

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Alexandre Marcucci Miotto

**ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E
METABÓLICAS INDUZIDAS PELA DIETA
HIPERLIPÍDICA EM RATOS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Alexandre Marcucci Miotto
e aprovada pela Comissão Julgadora.
D. Grassi-Kassisse

Tese ao Instituto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título
de Doutor em Biologia Funcional e Molecular
– Área de Fisiologia

Orientadora

Profa. Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse

Co-Orientadora

Profa. Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch

2006

UNIDADE BC
Nº CHAMADA: _____
T/UNICAMP M669a
V. _____ EX. _____
TOMBO BCCL 73868
PROC 16.145-07
C PX
PREÇO R\$ 11,00
DATA 28-8-07
BIB-ID 914149

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

M669a

Miotto, Alexandre Marcucci

Alterações cardiovasculares e metabólicas induzidas
pela dieta hiperlipídica em ratos / Alexandre Marcucci
Miotto . – Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadora: Dora Maria Grassi-Kassisse.

Co-orientadora: Regina Célia Spadari-Bratfisch.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Dislipidemia. 2. Hiperinsulinemia. 3. Hipertensão.
4. Hipertrofia ventricular esquerda. 5. Ratos. I. Grassi-
Kassisse, Dora Maria. II. Spadari-Bratfisch, Regina Célia.
III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. IV. Título.

Título em inglês: Cardiovascular and metabolic alterations in rat model high-fat diet-fed.

Palavras-chave em inglês: Dyslipidemia; Hyperinsulinemia; Hypertension; Left ventricular hypertrophy; Rats.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Dora Maria Grassi-Kassisse, Iraídes Nunes dos Santos, Miguel Arcan-
Áreas, Eliana Cotta de Farias, Cláudio Antônio Barbosa de Toledo.

Data da defesa: 30/08/2006.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

cp Hypertrophy, left ventricular

Data da Defesa: 30 de agosto de 2006

BANCA EXAMINADORA

Profa.Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse
(Orientadora)


Assinatura

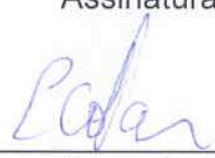
Profa.Dra. Iraídes Nunes dos Santos


Assinatura

Prof.Dr. Miguel Arcanjo Áreas


Assinatura

Profa.Dra. Eliana Cotta de Faria


Assinatura

Prof.Dr. Cláudio Antonio Barbosa de Toledo


Assinatura

Prof.Dr. Wilson Nadruz Júnior


Assinatura

Profa.Dra. Sarah Arana


Assinatura

Profa.Dra. Fernanda Ramos Gadelha


Assinatura

"Não sei como o mundo me vê; mas eu me sinto como um garoto brincando na praia, contente em achar aqui e ali uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita, tendo sempre diante de mim, ainda por descobrir, o grande oceano da verdade".

Isaac Newton

Dedico

Aos meus pais Joel Carlos Miotto e Maria Aparecida Marcucci Miotto este trabalho que representa nada comparado ao que já trabalharam por mim, se dedicaram a mim e se preocupam comigo. Aos constantes incentivos, elogios e à sua torcida pelo meu futuro...e pelas críticas, onde demonstram, apesar de tudo, esta mesma preocupação. A vocês que nunca deixarão de serem pais...meus pais!

"Os anos ensinam muita coisa que os dias desconhecem"

R.W. Emerson

À minha mulher Josiléia Caverzan, que me tem incentivado sempre e sempre, principalmente naqueles momentos em que as coisas parecem perder o sentido...e nós a vontade. Obrigado pelo amor, carinho, dedicação, apoio, e tudo o que você faz por mim, por nós. Eternamente, te amo!

"Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas"

Antoine de Saint-Exupéry

Agradecimentos Especiais

Quero aqui agradecer com especial carinho às minhas professoras, Dora e Regina, que tiveram enorme compreensão e paciência, pois ao longo destes sete anos que me encontro no Labeest não foram poucas as vezes em que cometi erros...ou que não os corrigido prontamente, ou ainda que agi de forma independente, seguindo minha consciência e esquecendo que nosso laboratório se trata na verdade de um grupo.

Entretanto, quero agradecer principalmente ao fato de que, ao longo deste mesmo período, elas têm se dedicado à minha formação, não apenas acadêmica, mas também pessoal. Neste exato momento em que me proponho a escrever este agradecimento me vêm à mente diversas situações nas quais pude apreender conhecimentos e principalmente valores que carregarei para toda a vida.

É claro que passar ensinamentos e valores como estes não é uma característica especial a todos os professores que lecionam em escolas ou universidades, mas somente àqueles que conduzem suas obrigações profissionais com a mesma dedicação, amor, respeito e ética que conduzem suas vidas pessoais; e isto as diferencia como profissionais e como pessoas.

Na verdade me faltam palavras para escrever estes agradecimentos, de forma que recorro a uma citação para expressar o quanto foram (e serão) importantes em minha vida.

**"Um professor influi para a eternidade; nunca se pode dizer
até onde vai sua influencia". Henry B. Adams**

Muito obrigado.

Agradecimentos

Quero aqui agradecer a todas as pessoas com as quais tenho convivido ou convivi (inclusive as que posso, neste momento, estar involuntariamente esquecendo) e que auxiliaram e têm auxiliado de alguma forma em minhas realizações, seja com esta tese ou outros trabalhos que realizamos em nossas vidas. Algumas destas pessoas nunca nos deixarão e certamente estarão presentes também em meu futuro, compartilhando trabalhos e realizações pessoais, pois o nascimento de uma amizade é acompanhado obrigatoriamente por laços de afeto e respeito, e isto permanece ao longo de toda uma vida, sempre, influenciando a pessoa em seu crescimento profissional e, principalmente, pessoal, pois continuarão a passar conhecimentos e valores, inclusive humanitários.

Assim, primeiramente gostaria de agradecer a toda minha família. Meus avós, Celso, Santa e João (in memorium) e Lazinha. Agradecer meus tios, Dila, Sônia e ao Mazzuia (in memorium), Luís e Neide, João e Marisa, Júnior e Fer, Nardo e Tirce, Dinho, Amaury e Loi, Sérgio e Neide, ao Paulão e à Dri e à Tata. Agradecer também aos meus primos Rafa e seu filho, Rebeca e sua filha, Marco, Anelisye (in memorium), Ro, Cristiano, Jac e seus filhos e ao Denis, que um dia me ensinou uma importante lição de vida (provavelmente sem saber!), Michelle, Mayko, Pablo, Juninho e ao querido Digo. E claro, não poderia me esquecer de minha irmã, a qual esteve presente em vinte e sete anos dos trinta que tenho hoje! Acho que nem preciso falar o quanto atrapalhou... opa! quero dizer, influenciou minha vida. Vi, você ficou por último, mas sempre deixo o melhor para o final! Apesar das constantes discussões (agora mais amenas!) você é muito importante para mim. Estas pessoas fazem parte de minha vida e influíram em sua formação. Estarão eternamente presentes na minha pessoa. Amo todos vocês! E por falar em amizade e em família, novamente não posso deixar de citar (e também, porque não, agradecer) os membros caninos que fazem parte dela, pois não foram poucas as vezes que alegraram em minhas angústias, me divertiram em nossas brincadeiras e que continuamente me ensinam importantes valores. Significam tanto que não consigo me imaginar sem este tipo de companhia. Laina, Brida, Nina, Kauê e à Ísis que recentemente nos abandonou; e em

VIII

especial ao meu velho Tom que já me acompanha há dez anos e compartilhou importantes momentos de minha vida.

Agradeço também com especial carinho às pessoas e amigos que trabalharam e conviveram comigo neste laboratório ao longo destes sete anos. Entretanto, não retomarei aqui os agradecimentos colocados na tese de mestrado; eles continuam válidos sim, mas dedicarei este espaço aos “novos” integrantes do grupo Labeest, que justamente devido a competência das pessoas que o formam nunca pára de se renovar. Assim, gostaria de agradecer primeiramente à mineirinha Márcia Carvalho Garcia, incansável, polivalente, fonte de muita sabedoria e ao mesmo tempo sedenta de conhecimento. Foi um orgulho tê-la conhecido, convivido e aprendido com ela. Ouvir seus pontos de vistas sempre foi muito importante, principalmente em nossos bate-papos nos finais de tarde, acompanhados de uma cervejinha bem gelada! Ao Edgar Teruhiko Hatore, o qual tenho grande admiração por sua inteligência, seu bom senso e sua dedicação. O qual também se tornou um querido amigo pela sua principal qualidade (do meu ponto de vista, lógico!): o companheirismo, pois sempre esteve presente quando precisei de ajuda, seja colocando a “mão na massa” e fazendo análises, ou mesmo discutindo comigo assuntos da nossa área (ou de fora dela). À Karina Friggi Sebe Petrelluzzi, a Kaká, atenciosa, sensível, competente, amiga...são tantas as qualidades que a torna tão querida por todos! Mas gostaria de exaltar aqui uma que às vezes só acreditamos que temos quando passamos por grandes provações: é uma guerreira de fé incansável. Parabéns, Vermelha, por esta força que é um exemplo para todos nós. Ao Rodrigo Gonçalves Dias, grande amigo e também um grande exemplo de dedicação e de busca pelos seus sonhos. Obrigado pelas conversas, lições e pelas ajudas nas horas difíceis. E parabéns por estar alcançando aquilo que tanto almeja. Ao Danilo Roberto Xavier de Oliveira Crege, ou simplesmente Danilinho, pelas conversas, risadas e socorro nos experimentos, onde demonstra muita competência e responsabilidade. É uma pessoa formidável, de muito bom senso (apesar de à primeira conversa não parecer!) e que em cuja companhia sempre se pode dar boas risadas devido seu refinado senso de humor. Obrigado. À Elaine Patrícia Maltêz Souza Francesconi (mamãe), por estar sempre bem humorada (eu, pelo menos, nunca a vi de mau-humor!) e sempre aberta a uma conversa e disposta a ajudar com seu enorme conhecimento. E claro, ao instinto maternal que realiza

IX

em casa e pratica no laboratório, sendo sempre atenciosa e participativa. À Juliana de Almeida, a Jú, pelas conversas e discussões...principalmente durante as longas horas de clamp! Ao Heder Frank Gianotto Estrela, o Frank, sempre de bom humor e sempre nos deixando de bom humor. À Maria Cândida Camargo Rolim pela atenção, companheirismo nas horas necessárias e pelos bate-papos. Aos recém-ingressos no laboratório: Edla, Aglécio, Heloísa e Gerusa. Muito obrigado. Agradeço também àqueles que não fazem oficialmente parte do grupo Labeest, mas que deixaram seus ensinamentos e momentos de alegria aqui dentro. Ao José Antônio, que sempre esteve pronto a ajudar e com quem as discussões sempre foram de altíssimo nível; ao Leandro dos Santos pelos momentos divertidos que passamos; à Emiliane, grande amiga, divertida, alegre...mas cuidado! não a deixe nervosa! À Viviane; à Claudinha e aos demais colegas e amigos do departamento, em cuja companhia nestes anos me ensinaram muitas lições.

A todo corpo docente do Departamento de Fisiologia e Biofísica e do Departamento de Bioquímica, pelos ensinamentos transmitidos e pelo esforço em manter este curso de Pós Graduação em alto nível.

A todos os funcionários que tem auxiliado e dado o suporte necessário à minha formação. Em especial, quero agradecer à Alexandra, à Andréia, ao seu Chico, ao Ivo e à Marina, com os quais tive maior convivência.

À professora Marta Helena Krieger pelo enorme auxílio neste trabalho, tanto com a infraestrutura necessária para as análises de pressão arterial, quanto pelas discussões e ensinamentos, principalmente no período do Programa de Estágio Docente (PED).

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal e suas alunas Marcela e Flávia que forneceram de forma irrestrita o auxílio necessário às análises com o microespectrofotômetro.

Agradeço a todas as pessoas que me ajudaram, direta ou indiretamente, na conclusão deste trabalho.

X

Às entidades de fomento à pesquisa CAPES e FAPESP que financiaram este projeto.

"O saber é uma atitude de espírito que se forma lentamente ao contato dos que sabem" Anísio Teixeira.

SUMÁRIO

<i>Lista de Abreviaturas</i>	<i>XII</i>
<i>Lista de Tabelas</i>	<i>XIV</i>
<i>Lista de Figuras</i>	<i>XVI</i>
<i>Resumo</i>	<i>XVIII</i>
<i>Abstract</i>	<i>XIX</i>
<i>Introdução</i>	<i>01</i>
<i>Objetivos</i>	<i>08</i>
<i>Metodologia</i>	<i>10</i>
<i>Resultados</i>	<i>24</i>
<i>Discussão</i>	<i>54</i>
<i>Conclusão</i>	<i>74</i>
<i>Referências</i>	<i>76</i>
<i>Anexos</i>	<i>93</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico

ACh - Acetilcolina

AGL – Ácido graxo livre

AMPc - Monofosfato de adenosina cíclico

β - Adrenoceptor beta

BSA - Albumina bovina sérica

$\beta\gamma$ - Subunidades da proteína G

CRH - Hormônio liberador da corticotrofina

CT – Colesterol total

DI – Diâmetro interno

EPV – Parede Ventricular esquerda

FC – Frequência cardíaca

G_i - Proteína G inibitória

GIR - Taxa de infusão de glicose

GK – Goto-Kakizaki

G_s - Proteína G estimulatória

HDL - Lipoproteína de alta densidade

IA - Índice aterogênico

IMV – Índice de massa ventricular

ivGTT - Teste de tolerância à glicose intravenoso

LDL - Lipoproteína de baixa intensidade

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno

XIII

MVE – massa ventricular esquerda

NO - Óxido nítrico

NOR – Noradrenalina

PAD – Pressão arterial diastólica

PAM - Pressão arterial média

PAS - Ácido periódico de Schiff

PC – Peso corporal

pD₂ - Logaritmo negativo da concentração do agonista que produz 50% da resposta máxima

PKA - Proteína quinase A

PKC - Proteína quinase C

RICO – Ratos geneticamente hipercolesterolêmicos

RM – Resposta máxima

SERCA-2 - Cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático e endoplasmático

SNS - Sistema nervoso autônomo simpático

TG - Triglicerídeos

VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 **pág. 26**

Concentrações plasmáticas de colesterol total (CT), HDL-, LDL-, VLDL- colesterol, triglicerídeos (TG), ácidos graxos livres (AGL) e índice aterogênico (IA) de ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

TABELA 2 **pág. 29**

Concentração plasmática de glicose e de insulina de ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

TABELA 3 **pág. 32**

Valores glicêmicos (mg/dL) e área sob a curva obtidos a partir de teste de tolerância à glicose em ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

TABELA 4 **pág. 35**

Valores glicêmicos (mg/dL), valores de taxa de infusão de glicose (GIR; mg/Kg/min) e área sob a curva obtidos a partir do ensaio de clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico em ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

TABELA 5 **pág. 38**

Concentração de glicogênio em (mg/100 mg) de tecido hepático e muscular de ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

TABELA 6 **pág. 41**

Pressão arterial Média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) de ratos em vigília após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

TABELA 7 **pág. 45**

Peso corporal (PC), massa ventricular esquerda (MVE), índice de massa ventricular (IMV), espessura da parede ventricular esquerda (EPV),

diâmetro interno (DI), razão espessura da parede ventricular esquerda e diâmetro interno do ventrículo esquerdo (EPV / DI) de ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

TABELA 8**pág. 48**

Área total, absorbância total, área do cutoff, absorbância do cutoff, relação das áreas, relação das absorbâncias, razão da absorbância pela área total e razão da absorbância pela área do cutoff medidas em ventrículo cardíaco por espectrofotometria de varredura de ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

TABELA 9**pág. 51**

Sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (RM) das curvas concentração-efeito à noradrenalina e % de resposta máxima à insulina em anéis de aorta isolada, com endotélio preservado (c) e sem endotélio (s), de ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 **pág. 27**

Concentrações séricas de colesterol total (CT), HDL-, LDL-, VLDL- colesterol, triglicerídeos (TG), ácidos graxos livres (AGL) e índice aterogênico (IA) de ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

FIGURA 2 **pág. 30**

Concentrações séricas de glicose (mg/dL) e plasmáticas de insulina (ng/mL) de ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

FIGURA 3 **pág. 33**

Curva glicêmica obtida a partir de teste de tolerância à glicose em ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H) após 16 h de jejum com os ratos em vigília e com livre movimentação.

FIGURA 4 **pág. 36**

Curva da glicemia (mg/dl) e da taxa de infusão de glicose (GIR; mg/kg/min) obtidas a partir do ensaio de clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico em ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

FIGURA 5 **pág. 39**

Concentração de glicogênio do tecido hepático e muscular de ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

FIGURA 6 **pág. 42**

Pressão arterial Média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) de ratos em vigília após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

FIGURA 7 **pág. 46**

Peso corporal (PC), massa ventricular esquerda (MVE), índice de massa ventricular (IMV), espessura da parede ventricular esquerda (EPV), diâmetro interno (DI), razão espessura da parede ventricular esquerda e

diâmetro interno do ventrículo esquerdo (EPV / DI) de ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

FIGURA 8**pág. 47**

Figura representativa das análises histológicas cardíacas de ratos tratados durante seis semanas com dieta balanceada normolipídica (N) ou hiperlipídica (H). Os tecidos foram corados com Tricômico de Masson. Coluna A, secção transversal de um coração inteiro na altura média do órgão. A espessura da parede do ventrículo esquerdo foi marcadamente aumentada em ratos alimentados com dieta hiperlipídica; coluna B mostra cardiomiócitos vistos em corte transversal (corte = $5\mu\text{m}$); coluna C, cardiomiócitos vistos longitudinalmente; coluna D apresenta fibrose perivascular (colunas B-E, aumento de 40x).

FIGURA 9**pág. 52**

Curvas concentração-efeito à noradrenalina apresentada em porcentagem de resposta máxima (A) e resposta contrátil em mN de força (B) em anéis de aorta isolada, com endotélio preservado (c) e sem endotélio (s), de ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

FIGURA 10**pág. 53**

Curva concentração-efeito à insulina apresentada em porcentagem de resposta máxima de relaxamento em anéis de aorta isolada, com endotélio preservado (c) e sem endotélio (s), de ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H). Os anéis foram pré-contraídos com noradrenalina antes do início das curvas de relaxamento à insulina (Nor, $0,1\ \mu\text{M}$). Ao final do experimento foi administrada concentração única de acetilcolina (Ach, $1\ \mu\text{M}$) para verificar a ausência do endotélio.

RESUMO

Diversas doenças como dislipidemia, hiperinsulinemia associada a diabetes tipo 2, hipertensão, aterosclerose e outras doenças cardiovasculares são decorrentes do estilo de vida moderno, principalmente aquele verificado nos ricos países ocidentais. Estas desordens, antes prevalentes nas pessoas mais idosas, estão se tornando atualmente epidêmicas e afetando pessoas de todas as idades. A dieta desbalanceada é, certamente, um dos maiores contribuidores para estas anormalidades. Neste estudo nós alimentamos ratos com uma dieta hiperlipídica por 6 semanas para indução de um estado de hiperlipidemia, com elevação das concentrações plasmáticas de colesterol total, do LDL-colesterol e dos triglicerídeos, além de apresentar também significativo aumento do índice aterogênico. Os resultados mostraram também um desenvolvimento paralelo de hiperinsulinemia ($0,75 \pm 0,02$ vs $1,30$ vs $0,12$ ng/mL; N vs H) com níveis glicêmicos elevados nos ratos alimentados com dieta hiperlipídica e após jejum *overnight* ($72,6 \pm 3$ vs $84,1 \pm 1,5$ mg/dL; N vs H), além de suave hipertensão e hipertrofia ventricular cardíaca. Nós concluímos que estas alterações metabólicas e cardiovasculares foram iniciadas pela dieta hiperlipídica administrada aos ratos, que esta condição se estabeleceu de forma relativamente rápida e que se encontra ainda em estágio inicial, podendo caracterizar o início da Síndrome Plurimetabólica, também conhecida como Síndrome X.

ABSTRACT

Several diseases, such as dyslipidemia, hyperinsulinemia and type 2 diabetes mellitus, hypertension, atherosclerosis, cardiovascular diseases, seem to be decurrent of the modern life style, mainly verified in the rich occidental countries. These disorders incidence, before prevalent in the elderly are more and more frequent and became now epidemic by affecting people of all ages. The disbalanced diet is a greater contributor for these abnormalities. In this study we fed rats with a high fat-cholesterol diet for six weeks to induce a hyperlipidaemia, which showed enhanced levels of total cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides, beyond presentate also a significative increase in the atherogenic index. The results showed also a parallel development of hyperinsulinemia (0.75 ± 0.02 vs 1.30 vs 0.12 ng/mL; N vs H) with glicemic levels elevated in rats fed with hyperlipidemic diet and after overnight fast (72.6 ± 3 vs 84.1 ± 1.5 mg/dL; N vs H), beyond mild hypertension and ventricular cardiac hypertrophy after diet administration. We conclude that there was hazardous metabolic and cardiovascular alterations and all of them were triggered by the high fat-cholesterol diet administered to the rats in a very short time, which may characterize the beggining of Plurimetabolic Syndrome or Syndrome X.

INTRODUÇÃO

Diversos artigos reportam a ocorrência de desordens associadas com insulina e com o metabolismo lipídico, como hiperinsulinemia e diabetes mellitus não dependente de insulina (tipo II) e dislipidemias, especialmente elevada concentração de triglicerídeos e LDL associado com reduzida concentração de HDL (DeFronzo & Ferrannini, 1991; Karhapää *et al.*, 1993; Bonora *et al.*, 1998; Howard, 1995; Grundy, 1999). Outras patologias também associadas com alterações no metabolismo dos lipídios e da insulina incluem a obesidade, a aterosclerose e a hipertensão têm sido verificadas afetar uma mesma pessoa. A este aglomerado de patologias foi designado o nome de Síndrome Plurimetabólica ou Síndrome X.

Todas estas desordens parecem ser decorrentes do estilo de vida moderno, verificado principalmente nos países ocidentais e ricos, afetando uma enorme parcela de indivíduos nestas sociedades cujos hábitos como dieta (tendência a alimentos do tipo “*fast-foods*” ricos em gordura) e de comportamento (sedentarismo e dia-a-dia apressado) (Roberts & Barnard, 2005; Stelmach *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2005). Estes hábitos seriam os causadores do aumento na ocorrência destas doenças em “pessoas mais velhas”, isto é, apresentando maior incidência com o aumento da idade populacional, ou seja, pessoas com faixa etária em torno de cinquenta a setenta anos, mas que são consideradas atualmente epidêmicas por afetar pessoas de todas as idades, com grande incidência na faixa etária ativa do mercado (Mokdad *et al.*, 2000).

Numerosos estudos experimentais, epidemiológicos, ensaios clínicos e metanálises estabeleceram claramente a associação entre dislipidemia e aumento do risco de morte. Segundo a Organização Mundial de Saúde o aumento nas concentrações plasmáticas de colesterol de baixa densidade (LDL-C), a redução dos níveis de colesterol de alta densidade (HDL-C) e também o aumento de triglicerídeos (TG) são fatores de risco para eventos

cardiovasculares, sendo esta a principal causa de morte no mundo. O Brasil acompanha este fenômeno internacional, apresentando estatísticas onde as principais causas de morte são as doenças cardiovasculares, com valores percentuais em torno de 25%, responsáveis por cerca de 250.000 mortes ao ano (OMS; <http://www.opas.org.br/opas.cfm>, 2006).

Ainda de acordo com a Organização Pan Americana da Saúde (OPAS) a diabetes mellitus afeta quase 19 milhões de pessoas e é reconhecida como um dos principais problemas de saúde na América Latina. No Brasil, estima-se que a prevalência média desta enfermidade é de 7,6% na população maior de 40 anos. Um estudo realizado nos Estados Unidos de 1990 a 1998 demonstrou que a prevalência de diabetes aumentou tanto em homens quanto em mulheres em todos os grupos sociodemográficos, étnicos e em todas as idades e níveis de educação, em todos os estados daquele país. Houve um aumento de 33% na prevalência de diabetes no período de 1990 a 1998, onde 76% incidiu sobre pessoas com faixa etária de 30-39 anos, um aumento de 64% em pessoas com “certo nível de escolaridade” e 52% em ex-fumantes (Mokdad *et al.*, 2000). Stelmach *et al.* (2005) afirmam que um alto nível de educação pode ser um forte e consistente preditor de boa saúde. Além disso, estes autores afirmam que a falta de atividade física representa um fator de risco para o desenvolvimento de síndrome metabólica.

