pharmacol*. 1995;48:601-9.

Lee MA, Böhm M, Paul M, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems. Their role in cardiovascular disease. *Circulation*. 1993;87(Suppl.5): IV7-13.

Lobato NS, Filgueira FP, Hagihara GN, Akamine EH, Pariz JR, Tostes RC, Carvalho MHC, Fortes ZB. Improvement of metabolic parameters and vascular function by metformin in obese non-diabetic rats. *Life Sci*. 2012;90:228-35.

Lobato NS, et al. Obesity Induced by Neonatal Treatment with Monosodium Glutamate Impairs Microvascular Reactivity in Adult Rats: Role of NO and Prostanoids. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2011;21:808-16.

Mather KJ, Mirzamohammadi B, Lteif A, et al. Endothelin Contributes to Basal Vascular Tone and Endothelial Dysfunction in Human Obesity and Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 2002;51(12):3517-23.

Matrougui K, Eskildsen-Helmond Y, Fiebeler A, et al. Angiotensin II stimulates Extracellular Signal-Regulated Kinase activity in intact pressurized rat mesenteric resistance arteries. *Hypertension.* 2000;36:617-21.

Messina MM, et al. Perinatal MSG treatment attenuates fasting-induced bradycardia and metabolic suppression. *Physiol Behav.* 2005;86(3):324-30.

Metha PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292:C82-C97.

Morris MJ, et al. Reduced BAT function as a mechanism for obesity in the hypophagic, neuropeptide Y deficient monosodium glutamate-treated rat. *Regul Pept.* 1998;25(75):441-7.

Morrison JFB, et al. Sensory and autonomic nerve changes in the monosodium glutamate-treated rat: a model of type II diabetes. *Exp Physiol.* 2007;93(2):213-22.

Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res.* 1977;41(1):19-26.

Muslin AJ. MAPK signaling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Clin Sci (Lond).* 2008;115(7):203-18.

Nemeroff CB et al. Growth, endocrinological and behavioral deficits after monosodium L-glutamato in the neonatal rat: possible involvement of arcuate dopamine neuron damage. *Psychoneuroendocrinology.* 1997;2:179-96.

Nishimatsu H, Suzuki E, Takeda R, et al. Endothelial dysfunction and hypercontractility of vascular myocytes are ameliorated by Fluvastatin in Obese Zucker Rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288:H1770–6.

Ohanian J, Cunliffe P, Ceppi E, et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinases by endothelin and noradrenaline in small arteries, regulation by calcium influx and tyrosine kinases, and their role in contraction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:19-21.

Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science.* 1969;164:719-21.

Park YS, Kim JS. Obesity phenotype and coronary heart disease risk as estimated by the Framingham risk score. *J Korean Med Sci.* 2012;27(3):243-9.

Perticone F, Ceravolo R, Candigliota M, et al. Obesity and body fat distribution induce endothelial dysfunction by oxidative stress: protective effect of vitamin C. *Diabetes*. 2001;50:159-65.

Puigserver P, Rhee J, Wu ZU, Yoon JC, et al. Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell*. 2001;8(5):971-82.

Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev*. 2007;21(12):1443-55.

Rahmouni K, Correia ML, Haynes WG, Mark AL. Obesity-associated hypertension: new insights into mechanisms. *Hypertension*. 2005;45:9-14.

Rodriguez-Sierra JF, et al. Monosodium glutamate disruption of behavioral and endocrine function in the female rat. *Neuroendocrinology*. 1980;31(3):228-35.

Sabuhi R, et al. Role of the angiotensin II AT2 in inflammation and oxidative stress: opposing effects in lean and obese Zucker rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;300:F700-F6.

Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414:799-806.

Sánchez A, et al. Altered arachidonic acid metabolism via COX-1 and COX-2 contributes to endothelial dysfunction of penile arteries from obese Zucker rats. *Br J Pharmacol*. 2010;159(3):604-16.

Schiffrin EL. Oxidative stress, nitric oxide synthase, and superoxide dismutase: a matter of imbalance underlies endothelial dysfunction in the human coronary. *Hypertension*. 2008;51:31-2.

Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J*. 1995;9(9):726-35.

Siddiqui AH, Hussain T. Enhanced AT1 receptor-mediated vasoconstrictive response to ANG II in endothelium-denuded aorta of obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H722-H7.

Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2009;15:78(6):539-52.

Staples CJ, et al. Cross-talk between the p38alpha and JNK MAPK pathways mediated by MAP kinase phosphatase-1 determines cellular sensitivity to UV radiation. *J Biol Chem*. 2010;285(34):25928-40.

Steckelings UM, et al., The AT2 receptor – a matter of love and hate. *Peptides*. 2005;26:1401-9.

Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, et al. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. *J Clin Invest*. 1996;97:2601-10.

Stroth U, Blume A, Mielke K, et al. Angiotensin AT2 receptor stimulates ERK1 and ERK2 in quiescent but not inhibits ERK in NGF-stimulated PC12W cells. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000;78(1-2):175-80.

Szasz T, Webb RC. Perivascular adipose tissue: more than just structural support. *Clinical Science*. 2012;122:1-12.

Toda N, et al. Interaction of endothelial nitric oxide and angiotensin in the circulation. *Pharmacol Rev*. 2007;59:54-9.

Tokarev D, et al. Treatment of neonatal rats with monosodium glutamate attenuates the cardiovascular reactivity to phenylephrine and angiotensin II. *Physiol Res*. 1997;46(3):165-71.

Toledo DP. Estudo da resposta inflamatória aguda e crônica e reatividade microvascular em modelo de resistência à insulina (obesidade em ratos). 2005. Tese de doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

Touyz RM e Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. 2000; 52:639-72.

Touyz RM, He G, Deng Ly, Schiffrin EL. Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance arteries. *Circulation*. 1999;99:392-9.

Tunctan B, et al. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) activity reverses endotoxin-induced hypotension via decreased nitric oxide production in rats. *Pharmacol Res*. 2007;56(1):54-6.

Verlohren S, Dubrovskaja G, Tsang SY, et al. Visceral periadventitial adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. *Hypertension*. 2004;44:271-6.

Wang X, et al. LOX-1 and angiotensin receptors, and their interplay. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2011; 25:401-17.

Weiss R. Fat distribution and storage: how much, where, and how? *Eur J Endocrinol*. 2007;157(1):S39-S45.

Wilcox G Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev*. 2005;26:19-27.

Wild S, Roglic G, Green A, et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004;27:1047-53.

Xu Z et al. Upregulation of angiotensin II type 1 receptor, inflammatory mediators, and enzymes of arachidonate metabolism in obese Zucker rats kidney: reversal by angiotensin II type 1 receptor blockade. *Circulation*. 2005;111:1962-9.

Yvan-Charvet L, Quignard-Boulangé A. Role of adipose tissue rennin-angiotensin system in metabolic and inflammatory diseases associated with obesity. *Hidney International*. 2011; 79:162-8.

Zheng J et al. Angiotensin II elevates nitric oxide synthase 3 express and nitric oxide production via a mitogen-activated protein kinase cascade in ovine fetoplacental artery endothelial cells. *Biol Reprod.* 0005;72:1421-8.

Zhou MS, Shulman IH, Chadipiralla K, et al. Role of c-jun n-terminal kinase in the regulation of vascular tone. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2010;15(1):78-83.

Zimet P, et al. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature.* 2001;414:782-7.