A hipertensão arterial também representa um dos maiores desafios em saúde pública, particularmente pela complexidade dos recursos necessários para seu controle como doença (serviços médicos, pessoal treinado, medicamentos, bem como as implicações negativas e o impacto à saúde das populações em seu papel de fator de risco para outros problemas de saúde, particularmente em sinergia com outras patologias como o diabetes e as cardiopatias (OPAS/OMS; <http://www.opas.org.br/opas.cfm>, 2006). Como resultado desta situação, aproximadamente 60% de pacientes apresentam algum tipo de complicação

micro-vascular no momento do diagnóstico inicial, o que gera uma grande porcentagem de pacientes com complicações irreversíveis posteriores, entre elas, perda da visão e problemas renais. No Brasil, estima-se que aproximadamente 30% da população geral com mais de 40 anos possa ter a pressão arterial elevada. Entre os países do continente americano (estudos realizados em diversos países em populações acima de 35 anos de idade) apresenta uma prevalência entre 14% e 40%, mas é geralmente desconhecida pela metade dos pacientes, e entre aqueles que conhecem seu problema, somente a metade deles recebe algum tipo de assistência médica para seu controle, deixando quase 75% de todos os casos sem nenhum tipo de atenção ou serviços médicos.

Estes fatos tornaram-se alarmantes por causa do número de pessoas em que a doença se manifesta, por causa dos custos anuais no tratamento destas doenças e por causa de sua solução estar ainda longe de ser descoberta, visto a elevada complexidade dos sistemas metabólicos envolvidos. Confirmando esta complexidade, diversos trabalhos apresentados já no 3º Congresso Mundial sobre o Estresse, realizado em Dublin-Irlanda (2000) relacionavam a Síndrome X com fatores sociais como estresse e depressão, estendendo a inter-relação dos sistemas metabólicos com o psicológico, o neuroendocrinológico e o psicossocial.

A fonte desta complexa síndrome ainda não está clara, de forma que a questão que deve ser primeiramente respondida é: o que causa a Síndrome Plurimetabólica? Estudos têm apontado resistência à insulina (Proietto *et al.*, 1999; Lichtenstein & Schwab, 2000) e dietas ricas em gordura (Grundy, 1999; Roberts & Barnard, 2005) correlacionadas e conduzindo a esta síndrome, mas ainda existe muita controvérsia.

Diversos modelos experimentais utilizando animais de laboratório já foram desenvolvidos para permitir uma melhor compreensão das diversas patologias que afetam

os seres humanos. Ratos SHR, que desenvolvem hipertensão arterial de forma espontânea, ratos que se tornam espontaneamente diabéticos como o Goto–Kakizaki (GK) ou aqueles que se tornam diabéticos mediante administração de estreptozotocina, ratos Zucker obesos e camundongos *db/db* (deficientes do hormônio leptina o que os tornam obesos), ratos geneticamente hipercolesterolêmicos (RICO), além de vários outros modelos transgênicos. Entretanto, como se percebe, grande parte destes modelos é produzida “artificialmente”, isto é, induzidos por drogas e/ou através de modificações genéticas, de forma que caracterizam apenas uma parcela da fonte geradora da doença. Além disso, estes modelos, geneticamente modificados, normalmente acabam por desenvolver apenas a patologia cujo genótipo foi condicionado, de forma que nem sempre correspondem às variações promovidas pelo ambiente, onde as várias condições existentes podem conduzir, em um mesmo indivíduo, a um quadro de múltiplas doenças, como a que ocorre na síndrome plurimetabólica.

Os estudos que deram início a esta tese foram iniciados em 1997, quando nosso grupo pretendeu estudar o efeito hipocolesterolêmico de uma planta, a *Croton cajucara* Benth. Neste período, nosso laboratório já possuía a infra-estrutura necessária para avaliação das respostas adrenérgicas, estudadas principalmente em átrio direito e utilizando basicamente ratos como modelo experimental. Entretanto, a indução de hipercolesterolemia por dieta em ratos era difícil e resolvemos estabelecer um estudo piloto a partir de uma referência que utilizava camundongos hipercolesterolêmicos induzidos por dieta (Paigen *et al.*, 1987). Este estudo piloto acabou fornecendo o modelo aqui utilizado, onde ao final de seis semanas de tratamento com dieta hiperlipídica, os ratos apresentaram as concentrações dos lípides séricos elevados. Apresentaram também uma significativa diminuição da sensibilidade às catecolaminas, noradrenalina (agonista seletivo β_1) e isoprenalina (agonista

não seletivo β_1 e β_2), em átrios direitos isolados, indicando uma disfunção fisiológica decorrente da dieta e após um período relativamente curto de administração (Miotto, 2001).

Os adrenoreceptores β são os primeiros elementos na cadeia de transdução do sinal mediando a estimulação adrenérgica. No coração, e em condições fisiológicas tal estimulação representa um passo chave na resposta do rendimento cardíaco a um aumento da demanda periférica por oxigênio e nutrientes (Castellano & Böhm, 1997). Adrenoreceptores pertencem a uma família de receptores integrais de membrana, com sete alças transmembrana, que usam proteína G ligada a uma enzima efetora para acoplar o estímulo externo a respostas intracelulares (Greenspan & Baxter, 1994). Alguns autores propuseram que a atividade do sistema β -AR/adenilil ciclase (β AR/AC) seria dependente da composição lipídica da membrana e que esta seria influenciada pela dieta lipídica (Lurie *et al.*, 1985; Patten *et al.*, 1989; Gudbjarnason & Benediktsdóttir, 1996). Membranas celulares são compostas principalmente de proteínas e lipídeos polares, como glicerofosfolipídeos e glicosfingolipídios, além de esteróis, os quais formam a matriz da bicamada. O ambiente lipídico dentro da bicamada consiste de esteróis e das cadeias de ácidos graxos destes fosfolipídios, mas a composição deste meio é variável e pode ser significativamente alterada pela dieta, pela idade e pela ação de diversos hormônios (Patten *et al.*, 1989; Field *et al.*, 1990). A bicamada lipídica da membrana celular oferece um ambiente dinâmico para o funcionamento de enzimas, canais iônicos e receptores, de modo que mudanças na composição lipídica das membranas podem causar alterações em suas funções.

Um outro estudo, tese de doutorado, também foi desenvolvida em nosso laboratório com o modelo de dislipidemia induzida pela dieta em ratos avaliando, neste caso, as

alterações no tecido adiposo destes animais, além de demonstrar que a administração do infuso obtido a partir das cascas de Sacaca apresentou efeitos hipocolesterolêmicos (Wolf-Nunes, 2004). Recentemente, em outra dissertação de mestrado (Moreira, 2005), foi verificado que a atividade física associada à dieta exerce uma proteção do átrio direito ao evitar que a subsensibilidade aos agonistas adrenérgicos se instale nos ratos tratados com dieta hiperlipídica.

Logo, tendo em vista os índices alarmantes de doenças plurimetabólicas na nossa população principalmente decorrente dos hábitos de vida (sedentarismo e dietas hiperlipídicas) associados à escassez de modelos experimentais onde o quadro é induzido pela dieta em ratos, nos propusemos a avaliar as alterações metabólicas e cardiovasculares induzidas pela administração crônica de uma dieta hiperlipídica a ratos.

OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram analisar, *in vivo*, o perfil cardiovascular e metabólico do modelo de ratos hiperlipidêmicos desenvolvidos neste laboratório, além de verificar as inter-relações entre parâmetros do metabolismo glicêmico e lipídico assim como a função cardiovascular decorrentes do protocolo de tratamento, na tentativa de caracterizar os estágios iniciais de uma síndrome plurimetabólica.

Para tanto, verificamos:

- a pressão arterial e a frequência cardíaca;
- a espessura de parede, diâmetro de cavidade ventricular e quantificação de matriz extracelular, a partir de análises histológicas cardíacas;
- a responsividade arterial;
- as variações sanguíneas a partir da quantificação de lipídios séricos, incluindo colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol, VLDL-colesterol, ácidos graxos livres e triglicerídeos;
- o metabolismo glicêmico, a partir de análises plasmáticas da glicose e da insulina; da quantificação dos estoques de glicogênio muscular e hepático; da análise de *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico; e da análise de *ivGTT*.

METODOLOGIA

Animais

Ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*, variação albina, Rodentia, Mammalia, S.P.F.), pesando cerca de 150 g ao início do experimento foram usados neste estudo. Os animais foram adquiridos do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB) com 5 semanas de idade e foram mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas, onde tiveram uma semana para se adaptarem antes de iniciarem o protocolo experimental, na sexta semana de vida.

Durante todo o período experimental foram mantidos em gaiolas coletivas sendo, após a cateterização dos vasos sanguíneos, transferidos para gaiolas metabólicas individuais a fim de evitar danos pós-cirurgia.

Além disso, durante todo o período experimental os ratos permaneceram em sala com temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro-escuro de 12 horas (com o ciclo claro iniciando-se às 6:30 horas a.m.).

Os experimentos foram realizados em concordância com os princípios para uso de animais em pesquisa e educação adotados pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA) e os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia (Protocolo número: 226-1; UNICAMP).

Tratamento

Os animais foram alimentados (*ad libitum*) durante seis semanas ou com ração laboratorial padrão balanceada (4% de gordura e 0% de colesterol; Labina-Purina, Brasil), caracterizando o grupo normolipidêmico (N) ou com uma dieta especialmente preparada para induzir concentrações plasmáticas elevadas de colesterol, sob marca Purina (ração # 5001) e fabricada por Dyets Inc. (2508 Easton Avenue, P.O. Box Bethel, PA 18017), a qual contém 15% de gordura proveniente de manteiga de cacau, 1,25% de colesterol e 0,5% de ácido fólico, caracterizando o grupo hiperlipidêmico (H) (Wolf-Nunes *et al.*, 2000; Miotto, 2001; Wolf-Nunes, 2004).

Cateterização dos Vasos Sanguíneos

Os ratos foram anestesiados com xilazina (50 mg/Kg de peso corporal, i.m.) e hidrocloreto de quetamina (0,01 mg/Kg de peso corporal, i.m.). Em seguida, após tricotomia e assepsia da área, a artéria carótida e a veia jugular foram cateterizadas cada qual com um tubo de polietileno PE 20 (siliconizado e preenchido com 5 mM de citrato de sódio) conectado a um tubo PE 50 (com cerca de 25 cm de comprimento e preenchido com 0,9 % NaCl m/v). Os tubos foram exteriorizados na região dorsal interescapular, onde foram presos à pele do animal por pontos simples com fios de algodão (Popovic & Popovic, 1960).

Este método permitiu a coleta de amostras de sangue com o animal em movimentação livre, sem anestesia e sem perturbá-lo. Todos os ratos tiveram 48 horas de

recuperação após a cirurgia em gaiolas individuais antes de serem conduzidos os experimentos.

Análise da Pressão Arterial

Os ensaios de medida de pressão arterial foram realizados segundo Barros *et al.*, (2002). Para monitoração da pressão sanguínea os ratos cateterizados foram mantidos em uma sala silenciosa, conscientes (em vigília) e com livre movimentação pela gaiola. A pressão arterial foi medida usando um transdutor de pressão do tipo *strain-gauge* (Gould-Strain Gauge) conectado à cânula intraarterial e acoplado a um pré-amplificador (General Purpose Amplifier, Stemtech Inc.).

O DI 220 AT-CODAS (Datach Q Instruments) foi usado como sistema de aquisição de dados e um manômetro de mercúrio conectado ao transdutor de pressão foi usado para calibração do sistema.

Os sinais foram integrados para obtenção da pressão arterial média a uma frequência de amostragem de 1500 Hz.

A pressão arterial sistólica e a pressão arterial diastólica, além da frequência cardíaca foram calculadas usando o *software* Advanced CODAS.

Análises Sanguíneas

Amostras sanguíneas foram coletadas após jejum *overnight* (16 horas) pelo cateter intraarterial entre 7:30h a.m. e 10h a.m..

Colesterol total, HDL-c, triglicerídeos e glicose foram determinados colorimetricamente usando *kits* comerciais de diagnóstico (Laborlab S/A Produtos para Laboratório, Barueri, SP, Brasil).

As concentrações plasmáticas de colesterol total foram avaliadas por colorimetria através da utilização de *kit* para dosagem de colesterol (Laborlab). O método se baseia em uma reação enzimática-colorimétrica utilizando-se as enzimas lipase, colesterol oxidase e a peroxidase, para determinação do colesterol no plasma ou no soro.

As concentrações plasmáticas de triacilgliceróis foram avaliadas por colorimetria, utilizando-se *kit* para dosagem enzimática (Laborlab). O método possui o seguinte fundamento: a hidrólise dos triacilgliceróis é catalisada por uma lipase que induz a produção de glicerol e ácidos graxos livres. O glicerol gerado é posteriormente fosforilado por adenosina 5-trifosfato em presença de gliceroquinase, resultando em glicerol-3-fosfato. Este, por sua vez, sofre uma oxidação catalisada pela enzima L-glicerol-3-fosfato oxidase produzindo água oxigenada. Um intenso cromógeno vermelho é produzido pela peroxidase que catalisa a copulação oxidativa da 4-aminoantipirina e 2-hidroxi-3,5-diclorobenzenosulfonato de sódio com água oxigenada.

As concentrações plasmáticas de HDL foram quantificadas por espectrofotometria utilizando-se *kit* de dosagem para HDL colesterol. As lipoproteínas de alta densidade (HDL) foram separadas seletivamente por precipitação das de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL) usando-se o sulfato de dextran em presença de íons Mg^{2+} .

Todas as leituras foram realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda (λ) = 505 nm.

Após a obtenção direta dos valores de HDL obtivemos indiretamente as concentrações plasmáticas de LDL e VLDL a partir da fórmula de Friedewald *et al.* (1972) (Visavadiya & Narasimhacharya, 2006):

$$VLDL \text{ colesterol (mg/dL)} = \text{triacilgliceróis (mg/dL)} / 5;$$

$$LDL \text{ colesterol (mg/dL)} = \text{colesterol total} - (\text{HDL colesterol} + \text{VLDL colesterol})$$

Além disso, foi determinado o índice aterogênico, que representa uma medida indicativa da propensão ao desenvolvimento de aterosclerose e o risco potencial de morbidade adquirido pelo consumo de dieta com alto teor em lipídios (Choi *et al.*, 1991), por meio do seguinte cálculo:

$$IA = (\text{colesterol total} - \text{HDL}) / \text{HDL}$$

Ácidos graxos foram determinados também colorimetricamente usando *kit* de diagnóstico comercial (Wako Chemicals GmbH; Neuss, Germany).

Determinação da Concentração de Insulina

A insulina secretada no teste de tolerância à glicose (*iv*GTT) foi dosada de acordo com o método descrito por Scott *et al.* (1981). As amostras foram adequadamente diluídas para possibilitar a extrapolação de valores desconhecidos, a partir de uma curva padrão.

Tampão fosfato (Na_2HPO_4 : 32,25 mM; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 10,2 mM, pH 7,4) foi utilizado para o preparo de todas as soluções e para diluição das amostras, do anticorpo anti-insulina (1:200) e da insulina radioativa. Além disso, os tubos correspondentes ao NSB (*non-specific binding* ou ligação inespecífica) e referência receberam 100 μL adicionais de tampão fosfato.

Feitas as pipetagens, os tubos foram agitados em vórtex e mantidos, durante 48 horas, a 4°C. Após este período todos os tubos, com exceção dos totais, receberam 200 μL de uma solução contendo 2,5% de carvão (Norit A), 0,5% de albumina e 0,25% de dextran T70. Os tubos foram mantidos a 4°C, durante 20 minutos. Em seguida, foram submetidos à centrifugação de 2800 rpm, por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a radioatividade das amostras medida em contador γ (Beckman Gamma Counter 5500). O sobrenadante dos 3 tubos correspondentes aos totais não foi descartado, de modo que todo o seu volume foi utilizado para leitura da radioatividade. Por intermédio dos valores obtidos nos tubos contendo concentrações conhecidas de insulina, elaborou-se a curva padrão que possibilitou a determinação da concentração de insulina de cada amostra.

Teste de Tolerância à Glicose (ivGTT)

O ensaio de ivGTT foi realizado conforme Farias-Silva *et al.* (2002).

Após a recuperação cirúrgica, os animais foram mantidos em jejum *overnight* (16h), com os experimentos iniciando às 8:00 h. Um cateter de polietileno, utilizado como extensão para injeção intravenosa de glicose e coleta de amostras de sangue arterial foi

acoplado à extremidade distal de cada cateter, previamente implantados na veia jugular e artéria carótida, como descrito acima.

Antes do início do experimento (tempo -5 minutos, jejum) uma alíquota de sangue foi retirada para medida da glicemia. O sangue foi coletado em tubos tipo *ependorf* heparinizados e centrifugado durante 3 minutos a 3000 g. A glicemia foi avaliada em 10 µL de plasma através de um analisador de glicose, glicosímetro (Super Glucocard II, ARKRAY FACTORY Inc., Kouka-Gun, Shiga, Japão). Em seguida foi aplicada uma infusão intravenosa de glicose (1,5 g de glicose/Kg de peso corporal) e amostras de sangue com volume de 100 µL foram coletadas nos tempos 2, 5, 10, 15, 30 e 60 minutos pós-infusão de glicose.

Durante as coletas de sangue os animais foram mantidos em sua gaiola-moradia, onde permaneceram conscientes durante todo o experimento.

Os animais foram sacrificados após a coleta da última amostra.

***Clamp* Euglicêmico Hiperinsulinêmico**

O ensaio do *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico é utilizado para determinação do metabolismo glicêmico dos animais e consiste na manutenção de uma taxa de infusão constante para a insulina enquanto que a taxa de infusão de glicose (GIR) deve ser regulada momento a momento. Como o princípio básico do ensaio relaciona-se com a manutenção de uma euglicemia verifica-se, ao final de 2 horas de experimentação, se houve alteração da captação de glicose pelos tecidos periféricos entre os grupos. Entende-se que, em *clamp*-

euglicêmico hiperinsulinêmico, quanto mais resistente os tecidos do indivíduo à insulina menor será a taxa de infusão de glicose (GIR) (Agosto *et al.*, 1997).

Os ratos tiveram sua veia jugular direita e artéria carótida esquerda cateterizadas, como descrito acima. No dia do ensaio foram implantadas extensões de cateteres para que o animal (em jejum, 16 horas) tivesse liberdade de movimento dentro de sua gaiola. No cateter venoso foi implantado um T para que ocorresse a infusão simultânea das seguintes soluções:

- Uma solução de insulina de cerca de 6 mU/Kg.min diluída em solução de NaCl 0,9% adicionada de 1% de BSA, com auxílio de uma bomba de infusão em velocidade constante;

- Uma solução de glicose (10 %) com auxílio de uma bomba peristáltica. O débito de infusão em função da velocidade da bomba foi verificado antes de cada *clamp*.

Uma alíquota de 25 µL de sangue foi retirada a cada 5 minutos. O sangue foi coletado em tubos tipo *ependorf* heparinizados e centrifugado durante 3 minutos a 3000 g. A glicemia foi avaliada em 10 µL de plasma através de um analisador de glicose, glicosímetro (Super Glucocard II, ARKRAY FACTORY Inc., Kouka-Gun, Shiga, Japão). O débito de perfusão de glicose foi realizado de tal forma que a glicemia fosse mantida em 6 mM. O tempo de realização do *clamp* foi de 2 horas, sendo a primeira hora para atingir a estabilização das concentrações plasmáticas de insulina e de glicose.

Os resultados foram expressos como a quantidade de glicose infundida para manter a euglicemia (mg/Kg.min) durante a primeira e segunda horas de *clamp*, que foi um índice de utilização total de glicose pelo organismo inteiro (Agosto *et al.*, 1997; Baret *et al.*, 2002).

Determinação da Concentração de Glicogênio

Amostras de fígado, músculo sóleo, gastrocnêmio branco e vermelho e do ápice ventricular foram obtidas para determinação do conteúdo de glicogênio de acordo com Lo *et al.*, (1970) com pequenas modificações (Sampaio-Barros *et al.*, 2003). Após coleta, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C. As amostras de fígado e músculo foram pesadas e imersas em solução de KOH 30% saturada com Na₂SO₄. Foi adicionado etanol 95% para precipitar o glicogênio da digestão alcalina. As amostras foram então centrifugadas e o sobrenadante cuidadosamente aspirado. Os *pellets* foram dissolvidos em uma mistura de água destilada, fenol (5%) e H₂SO₄ concentrado. A absorbância foi determinada em um Beckman DU[®] -640 (Fullerton, CA, USA) e os resultados expressos em miligramas de glicogênio por 100 miligramas de tecido.

Análises Histológicas Cardíacas

Amostras de tecido cardíaco foram removidas para análise histológica. O coração foi parado com 1 ml de xilocaína misturado com 0,5 ml de heparina (para evitar ou reduzir coagulação do sangue dentro das câmaras cardíacas) administrado diretamente na aorta, no sentido oposto à circulação (retrógrado). Após a coleta o coração foi colocado em salina para retirar o excesso de sangue, evitando o excesso de manuseio para melhor preservação do tecido. Átrio e ventrículo foram separados; o ventrículo foi lavado em solução

fisiológica, pesado e imediatamente colocado para fixação em um recipiente contendo formaldeído. Em seguida, depois de fatiado, foi desidratado em álcool com concentrações crescentes (70% até o absoluto), seguido de uma diafanização em xilol, imersão em Bouin e inclusão em parafina (58°C a 60°C).

Os blocos foram cortados com 5 µm de espessura e corados com Tricômico de Masson para análise de espessura da parede ventricular e diâmetro da câmara, utilizando o *software* Scion Image (NIH Image; Scopacasa, 2002).

Para quantificação da matriz extracelular as lâminas foram submetidas a um tratamento específico, denominada PAS (Ácido Periódico de Schiff) para realçar o colágeno do tecido muscular. O processo requer a desparafinização seguido pela celoidinização das lâminas as quais são submetidas a um tratamento enzimático com uma solução de α -amilase (Sigma, Chem. CO EUA) na concentração de 0,4% em solução salina, em câmara úmida por 1 hora à 37°C (Vidal *et al.*, 1973). Esse tratamento teve por finalidade retirar possíveis substâncias que pudessem bloquear os sítios específicos de ligação da molécula de colágeno com o corante. Logo em seguida as lâminas foram submersas em solução de borohidreto de sódio (Nuclear, Brasil) a 0,5% com o objetivo de remover os grupos aldeídos presentes no tecido. Removeu-se a celoidina e iniciou-se a coloração das lâminas pela oxidação com ácido periódico (0,5% diluído em água destilada), e tratado com reativo de Schiff durante 9 minutos. Após 3 banhos de 3 minutos cada, com água sulfurosa e em seguida com água destilada, as lâminas foram montadas em bálsamo do Canadá natural (Vetec, Brasil), o qual possui um índice de refração conhecido ($n=1,54$) e tradicionalmente recomendado já que seu índice de refração é próximo àquele dos tecidos biológicos. A medida dos cortes foi realizada com um microespectrofotômetro de varredura

automático Carl Zeiss (Oberkochen, Alemanha) no qual estava acoplado a um computador provido de software específico para análise dos dados. Inicialmente foi estabelecido um comprimento de onda de 560 nm para análise do tecido. A escolha desse comprimento de onda foi a partir de uma curva de absorbância espectral obtida com uma régua de filtro monocromadora Schott (Oberkochen, Alemanha), onde se determinou previamente a absorbância dos tecidos muscular e intersticial. A varredura do tecido foi monodirecional, usando-se uma objetiva Planapo 40x, optovar 2, diâmetro do diafragma de medida de 0,1 mm e diafragma de campo 0,2 mm. Realizou-se uma média das absorbâncias no próprio tecido intersticial para se estabelecer um valor de corte (*cutoff* = 0,27) e exclusão de valores que não representassem o tecido estudado. Além disso, absorbâncias inferiores a 0,02 foram consideradas *background* e automaticamente excluídas.

Análises de Aorta Isolada

Os ensaios foram realizados segundo Zanichelli *et al.*, (2004) Os animais foram sacrificados por meio de um golpe na cabeça com posterior secção dos vasos cervicais. Em seguida, a aorta torácica foi cuidadosamente isolada para preservação do endotélio. De cada aorta foram retirados dois anéis (3-5 mm) tendo um deles sua superfície interna delicadamente massageada para remoção do endotélio. Estes anéis foram montados sob 2 g de tensão inicial, em câmara para órgão isolado contendo solução de Krebs-Hanseleit com a seguinte composição (mM): NaCl: 115; KCl: 4,6; CaCl₂.H₂O: 2,5; KH₂PO₄: 1,2; MgSO₄.7

H₂O: 2,5; NaHCO₃: 25; glicose: 11. O líquido de incubação foi continuamente borbulhado com 5% de CO₂ e 95% de O₂ e mantido a 37°C.

Antes da adição de qualquer droga os anéis permaneceram no banho, para equilíbrio, durante 60 minutos e a solução fisiológica foi trocada a cada 15 minutos. Após o equilíbrio, a presença do endotélio foi comprovada fisiologicamente pela indução de relaxamento com a adição de acetilcolina (ACh 1 µM) em anéis pré-contraídos com noradrenalina (0,1 µM). Considerou-se que o endotélio estava presente nos anéis que apresentaram 80 a 90% de relaxamento, e ausente nos anéis que não apresentaram nenhum relaxamento. Anéis que apresentaram relaxamento inferior a 80% em resposta a ACh foram descartados. Após este teste, os anéis foram re-equilibrados por um período de 45 minutos, com troca de solução fisiológica a cada 15 minutos.

Após o período de re-equilíbrio acima descrito, uma única curva dose-resposta à noradrenalina foi obtida em cada anel, com ou sem endotélio.

Curvas concentração-efeito também foram realizadas para determinar a capacidade relaxante da insulina em anéis de aorta, os quais foram pré-contraídos com noradrenalina (200 µL). Concentrações de 10, 50, 100, 500, 1000 e 5000 µU/mL foram aplicadas à cuba. Uma última aplicação com acetilcolina foi realizada para determinar a presença do endotélio.

Análises Estatísticas

Os dados são apresentados como média e erro padrão da média e considerados significativos valores de P menores que 0,05.

As áreas sob as curvas obtidas no teste de tolerância à glicose (*ivGTT*) e de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico foram realizadas pelo método trapezoidal através do *software* Graph-Pad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) e em seguida analisadas utilizando o teste *t* de Student.

A análise de regressão não-linear foi utilizada para determinar os valores pD_2 do agonista adrenérgico e para a confecção das curvas concentração-efeito foi realizada através do emprego do *software* GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA), com valores para resposta na ausência de agonista igual a zero. Os resultados obtidos em anéis de aorta com e sem endotélio foram analisados utilizando ANOVA seguido de Tukey.

Para a análise da pressão sanguínea foi usado o *software* Advanced CODAS.

A análise comparativa entre os grupos foi realizada pelo teste *t* de Student não pareado através do *software* GraphPad InStat.

RESULTADOS

Análises Sanguíneas - Lipídios

A dieta rica em gordura administrada aos animais durante seis semanas elevou significativamente a concentração plasmática de colesterol total comparado ao grupo alimentado com dieta balanceada. Além disso, aumento foi observado para suas frações LDL-c, VLDL-c e para o triglicerídeo. O índice aterogênico, que representa uma medida indicativa da propensão ao desenvolvimento de aterosclerose e o risco potencial de morbidade adquirido pelo consumo de dieta com alto teor em lipídios, apresentou valores significativamente maiores no grupo H que o grupo N (Tabela 1 e Figura 1). Por outro lado, não houve alterações plasmáticas para a fração HDL-c e nem para AGL, embora este último tenha se apresentado quase 2 vezes maior.

Tabela 1 – Concentrações plasmáticas de colesterol total (CT), HDL-, LDL-, VLDL- colesterol, triglicerídeos (TG), ácidos graxos livres (AGL) e índice aterogênico (IA) de ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

Grupo	CT (mg/dL)	HDL-c (mg/dL)	LDL-c (mg/dL)	VLDL-c (mg/dL)	TG (mg/dL)	AGL (mmol/L)	IA
N	36,2±4,2	5,2±1,2	24,2±5,5	6,7±0,8	20,9±1,2	0,65±0,06	7,1±1,8
H	95,7±9,5*	6,6±0,4	83,2±9,4*	10,5±0,5*	51,3±1,7*	1,02±0,14	15,3±1,3*

Amostras sanguíneas foram coletadas após 16 h de jejum com os ratos em vigília e com livre movimentação.

Unidades das concentrações apresentadas como mg/dL exceto para AGL que é apresentado como mmol/L

Índice aterogênico = [(colesterol total – HDL)/HDL].

O número de experimentos foi de 4 para o grupo N e de 5 para o grupo H.

Dados apresentados como média ± EPM.

* P<0,05 H vs N; teste *t* de Student.

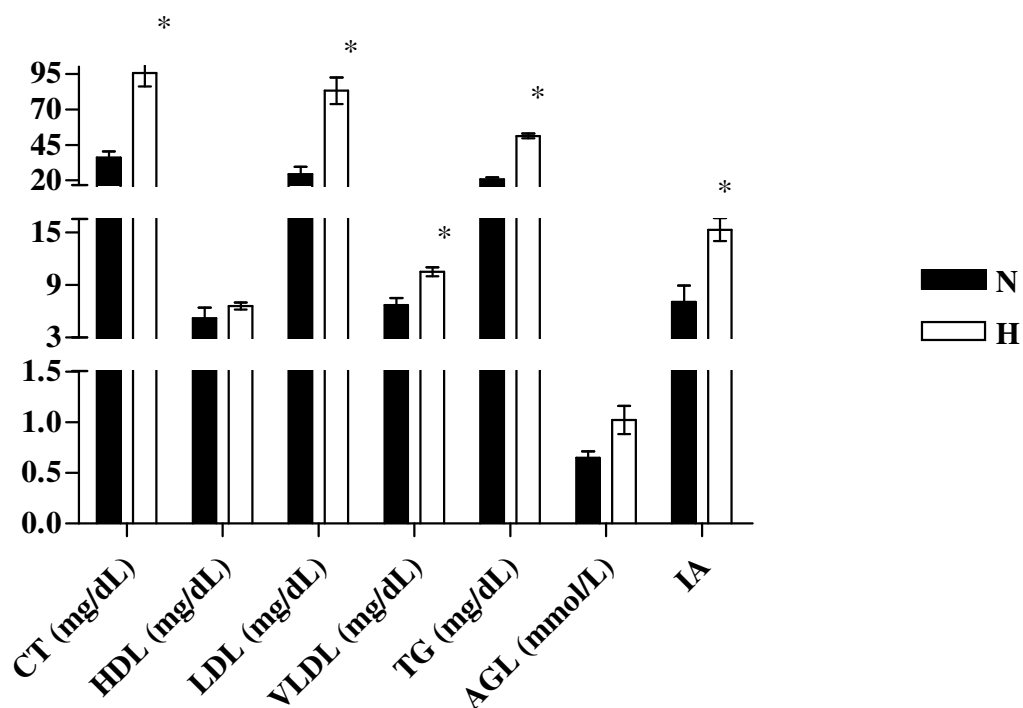


Figura 1 – Concentrações plasmáticas de colesterol total (CT), HDL-, LDL-, VLDL-colesterol, triglicerídeos (TG), ácidos graxos livres (AGL) e índice aterogênico (IA) de ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

Todos os valores são apresentados em mg/dL, exceto para AGL (mmol/L).

O número de experimentos foi de 4 para o grupo N e 5 para o grupo H.

* $P < 0,05$ H vs N; teste *t* de Student.

Análises Sanguíneas - Glicose e Insulina

A dieta hiperlipídica não promoveu qualquer alteração na glicemia após seis semanas de tratamento, quando analisadas pelo *kit* da Laborlab. Contudo, a concentração de insulina apresentou um aumento significativo no grupo alimentado com a dieta hiperlipídica comparado ao grupo controle após seis semanas de tratamento (Tabela 2 e Figura 2).

Tabela 2 – Concentração plasmática de glicose e de insulina de ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

Grupo	Glicose (mg/dL)	Insulina (ng/mL)
N	112,9±11,9	0,75±0,02
H	110,5±4,9	1,30±0,12*

Amostras sanguíneas foram coletadas após 16 h de jejum com os ratos em vigília e com livre movimentação. A glicemia foi analisada pelo kit da Laborlab.

O número de experimentos foi de 4 para o grupo N e de 5 para o grupo H.

Dados apresentados como média ± EPM.

* $P < 0,05$ H vs N; teste t de Student.

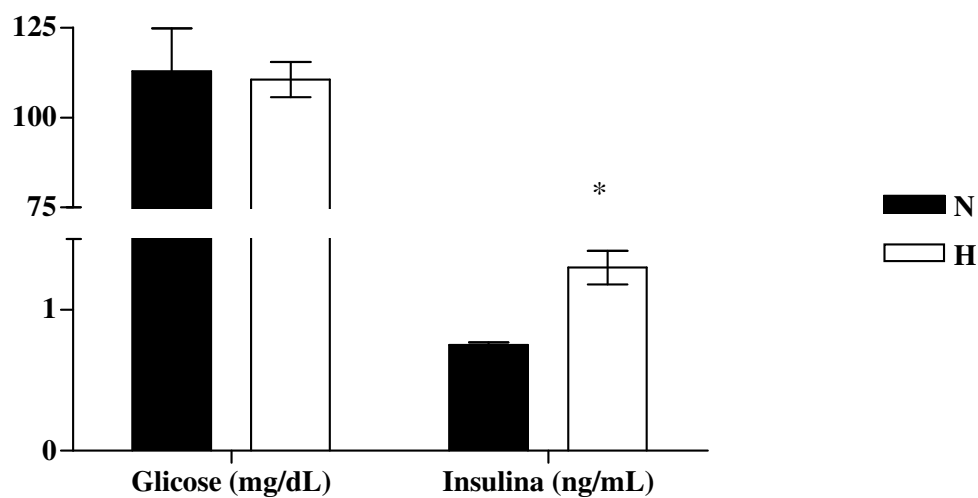


Figura 2 – Concentrações plasmática de glicose (mg/dL) e de insulina (ng/mL) de ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H). O número de experimentos foi de 4 para o grupo N e 5 para o grupo H. * $P < 0,05$ H vs N; teste t de Student.

Teste de Tolerância à Glicose (*iv*GTT)

O teste de tolerância à glicose intravenosa foi realizado em ratos sob vigília e com livre movimentação em suas gaiolas. Amostras sanguíneas foram coletadas após 16 h de jejum nos tempos (minutos) 2, 5, 10, 15, 30 e 60, além de uma coleta prévia à infusão de solução de glicose saturada especificada na Tabela 3 como jejum. Nenhuma diferença significativa foi observada nestes ensaios entre os grupos que se alimentaram com uma dieta balanceada (N) e com uma dieta hiperlipídica (H), exceto na amostra jejum. A curva glicêmica do ensaio pode ser vista na Figura 3.

Tabela 3 – Valores glicêmicos (mg/dL) e área sob a curva obtidos a partir de teste de tolerância à glicose em ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

Grupo	Jejum	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min	Área sob Curva
N	72,6±3	544±26	481±49	317±10	232±28	103±24	90±12	12475,8±1132,5
H	84,1±1,5*	528±12	380±18	289±13	181±20	86±5	84±11	10977,8±276,9

Amostras sanguíneas foram coletadas após 16 h de jejum com os ratos em vigília e com livre movimentação. As coletas foram realizadas nos tempos (minutos) 2, 5, 10, 15, 30 e 60, além de uma coleta prévia à infusão de solução de glicose saturada indicada como jejum.

O número de experimentos foi de 4 para o grupo N e de 4 para o grupo H exceto para as amostras no jejum que foram 12 para o grupo N e 11 para o grupo H.

Dados apresentados como média ± EPM.

- $P < 0,05$ H vs N; teste t de Student.

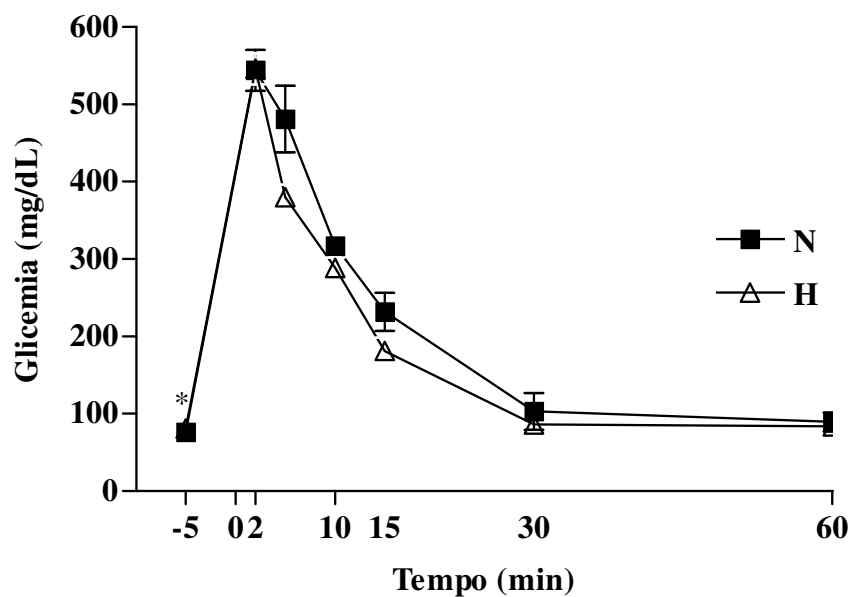


Figura 3 – Curva glicêmica obtida a partir de teste de tolerância à glicose em ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H) após 16 h de jejum com os ratos em vigília e com livre movimentação. O número de experimentos foi de 4 para o grupo N e 4 para o grupo H exceto para as amostras no jejum que foram 12 para o grupo N e 11 para o grupo H.

* $P < 0,05$ H vs N; teste t de Student.

***Clamp* Euglicêmico Hiperinsulinêmico**

O ensaio do *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico também foi realizado em ratos sob vigília e com livre movimentação em suas gaiolas. Estes animais também foram submetidos a um jejum *overnight* (16 h) e amostras sanguíneas foram coletadas a cada 10 minutos durante as duas horas de ensaio, visando a manutenção de sua glicemia. Uma amostra de sangue foi coletada antes do início da infusão de glicose e insulina para determinação da glicemia de jejum (Tabela 4 e Figura 4). Os valores de jejum indicam uma glicemia significativamente maior para o grupo H. A euglicemia foi mantida nos períodos analisados e não houve diferença entre grupos. A taxa de infusão de glicose foi significativamente maior para o grupo H na segunda hora após o início do *clamp*. Não foram observadas diferenças significativas para a glicemia e taxa de infusão de glicose quando os dados foram analisados como área sob a curva na segunda hora.

Tabela 4 – Valores glicêmicos (mg/dL), valores de taxa de infusão de glicose (GIR; mg/Kg/min) e área sob a curva obtidos a partir do ensaio de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico em ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

Grupo	Jejum	1ª hora		2ª hora		Área sob Curva (2ª hora)	
		Glicose	GIR	Glicose	GIR	Glicose	GIR
N	72,6±3	101,6±1,49	22,0±0,16	103,4±2,23	20,0±0,22	5283,0±109,0	1001,5±215,4
H	84,1±1,5*	103,4±0,94	24,4±0,14	107,7±2,67	22,7±0,28*	5440,0±229,9	1111,3±58,2

Amostras sanguíneas foram coletadas após 16 h de jejum com os ratos em vigília e com livre movimentação. As coletas foram realizadas a cada 10 minutos durante 2 horas de ensaio. O tempo zero representa o início deste prazo, determinado após a estabilização da glicemia em valores próximos ao de jejum, verificada após três repetições seguidas. Uma coleta prévia à infusão de solução de glicose e insulina indica a glicemia de jejum.

O número de experimentos foi de 7 para o grupo N e de 7 para o grupo H exceto para as amostras no jejum que foram 12 para o grupo N e 11 para o grupo H.

Dados apresentados como média ± EPM.

* $P < 0,05$ H vs N; teste *t* de Student.

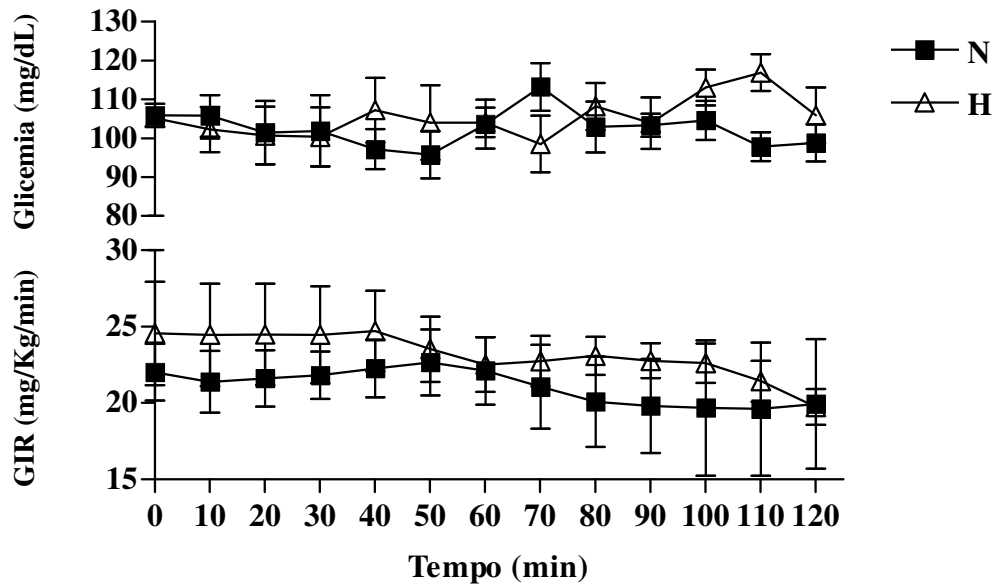


Figura 4 – Curva da glicemia (mg/dl) e da taxa de infusão de glicose (GIR; mg/kg/min) obtidas a partir do ensaio de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico em ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H). O número de experimentos foi de 7 para o grupo N e 7 para o grupo H exceto para as amostras no jejum que foram 12 para o grupo N e 11 para o grupo H.

Determinação da Concentração de Glicogênio

Os resultados da concentração de glicogênio tecidual estão apresentados na Tabela 5 e Figura 5 e foram determinados após um jejum overnight. Não foram observadas alterações nos estoques de glicogênio entre os grupos, exceto para o músculo esquelético gastrocnêmio branco, com o grupo tratado com dieta hiperlipídica (grupo H) apresentando uma concentração significativamente mais elevada quando comparado aos ratos alimentados com dieta balanceada (grupo N).

Tabela 5 – Concentração de glicogênio em (mg/100 mg) de tecido hepático e muscular de ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

Grupo	Fígado	Sóleo	GB	GV	Ventrículo Esquerdo
N	0,49±0,05	0,39±0,09	0,25±0,01	0,37±0,09	0,40±0,06
H	0,81±0,19	0,46±0,04	0,45±0,01*	0,32±0,05	0,39±0,03

Amostras teciduais foram coletadas após 16 h de jejum. GB = gastrocnêmio branco; GV = gastrocnêmio vermelho.

O número de experimentos foi de 4 para o grupo N e de 4 para o grupo H.

Dados apresentados como média ± EPM.

* $P < 0,05$ H vs N; teste *t* de Student.

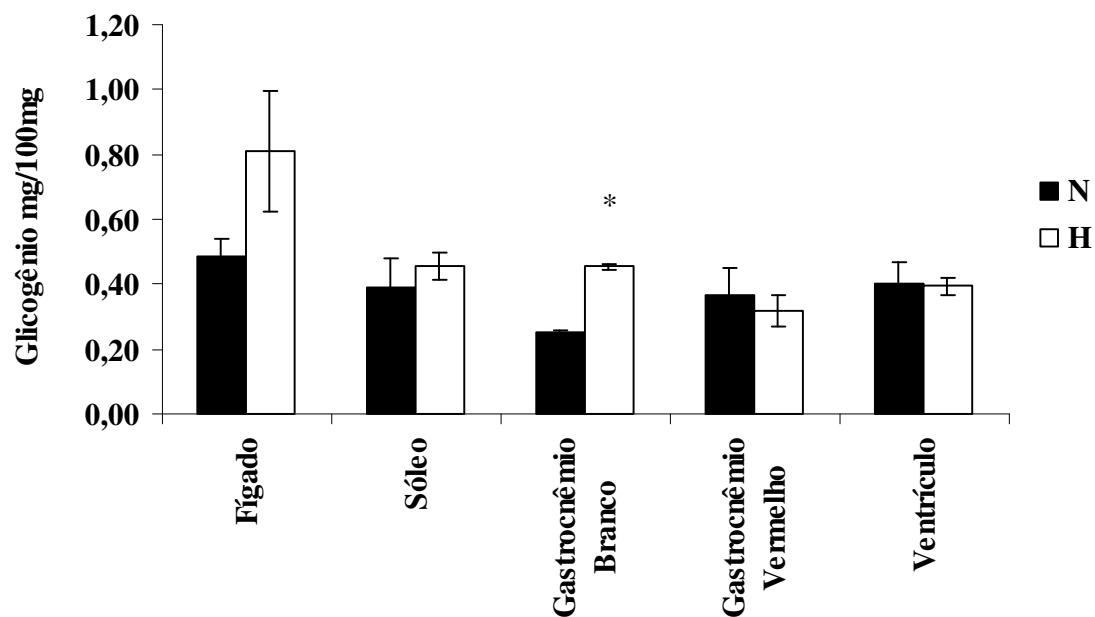


Figura 5 – Concentração de glicogênio do tecido hepático e muscular de ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H). Todos os valores são apresentados em mg/100mg. O número de experimentos foi de 4 para o grupo N e 4 para o grupo H. * $P < 0,05$ H vs N; teste *t* de Student.

Análise da Pressão Arterial

A tabela 6 e Figura 6 mostram a pressão arterial média, a pressão arterial sistólica e a pressão arterial diastólica registradas em ratos em vigília e com livre movimentação. Todas as medidas de pressão arterial apresentaram uma leve, mas significativa, elevação em resposta à dieta hiperlipídica administrada por seis semanas. Além disso, apresentam a frequência cardíaca que, da mesma forma que a pressão arterial, apresentou um aumento significativo no grupo H comparado ao grupo N.

Tabela 6 – Pressão arterial Média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) de ratos em vigília após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

Grupo	PAM (mmHg)	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	FC (bpm)
N	105±2	120±2	91±1	346±7
H	112±1*	130±1*	98±2*	368±4*

O número de experimentos foi de 3 para o grupo N e de 4 para o grupo H.

Dados apresentados como média ± EPM.

* P<0,05 H vs N; teste *t* de Student.

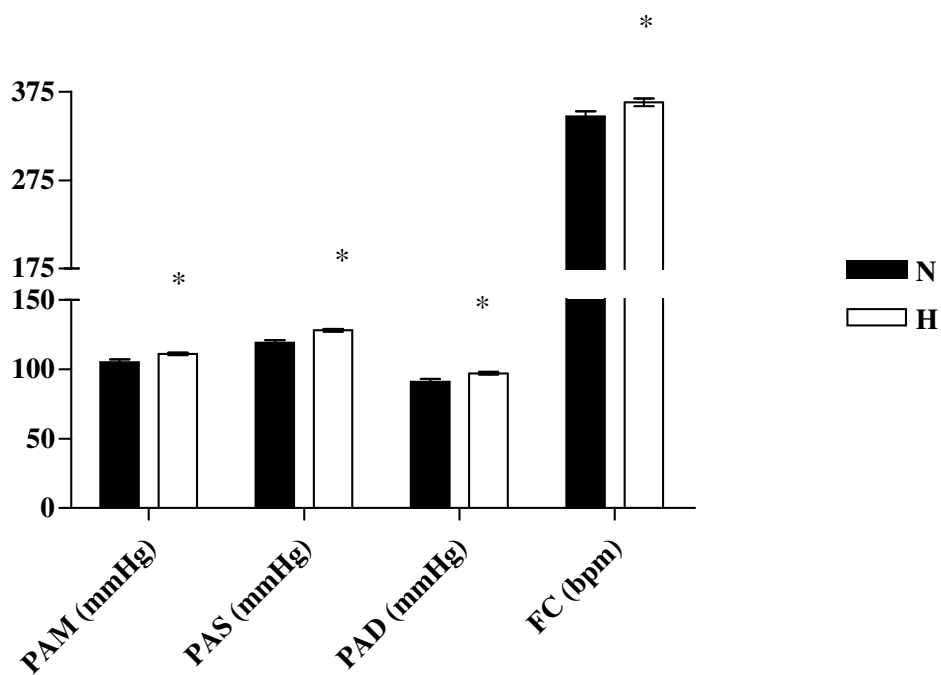


Figura 6 – Pressão arterial Média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) de ratos em vigília após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H). O número de experimentos foi de 3 para o grupo N e 4 para o grupo H. * $P < 0,05$ H vs N; teste t de Student.

Análises Histológicas Cardíacas

O peso corporal não diferiu entre os grupos, mas a massa do ventrículo esquerdo foi significativamente maior nos ratos alimentados com a dieta hiperlipídica. Entretanto, o índice de massa ventricular, que representa a razão do peso do ventrículo pelo peso corporal do rato, acabou demonstrando que este aumento da massa cardíaca dos ratos alimentados com dieta hiperlipídica foi influenciado pelo peso corporal, de forma que a diferença entre os grupos não foi significativa. Por outro lado, apresentaram diferença estatística significativa na espessura da parede do ventrículo esquerdo ($p < 0,0001$), o diâmetro interno do ventrículo esquerdo e para a razão espessura da parede ventricular esquerda pelo diâmetro interno do ventrículo esquerdo ($p < 0,0001$), razão esta que indica se a hipertrofia corrente é concêntrica ou excêntrica (Tabela 7 e Figura 7). Como resultado desta medida observamos que a hipertrofia verificada nos ratos alimentados com dieta hiperlipídica é caracterizada como concêntrica, a qual está relacionada principalmente com sobrecarga de pressão.

As alterações morfológicas são mostradas na Figura 8, cujas imagens foram obtidas por análises microscópicas e coradas com Tricômico de Masson: a coluna A representa o coração inteiro após uma secção transversal na altura média do órgão; a coluna B mostra miócitos vistos em corte transversal (40x); miócitos vistos em seu eixo longitudinal (40x) são apresentados na coluna C e fibrose perivascular (40x) na coluna D.

As medidas da quantificação da matriz extracelular a partir da coloração com PAS e feita com microespectrofotometria de varredura são mostradas na Tabela 8. As medidas da área total de matriz extracelular analisada foram semelhantes em ambos os grupos e a

absorbância desta área total também não apresentaram diferença estatística. A medida do *cutoff* representa o valor de corte para absorbâncias que se encontram abaixo daquele que o tecido avaliado, no caso tecido conjuntivo, apresenta, de forma a impedir que absorbância do tecido muscular circunvizinho seja considerada no cálculo. Tanto a área do *cutoff* quanto a absorbância verificada nesta área não apresentaram diferenças significativas. Ausência de diferença estatística também foi observada na relação das áreas e na relação das absorbâncias, além da razão absorbância pela área, total e do *cutoff*. Logo, estes resultados mostram nenhuma diferença na quantidade de tecido conjuntivo perivascular entre os grupos avaliados. Apesar de ser esta a região a que apresenta maior acúmulo de tecido conjuntivo, não podemos descartar a possibilidade de que este tecido esteja alterado entre os miócitos no preenchimento do espaço intersticial, como também é possível que a hipertrofia observada nos corações dos ratos hiperlipidêmicos seja decorrente do aumento dos miócitos cardíacos.

Tabela 7 – Peso corporal (PC), massa ventricular esquerda (MVE), índice de massa ventricular (IMV), espessura da parede ventricular esquerda (EPV), diâmetro interno (DI), razão espessura da parede ventricular esquerda e diâmetro interno do ventrículo esquerdo (EPV / DI) de ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

Grupo	PC (g)	MVE (mg)	IMV (mg/g)	EPV (mm)	DI (mm)	EPV/DI
N	292,4±13,2	546,6±23,9	1,89±0,15	11,5±0,12	28,8±0,2	0,40±0,004
H	307,8±7,5	653,8±28,2*	2,22±0,10	15,1±0,51*	20,6±0,3*	0,64±0,010*

Os dados são apresentados como média ± EPM. Índice de massa ventricular = peso do ventrículo / peso corporal.

O número de experimentos foi de 4 para o grupo N e de 4 para o grupo H.

Dados apresentados como média ± EPM.

* P<0,05 H vs N; teste *t* de Student.

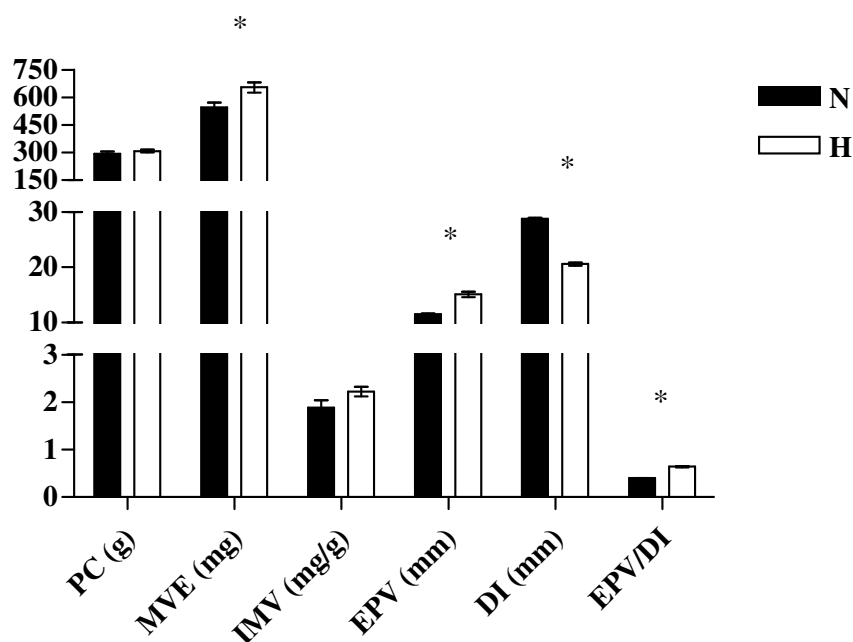


Figura 7 - Peso corporal (PC), massa ventricular esquerda (MVE), índice de massa ventricular (IMV), espessura da parede ventricular esquerda (EPV), diâmetro interno (DI), razão espessura da parede ventricular esquerda e diâmetro interno do ventrículo esquerdo (EPV / DI) de ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H). O número de experimentos foi de 4 para o grupo N e 4 para o grupo H. * $P < 0,05$ H vs N; teste *t* de Student.

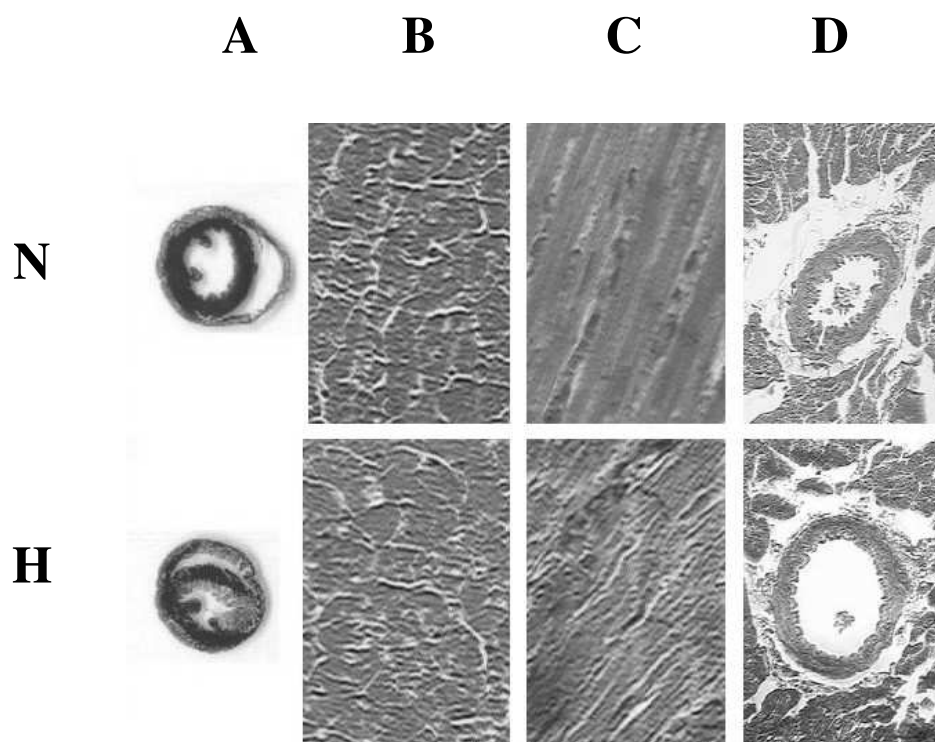


Figura 8 – Figura representativa das análises histológicas cardíacas de ratos tratados durante seis semanas com dieta balanceada normolipídica (N) ou hiperlipídica (H). Os tecidos foram corados com Tricômico de Masson. Coluna A, secção transversal de um coração inteiro na altura média do órgão. A espessura da parede do ventrículo esquerdo foi marcadamente aumentada em ratos alimentados com dieta hiperlipídica; coluna B mostra cardiomiócitos vistos em corte transversal (corte = 5μm); coluna C, cardiomiócitos vistos longitudinalmente; coluna D apresenta fibrose perivascular (colunas B-E, aumento de 40x).

Tabela 8 – Área total, absorvância total, área do *cutoff*, absorvância do *cutoff*, relação das áreas, relação das absorvâncias, razão da absorvância pela área total e razão da absorvância pela área do *cutoff* da matriz extracelular medidas por espectrofotometria de varredura em ventrículo esquerdo cardíaco de ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

Grupo	Área Total (μm^2)	Abs. Total (ηm)	Área Cutoff (μm)	Abs. Cutoff (ηm)	Rel. Áreas	Rel. Abs	Abs/Área Total	Abs/Área Cutoff
N	917 $\pm$ 291	234 $\pm$ 60	566 $\pm$ 183	188 $\pm$ 51	59,6 $\pm$ 3,9	1,32 $\pm$ 0,03	0,27 $\pm$ 0,04	0,34 $\pm$ 0,05
H	1613 $\pm$ 217	431 $\pm$ 72	1153 $\pm$ 311	352 $\pm$ 75	68,6 $\pm$ 10,3	1,22 $\pm$ 0,08	0,28 $\pm$ 0,04	0,33 $\pm$ 0,05

O número de experimentos foi de 4 para o grupo N e de 4 para o grupo H.

Dados apresentados como média $\pm$ EPM.

Análises com Aorta Isolada

Aortas isoladas de ratos alimentados com dieta normolipídica e hiperlipídica foram submetidas a uma curva concentração efeito à noradrenalina, agonista seletivo β_1 , e α -adrenérgicos para promover vasoconstrição e verificar a responsividade do vaso sanguíneo ao estímulo adrenérgico. Anéis de aorta torácica foram cortados em pares e em um deles foi realizada uma leve massagem para remoção da camada endotelial. Os resultados relacionados à força (mN/100mg) obtidos a partir destas análises não demonstraram alterações da responsividade da aorta ao estímulo adrenérgico quando comparados anéis com endotélio, ou quando comparados anéis sem endotélio, de ambos os grupos (Tabela e Figura 9). Apenas as comparações de anéis com endotélio intacto com anéis que tiveram o endotélio removido foram diferentes significativamente, tanto com relação à porcentagem de relaxamento (Figura 9 A) quanto com relação à força contrátil (Figura 9 B).

Na tabela 9 e na Figura 10 também são apresentados os resultados (% relaxamento) de uma curva cumulativa concentração-efeito à insulina em anéis de aorta. Verificamos, nesta análise, que os anéis de aorta sem endotélio apresentaram um relaxamento à insulina significativamente maior quando comparados aos anéis com endotélio, entretanto somente o grupo N apresentou diferença significativa ($P < 0,01$).

Ao final da curva foi administrada uma única dose de acetilcolina (1 μ M) para assegurar a ausência ou presença de endotélio. Podemos observar na figura 10 que, nos grupos onde o endotélio foi removido, não houve resposta relaxante, comprovando a eficácia na remoção desta camada celular. Por outro lado, os grupos em cujos anéis foi mantido intacto o endotélio demonstraram um relaxamento significativo. Embora não

significativa observamos um maior relaxamento em anéis de aorta com endotélio provenientes de ratos tratados com a dieta hiperlipídica ($Nc = 25,7 \pm 7,2\%$ vs $Hc = 54,9 \pm 10,8\%$).

Tabela 9 – Sensibilidade (pD_2) e resposta máxima (RM) à noradrenalina e porcentagem de relaxamento em resposta máxima à insulina (5000 μ U/mL) em anéis de aorta isolada, com endotélio preservado (c) e sem endotélio (s), de ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

Grupo	Noradrenalina		Insulina	Acetilcolina (1 μ M)
	pD_2	RM (mN/100 mg)	% Relaxamento	% Relaxamento
Nc	7,25 $\pm$ 0,06 (6)	202,8 $\pm$ 40,8 (6)	4,0 $\pm$ 1,5 (2)	25,7 $\pm$ 7,2 (2)
Ns	8,12 $\pm$ 0,11 (6)*	382,9 $\pm$ 54,1 (6)*	33,0 $\pm$ 7,6 (3) [#]	8,3 $\pm$ 4,1 (3)
Hc	7,21 $\pm$ 0,10 (5)	159,1 $\pm$ 59,4 (5)	8,9 $\pm$ 0,6 (3)	54,9 $\pm$ 10,8 (3)
Hs	8,20 $\pm$ 0,16 (5)*	362,6 $\pm$ 52,0 (5)*	32,5 $\pm$ 0,5 (2)	0,0 $\pm$ 0,0 (2) †

O número de experimentos está entre parênteses.

Dados apresentados como média $\pm$ EPM.

* $P < 0,05$ Ns vs Nc; Hs vs Hc

$P < 0,05$ Nc vs Ns

† $P < 0,05$ Hs vs Hc

ANOVA seguido de Tukey

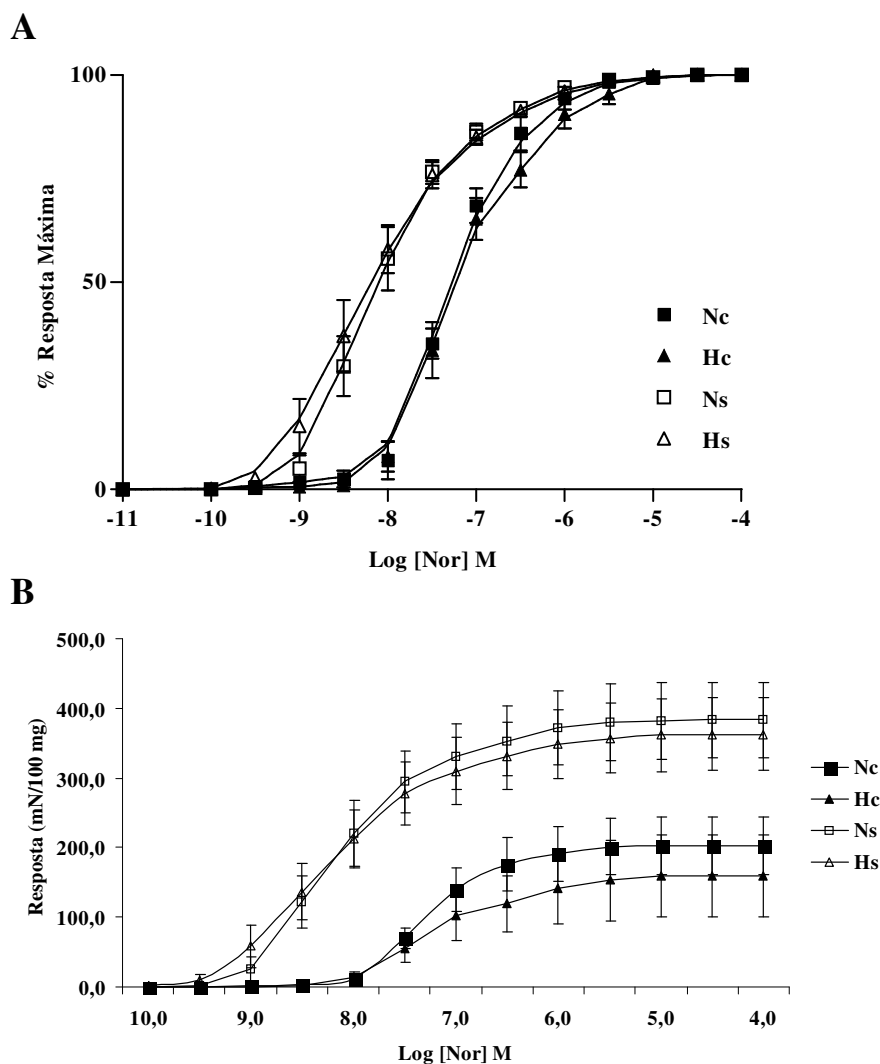


Figura 9 – Curvas concentração-efeito à noradrenalina apresentadas em porcentagem de resposta máxima (A) e resposta contrátil em mN de força (B) em anéis de aorta isolada, com endotélio preservado (c) e sem endotélio (s), de ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H).

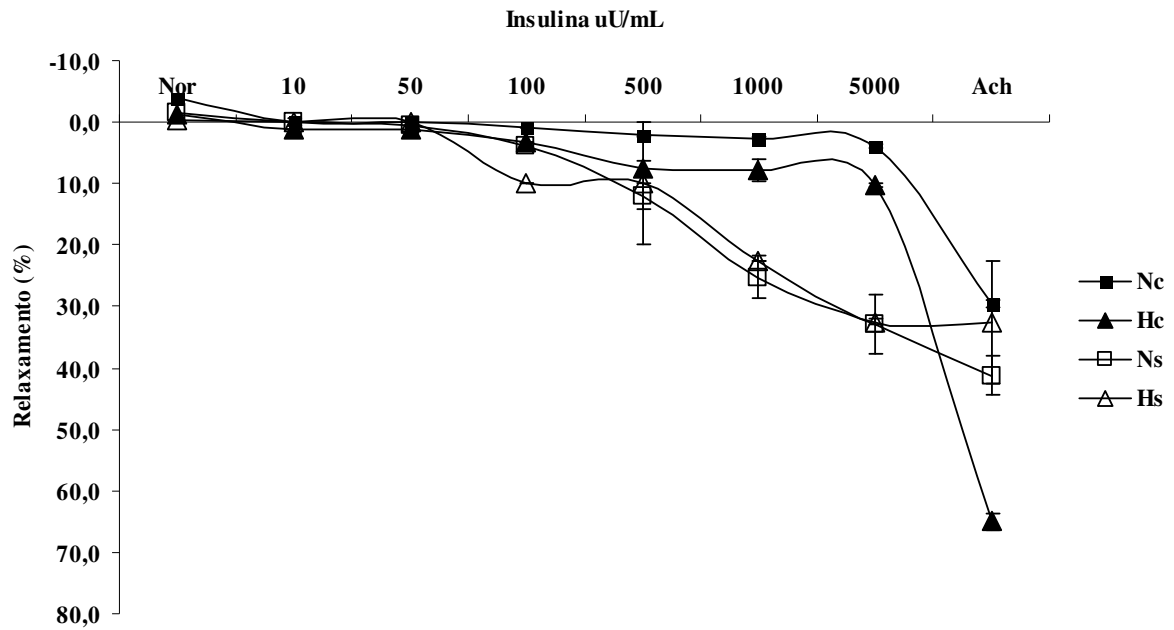


Figura 10 – Curva concentração-efeito à insulina apresentada em porcentagem de resposta máxima de relaxamento em anéis de aorta isolada, com endotélio preservado (c) e sem endotélio (s), de ratos após seis semanas recebendo dieta balanceada (N) ou hiperlipídica (H). Os anéis foram pré-contraindidos com noradrenalina antes do início das curvas de relaxamento à insulina (Nor, 200 μ L). Ao final do experimento foi administrada concentração única de acetilcolina (ACh, 1 μ M) para verificar a ausência ou presença endotélio.

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram algumas das mudanças metabólicas e estruturais que se efetivaram após seis semanas de alimentação com uma dieta hiperlipídica em ratos. Dentre elas, verificamos dislipidemia associada à hiperinsulinemia, leve hipertensão arterial e hipertrofia ventricular cardíaca. Com relação à dislipidemia determinamos elevada concentração plasmática de triglicerídeos, colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). Entretanto, a concentração da fração lipoprotéica HDL (alta densidade) não se alterou com a dieta enquanto ácidos graxos livres também não apresentaram diferença estatística significativa. A presença desta dislipidemia decorrente da dieta pode ter um papel mais importante na indução de outras alterações metabólicas do que se tem proposto.

Por outro lado, a resistência à insulina e o diabetes são apontados como os principais indutores de diversas doenças metabólicas. Insulina apresenta um efeito inibitório na liberação de ácidos graxos pelo tecido adiposo e um efeito estimulatório no catabolismo das micelas e da fração VLDL, além de favorecer o *clearance* da fração LDL (DeFronzo & Ferrannini, 1991; Malminiemi *et al.*, 1995). Contudo, no estado de resistência à insulina estas ações se apresentam reduzidas e, conseqüentemente, a concentração destes lipídios no sangue se eleva, pois ocorre uma aceleração na síntese de VLDL, enquanto a fração HDL se apresenta inalterada ou mesmo reduzida, o que resulta em hipertrigliceridemia e esteatose hepática (Kusunoki *et al.*, 2002), como também foi observado nos ratos aqui estudados (Wolf-Nunes, 2004), além de resultar em acúmulo de triglicerídeos no músculo esquelético.

Hiperlipidemia é encontrada em inúmeras patologias como, por exemplo, doenças dos sistemas endócrino, hepático e renal (Mokler *et al.*, 1985), em doenças cardiovasculares (Grundy & Bearn, 1988; Danev *et al.*, 1997), promovendo alterações na contratilidade

cardíaca e na responsividade vascular (Mokler *et al.*, 1985), além de estar entre os principais fatores de risco em doenças vasculares, incluindo aterosclerose e hipertensão (De Las Heras *et al.*, 2003). Diversos estudos epidemiológicos e experimentais têm confirmado que dislipidemias primárias (genéticas) e secundárias (decorrentes de alterações hormonais e/ou metabólicas resultantes de fatores ambientais) são altamente aterogênicas e são os principais fatores de risco no desenvolvimento de aterosclerose e doenças cardíacas (Lurie *et al.*, 1985; Grundy & Bearn, 1988; Marinetti, 1990; Rubattu *et al.*, 1993; Wald & Law, 1995; Danev *et al.*, 1997; Howard, 1999; Huang *et al.*, 2004). Apesar de não termos verificado a presença de lesões ateroscleróticas, foi verificada uma elevada aterogenicidade, estipulada pelo índice aterogênico (Visavadiya & Narasimhacharya, 2006), o qual foi significativamente maior no grupo alimentado com a dieta hiperlipídica comparado ao grupo controle.

Em um estudo feito com humanos em 1998, Bonora *et al.* constataram que a hipertrigliceridemia e a diminuição da HDL nunca ocorriam como desordens isoladas, e sim como uma síndrome polimetabólica. Logo, no conjunto, os resultados observados neste estudo podem indicar a instalação de uma síndrome, conhecida como Síndrome X ou Síndrome Plurimetabólica, a qual é caracterizada por um conjunto de diversas patologias. A estreita relação entre esta síndrome e resistência à insulina sugere ser este último um dos principais fatores conduzindo à síndrome (DeFronzo & Ferrannini, 1991; Haffner & Miettinen, 1997), visto que resistência à insulina, associada à hiperinsulinemia, tem sido associada ao desenvolvimento de patologias como dislipidemia, aterosclerose e hipertensão (Reaven, 1988, DeFronzo & Ferrannini, 1991; Osei, 1999; Raji *et al.*, 2000). Entretanto, apesar desta corrente indicando ser a resistência à insulina o fator causador, a fonte geradora desta síndrome ainda não é conhecida ou comprovada, devido à sua

complexidade, o que conduz à seguinte questão: qual desordem realmente dá início à Síndrome X?

Neste trabalho nós usamos uma dieta rica em gordura para desenvolver hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia em ratos. Contudo, os resultados mostraram um aumento paralelo da glicemia juntamente com uma hiperinsulinemia, leve hipertensão arterial e hipertrofia ventricular cardíaca no período relativamente curto da administração da dieta hiperlipídica, sugerindo que um desequilíbrio lipídico poderia ser o fator desencadeante de todo o processo que conduzirá a uma resistência à insulina e, possivelmente, a longo prazo, à Síndrome X. Por exemplo, Pan *et al.* (1997) propuseram que o acúmulo intracelular de triglicerídeo poderia aumentar a produção de glicose e, conseqüentemente, interferir com a ação da insulina, de forma a reduzir a ação da insulina na musculatura (Boden, 1996; Bergman & Ader, 2000).

Já em 1978, Bernstein *et al.* sugeriam um mecanismo patogênico para o desenvolvimento de hipertrigliceridemia, onde um estado de resistência à captação de glicose conduziria à hiperinsulinemia que, por sua vez, aumentaria a produção de lipoproteínas de muito baixa densidade rica em triglicerídeos (VLDL-TG), aumentando assim a concentração plasmática de triglicerídeos. Como já citado por Danev *et al.* (1997), uma concentração aumentada de lipídeos plasmáticos correlaciona-se significativamente com um tônus simpático cronicamente aumentado, pois o sistema nervoso simpático é responsivo à ingestão alimentar (Kaufman *et al.*, 1991) e recentes evidências experimentais indicam que sua atividade pode ser alterada pela dieta ou, mais especificamente, pela alta concentração de macronutrientes como carboidratos e lipídios na corrente sanguínea, de forma que situações de jejum tendem a suprimi-la, enquanto dietas ricas nestes

macronutrientes tendem a aumentá-la (Crandall *et al.*, 1983; DeFronzo & Ferrannini, 1991; Kaufman, 1991).

Vários dados na literatura apontam o fato de que a ingestão de uma dieta hiperlipídica afeta outros parâmetros fisiológicos, como indução da ativação do eixo sistema nervoso simpático-medula adrenal e também do eixo hipotálamo-hipófise-córtex adrenal causando, respectivamente, a elevação das concentrações plasmáticas de catecolaminas e de glicocorticóides. Catecolaminas que atuam como neurotransmissores poderiam causar elevação adicional nas concentrações de glicocorticóides, através de adrenoceptores localizados no hipotálamo, os quais estimulam a liberação de hormônio liberador da corticotrofina (CRH). Este último causa elevação das concentrações plasmáticas não apenas de corticotrofina (ACTH) (Nomura *et al.*, 1981; Al-Damluji, 1988), como também das próprias catecolaminas (Brown & Fisher, 1984; 1985), as quais, em conjunto, promovem alterações metabólicas no sentido de causar mobilização de substratos energéticos a partir dos tecidos de armazenamento, como o hepático e o adiposo branco, liberando-os para a circulação sanguínea (Berne & Levy, 2000).

Isto afetaria significativamente o metabolismo de carboidratos, pois as catecolaminas endógenas, principalmente a adrenalina, estimulam a glicogenólise e a gliconeogênese hepáticas (Himms-Hagen, 1967; Exton *et al.*, 1972; Hue *et al.*, 1978; Yorek *et al.*, 1980; Kneer & Lardy, 1983; Pilkis *et al.*, 1988; Watt *et al.*, 2001). Em tecido pancreático estas, através de adrenoceptores alfa, estimulam a liberação de glucagon pelas células alfa das ilhotas de Langerhans, enquanto inibem a liberação de insulina pelas células beta (Porte Jr., 1969; Porte Jr. & Robertson, 1973), sendo que os adrenoceptores beta podem estimular a liberação de insulina pelas células beta-pancreáticas (Yoshida, 1992; Atef *et al.*, 1996). A corticosterona influencia o metabolismo de carboidratos por

meio de sua ação permissiva aos efeitos glicogenolíticos e gliconeogênicos das catecolaminas e do glucagon (Exton *et al.*, 1972). Como resultado destes efeitos ocorre aumento da glicemia (Verago *et al.*, 2001; Retana-Marquez *et al.*, 2003).

Se considerarmos a possibilidade de que nos ratos hiperlipidêmicos ocorra uma hiperatividade simpática esta condição poderia resultar em um significativo aumento da glicemia de jejum, como verificado nos ensaios do *ivGTT* e do *clamp* quando analisamos a glicemia pelo glicosímetro. Entretanto, quando amostras sanguíneas de ratos hiperlipidêmicos foram analisadas com o *kit* enzimático não verificamos este mesmo resultado. Além disso, fatores que conduzem a esta glicemia de jejum elevada, como uma captação reduzida da glicose, foram verificados em testes como o de tolerância à glicose, mas nenhuma diferença estatística foi observada. Srinivasan *et al.* (2005), utilizaram o ensaio de *ivGTT* para determinar a sensibilidade à insulina e verificaram uma redução significativa da taxa de remoção de glicose. Entretanto, estes autores utilizaram uma porcentagem de gordura na dieta administrada aos animais muito superior à que nós utilizamos (58% vs 25%).

Os valores médios da taxa de infusão de glicose no *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico demonstraram valores significativamente mais elevados para o grupo hiperlipídico, o que não está de acordo com dados de literatura onde se observa resistência à insulina (Kusunoki *et al.*, 2002). Este resultado indica, por outro lado, que os ratos alimentados com dieta hiperlipídica apresentam maior captação da glicose sanguínea, com significância estatística observada na segunda hora do ensaio. Wolf-Nunes (2004) verificou que adipócitos isolados da região epididimal de ratos submetidos a tratamento idêntico ao utilizado neste trabalho não apresentava resistência à insulina.

Farias-Silva *et al.* (2002) verificaram, em estudos de indução de estresse em ratos por choque nas patas, que estes animais apresentavam hiperglicemia e hiperinsulinemia após três sessões de choque. Por outro lado, verificaram também que a secreção estática de insulina pelas ilhotas pancreáticas estimulada pela glicose não estava alterada pelo choque, mas os animais apresentavam elevada concentração sérica de corticosterona. Glicocorticóides e catecolaminas inibem a captação de glicose por tecidos periféricos, desta forma conservando-a para eritrócitos e células nervosas. Assim, a elevada concentração plasmática de glicose resistente à hiperinsulinemia observada neste trabalho, como aquela observada em ratos submetidos a estresse, pode ser consequência da alta concentração destes hormônios do estresse, ao invés de resistência à insulina. Além disso, neste caso, poderíamos pensar que a dieta hiperlipídica administrada aos animais seria uma fonte de estresse, conduzindo a efeitos semelhantes àqueles verificados pelo choque nas patas.

Assim, nossos resultados demonstram que estes animais não são resistentes à insulina e, aparentemente, apresentam sensibilidade maior ao seu efeito de promover a captação de glicose. O fato destes ratos não apresentarem um estado de resistência à insulina parece demonstrar uma condição prévia a todos os sintomas da síndrome metabólica que se pretendeu induzir neste modelo animal. As variações na administração da dieta novamente devem ser consideradas, pois diferenças da porcentagem de lipídios utilizados nos vários estudos e a questão do prazo durante o qual a dieta foi administrada nos remete à seguinte questão: poderiam estes animais se tornar resistentes à insulina com a continuidade da dieta?

Resistência à insulina pode promover diminuição do conteúdo de glicogênio no músculo esquelético (Kusunoki *et al.*, 2002). Sob condições experimentais de euglicemia e hiperinsulinemia, como no ensaio de *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, o metabolismo

não-oxidativo da glicose refletiria primariamente a síntese de glicogênio no músculo esquelético, com apenas pequena quantidade de glicose sendo convertida em lipídios e/ou lactato. Um estado de resistência à insulina poderia promover uma diminuição do metabolismo não-oxidativo da glicose estimulado pela insulina e, desta forma, uma menor estocagem de glicose no músculo na forma de glicogênio seria verificada (Vestergaard *et al.*, 1995). Nossos resultados demonstram que não houve diferença nos estoques de glicogênio muscular entre os grupos estudados, exceto para o músculo gastrocnêmio branco, cuja concentração de glicogênio foi maior no grupo alimentado com dieta hiperlipídica. Este efeito pode ser decorrente da maior adaptação deste tipo de músculo, de fibras glicolíticas, a determinadas situações onde uma maior reserva energética se faz necessária, como ocorre em condições de estresse crônico.

Resistência à insulina pode promover diminuição na atividade da glicogênio sintetase, o que resulta em redução na síntese de glicogênio (Kusunoki *et al.*, 2002). No entanto, como relatado por Upton *et al.* (1998) que verificaram que a síntese de glicogênio no fígado não era afetada em ratos diabéticos Zucker, este efeito nem sempre foi confirmado. Além disso, Kusunoki *et al.* (2002) também estudaram ratos alimentados por 10 semanas com dieta rica em lipídeos, mas contendo 26,7% de óleo de girassol, e afirmaram haver uma relação inversa entre o conteúdo de glicogênio e de triglicerídeo hepático. Resultados anteriores obtidos em nosso laboratório com este modelo animal utilizado em nossos estudos já confirmaram a condição de esteatose hepática nestes animais (Miotto, 2001; Wolf-Nunes, 2004). No entanto, a resistência à insulina não ocorre nestes animais e, apesar da condição de esteatose hepática observada neste modelo, podemos verificar que o conteúdo de glicogênio hepático (e muscular) não se altera entre os grupos estudados, apenas são depletados pelo jejum a que os animais foram submetidos (animais

controle alimentados apresentam uma concentração de glicogênio hepático de $4,16 \pm 0,38$ mg/100mg). Logo, como seria mantida esta glicemia de jejum elevada nos ratos alimentados com dieta hiperlipídica?

Uma possibilidade relaciona-se com a hipótese de Randle (1963), onde a elevada concentração de ácidos graxos livres decorrente da dieta e, conseqüentemente, o aumento de sua disponibilidade, os torna mais utilizados para processos metabólicos oxidativos, reduzindo a captação de glicose e sua utilização no tecido muscular esquelético e no tecido adiposo. Isto poderia, ainda, ocasionar o acúmulo intramuscular de triglicerídeos e o aumento da produção de glicose, o que precederia as ações periféricas da insulina (Boden, 1996; Pan *et al.*, 1997; Bergman, 2000). Além disso, produtos derivados do tecido adiposo, como leptina, PPAR γ , TNF α apresentam ações fundamentais na regulação do armazenamento dos substratos energéticos e na sua homeostasia. O aumento de PPAR γ pode contribuir, por exemplo, para aumentar a expressão de genes envolvidos no transporte e na oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético, podendo até ocasionar o acúmulo de lipídios no músculo, reduzindo sua capacidade oxidativa em sujeitos obesos e diabéticos e afetar o metabolismo glicêmico (Kawamura *et al.*, 2004).

Outra possibilidade envolve a produção de lactato: animais alimentados com uma dieta rica em gordura apresentam aumento da taxa de conversão de glicose para lactato, o qual seria reconvertido a glicose no fígado pelo ciclo de Cori. Este efeito da dieta seria rápido (em torno de duas semanas) e estaria acompanhado por um estado de resistência específica em certos tecidos ou mesmo sistêmica à insulina (Digirolamo *et al.*, 1992). Entretanto, antes do quadro de resistência à insulina se fixar, poderia ser observada uma elevação da glicemia e, em resposta, uma hiperinsulinemia.

Sabe-se que o excesso de algum dos itens na suplementação alimentar, principalmente com relação à glicose e à gordura, pode causar resistência à insulina nos tecidos muscular e adiposo, bem como prejudicar a supressão da produção endógena de glicose. Modelos experimentais alimentados com dietas ricas em gordura mostraram redução na tolerância à glicose, associada a um menor metabolismo basal da glicose e/ou mediado pela insulina (Proietto *et al.*, 1999). Além disso, diminuição na afinidade da insulina a seu receptor e/ou do transporte de glicose são constantemente relacionados a alterações da composição de ácidos graxos da membrana celular, são decorrentes de dieta hiperlipídica e rica em gordura saturada, como a que constitui a dieta utilizada neste experimento. Esta é considerada mais deletéria com relação à resistência à insulina induzida por gordura, quando comparada à dietas mono e poliinsaturada (Lichtenstein & Schwab, 2000). Além disso, o consumo excessivo de calorias e conseqüente ganho de peso também conduz ao quadro de resistência dos tecidos à ação da insulina. No entanto, as células pancreáticas são capazes de aumentar sua atividade secretora quando a eficácia na ação deste hormônio diminui. O resultado é um estado metabólico bem compensado, onde a resistência à insulina é compensada pelo aumento de sua secreção causando hiperinsulinemia. Com a continuidade deste estado de resistência à insulina, a excessiva taxa de secreção de insulina não pode ser mantida e o indivíduo torna-se diabético, além de estar sujeito às demais disfunções descritas acima (DeFronzo & Ferrannini, 1991). Assim, podemos questionar: em que estágio se encontram os animais deste estudo? Uma vez que apresentam aumento significativo na glicemia de jejum, mas não apresentam alterações no teste de tolerância à glicose ou no clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico, e nem alterações na resposta anti-lipolítica de adipócitos à insulina.

Outro aspecto importante está relacionado ao sistema nervoso simpático (SNS) que também apresenta uma importante função regulatória do metabolismo metabólico favorecendo, por exemplo, a lipólise, e simultaneamente sobre o sistema cardiovascular promovendo, por exemplo, vasoconstrição. Interessantemente, a insulina também pode atuar sinergicamente relacionando a absorção dos nutrientes à atividade simpática. Esta relação entre insulina e atividade do sistema nervoso simpático pode ocorrer pela ação do hormônio leptina, liberado pelos adipócitos e que atua no sistema nervoso central promovendo a sensação de saciedade. A insulina promove aumento da expressão e da secreção de leptina pelo tecido adiposo branco, a qual aumenta a atividade do sistema nervoso simpático. Por uma alça de *feedback* negativo, as catecolaminas liberadas pela ativação simpática inibem, via adrenoreceptores β_3 , a expressão do gene responsável pela síntese deste hormônio pelas células adiposas (Nonogaki, 2000). Pode-se hipotetizar que, devido à hiperlipidemia mantida, a insulina sinaliza constantemente a secreção de leptina que, por sua vez, mantém o tônus simpático ativado, de forma a produzir efeitos tais como maior mobilização das reservas energéticas, favorecendo a manutenção da hiperlipidemia e da elevada glicemia, além da elevação da pressão arterial, como verificado neste trabalho.

Há também inúmeras evidências de que a atividade do sistema nervoso simpático está aumentada em uma fração de indivíduos com hipertensão essencial (Kaufman *et al.*, 1991; Castellano & Böhm, 1997), e que há também uma forte associação entre frequência cardíaca e pressão arterial. Elevada frequência cardíaca, como observado em nossos resultados, é um dos indicadores da hiperatividade do SNS (Bønnaa & Arnesen, 1992; Danev *et al.*, 1997). Além disso, uma concentração aumentada de lipídeos plasmáticos correlaciona-se significativamente com tônus simpático cronicamente aumentado (Danev *et*

al., 1997), condição esta que poderia favorecer a manutenção de um tônus vasoconstritor suficiente para gerar um estado hipertenso. Elevada frequência cardíaca é frequentemente observada em pessoas hipertensas as quais, muito frequentemente, possuem também alterações na concentração plasmática de lipídeos (Bønna & Arnesen, 1992; Wannamethee & Shaper, 1994; Ma *et al.*, 1996; Danev *et al.*, 1997). A resistência à insulina também parece estar associada com hipertensão essencial (Ferrannini *et al.*, 1987) e com a chamada Síndrome X cardiológica, a qual se relaciona com uma menor resposta do fluxo coronariano relacionado ao aumento da frequência de disparos do marcapasso atrial. Pacientes acometidos com esta síndrome apresentam como sintomas isquemia induzida por exercícios e angina microvascular, além de uma hiperinsulinemia que parece estar intimamente envolvida na disfunção microvascular coronariana e na angina (Vestergaard *et al.*, 1995). Desta forma, a Síndrome X Cardiológica relaciona-se com a Síndrome X Metabólica.

Gotoh *et al.* (1989) relatam ainda que a estimulação do sistema colinérgico central aumenta tanto a atividade do sistema simpático quanto do parassimpático, elevando as concentrações plasmáticas de catecolaminas e glucagon e de insulina, respectivamente. No entanto, os efeitos da insulina são mascarados pela ação antagônica das catecolaminas (Nonogaki, 2000). Interessantemente, na condição de resistência à insulina os terminais nervosos simpáticos não são afetados, de forma que a ativação simpática sobre os vasos sanguíneos se mantém inalterada (Chi *et al.*, 2000) e, conseqüentemente, o tônus contrátil dos vasos sanguíneos se eleva.

De Las Heras *et al.* (2003), observaram que uma dieta hiperlipídica administrada em coelhos promovia redução no relaxamento induzido por acetilcolina em anéis de aorta. Nossas análises em anéis de aorta isolada, por outro lado, não apresentaram alterações da

resposta a acetilcolina decorrentes da dieta hiperlipídica no prazo de seis semanas. Entretanto, dois aspectos fundamentais podem estar determinando esta diferença nestes resultados: o prazo de administração de dieta para o desenvolvimento das alterações funcionais e estruturais verificados por aqueles autores foi de 12-14 semanas, enquanto nosso estudo durou apenas seis semanas; eles usaram coelhos como modelos experimentais, que reconhecidamente apresentam maior predisposição aos efeitos de uma dieta hiperlipídica e ao desenvolvimento da aterosclerose do que ratos. Por outro lado, mesmo a diferença nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos não ser estatisticamente significativa entre os ratos dos diferentes grupos, não podemos desconsiderar as possíveis implicações dos resultados observados no grupo alimentado com dieta hiperlipídica. Está relatado na literatura que elevada exposição aos ácidos graxos promove lipotoxicidade endotelial, com aumento da síntese de diacilglicerol e ativação de proteína quinase C (PKC) no endotélio vascular, causando endotéliopatia e aumento do risco vascular associado com a síndrome de resistência à insulina. Interessantemente, isoformas da proteína quinase C (PKC) também podem interferir na fosforilação do resíduo de serina da via sinalizante da insulina. Estimulação de α_1 -AR presentes em adipócitos ativam a fosfolipase C- β e, portanto, também elevam a concentração de cálcio intracelular, o que pode reduzir a eficiência do transporte de glicose mediado por insulina ao bloquear a desfosforilação do GLUT 4, conseqüentemente conduzindo à resistência à insulina (McCarty, 2004).

Evidências de que a hiperinsulinemia também pode preceder o desenvolvimento de doença vascular foram demonstrados em diversos estudos que abordam o desenvolvimento de aterosclerose e hipertensão em modelos experimentais (Lais & Brody, 1978; Hwang *et al.*, 1987). A estimulação do crescimento das células musculares lisas vasculares e sua migração na parede do vaso sanguíneo estão estritamente associadas com a iniciação e

progressão destas patologias, sendo favorecida quando a síntese de óxido nítrico (NO) se torna reduzida, condição observada na resistência à insulina (Saward & Zahradka, 1996; LaBelle & Tulenko, 2004; González-Timón *et al.*, 2004). Assim, insulina também pode regular a resistência vascular periférica diretamente e/ou regular o sistema nervoso simpático, ambos os efeitos resultando em importantes modificações no funcionamento circulatório, causando vasodilatação, por elevar a produção de óxido nítrico (NO), diminuir a vasoconstrição mediada pela adrenalina e potencializar a vasodilatação mediada pela acetilcolina. Todas estas ações parecem proteger contra o desenvolvimento de hipertensão arterial. Mas, na condição de resistência à insulina e hiperinsulinemia compensatória estes efeitos estariam reduzidos (Ferrannini *et al.*, 1987; Bønaa & Arnesen, 1992; Baron, 1996; Steven *et al.*, 1997; Fuenmayor *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1999; Osei, 1999; Raji *et al.*, 2000). No entanto, Kimura *et al.* (2002) demonstraram que insulina inibe a resposta vasodilatadora à acetilcolina em arteríolas mesentéricas de ratos quando a síntese de NO é interrompida ou quando sua síntese está reduzida. Este efeito sugere um meio pelo qual altas concentrações plasmáticas de insulina, como ocorre em síndromes de hiperinsulinemia, podem contribuir para a progressão de doenças como hipertensão e arteriosclerose.

De Las Heras *et al.* (2003) acrescentam que também a hiperlipidemia pode conduzir a efeitos como vasoconstrição por elevar as concentrações sanguíneas de endotelina e tromboxano A₂, que são potentes fatores vasoconstritores que podem se opor aos efeitos do NO. Uma correlação entre a concentração plasmática de triglicerídeos e o nível de endotelina em pacientes com diabetes tipo 2 e dislipidemia já foi relatada, como também já foi verificado um aumento da taxa de excreção de TXA₂ em pacientes com hipercolesterolemia. Neste mesmo sentido, outra possibilidade protetora contra o

desenvolvimento de hipertensão arterial pode estar ocorrendo: na curva concentração-efeito à noradrenalina pode-se observar que as curvas em anéis com endotélio não se apresentam paralelas, o que pode indicar a presença de dois subtipos de adrenorreceptores alfa atuantes neste tecido. Estes receptores estariam se opondo em seus efeitos, de forma que enquanto um favoreceria a contração, outro promoveria a vasodilatação. Como os anéis de aorta isolados de ratos alimentados com dieta hiperlipídica apresentam uma tendência de resposta contrátil menor quando comparado ao grupo alimentado com dieta padrão, é possível que a expressão de receptores envolvidos com vasodilatação esteja aumentada, o que indicaria outro mecanismo adaptativo do organismo para evitar que o quadro hipertensivo se instale. Entretanto, há a necessidade de maior aprofundar estas investigações para certificarmos esta hipótese.

Interessantemente, as curvas concentração-efeito à insulina apresentaram um efeito vasodilatador significativamente mais pronunciado em anéis de aorta sem endotélio (estatisticamente diferente em N_s vs N_c), o que descarta o mecanismo de vasodilatação da insulina via NO e, mais importante, apresenta uma nova situação onde um relaxamento mediado pela insulina ocorreria em vasos sanguíneos que apresentam injúria endotelial, indo de encontro ao trabalho de Kimura *et al.* (2002) citado acima que, no entanto, utilizaram concentrações de insulina significativamente menores em seus estudos. Isto indica que o mecanismo relaxante dependente de NO não está ativo e que outro mecanismo, independente da via do NO pode estar envolvido nesta condição. Esta possibilidade existe, pois em condições hipertensivas este mecanismo de vasodilatação via NO já está atuando e representa um mecanismo adaptativo para abrandar o aumento da pressão arterial. Além disso, se pensarmos que os principais vasos sanguíneos responsáveis pelo controle hemodinâmico são os de pequeno calibre, certamente os efeitos mais

significativos da insulina como regulador do tônus deve ocorrer justamente nestes vasos, de forma que outras investigações neste sistema vascular devem ser realizadas para compreender melhor estes mecanismos. Kimura *et al.* (2002) acrescentam ainda que a insulina apresenta efeito inibidor na produção do EDHF (Fator Hiperpolarizante Derivado de Endotélio), diminuindo assim o relaxamento mediado por este em pequenas artérias, mas não em grandes artérias e que este efeito da insulina é especialmente eficaz em situações onde a função do NO se encontra reduzida.

Além disso, alterações na função sistólica e diastólica também já foram observadas em coelhos com hipercolesterolemia induzida por dieta (Huang *et al.*, 2004). Os autores creditaram este efeito ao enriquecimento do sarcolema do miócito com colesterol, que resulta em alterações na permeabilidade ao cálcio e/ou alterações da atividade da SERCA-2. Em nossos resultados, mostramos que ratos alimentados com dieta hiperlipídica também apresentam significativas alterações na função cardiovascular. A análise da pressão arterial demonstrou uma leve elevação da pressão arterial média, da sistólica e da diastólica comparada aos animais controle, além de significativo aumento da frequência cardíaca.

Assim, alterações na atividade do sistema nervoso simpático, tendo como indicador uma elevada frequência cardíaca ou elevada pressão arterial, podem ser favoráveis à ocorrência de arritmias com conseqüente progressão a fibrilação ventricular, uma causa comum de morte cardíaca súbita. Mecanismos adrenérgicos também podem influenciar o metabolismo lipídico e energético, pois as catecolaminas são os mais importantes hormônios que estimulam agudamente a degradação dos estoques de triglicerídeos a ácidos graxos e glicerol (Bønaa & Arnesen, 1992). A atividade nervosa simpática pode também modular o metabolismo lipoprotéico. Elevada frequência cardíaca, refletindo aumentada atividade nervosa simpática, pode desempenhar importante papel no desenvolvimento de

aterosclerose via lipídeos sanguíneos e pressão arterial, contribuindo assim para o grande número de óbitos relacionados a estes fatores (Rubattu *et al.*, 1993; Wannamethee & Shaper, 1994; Koskinen *et al.*, 1995).

Resultados obtidos em estudos prévios realizados em nosso laboratório indicam que houve diminuição na sensibilidade da resposta cronotrópica ao isoproterenol, agonista não-seletivo de β_1 -AR e β_2 -AR e à noradrenalina, agonista seletivo β_1 -AR em átrios direitos deste modelo de ratos com hiperlipidemia induzida por dieta (Miotto, 2000). De fato, Rose *et al.* (1996) estudando pacientes com falência cardíaca crônica ou com cardiomiopatia hipertrófica verificaram uma ativação anormal do SNS. Estes pacientes mostraram também uma reduzida densidade de beta adrenoceptores miocárdicos, sugerindo que *downregulation* destes receptores pode estar refletindo uma adaptação à concentração elevada de catecolaminas (Castellano & Böhm, 1997; Bünnemann *et al.*, 1999). Além disso, vários modelos animais utilizados em estudos sobre hipertensão desenvolvem hipertrofia cardíaca (Pinto *et al.*, 1998), fato também observado nos resultados deste nosso estudo.

A hipertrofia cardíaca observada em nossos resultados pode ser acompanhada de alterações na população de adrenoceptores dos cardiomiócitos. A subsensibilidade a isoprenalina e a noradrenalina observada neste modelo experimental sugere que estes apresentam alteração da resposta mediada pelo subtipo β_1 , o qual é ativado por ambos os agonistas estudados (Daaka *et al.*, 1997). Sabe-se que o β_1 -AR ativa uma via de sinalização intracelular que leva a apoptose dos cardiomiócitos. Assim, a diminuição da atividade do β_1 -AR teria um papel adaptativo, protegendo os cardiomiócitos deste efeito (Santos e Spadari-Bratfisch, 2006).

O sistema renina angiotensina também pode apresentar um significativo papel na hipertrofia cardíaca. Angiotensina II pode se fixar a seu receptor AT₁, o qual é acoplado a proteína G e predomina em tecidos de animais adultos (Ishiye *et al.*, 1995). Em miócitos cardíacos de ratos o receptor AT₁ está presente na membrana plasmática, no sarcolema, nos túbulos T e no núcleo, onde pode estimular uma via sinalizante do crescimento tecidual. Entretanto, estudos com diabéticos e hipertensos indicam que a concentração intracelular de angiotensina II se encontra elevada em cerca de 2 a 4 vezes. Interessantemente, Saward & Zahradka (1996) estudando células musculares lisas vasculares A10 em cultura sugeriram que insulina foi um componente indispensável para a hipertrofia induzida por angiotensina II.

Ishiye *et al.* (1995) indicam que angiotensina II endógena pode contribuir, via receptores AT₁, ao desenvolvimento de hipertrofia cardíaca por sobrecarga de volume e que endotelina-1 pode mediar alguns destes efeitos hipertróficos. Baker *et al.*, (2004), por outro lado, identificaram um novo mecanismo de hipertrofia cardíaca induzida por angiotensina II que não requer a interação deste hormônio com seu receptor AT₁ presente na membrana celular. Esta angiotensina II seria produzida intracelularmente e poderia estar, como alguns outros hormônios e fatores de crescimento, associando-se com a cromatina e implicando na modulação direta da expressão gênica, ou poderia conduzir a um rápido aumento na concentração de cálcio intracelular, o que induziria a um crescimento celular, como verificado em células musculares lisas vasculares após aplicação de angiotensina II.

Óxido nítrico também é efetivo em processos anti-hipertróficos e na inibição da remodelagem cardíaca (Liao *et al.*, 2004). Insulina apresenta um importante papel na liberação de NO pelos vasos sanguíneos, e as alterações observadas para este hormônio podem influenciar tal efeito. Contudo, é mais provável que a elevada concentração

plasmática de LDL observada nestes ratos alimentados com dieta hiperlipídica possa produzir aumento do estresse oxidativo por meio da peroxidação lipídica, reduzindo a concentração de NO disponível para exercer estes efeitos (Raij *et al.*, 1993; Holvoet *et al.*, 1998), além de aumentando a concentração de nitrito e nitrato. Esta condição foi comprovada por Choi (2004) que observou um aumento da concentração de nitrito e nitrato, produtos da degradação do NO, em sujeitos com alta concentração plasmática de lipídios. Adicionalmente, o fator de necrose tumoral α (TNF α), o qual é secretado pelo tecido adiposo e está intimamente relacionado à dislipidemia e à resistência à insulina, também pode induzir hipertrofia concêntrica. TNF α é um adicional indutor de apoptose de miócitos e, apesar de nós não termos verificado se ocorre apoptose nestes corações, esta condição está associada à diminuição progressiva da função ventricular e à injúria miocárdial, como múltiplos focos de fibrose (Olivetti *et al.*, 2000) em estágios avançados.

Atualmente, diversos estudos estão tentando estabelecer um modelo experimental semelhante à condição humana e, embora existam numerosos modelos animais (tanto espontâneos quanto induzidos) disponíveis para o estudo das patologias metabólicas que acometem os seres humanos, os padrões de iniciação da doença e seu desenvolvimento, na maioria destes modelos, não são exatamente análogos às condições clínicas. Isto ocorre porque há uma enorme variedade de fatores envolvidos e as observações derivadas destes modelos experimentais nem sempre são satisfatoriamente estendidas à população humana, visto a enorme heterogeneidade desta última. Apesar disto, nós iniciamos este estudo com o objetivo de desenvolver um modelo experimental que mimetizasse o mais exatamente possível a história natural dos eventos de uma doença, bem como suas características metabólicas, no ser humano.

Em suma, os dados aqui apresentados mostraram que, a partir da ingestão de uma dieta hiperlipídica por seis semanas, diversas alterações funcionais e estruturais foram induzidas, incluindo dislipidemia, a qual foi associada com hiperinsulinemia, hipertensão e hipertrofia do ventrículo esquerdo. Apesar de algumas características da síndrome plurimetabólica humana não estarem presentes neste modelo animal, as alterações descritas acima nos levam a acreditar que um período maior de ingestão da dieta hiperlipídica, ou mesmo um aumento nas proporções de lipídios da dieta, como verificado na literatura, podem conduzir definitivamente à patologia. Entretanto, nesta fase, acreditamos que as alterações observadas neste modelo podem caracterizar os parâmetros e alguns dos mecanismos iniciadores da Síndrome X. O modelo de rato descrito neste trabalho é único, tanto para o procedimento adotado para o desenvolvimento do próprio modelo, quanto para os resultados atingidos, os quais acreditamos poderem ser ampliados se o estudo for mantido por um prazo maior. Além disso, tal modelo pode ser bastante apropriado para o esclarecimento dos mecanismos desta complexa condição patogênica e para estudos farmacológicos e não-farmacológicos visando a síntese de medicamentos preventivos e terapêuticos.

CONCLUSÃO

Tendo em vista o modelo proposto para este projeto, podemos apontar três possíveis conclusões.

O fator desencadeante de todo o processo foi a dieta hiperlipídica administrada aos ratos durante seis semanas, a qual conduziu a um quadro com várias alterações metabólicas, como hiperlipidemia, elevada concentração plasmática de glicose e hiperinsulinemia.

A hiperinsulinemia decorrente da dieta hiperlipídica pode apresentar importante papel, juntamente com a dislipidemia, na progressão de condições patológicas como a hipertensão e a hipertrofia cardíaca observada nestes animais.

Os ratos tratados com a dieta hiperlipídica durante seis semanas apresentaram modificações metabólicas e cardiovasculares que indicam uma condição semelhante àquela observada na Síndrome Metabólica, sugerindo que este modelo apresenta um estágio inicial do processo patogênico.

Este protocolo experimental delineou um modelo experimental que permite verificar o progresso de diversas doenças comuns na sociedade moderna decorrentes do estilo de vida. Como consequência, permite o estudo de terapias visando o tratamento e, a prevenção destas doenças.

REFERÊNCIAS

- AGOSTO, E., CIMMINO, M., MINAIRE, Y., GELOEN, A. Short-term cold-exposure does not improve insulin sensitivity in rats. **Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol.**, 117 (2): 231-8, 1997.
- AL-DAMLUJI, S. Adrenergic mechanisms in the control of corticotrophin secretion. **J. Endocrinol.**, 119 (1): 5-14, 1988.
- ATEF, N., LAFONTAN, M.; DOUBLE, A., HELARY, C., KTORZA, A., PENICAUD, L. A specific beta 3-adrenoceptor agonist induces increased pancreatic islet blood flow and insulin secretion in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, 298 (3): 287-292, 1996.
- BAKER, K.M., CHERNIN, M.I., SCHREIBER, Y., SANGHI, S., HAIDERZAIDI, S., BOOZ, G.W., DOSTAL, D.E., KUMAR, R. Evidence of a novel intracrine mechanism in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. **Regulatory Peptides**, 120: 5-13, 2004.
- BARET, G., PEYRONNET, J., GRASSI-KASSISSE, D.M., DALMAZ, Y., WIERNSPERGER, N., GELOEN, A. Increased intraabdominal adipose tissue mass in fructose fed rats: correction by metformin. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**, 110 (6): 298-303, 2002.
- BARON, A.D. Insulin and the vasculature-old actors, new roles. **Journal of Investigative Medicine**, 44 (8): 406-412, 1996.
- BARROS, B.F., TOLEDO J.C., FRANCO, D.W., FOUNI, E., KRIEGER, M.H. A new inorganic vasodilator, *trans*-[Ru(NO)(NH₃)₄(POEt)₃](PF₆)₃: hypotensive effect of endothelium-dependent and -independent vasodilators in different hypertensive animals models. **Nitric Oxide**, 7: 50–56, 2002.
- BERGMAN, R.N., ADER, M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **TEM**, 11(9): 351-356, 2000.

- BERNE, R.M.; LEVY, M.N. **Fisiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1034 p.
- BERNSTEIN, R.M., DAVIS, B.M., OLEFSKY, J.M. and REAVEN, G.M. Hepatic insulin responsiveness in patients with endogenous hypertriglyceridaemia. **Diabetologia**, 14:149-253, 1978.
- BODEN, G. Fatty acids and insulin resistance. **Diabetes Care**, 19 (4): 394-395, 1996.
- BØNAA, K.H., ARNESEN, E. Association between heart rate and atherogenic blood lipid fractions in a population (The Tromsø Study). **Circulation**, 86: 394-405, 1992.
- BONORA, E., KIECHL, S., WILLEIT, J., OBERHOLLENZER, F., EGGER, G., TARGHER, G., ALBERICH, M., BONADONNA, R.C., MUGGEO, M. Prevalence of insulin resistance in metabolic disorders – The Bruneck study. **Diabetes**, 47: 1643-1649, 1998.
- BREHM, B.R., MEERGANS, M., AXEL, D.I., HEINLE, H., KARSCH, K.R. Downregulation of β -adrenergic receptors by low density lipoproteins and its prevention by β -adrenergic receptor antagonists. **Cardiovascular Research**, 38 (2): 522-530, 1998.
- BROWN, M.R.; FISHER, L.A. Brain peptide regulation of adrenal epinephrine secretion. **Am. J. Physiol.**, 247 (1, pt 1): E41-E46, 1984.
- BROWN, M.R. Corticotrophin-releasing factor: effects on the autonomic nervous system and visceral systems. **Fed. Proc.**, 44: 234-248, 1985.
- BÜNEMANN, M., LEE, K.B., PALS-RYLAARSDAM, R., ROSEBERRY, A.G., HOSEY, M.M. Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. **Annu. Rev. Physiol**, 61: 169-92, 1999.

- CASTELLANO, M., BÖHM, M. The cardiac β -adrenoceptor-mediated signaling pathway and its alterations in hypertensive heart disease. **Hypertension**, 29: 715-722, 1997.
- CHANG, C.J., WU, J.S., LU, F.H., LIU, I.M., CHI, T.C., CHENG, J.T. Sympathetic hyperactivity in Wistar rats with insulin-resistance. **Journal of Autonomic Nervous System**, 74: 116-119, 1998.
- CHI, T.Z., LIU, I.M., CHENG, J.T. Less of insulin desensitization in sympathetic nerve terminals from wistar rats with insulin resistance. **Journal of the Autonomic Nervous System**, 80: 80-84, 2000.
- CHOI, J.S. et al. Hypolipemic and hypoglycemic activities of *Prunus davidiana* in high fat-fed rats. **Arch. Pharm. Res.**, 14: 44-7, 1991.
- CHOI, J.W. Enhanced nitric oxide production is closely associated with serum lipid concentrations in adolescents. **Clinica Chimica Acta**, 347: 151-156, 2004.
- CRANDALL, D.L., LAI, F.M., HUGGINS, F.J., TANIKELLA, T.K., CERVONI, P. Effects of caloric restriction on cardiac reactivity and β -adrenoceptor concentration. **Am. J. Physiol.**, 244 (Heart Circ. Physiol. 13): H444-H448, 1983, 1983.
- DAAKA, Y., LUTTRELL, L.M., LEFKOWITZ, R.J. Switching of the coupling of the β_2 -adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. **Nature**, 390: 88-91, 1997.
- DANEV, S., NIKOLOVA, R., KEREKOVSKA, M., SVETOSLAVOV, S. Relationship between heart rate variability and hypercholesterolaemia. **Cent. Eur. Publ. Hlth.**, 5 (3): 143-146, 1997.

- DEFRONZO, R.A., FERRANNINI, E. Insulin resistance – A multifactorial syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. **Diabetes Care**, 14 (3): 173-194, 1991.
- DE LAS HERAS, N., CEDIEL, E., OUBIÑA, M.P., ARAGONCILLO, P., SANZ-ROSA, D., LAHERA, V., CACHOFEIRO, V. Comparison between the effects of mixed dyslipidaemia and hypercholesterolaemia on endothelial function, atherosclerotic lesions and fibrinolysis in rabbits. **Clinical Science**, 104: 357-365, 2003.
- DIGIROLAMO, M., NEWBY, D., LOVEJOY, J. Lactate production in adipose tissue: a regulated function with extra-adipose implications. **FASEB J.**, 6: 2405-2412, 1992.
- EXTON, J.H.; FRIEDMANN, N.; WONG, E.H.; BRINEAUX, J.P.; CORBIN, J.D.; PARK, C.R. Interaction of glucocorticoids with glucagon and epinephrine in the control of gluconeogenesis and glycogenolysis in liver and of lipolysis in adipose tissue. **J. Biol. Chem.**, 247 (11): 3579-3588, 1972.
- FARIAS-SILVA E., SAMPAIO-BARROS M.M., AMARAL M.E., CARNEIRO E.M., BOSCHERO A.C., GRASSI-KASSISSE D.M., SPADARI-BRATFISCH, R.C. Subsensitivity to insulin in adipocytes from rats submitted to foot-shock stress. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, 80 (8), 783-789, 2002
- FERRANNINI, M., BUZZIGOLI, G., BONADONNA, R., GIORICO, M.A., OLEGGINI, M., GRAZIADEI, L., PEDRINELLI, R., BRANDI, L. and BEVILACQUA, S. Insulin resistance in essential hypertension. **N. Engl. J.**, 317: 350-357, 1987.
- FIELD, C.J., RYAN, E.A., THOMSON, A.B.R., CLANDININ, M.T. Diet fat composition alters membrane phospholipid composition, insulin binding, and glucose metabolism in adipocytes from control and diabetic animals. **J. Biol. Chem.**, 265 (19): 11143-11150, 1990.

- FRIEDEWALD, W.T., LEVY, R.I., FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, 18: 499-502, 1972.
- FUENMAYOR, N., MOREIRA, E., CUBEDDU, L.X. Salt sensitivity is associated with insulin resistance in essential hypertension. **Am. J. Hypertension**, 4: 397-402, 1998.
- GONZÁLEZ-TIMÓN, B., GONZÁLEZ-MUÑOZ, M., ZARAGOZA, C., LAMAS, S., MELIÁN, E.M. Native and oxidized low density lipoproteins oppositely modulate the effects of insulin-like growth factor I in VSMC. **Cardiovascular Research**, 61: 247–255, 2004.
- GOTOH, M., IGUCHI, A., YATOMI, A., *et al.* Vagally mediated insulin secretion by stimulation of brain cholinergic neurons with neostigmine in bilateral adrenalectomized rats. **Brain Res.**, 493: 97-102, 1989.
- GREENSPAN, F.S., BAXTER, J.D. **Basic and clinical endocrinology**. Connecticut: Appleton & Lange, 4th ed., 1994. 811 p.
- GRUNDY, S.M., BEARN, A.G. The role of cholesterol in atherosclerosis: new therapeutic opportunities. Hanley & Belfus, Philadelphia, 261 p., 1988.
- GRUNDY, S.M. Hypertriglyceridemia, insulin resistance, and the metabolic syndrome. **Am. J. Cardiol.**, 83: 25F–29F, 1999.
- GUDBJARNASON, S., BENEDIKTSDÓTTIR, V.E. Regulation of β adrenoceptor properties and the lipid milieu in heart muscle membranes during stress. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.163/164, p.137-143, 1996.
- HAFFNER, S.M., MIETTINEN, H. Insulin resistance implications for type II diabetes mellitus and coronary heart disease. **Am. J. Med.**, 103:152–162, 1997.

- HERCHUELZ, A. Regulation des flux calciques dans les ilots des Langerhans. Bruxelles, [Tese – Univ. Libre de Bruxelles], p. 336, 1980.
- HIMMS-HAGEN, J. Sympathetic regulation of metabolism. **Pharmacol. Rev.**, 19 (3): 367-461, 1967.
- HOLVOET, P., THEILMEIER, G., SHIVALKAR, B., FLAMENG, W., COLLEN, D. LDL hypercholesterolemia is associated with accumulation of oxidized LDL, atherosclerotic plaque growth, and compensatory vessel enlargement in coronary arteries of miniature pigs. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 18: 415-422, 1998.
- HOWARD, B.V., HANNAH, J.S. Dietary fat intake and diabetes. **Current Opinion in Endocrinology & Diabetes**, 2: 530-537, 1995.
- HOWARD, B.V. Insulin resistance and lipid metabolism. **Am. J. Cardiol.**, 84: 28J-32J, 1999.
- HSUE, W.A., LAW, R.E. Insulin signaling in the arterial wall. **Am. J. Cardiol.**, 84: 21J-24J, 1999.
- HUANG, Y., WALKER, K.E., HANLEY, F., NARULA, J., HOUSER, S.R., TULENKO, T.N. Cardiac systolic and diastolic dysfunction after a cholesterol-rich diet. **Circulation**, 109: 97-102, 2004.
- HUE, L.; FELIU, J.E.; HERS, H.G. Control of gluconeogenesis and of enzymes of glycogen metabolism in isolated rat hepatocytes. A parallel study of the effect of phenylephrine and of glucagon. **Biochem. J.**, 176 (3): 791-797, 1978.
- ISHIYE, M., UMEMURA, K., UEMATSU, T., NAKASHIMA, M. Angiotensin AT₁ receptor-mediated attenuation of cardiac hypertrophy due to volume overload: involvement of endothelin. **European Journal of Pharmacology**, 280: 11-17, 1995.

- JIAO, S., COLE, T.G., KITCHENS, R.T. Genetics heterogeneity of lipoproteins in inbred strains of mice: analysis by gel-permeation chromatography. **Metabolism**, 39: 155-160, 1990.
- KARHAPAÄ, P., VOUTILAINEN, E., KOVANEN, P.T., LAAKSO, M. Insulin resistance in familial and nonfamilial hypercholesterolemia. **Arteriosclerosis and Thrombosis**, 13: 41-47, 1993.
- KAUFMAN, L.N., PETERSON, M.M., SMITH, S.M. Hypertension and sympathetic hyperactivity induced in rats by high-fat or glucose diets. **Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab)**, E95-E100, 1991.
- KAWAMURA, T. et al. Regulation of skeletal muscle peroxisome proliferators-activated receptor γ expression by exercise and angiotensine-converting enzyme inhibition in fructose-fed hypertensive rats. **Hypertens. Res.**, 27: 61-70, 2004.
- KHAN, S., CLEANTHIS, M., SMOUT, J., FLATHER, M., STANSBY, G. Life-style modification in peripheral arterial disease. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, 29: 2-9, 2005.
- KIMURA, N. et al. Insulin inhibits acetylcholine responses in rat isolated mesenteric arteries via a non-nitric oxide nonprostanoid pathway. **Hypertension**, 39: 35-40, 2002.
- KNEER, N.M. & LARDY, H.A. Regulation of gluconeogenesis by norepinephrine, vasopressin, and angiotensin II: a comparative study in the absence and presence of extracellular Ca^{2+} . **Arch. Biochem. Biophys.**, 225 (1): 187-195, 1983.
- KOSKINEN, P., KUPARI, M., VIROLAINEN, J., STJERNVALL, J., JOLKKONEN, J., TUOMILEHTO, J., TIKKANEN, M.J. Heart rate and blood pressure variability and baroreflex sensitivity in hypercholesterolaemia. **Clin. Physiol.**, 15: 483-489, 1995.

- KUSTERER, K., POHL, T., FORTMEYER, H.P., MARZ, W., SCHARNAGL, H., OLDENBURG, A., ANGERMULLER, S., FLEMING, I., USADEL, K.H., BUSSE, R. Chronic selective hypertriglyceridemia impairs endothelium-dependent vasodilatation in rats. **Cardiovascular Research**, 42: 783–793, 1999.
- KUSUNOKI, M., TSUTSUMI, K., HARA, T., OGAWA, H., NAKAMURA, T., MIYATA, T., SAKAKIBARA, F., FUKUZAWA, Y., SUGA, T., KAKUMU, S., NAKAYA, Y. Correlation Between Lipid and Glycogen Contents in Liver and Insulin Resistance in High-Fat-Fed Rats Treated With the Lipoprotein Lipase Activator NO-1886. **Metabolism**, 51 (6): 792-795, 2002.
- LABELLE, E.F., TULENKO, T.N. LDL, IGF-1, and VSMC apoptosis: linking atherogenesis to plaque rupture in vulnerable lesions. **Cardiovascular Research**, 61: 204–205, 2004.
- LACY, P.E., KOSTIANOVSKY, M. Method for isolation of the intact islet of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, 16: 35-39, 1967.
- LAIS, L.T., BRODY, M.J. Vasoconstrictor hyperresponsiveness: An early pathogenic mechanism in the spontaneously hypertensive rat. **European Journal of Pharmacology**, 47 (2): 177-189, 1978.
- LIAO, Y. *et al.* Celiprolol, A vasodilatory beta-blocker, inhibits pressure overload–induced cardiac hypertrophy and prevents the transition to heart failure via nitric oxide–dependent mechanisms in mice. **Circulation**, 110: 692-699, 2004.
- LICHTENSTEIN, A.H., SCHWAB, U.S. Relationship of dietary fat to glucose metabolism. **Atherosclerosis**, 150:227–243, 2000.
- LO, S., RUSSELL, J.C., TAYLOR, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples, **J. Appl. Physiol.**, 28: 234-236, 1970.

- LURIE, K.G., CHIN, J.H., HOFFMAN, B.B. Decreased membrane fluidity and β -adrenergic responsiveness in the atherosclerotic quail. **Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol. 18)**, 249: H380-H385, 1985.
- MA, X.L., YUE, T.L., LOPEZ, B.L., BARONE, F.C., CHRISTOPHER, T.A., RUFFOLO, R.R., FEUERSTEIN, G.Z. Carvelidol, a new beta-adrenoceptor blocker and free radical scavenger, attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in hypercholesterolemic rabbits. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 277 (1): 128-136, 1996.
- MALMINIEMI, K., LAHTELA, J.T., HUUPPONEN, R. Effects of celiprolol on insulin sensitivity and glucose tolerance in dyslipidemic hypertension. **International Journal of Clinical Pharmacol. and Therapeutics**, 32 (3): 156-163, 1995.
- MARINETTI, G.V. Disorders of lipid metabolism. Plenum Press, New York, 226 pp, 1990.
- MASUCCI-MAGOULAS, L., PLUMP, A., JIANG, X.C., WALSH, A., BRESLOW, J.L., TALL, A.R. Profound induction of hepatic CETP transgenic expression in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor knock out mice. **J. Clin. Invest.**, 97: 154-161, 1996.
- McCARTY, M.F. Elevated sympathetic activity may promote insulin resistance syndrome by activating alpha-1 adrenergic receptors on adipocytes. **Medical Hypotheses**, 62: 830-838, 2004.
- McCARTY, M.F. De novo synthesis of diacylglycerol in endothelium may mediate the association between PAI-1 and the insulin resistance syndrome. **Medical Hypotheses**. *Artigo em impressão.*

- MIOTTO, A.M., WOLF-NUNES, V., GRASSI-KASSISSE, D.M., SPADARI-BRATFISCH, R.C. Effects of chronic administration of Croton cajucara Benth. Infuse to normo and hypercholesterolemic rats on the right atria sensitivity catecholamines. Livro de Resumos, **XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, p.274, 2000.
- MIOTTO, A.M. Perfil lipídico e sensibilidade adrenérgica em átrio direito de ratos normo e hipercolesterolêmicos tratados ou não com infuso das cascas de Croton cajucara Benth. **Dissertação Mestrado** (Ciências Biológicas (Fisiologia) - Universidade Estadual de Campinas, 2001.
- MOREIRA, M. F., DIAS, R. G., MIOTTO, A. M., SPADARI-BRATFISCH, R. C., GRASSI-KASSISSE, D. M. Sensibilidade adrenérgica de átrios direitos isolados de ratos com dieta normolipídica ou hiperlipídica, sedentários ou submetidos ao treinamento físico. Livro de Resumos, **XXIV Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo (Socesp)**, Campos do Jordão, p. 93, 2003.
- MOKDAD, A.H., FORD, E.S., BOWMAN, B.A., NELSON, D.E., ENGELGAU, M.M, VINICOR, F., MARKS, J.S. Diabetes trends in the U.S.: 1990-1998. **Diabetes Care**, 23 (9): 1278-1283, 2000.
- MOKLER, C.M., ABDEL-AZIZ, M.T., HERIC, E. Effects of hypercholesterolemia on beta adrenoceptors in the rabbit heart. **Drug-Nutrient Interactions**, 3: 165-172, 1985.
- MOLLER, D.E. Potential Role of TNF- α in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. **TEM**, 11 (6): 212-217, 2000.
- NOMURA, S. WATANABE, M.; UKEI, N.; NAKAZAWA, T. Stress and beta-adrenergic receptor binding in the rat's brain. **Brain Res.**, 224 (1): 119-203, 1981.
- NONOGAKI, K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. **Diabetologia**, 43: 533-549, 2000.

- OLIVETTI, G., CIGOLA, E., MAESTRI, R., LAGRASTA, C., CORRADI, D., QUAINI, F. Recent advances in cardiac hypertrophy. **Cardio Source**, 45 (1): 68-75, 2000.
- ORGANIZAÇÃO PAN AMERICANA DA SAÚDE – Escritório Regional para as Américas da Organização Mundial da Saúde (OMS). <http://www.opas.org.br/opas.cfm>
Acesso 11 de setembro de 2006.
- OSEI, K. Insulin resistance and systemic hypertension. **Am. J. Cardiol.**, 84: 33J–36J, 1999.
- PAN, D.A., LILLIOJA, S., KRIKETOS, A.D., MILNER, M.R., BAUR, L.A., BOGARDUS, C., JENKINS, A.B., STORLIEN, L.H. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. **Diabetes**, 46: 983–988, 1997.
- PATTEN, G., RINALDI, J.A., McMURCHIE, E.J. Effects of dietary eicosapentaenoate (20:5 n-3) on cardiac beta-adrenergic receptor activity in the marmoset monkey. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 162 (2): 686-693, 1989.
- PILKIS, S.J.; EL-MAGHRABI, M.R.; CLAUS, T.H. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. **Annu. Rev. Biochem.**, 57: 755-783, 1988.
- PINTO, Y.M., PAUL, M., GANTEN, D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. **Am. J. Cardiol.**, 39 (1): 77-88, 1998.
- POPOVIC, V., POPOVIC, P. Permanent cannulation of aorta and vena cava in rats and ground squirrels. **J. Appl. Physiol.**, 15: 727-728, 1960.
- PORTE JR., D. Sympathetic regulation of insulin secretion. Its relation to diabetes mellitus. **Arch. Intern. Med.**, 123 (3): 252-260, 1969.
- PORTE JR., D.; ROBERTSON, R.P. Control of insulin secretion by catecholamines, stress, and the sympathetic nervous system. **Fed. Proc.**, 32 (7): 1792-1796, 1973.

- PROIETTO, J., FILIPPIS, A., NAKHLA, C., CLARK, S. Nutrient-induced insulin resistance. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 151: 143–149, 1999.
- RAIJ, L., NAGY, J., COFFEE, K., DEMASTER, E.G. Hypercholesterolemia promotes endothelial dysfunction in vitamin E and selenium-deficient rats. **Hypertension**, 22; 56-61, 1993.
- RAJI, A., WILLIAMS, G.H., XAVIER, J., HOPKINS, P.N., HUNT, S.C., HOLLENBERG, N.K., SEELY, E.W. Insulin resistance is affected by sodium intake in nonmodulating subset of essential hypertension. **AJH**, 13 (4) part 2, 2000.
- RANDLE, P.J., GARLAND, P.B., HALES, C.N., NEWSHOLME, E.A. The glucose-fatty acid cycle. Its role in insulin sensitivity and metabolic disturbances in diabetes mellitus. **Lancet**, 1: 785-789, 1963.
- REAVEN, G.M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, 37: 1595-1607, 1988.
- RETANA-MARQUEZ, S.; BONILLA-JAIME, H.; VAZQUEZ-PALACIOS, G.; DOMINGUEZ-SALAZAR, E.; MARTINEZ-GARCIA, R.; VELAZQUEZ-MOCTEZUMA, J. Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. **Psiconeuroendocrinol.**, 28 (2): 207-227, 2003.
- ROBERTS, C.K., BARNARD, R.J. Effects of exercise and diet on chronic disease. **J. Appl. Physiol.**, 98:3–30, 2005.
- ROSE, S.D., BOYD, H., RHODES, C.G., KASKI, J.C., CAMICI, P.G. Myocardial beta-adrenoceptor density and plasma catecholamines in syndrome X. **Am. J. Cardiol.**, 78: 37-42, 1996.

RUBATTU, S., VOLPE, M., ENEA, I., RUSSO, R., ROMANO, M., TRIMARCO, B.

Influence of hypercholesterolemia on adrenal steroid metabolism and eletrolyte balance in spontaneously hypertensive rats. **Endocrinology**, 133 (5): 2015-2021, 1993.

SAMPAIO-BARROS, M.M., FARIAS-SILVA, E., GRASSI-KASSISSE, D.M.,

SPADARI-BRATFISCH, R.C. Effect of swimming session duration and repetition on metabolic markers in rats. **Stress**, 6 (2): 127-132, 2003.

SANTOS, I.N., SPADARI-BRATFISCH, R.C. Stress and cardiac beta adrenoceptors.

Stress, 9 (2): 1-16, 2006.

SAWARD, L., ZAHRAKKA, P. Insulin is required for angiotensin II-mediated

hypertrophy of smooth muscle cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 122: 93-100, 1996.

SCOPACASA, B.S. Efeito do tratamento com colchicina na hipertrofia cardíaca por

sobrecarga pressora em ratos. **Dissertação Mestrado** Ciências Médicas (Clínica Médica) - Universidade Estadual de Campinas, 2002.

SCOTT, A.M.; ATWATER, I.; ROJAS, E. A method for the simultaneous measurement of

insulin release and β -cell membrane potential in single mouse islet of Langerhans. **Diabetologia**, 21: 470-475, 1981.

SRINIVASAN, K.; VISWANAD, B.; ASRAT, L.; KAUL, C.L.; RAMARAO, P.

Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. **Pharmacological Research**, 52: 313–320, 2005.

STELMACH, W., KACZMARCZYK-CHAŁAS, K., BIELECKI, W., DRYGAS, W. How

education, income, control over life and life style contribute to risk factors for

- cardiovascular disease among adults in a post-communist country. **Public Health**, xx: 1–11, 2005.
- STEVEN, M., HAFFNER, M.D., MIETTINEN, M.D. Insulin resistance implications for type II diabetes mellitus and coronary heart disease. **Am. J. Med.**, 103: 152–162, 1997.
- STROSBERG, A.D. Structural and functional diversity of β -adrenergic receptors. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 757: 253-260, 1995.
- VERAGO, J.L.; GRASSI-KASSISSE, D.M.; SPADARI-BRATFISCH, R.C. Metabolic markers following beta-adrenoceptor agonist infusion in footshock-stressed rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 34 (9): 1197-1207, 2001.
- VESTERGAARD, H., SKØTT, P., STEFFENSEN, R., WROBLESKI, H., PEDERSEN, O., KASTRUP, J. Insulina-Resistant Glucose Metabolism in Patients With Microvascular Angina-Syndrome X. **Metabolism**, 44 (7): 876-882, 1995.
- UPTON, R., WINDOWSONS, P.S., ISHII, S., et al. Improved metabolic status and insulin sensitivity in obese fatty (fa/fa) Zucker rats and Zucker diabetic fatty (ZDF) rats treated with thiazolidinedione, MCC-555. **Br. J. Pharmacol.**, 125: 1708-1214, 1998.
- VIDAL, B.C., SCHLÜTER, G., MOORE, G.W. Cell nucleospattern recognition: influence of staining. **Acta Cytologica**, 17 (6): 510-512, 1973.
- VISAVADIYA, N.P. & NARASIMHACHARYA A.V. Hypocholesteremic and antioxidant effects of *Withania somnifera* (Dunal) in hypercholesteremic rats. **Phytomedicine**, 2006 *in press*
- WALD, N.J., LAW, M.R. Serum cholesterol and ischaemic heart disease. **Atherosclerosis**, 118 (Suppl.): S1-S5, 1995.

- WANNAMETHEE, G., SHAPER, A.G. The association between heart rate and blood pressure, blood lipids and other cardiovascular risk factors. **Journal of Cardiovascular Risk**, 1: 223-230, 1994.
- WATT, M.J.; HOWLETT, K.F.; FEBBRAIO, M.A.; SPRIET, L.L.; HARGREAVES, M. Adrenaline increases skeletal muscle glycogenolysis, pyruvate dehydrogenase activation and carbohydrate oxidation during moderate exercise in humans. **J. Physiol.**, 534 (1): 269-278, 2001.
- WOLF-NUNES, V., MIOTTO, A.M., FARIAS-SILVA, E., GRASSI-KASSISSE, D.M., SPADARI-BRATFISCH, R.C. Plasmatic levels of cholesterol, triglycerides and glucose of normo- and hypercholesterolemic rats treated with Croton cajucara Benth In: **XVI Latinamerican Congress of Pharmacology, XXXII Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, II Iberoamerican Congress of Pharmacology, VII Interamerican congress of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2000, São Paulo/SP. XVI Latinamericana Congress of Pharmacology, XXXII Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, II Iberoamerican Congress of Pharmacology, VII Interamerican congress of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2000.**
- WOLF-NUNES, V. Efeito do tratamento com infuso de Croton cajucara Benth em ratos wistar jovens e adultos normo- ou hiperlipidêmicos. **Tese de Doutorado.** Biologia Funcional e Molecular, área de Fisiologia. Instituto de Biologia-UNICAMP, 2004.
- YOREK, M.A.; RUFO JR., G.A.; RAY, P.D. Gluconeogenesis in rabbit liver. III. The influences of glucagon, epinephrine, alpha- and beta-adrenergic agents on gluconeogenesis in isolated hepatocytes. **Biochim. Biophys. Acta**, 632 (4): 517-526, 1980.

YOSHIDA, T. The antidiabetic beta-3-adrenoceptor agonist BRL26830^A works by release of endogenous insulin. **Am. J. Clin. Nutr.**, 55 (suppl 1): 237S-241S, 1992.

ZANICHELLI P.G., MIOTTO A.M., ESTRELA H.F., SOARES F.R., GRASSI-KASSISSE D.M., SPADARI-BRATFISCH R.C., CASTELLANO E.E., RONCAROLI F., PARISE A.R., OLABE J.A., DE BRITO A.R., FRANCO D.W. The [Ru(Hedta)NO](0.1-) system: structure, chemical reactivity and biological assays. **J. Inorg. Biochem.**, 98 (11): 1921-32, 2004.

Elsevier Editorial System(tm) for Nutrition Research

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Cardiovascular Alterations in Rat Model High-Fat Diet-Fed

Article Type: Research Article

Corresponding Author: Dr Dora Grassi-Kassisse,

Corresponding Author's Institution: University of Campinas

First Author: Alexandre M Miotto, student

Order of Authors: Alexandre M Miotto, student; Valéria Wolf-Nunes, PhD; Marta H Krieger, PhD; P Fonseca, PhD; Kleber G Frankini, PhD; Regina C Spadari-Bratfisch, PhD; Dora Grassi-Kassisse

04 April 2006

Editorial Office

Nutrition Research, Lipid Chemistry & Molecular Biology Laboratory, 745

Agriculture Mall Drive, Purdue University, West Lafayette, IN 47907-2009, USA;

Tel.: (765) 496-7849;

Fax: (765) 494-7953;

E-mail: ntr@purdue.edu.

Dear Profa. Angela Ranalli

Managing Editor

Please find enclosed three copies of the manuscript entitled “*Cardiovascular Alterations in Rat Model High-Fat Diet-Fed*” by Alexandre Marcucci Miotto, V. Wolf-Nunes, M.H. Krieger, P. Fonseca, K. Franchini, R.C. Spadari-Bratfisch & D.M. Grassi-Kassisse, that we would like to submit for publication in the *Nutrition Research*.

Please, find also enclosed the statement duly signed by all authors.

I hope this manuscript is acceptable for publication.

Yours sincerely

D.M. Grassi-Kassisse, PhD

Departamento de Fisiologia e Biofísica

Instituto de Biologia

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

PO BOX 6109

13083-970 – Campinas – SP

Brasil

Fax: 55-02119-3788-6185

Email: doramgk@unicamp.br

Cardiovascular Alterations in Rat Model High-Fat Diet-Fed

Miotto, AM¹; Wolf-Nunes, V¹; Krieger, MH¹; Fonseca, P²; Franchini, K G²; Spadari-Bratfisch,
R C¹; Grassi-Kassisse, DM^{1*}

¹ Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biology; State University of Campinas
(Unicamp), Campinas, SP, Brazil.

² Department of Internal Medicine, School of Medicine, State University of Campinas (Unicamp),
Campinas, SP, Brazil.

* Author for correspondence

D.M. Grassi-Kassisse

Laboratório de Estudo de Estresse

Departamento de Fisiologia e Biofísica

Instituto de Biologia

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

email: doramgk@unicamp.br

telephone: 55 (19) 3788 6186 or 3788 6390, fax: 55 (19) 3788 6185

20

21 **ABSTRACT**

22 Several diseases, such as dislipidemia, hyperinsulinemia and type 2 diabetes mellitus,
23 hypertension, atherosclerosis, cardiovascular diseases, seem to be decurrent of the modern life style,
24 mainly verified in the rich occidental countries. These disorders incidence, before prevalent in the
25 elderly are more and more frequent and became now epidemic by affecting people of all ages. The
26 diet is a greater contributor for these abnormalities. In this study we fed rats with a high fat-
27 cholesterol diet (HFD) for six weeks to induce a hyperlipidaemia and develop a rat model that
28 replicate the natural history and metabolic characteristics of human disease. The results showed a
29 parallel development of hiperinsulinemia with euglycemic levels at fasting, mild hypertension and
30 ventricular cardiac hypertrophy after the time of diet administration. We conclude that there was
31 hazardous metabolic and cardiovascular alterations and all of them were triggered by a high fat-
32 cholesterol diet administered for rats in a very short time, which may characterize the begun of
33 plurimetabolic syndrome. Besides, this rat serves as an alternative model for this pathology, to
34 investigate it initiation and suitable for testing agents for the treatment.

35

36 **Key words:** hyperlipidaemia, hypertension, hyperinsulinemia, ventricular hypertrophy, rats

1-INTRODUCTION

Several disorders associated with the insulin and lipid metabolism, such as hyperinsulinemia, type 2 diabetes and dyslipidemias are characterized by high plasma concentrations of triglycerides and LDL, associated with reduced concentrations of HDL ^[1,2,3,4]. Obesity, atherosclerosis and hypertension when associated in a single patient consist of a clustering of metabolic risk factors known as the Syndrome X or metabolic syndrome.

Those disorders seem to be decurrent of the modern occidental way of life. Some conditions mainly verified in the occidental rich countries, as the social life style including a tendency to eat high-fat foods, sedentarism and rush's life contribute to the high incidence of those disease in people of almost all ages, mainly active workers ^[5,6,7].

The source of this complex syndrome is not yet clear so that an important question that remains is: what disorder trigger the syndrome X? A close relationship has been pointed out between this syndrome, insulin resistance ^[8,9] and the diet ^[4,5], with the high fat diets leading to the syndrome.

Although there exist a number of animal models (genetic-spontaneous as well as induce) available for the study of the severael pathologies, the pattern of disease initiation and development in most of them do not appear to be closely analogous to clinical situation in humans. Thus, we initiate this study with the objective of developing a suitable rat model that would closely mimic the natural history of the disease events as well as metabolic features as observed in human disease by fed rats with a high-fat-cholesterol diet (HFD) during six weeks in order to analyze the cardiovascular and metabolic profile of them and characterize the early stages of the metabolic syndrome.

2-METHODS

2.1-Animals. Male Wistar rats weighting 150 g at the beginning of the experiment were used. The animals were maintained in a temperature-controlled room ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), on a 12 h light-dark cycle (lights on at 6:30 a.m.). The experiments were performed in accordance with the principles for the use of animals in research and education adopted by COBEA (Brazilian College for Animal Experimentation) under number 226-1.

2.2-Treatments. The rats were fed *ad libitum*, for six weeks, either standard laboratory chow (4% fat and 0% cholesterol; Labina-Purina, Brazil) characterizing the normolipidemic pellet diet group (ND) or a high fat-cholesterol diet containing 15% cocoa butter fat, 1.25% cholesterol and 0.5% cholic acid constituting the hyperlipidemic group (HFD) ^[10].

2.3-Blood Vessel Catheterization. The rats were anesthetized with xylazine (50 mg/kg body weight, i.m.) and ketamine hydrochloride (0.01 mg/kg body wt, i.m.), and the left carotid artery was catheterized with a polyethylene tubing (PE 20), siliconized and filled with 5 mM sodium citrate. This catheter was connected to a PE 50 tubing (25 cm long, filled with 0.9 % NaCl), exteriorized in the dorsal interscapular region where it was fixed to the animal's skin ^[11]. This method allowed the collection of blood samples from unanaesthetized, undisturbed, freely moving rats. All the rats were allowed 48 hours to recover of the surgery in individual cages before experiments were carried out.

2.4-Arterial Blood Pressure Monitoring. After the complete animal recovery of the surgery, the catheterized rats were maintained conscious, unrestrained in its on cage, in a silent room. Blood pressure was recorded on a beat-to-beat base and sampled at 1500 Hz using a pressure transducer (Gould-Strain Gauge), connected to a preamplifier (General Purpose Amplifier, Stemtech Inc.) attached to the intraarterial catheter. The measurements were acquired in a computer for posterior analysis with WINDAQ-PRO Data Acquisition software (DI220 AT CODAS data acquisition

system, DataQ Instruments Co). The systolic, diastolic, and mean arterial pressures (MAP), and the heart rate (HR, peak-to-peak counting) in the basal condition were calculated using the software Advanced CODAS.

2.5-Blood Samples. Blood samples were collected through the catheter after an overnight fasting. Total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides (TG) and glucose concentrations were determined in the serum, colorimetrically, using commercial diagnostic kits (Laborlab; Barueri, SP, Brazil). An indirect method was used to determine serum LDL- and VLDL- cholesterol ^[12]. Free fatty acids (FFA) were also colorimetrically determined in the serum using commercial diagnostic kits (Wako Chemicals GmbH; Neuss, Germany). Insulin was measured by radioimmunoassay (RIA) as previously described ^[13]. The atherogenic index (AI) is a measure to indicate the prone of the organism to develop atherosclerosis and was determined as follows: $[(\text{total cholesterol} - \text{HDL}) / \text{HDL}]$.

2.6-Histological Analysis. The rats were weighted and then sacrificed. Samples of the cardiac tissue were removed for histological analysis to verify the ventricular hypertrophy. The ventricle was washed in physiological solution, weighted and immediately put in a bottle containing formaldeide. The ventricle slices were dehydrated in alcohol with crescent concentrations (70% up to the absolute), following the diafanization in xilol, Bouin immersion and inclusion in paraffin (58 - 60°C). The blocks were cut at 5 μm of thickness and stained with Masson trichrome. The chamber diameter, as well as the area and the ventricular wall thickness were determined with the software Scion Image (NIH Image software). The extra cellular perivascular matrix was analyzed by scanning microphotometry.

2.7-Statistical analysis. The results are presented as means $\pm$ SEM and were compared using Student's *t* test. Differences were considered significant at $P \leq 0.05$.

3-RESULTS

Serum Lipid Parameters. The high fat-CHO diet feeding during six weeks significantly increased the rats serum levels of total cholesterol, LDL-, VLDL-cholesterol and triglycerides (Table 1). No significant difference was observed in the HDL-cholesterol serum levels. In addition, in the HFD rats, the atherogenic index (AI) was higher than the ND rats (Table 1).

Insulin and Glucose Serum Levels. The glucose serum levels were not altered, whereas the insulin plasma levels were significantly higher in HFD rats compared to rats fed a normolipidemic rats (Table 2).

Arterial Blood Pressure and Heart Rate. The MAP, the systolic and diastolic blood pressure as well as the heart rate were significantly higher in HFD rats compared to control rats (Table 3).

Histological Analysis. The body weight did not differ between groups, but mass of left ventricle was significantly greater in the HFD rats. The ventricular mass index did not show this significance, but it was observed for the left ventricle wall thickness ($p<0.0001$), internal diameter ($p<0.0001$) and the ratio between the wall thickness and internal diameter ($p<0.0001$). The left ventricle chamber area, in contrast, did not show any modification (Table 4). The morphological alterations are shown in the Figure 1. The row A shows representative images of whole-heart cross section at the half size of the organ obtained by microscopic analysis and row B show the perivascular fibrosis (Masson trichrome stain; scar = 5 μ m; magnification 40x).

4-DISCUSSION

Epidemiological and experimental studies have confirmed that primary (genetics) and secondary (hormonal and/or metabolic alterations resulting from environmental factors) dyslipidemia are highly atherogenic, and are major risk factors for atherosclerosis and coronary artery disease^[14,15,16,17]. This study was initiated with the objective of developing an ideal model for plurimetabolic syndrome that would closely reflect the natural history and metabolic characteristics of human disease. The results of the present study show that after six weeks of feeding with a high fat-CHO diet, the rats presented dyslipidemia associated with hyperinsulinemia and mild hypertension. The dyslipidemia was characterized by high serum levels of triglycerides, total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) and very low-density lipoprotein (VLDL). We did not verify the presence of atherosclerosis, but the atherogenicity, stipulated by atherogenic index, was significantly higher in the HFD rats compared to control rats. The serum levels of high-density lipoprotein (HDL) or FFA were not altered by the diet.

The high lipid levels may be a factor triggering other metabolic alterations. The glucose-fatty acid or Randle's cycle give evidence of that high levels of triglycerides due excess fat intake could constitute a source of increased fatty acid availability, which is preferential for oxidation and reduce the glucose uptake or utilizations in skeletal muscle leading to compensatory^[18]. It has also been proposed that the intracellular accumulation of triglycerides^[19] increase glucose production and precedes the effect of high fat on peripheral insulin action^[20,21].

The excess of nutrients supply, mostly glucose and fat, may cause insulin resistance in the muscle and adipose tissue, as well as impaired suppression of endogenous glucose production. Experimental animal models, fed with high fat diets showed impaired glucose tolerance, associated with lower basal and insulin-stimulated glucose metabolism^[8]. The results presented here have

shown that the HFD rats were hyperinsulinemic and euglycaemic, what probably indicates impaired glucose tolerance. Impaired insulin binding and/or glucose transport have been related to changes in the fatty acid composition of the cell plasma membrane induced by dietary fat. Saturated fat, that was present in the high fat-CHO diet, appears to be more deleterious with respect to fat-induced insulin insensitivity than monounsaturated and polyunsaturated fat ^[9]. The 2-deoxy-glucose uptake by adipocytes as well as the euglycemic-hyperinsulinemic clamp are being evaluated in our laboratory to confirm this condition in this experimental model.

Rabbits presenting diet-induced hypercholesterolemia have impaired systolic and diastolic function due to cholesterol enrichment of the cardiac sarcolemmal plasma membranes and alterations in the calcium permeability and/or SERCA-2 activity ^[17]. The HFD rats also showed significantly higher heart rate and mean arterial blood pressure, with a mild but significant increase of systolic and diastolic blood pressure compared to the control rats. Higher heart rate is an indicator of SNS overactivity ^[16,22] and it is accepted that the sympathetic nervous system (SNS) activity increases along with calories intake ^[21,23,24]. The high plasma insulin levels being the link between the nutrients absorption and the sympathetic drive. The higher heart rate associated with dyslipidemia play an important role in the genesis of pathological conditions such as hypertension and atherosclerosis and might trigger adaptive processes. Indeed, Rose et al. ^[25] studying patients with chronic heart failure or hypertrophic cardiomyopathy have confirmed abnormal activation of the SNS, along with reduced density of myocardial beta adrenoceptors (β -AR) ^[26,27]. Besides, was already propose the β_2 -AR mediated G-protein switching to active MAP kinase, which play an important role in the hypertrophy by induce protein synthesis ^[28]. Interestingly, in this rat model was observed a subsensitivity to the chronotropic effect of β_1 -AR agonists in isolated atrium (unpublished data).

Insulin resistance and the accompanying hyperinsulinemia have also been reported to play an important role in the pathophysiology of essential hypertension, dyslipidemia and arteriosclerosis [1,29,30,31]. Insulin has been suggested to regulate the peripheral vascular resistance inducing vasoconstriction by activating the SNS. In the insulin resistance state the sympathetic nerve terminals are not significantly affected so that the sympathetic stimulus is continuous [32]. On the other hand, insulin enhances nitric oxide (NO) synthesis [33,34], reducing the adrenergic-mediated vasoconstriction, and potentiating the acetylcholine-mediated vasodilation in limb vessels. These actions appear to protect against the development of arterial hypertension. However, in the insulin resistance condition, those insulin effects are impaired [22,30,31,35], leading to atherosclerosis as well as hypertension. Furthermore, stimulation of smooth muscle cell growth and migration within the vessel wall is closely associated with the initiation and progression of those processes [36,37] where the NO synthesis is reduced. Evidence that hyperinsulinemia may precede the development of vascular disease has already been provided in several studies [38]. Moreover, high triacylglycerol and cholesterol plasma levels have been associated with enhanced levels of endothelin and thromboxane A₂, potent vasoconstrictor factors which can counteract the effect of NO [39]. However, we available the adrenergic agonists in rings thoracic aorta of rats fed with hiperlipidic diet but did not found alterations (data not shown).

Nitric oxide has been demonstrated to be effective in antihypertrophy and inhibiting cardiac remodeling [40]. However, the high LDL plasma levels observed in the HFD rats could promote an increase of oxidative stress through lipid peroxidation, reducing the NO availability [41,42] and increasing nitrite and nitrate concentration [43]. Moreover, factors such as tumor necrosis factor α (TNF α), which is secreted by the adipose tissue and it is a contributing factor in insulin resistance and dyslipidemia [44], is also an additional inducer of myocyte apoptosis. Despite we did not verify apoptosis in these hearts, this condition is associated to the progressive decrease in the ventricular

function or myocardial injury, such as the concentric hypertrophy due a pressure overload, here demonstrated. The extra cellular perivascular matrix was analyzed by scanning microphotometry and did not show differences between groups (data not shown), suggesting that the heart muscular tissue is increase in the hiperlipidemic group promoting the concentric hypertrophy verified, which may be decurrent by hyperinsulinemia action ^[45,46] inducing the growth of muscular tissue or, with the hypertriglyceridemia, promoting a large impact on arterial stiffness and playing an important role in the early pathophysiology of macrovascular disease, particularly hypertension and atherosclerosis ^[30,47] and consequent overload pressure, as observed.

Concluding, the data presented here show that a high fat diet intake for six weeks induced dyslipidemia associated with hyperinsulinemia, hypertension and left ventricle hypertrophy. Those alterations might characterize the trigger mechanisms of the Syndrome X and render this rat model unique in so far as the approach adopted towards the development. So, based on the foregoing observations, an appreciation of the current animal model can be as compared with the other literature models which requires genetic manipulations or high dose of drug to induce the pathologic condition. Also, this model is not expensive and might be useful to elucidate the mechanisms of this complex pathologic condition and also suitable for pharmacological screening.

215

216 **5-ACKNOWLEDGMENTS**

217 This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
 218 (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp).

219

220 **6-REFERENCES**

221

222 [1] DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance – A multifactorial syndrome responsible for
 223 NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease.
 224 Diabetes Care 1991;14:173-194.

225 [2] Kaarhapaä P, Voutilainen E, Kovanen PT, Laakso M. Insulin resistance in familial and
 226 nonfamilial hypercholesterolemia. Arteriosclerosis and Thrombosis 1993;13:41-47.

227 [3] Howard BV; Hannah JS. Dietary fat intake and diabetes. Current Opinion in Endocrinology &
 228 Diabetes 1995;2:530-537.

229 [4] Grundy SM. Hypertriglyceridemia, Insulin Resistance, and the Metabolic Syndrome. Am J
 230 Cardiol 1999;83:25F–29F

231 [5] Roberts CK, Barnard RJ. Effects of exercise and diet on chronic disease. J Appl Physiol
 232 2005;98:3–30.

233 [6] Stelmach W, Kaczmarczyk-Chałas K, Bielecki W, Drygas W. How education, income, control
 234 over life and life style contribute to risk factors for cardiovascular disease among adults in a post-
 235 communist country. Public Health 2005;xx:1–11.

236 [7] Khan S, Cleanthis M, Smout J, Flather M, Stansby1 G. Life-style Modification in Peripheral
 237 Arterial Disease. Eur J Vasc Endovasc Surg 2005;29:2–9.

- 238 [8] Proietto J, Filippis A, Nakhla C, Clark S. Nutrient-induced insulin resistance. *Molecular and*
 239 *Cellular Endocrinology* 1999;151:143–149.
- 240 [9] Lichtenstein AH, Schwab US. Relationship of dietary fat to glucose metabolism. *Atherosclerosis*
 241 2000;150:227–243.
- 242 [10] Wolf-Nunes V, Miotto AM, Farias-Silva E, Grassi-Kassisse DM, Spadari-Bratfisch RC.
 243 Plasmatic levels of cholesterol, triglycerides and glucose of normo- and hypercholesterolemic
 244 rats treated whit Croton cajucara Benth In: XVI Latinamerican Congress of Pharmacology,
 245 XXXII Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, II Iberoamerican
 246 Congress of Pharmacology, VII Interamerican congress of Clinical Pharmacology and
 247 Therapeutics, 2000, São Paulo/SP. XVI Latinamericana Congress of Pharmacology, XXXII
 248 Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics, II Iberoamerican Congress
 249 of Pharmacology, VII Interamerican congress of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2000.
- 250 [11] Popovic V, Popovic P. Permanent cannulation of aorta and vena cava in rats and ground
 251 squirrels. *J Appl Physiol* 1960;15:727-728.
- 252 [12] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density
 253 lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*
 254 1972;18:499-502.
- 255 [13] Scott AM, Atwater I, Rojas E. A method for the simultaneous measurement insulin release and
 256 B-cell membrane potencial in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia* 1981;21:407-475.
- 257 [14] Howard BV. Insulin resistance and lipid metabolism. *Am J Cardiol* 1999;84:28J-32J.
- 258 [15] Grundy SM, Bearn AG. The Role of Cholesterol in Atherosclerosis: New Therapeutic
 259 Opportunities. Philadelphia: Hanley & Belfus, 1988. 261 p.
- 260 [16] Danev S, Nikolova R, Kerekovska M, Svetoslavov S. Relationship between heart rate
 261 variability and hypercholesterolaemia. *Cent Eur Publ Hlth* 1997;5:143-146.

- 262 [17] Huang Y, Walker KE, Hanley F, Narula J, Houser SR, Tulenko TN. Cardiac Systolic and
263 Diastolic Dysfunction After a Cholesterol-Rich Diet. *Circulation* 2004;109:97-102.
- 264 [18] Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose-fatty acid cycle. Its role in
265 insulin sensitivity and metabolic disturbances in diabetes mellitus. *Lancet* 1963;1:785-789.
- 266 [19] Pan DA, Lillioja S, Kriketos AD, Milner MR, Baur LA, Bogardus C, Jenkins AB, Storlien LH.
267 Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes* 1997;46:983–
268 988.
- 269 [20] Boden G. Fatty acids and insulin resistance. *Diabetes Care* 1996;19(4):394-395.
- 270 [21] Bergman RN, Ader M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *TEM*
271 2000;11(9):351-356.
- 272 [22] Bønaa KH, Arnesen E. Association between heart rate and atherogenic blood lipid fractions in a
273 population (The Tromsø Study). *Circulation*. 1992;86:394-405.
- 274 [23] Crandall DL, Lai FM, Huggins FJ, Tanikella TK, Cervoni P. Effects of caloric restriction on
275 cardiac reactivity and β -adrenoceptor concentration. *Am J Physiol* 1983;244 (Heart Circ. Physiol.
276 13):H444-H448.
- 277 [24] Kaufman LN, Peterson MM, Smith SM. Hypertension and sympathetic hyperactivity induced
278 in rats by high-fat or glucose diets. *Am J Physiol (Endocrinol. Metab)* 1991;E95-E100.
- 279 [25] Rose SD, Boyd H, Rhodes CG, Kaski JC, Camici PG. Myocardial beta-adrenoceptor density
280 and plasma catecholamines in syndrome X. *Am J Cardiol* 1996;78:37-42.
- 281 [26] Castellano M, Böhm M. The cardiac β -adrenoceptor-mediated signaling pathway and its
282 alterations in hypertensive heart disease. *Hypertension* 1997;29:715-722.
- 283 [27] Bünnemann M, Lee KB, Pals-Rylaarsdam R, Roseberry AG, Hosey MM. Desensitization of G-
284 protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 1999;61:169-92.

- 285 [28] Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Switching of the coupling of the β_2 -adrenergic receptor to
 286 different G proteins by protein kinase A. *Nature* 1997;390:88-91.
- 287 [29] Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37:1595-1607.
- 288 [30] Osei K. Insulin Resistance and Systemic Hypertension. *Am J Cardiol* 1999;84:33J–36J.
- 289 [31] Raji A, Williams GH, Xavier J, Hopkins PN, Hunt SC, Hollenberg NK, Seely EW. Insulin
 290 resistance is affected by sodium intake in nonmodulating subset of essential hypertension. *AJH*
 291 2000;13(4)part 2.
- 292 [32] Chi TZ, Liu IM, Cheng JT. Less of insulin desensitization in sympathetic nerve terminals from
 293 Wistar rats with insulin resistance. *Journal of the Autonomic Nervous System* 2000;80:80–84.
- 294 [33] Baron AD, Insulin and the vasculature-old actors, new roles. *Journal of Investigative Medicine*
 295 1996;44(8):406-412.
- 296 [34] Hsue WA, Law RE. Insulin signaling in the arterial wall. *Am J Cardiol* 1999;84:21J-24J.
- 297 [35] Chang CJ, Wu JS, Lu FH, Liu IM, Chi TC, Cheng JT. Sympathetic hyperactivity in Wistar rats
 298 with insulin-resistance. *Journal of Autonomic Nervous System* 1998;74:116-119.
- 299 [36] Saward L, Zahradka P. Insulin is required for angiotensin II-mediated hypertrophy of smooth
 300 muscle cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1996;122:93-100.
- 301 [37] González-Timón B, González-Muñoz M, Zaragoza C, Lamas S, Melián EM. Native and
 302 oxidized Low Density Lipoproteins oppositely modulate the effects of insulin-like growth factor I
 303 in VSMC. *Cardiovascular Research* 2004;61:247–255.
- 304 [38] Lais LT, Brody MJ. Vasoconstrictor hyperresponsiveness: An early pathogenic mechanism in
 305 the spontaneously hypertensive rat. *European Journal of Pharmacology* 1978;47(2):177-189.
- 306 [39] De Las Heras N, Cediél E, Oubiña MP, Aragoncillo P, Sanz-Rosa D, Lahera V, Cachofeiro V.
 307 Comparison between the effects of mixed dyslipidaemia and hypercholesterolaemia on endothelial
 308 function, atherosclerotic lesions and fibrinolysis in rabbits. *Clinical Science* 2003;104:357-365,.

- 309 [40] Liao Y. et al. Celiprolol, A Vasodilatory beta-Blocker, Inhibits Pressure Overload–Induced
 310 Cardiac Hypertrophy and Prevents the Transition to Heart Failure via Nitric Oxide–Dependent
 311 Mechanisms in Mice. *Circulation* 2004;110:692-699.
- 312 [41] Raij L; Nagy J; Coffee K; DeMaster EG. Hypercholesterolemia promotes endothelial
 313 dysfunction in vitamin E and selenium-deficient rats. *Hypertension* 1993;22;56-61.
- 314 [42] Holvoet P, Theilmeier G, Shivalkar B, Flameng W, Collen D. LDL hypercholesterolemia is
 315 associated with accumulation of oxidized LDL, atherosclerotic plaque growth, and compensatory
 316 vessel enlargement in coronary arteries of miniature pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*
 317 1998;18:415-422.
- 318 [43] Choi JW. Enhanced nitric oxide production is closely associated with serum lipid
 319 concentrations in adolescents. *Clinica Chimica Acta* 2004;347:151-156.
- 320 [44] Moller DE, Potential Role of TNF- α in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2
 321 Diabetes. *TEM* 2000;11(6):212-217.
- 322 [45] Olivetti G, Cigola E, Maestri R, Lagrasta C, Corradi D, Quaini F. Recent advances in cardiac
 323 hypertrophy. *Cardio Source* 2000;45(1):68-75.
- 324 [46] Zimlichman R, Eliahou H, Gass S, Vogel Z, Gefel, D, Barg J. Insulin induces hypertrophy of
 325 cardiomyocytes and proliferation of noncardiomyocytes in culture. *AJH* 1995;8(4) Part 2: 52A.
- 326 [47] Kamide K, Rakugi H, Higaki J, Okamura A, Nagai M, Moriguchi K, Ohishi M, Satoh N, Tuck
 327 ML, Ogihara T. The renin-angiotensin and adrenergic nervous system in cardiac hypertrophy in
 328 fructose-fed rats. *Am J Hypertens* 2002;15:66-71.

Table 1 – Total cholesterol (TC), HDL-, LDL-, VLDL-cholesterol, triglycerides (TG) and free fat acids (FFA) serum levels and atherogenic index (AI) of ND- and HFD rats.

Diet	TC (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	VLDL (mg/dl)	TG (mg/dl)	FFA (mmol/l)	AI
ND (4)	36.2±4.2	5.2±1.2	24.2±5.5	6.7±0.8	20.9±1.2	0.65±0.06	7.1±1.8
HFD (5)	95.7±9.5*	6.6±0.4	83.2±9.4*	10.5±0.5*	51.3±1.7*	1.02±0.14	15.3±1.3*

Blood samples were taken after 16 h fast from conscious unrestraint rats. Atherogenic index = [(total cholesterol – HDL)/HDL]. The data are presented as means ± SEM. The number of rats is given between parentheses. * means significantly different from standard group; (P<0.05; Student's *t* test).

Table 2 – Glucose serum levels and insulin plasma levels of ND- and HFD rats.

Diet	Glucose (mg/dl)	Insulin (ng/ml)
ND (4)	112.9±11.9	0.75±0.02
HFD (5)	110.5±4.9	1.30±0.12*

Blood samples were taken after 16 h fast from conscious unrestraint rats. The data are presented as means $\pm$ SEM. The number of rats is given between parentheses. * means significantly different from standard group; ($P < 0.05$; Student's *t* test).

Table 3 – Mean arterial blood pressure (MAP), systolic pressure (SP), diastolic pressure (DP) and heart rate (HR) of conscious of ND- and HFD rats.

Diet	MAP (mmHg)	SP (mmHg)	DP (mmHg)	HR (bat/min)
ND (3)	105±2	120±2	91±1	346±7
HFD (4)	112±1*	130±1*	98±2*	368±4*

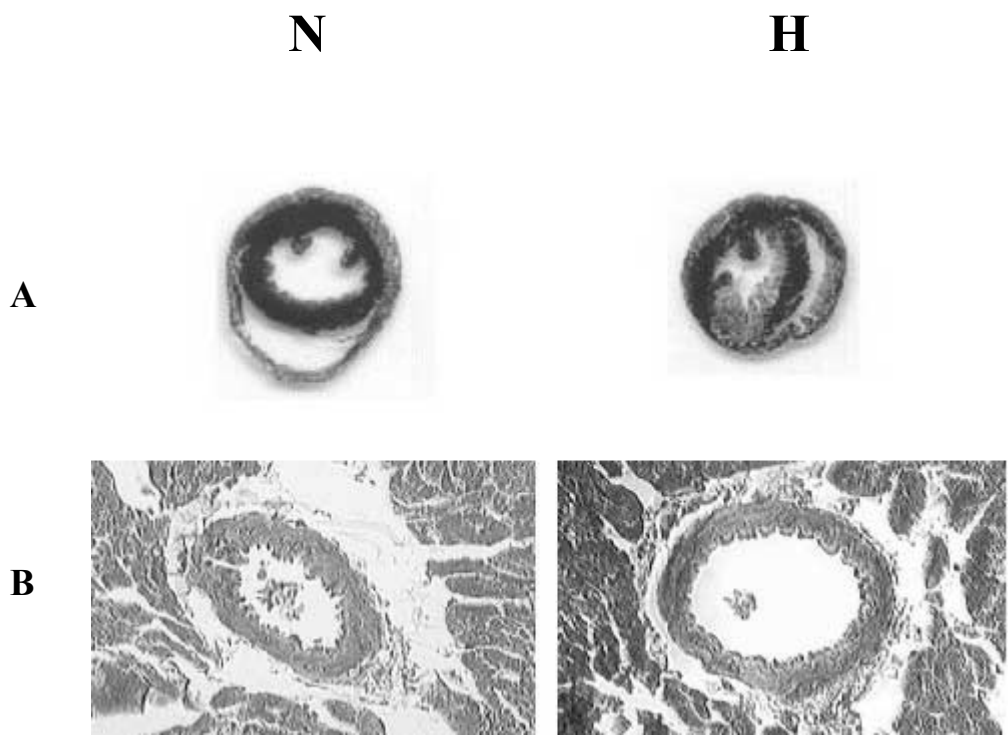
The data are means $\pm$ SEM. The number of rats is given between parentheses. * means significantly different from standard group; ($P < 0.05$; Student's t test).

Table 4 – Body weight (BW), left ventricle mass (VM), ventricular mass index (VMI), left ventricle wall thickness (WT), internal diameter (ID), the ratio of wall thickness and internal diameter of left ventricle (WT / ID) and chamber area (A) of ND- and HFD rats.

Diet	BW	VM	VMI	WT	ID	WT / ID	A
	(g)	(mg)	(mg/g)	(mm)	(mm)		(mm)
ND							
(4)	290.5±14.0	528.9±18.6	1.84±0.25	11.5±0.12	28.8±0.2	0.40±0.004	218.1±4.4
HFD							
(4)	307.8±3.8	653.8±28.2*	2.13±0.10	15.1±0.51*	20.6±0.3*	0.64±0.010*	220.1±4.7

The data are presented as means ± SEM. Mass ventricular index = ventricle weight/ body weight. The number of rats used is given in parentheses. * means significantly different from standard group; (P<0.05; Student's *t* test).

Figure 1 - Representative pictures of cardiac histology of rats treated during six weeks with standart (normolipidemic-N) or high fat-CHO (hyperlipidemic-H) diet. Tissues were stained with Masson trichrome. Row A, whole-heart cross section at the half size of organ. Left ventricle wall thickness was markedly increased in HFD rats. Row B show the perivascular fibrosis (scar = 5μm; magnification 40x).



NUTRITION RESEARCH

Corresponding Author Checklist

General requirements

- x ☐ Manuscript double-spaced, size 12 fonts with line numbering
- x ☐ Consecutive numbers on all pages
- x ☐ Arabic numbers used for all sections and major heading beginning with the Introduction
- x ☐ Authors are encouraged to consult a recent issue of Nutrition Research for manuscript format and presentation

Title page (page 1)

- x ☐ Appropriate title that includes the model (human subject, animal, cell culture)
- x ☐ Authors and affiliations listed
- x ☐ Corresponding author's contact information provided

Abstract (page 2)

- x ☐ 250 words that includes the objectives of the study, experimental approach, major results and conclusion
- x ☐ Minimize the use of abbreviations
- x ☐ Keywords at least five and must include the model for the study

Introduction (page 3)

- x ☐ Concise synopsis of relevant literature
- x ☐ Clearly stated objectives or hypothesis for the study

Materials and methods

- x ☐ Statement providing approval from the Institutional Review Committee for animals or human subjects.
- x ☐ Experimental design with appropriate statistics

Tables and Figures

- x ☐ Conform to the guidelines for Nutrition Research
- x ☐ Numbered appropriately, legends provided, and adequate footnotes
- x ☐ Concise and intelligible

Acknowledgments

- x ☐ Financial support and outside assistance acknowledged
Do not include author contributions!
Appropriate example: "This study was supported by the National Institutes of Health grant no. 0000. We thank Dr. Smith for providing the expertise in analytical methods."

References

- x ☐ Verified, all authors listed, and thoroughly checked throughout the document
- x ☐ Numbered and referenced in text with brackets

Responsibilities of Corresponding Author:

- Maintain correspondence with the Editorial Office and the coauthors.
- Provide all necessary materials to the Editorial Office.
- Obtain permission from all authors to submit the manuscript for publication.

I, Dora Maria Grassi-Kassisse, Corresponding Author for NTR Manuscript
#Miotto et al., certify that all of the above criteria have been met.

Signature _____

Date april 11th 2006



Search PubMed

for

Go Clear

Limits

Preview/Index

History

Clipboard

Details

About Entrez

Display

Abstract

Show

20

Sort by

Send to

Text Version

All: 1

Review: 0



Entrez PubMed

Overview

Help | FAQ

Tutorials

New/Noteworthy

E-Utilities

PubMed Services

Journals Database

MeSH Database

Single Citation

Matcher

Batch Citation

Matcher

Clinical Queries

Special Queries

LinkOut

My NCBI

Related Resources

Order Documents

NLM Mobile

NLM Catalog

NLM Gateway

TOXNET

Consumer Health

Clinical Alerts

ClinicalTrials.gov

PubMed Central

1: J Pharm Pharmacol. 2003 Feb;55(2):253-7.

Related Articles, Links



Sensitivity to beta-adrenoceptor agonists of adipocytes from rats treated with an aqueous extract of Croton cajucara Benth.

Grassi-Kassisse DM, Wolf-Nunes V, Miotto AM, Farias-Silva E, Souza Brito AR, Nunes DS, Spadari-Bratfisch RC.

Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil. doramgk@unicamp.br

Aqueous extracts of *Croton cajucara* bark are used in folk medicine to treat hepatic and gastrointestinal disorders and as a coadjuvant in weight-loss programs. We examined the effect of treating rats for 15 days with a 5% aqueous extract of *C. cajucara* on body weight and food intake. The epididymal adipose pads were removed and the lipolytic responses of isolated adipocytes to isoprenaline, noradrenaline (norepinephrine), BRL37344 and adrenaline (epinephrine) were analysed in the absence or presence of metoprolol or ICI118,551. Treated rats had a significantly lower weight gain than control rats, with no difference in food and liquid intake, epididymal fat-pad weight or basal glycerol release. The sensitivity of the lipolytic response to isoprenaline and adrenaline was significantly higher in adipocytes from treated rats. The sensitivity to noradrenaline or BRL37344 was unaltered. Metoprolol shifted the dose-response curves to noradrenaline to the right in adipocytes from control and treated rats; the dose-response curve to isoprenaline in adipocytes from control rats was also shifted to the right. In adipocytes from treated rats, the dose-response curve to isoprenaline was unaltered by metoprolol but was shifted to the right by ICI118,551, a beta(2)-adrenoceptor antagonist. We conclude that in adipocytes from treated rats there is an increase in the lipolytic response to non-selective agonists (isoprenaline and adrenaline) mediated by beta(2)-adrenoceptors, with no alteration in the responses mediated by beta(1)-adrenoceptors (noradrenaline) or beta(3)-adrenoceptors (BRL37344). This effect could increase the role of adrenaline as an endogenous stimulator of lipolysis.



A service of the National Library of Medicine
and the National Institutes of Health

My NCBI
[Sign In] [Regis]

All Databases PubMed Nucleotide Protein Genome Structure OMIM PMC Journals Book

Search PubMed for Go Clear

Limits Preview/Index History Clipboard Details

About Entrez

Text Version

Display Abstract Show 20 Sort by Send to

All: 1 Review: 0

Entrez PubMed

Overview
Help | FAQ
Tutorials

New/Noteworthy
E-Utilities

PubMed Services

Journals Database
MeSH Database
Single Citation
Matcher
Batch Citation
Matcher
Clinical Queries
Special Queries
LinkOut
My NCBI

Related Resources

Order Documents
NLM Mobile
NLM Catalog
NLM Gateway
TOXNET
Consumer Health
Clinical Alerts
ClinicalTrials.gov
PubMed Central

1: J Inorg Biochem. 2004 Nov;98(11):1921-32.

[Related Articles, Links](#)

ELSEVIER
FULL-TEXT ARTICLE

The [Ru(Hedta)NO](0.1-) system: structure, chemical reactivity and biological assays.

Zanichelli PG, Miotto AM, Estrela HF, Soares FR, Grassi-Kassisse DM, Spadari-Bratfisch RC, Castellano EE, Roncaroli F, Parise AR, Olabe JA, de Brito AR, Franco DW.

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador São Carlense, CEP: 13560-970, São Carlos, SP, Brazil.

The [Ru(II)(Hedta)NO(+)] complex is a diamagnetic species crystallizing in a distorted octahedral geometry, with the Ru-N(O) length 1.756(4) Å and the RuNO angle 172.3(4) degrees. The complex contains one protonated carboxylate (pK(a)=2.7±0.1). The [Ru(II)(Hedta)NO(+)] complex undergoes a nitrosyl-centered one-electron reduction (chemical or electrochemical), with E(NO+/NO)=−0.31 V vs SCE (I=0.2 M, pH 1), yielding [Ru(II)(Hedta)NO](-), which aquates slowly: k(-NO)=2.1±0.4×10⁻³ s⁻¹ (pH 1.0, I=0.2 M, CF₃COOH/NaCF₃COO, 25 degrees C). At pHs>12, the predominant species, [Ru(II)(edta)NO](-), reacts according to [Ru(II)(edta)NO](-)+2OH⁻→[Ru(II)(edta)NO(2)](3-), with K(eq)=1.0±0.4×10³ M⁻² (I=1.0 M, NaCl; T=25.0±0.1 degrees C). The rate-law is first order in each of the reactants for most reaction conditions, with k(OH(-))=4.35±0.02 M⁻¹s⁻¹ (25.0 degrees C), assignable mechanistically to the elementary step comprising the attack of one OH⁻ on [Ru(II)(edta)NO](-), with subsequent fast deprotonation of the [Ru(II)(edta)NO(2)H](2-) intermediate. The activation parameters were DeltaH(#)=60±1 kJ/mol, DeltaS(#)=−31±3 J/Kmol, consistent with a nucleophilic addition process between likely charged ions. In the toxicity up-and-down tests performed with Swiss mice, no death was observed in all the doses administered (3–9.08×10⁻⁵ mol/kg). The biodistribution tests performed with Wistar male rats showed metal in the liver, kidney, urine and plasma. Eight hours after the injection no metal was detected in the samples. The vasodilator effect of [Ru(II)(edta)NO](-) was studied in aortic rings without endothelium, and was compared with sodium nitroprusside (SNP). The times of maximal effects of [Ru(II)(edta)NO](-) and SNP were 2 h and 12 min, respectively, suggesting that [Ru(II)(edta)NO](-) releases NO slowly to the medium in