

RUDSON ANTONIO RIBEIRO OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR E ALTERAÇÕES
MORFOLÓGICAS EM ARTÉRIAS DE RATOS FEITOS
OBESOS POR UMA DIETA HIPERLIPÍDICA
ASSOCIADA À INGESTA DE FRUTOSE

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

BRAGANÇA PAULISTA/SP

2013

RUDSON ANTONIO RIBEIRO OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR E ALTERAÇÕES
MORFOLÓGICAS EM ARTÉRIAS DE RATOS FEITOS
OBESOS POR UMA DIETA HIPERLIPÍDICA
ASSOCIADA À INGESTA DE FRUTOSE

ORIENTADORA:

PROF.^a Dra. FERNANDA BRUSCHI MARINHO PRIVIERO

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em
Ciências da Saúde da Universidade São
Francisco para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

BRAGANÇA PAULISTA/SP

2013

WD 210 Oliveira, Rudson Antonio Ribeiro.
A51a Avaliação da reatividade vascular e alterações morfológicas em artérias de ratos feitos obesos por uma dieta hiperlipídica associada à ingestão de frutose / Rudson Antonio Ribeiro Oliveira. -- Bragança Paulista, 2013.
xii, 40 p.
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.
Orientação de: Fernanda Bruschi Marinho Priviero.


1. Obesidade. 2. Disfunção vascular. 3. Ratos.
4. Dieta hiperlipídica. 5. Frutose. I. Priviero, Fernanda Bruschi Marinho

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de
Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

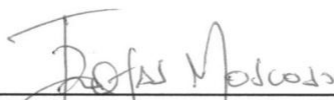
OLIVEIRA A. R., Rudson, “Avaliação da reatividade vascular e alterações morfológicas em artérias de ratos feitos obesos por uma dieta hiperlipídica associada à ingesta de frutose”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e sete de Fevereiro de 2013 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dra. Fernanda Bruschi Marinho Priviero
Universidade São Francisco



Prof. Dr. Mário Angelo Claudino
Universidade São Francisco



Prof. Dr. Julio Alejandro Rojas Moscoso
Universidade Estadual de Campinas

Dedicatória

O trabalho de pesquisa exige diferentes colaborações. O apoio recebido da orientadora foi de fundamental importância para a conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade e por me dar a inspiração para produzir um trabalho que sirva de contribuição na formação de um mundo mais justo.

Agradeço a minha maravilhosa e inspiradora esposa, que me apoiou em todos os momentos na elaboração desse trabalho.

Agradeço as minhas filhas por me perdoarem, por aqueles momentos em que não pude dedicar atenção.

Agradeço a meus pais, fazendo com que seguisse em frente sem nunca desistir de um sonho.

Agradeço a meus irmãos e amigos pelo incentivo na elaboração deste trabalho.

Agradeço a colega Sueli pelo incentivo nesta trajetória.

Agradeço a minha orientadora Prof.^a Fernanda que com muita tranquilidade e sabedoria soube me conduzir nesta produção acadêmica.

Agradeço ao Prof. Dr. Mario Claudino que esteve junto neste trabalho.

Agradeço Prof.^{da}. Dra. Thalita Rocha pela contribuição deste trabalho.

Agradeço ao Dr. Júlio Alejandro Rojas-Moscoso por fazer parte da banca.

Agradeço Tatine e Vilma pela atenção dispensada nessa jornada.

Agradeço aos Alunos do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa da USF Amanda Ravos, Tatiana Mendes Costa, Isabela Mendes e Marta Gracias.

Epígrafe

*“A mente que se abre a uma nova idéia,
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

RESUMO

A obesidade é um problema de saúde pública que vem tomando proporções epidêmicas em todo o mundo. Uma das principais consequências da obesidade é o desenvolvimento das doenças cardiovasculares, e esta por sua vez, é umas das principais causa de morte todo ano no Brasil e no mundo. Objetivo: Avaliar a reatividade vascular e as alterações morfológicas da artéria mesentérica na obesidade induzida por uma dieta hiperlipídica associada à frutose. Método: Ratos Wistar machos foram submetidos a uma dieta normolipídica (3,8% gordura – grupo controle) ou hiperlipídica (59% gorduras – grupo dieta) associada à frutose na água de beber (100 mg/ml) por 12 semanas, a partir da quarta semana de vida. Foram avaliados o peso corporal inicial e final, a tolerância à glicose, o perfil lipídico, a gordura epididimal e as artérias mesentéricas e aorta foram removidas para avaliação funcional e histológica. Os tecidos hepático e renal também foram coletados para avaliação dos efeitos da dieta hiperlipídica na morfologia destes órgãos. A função hepática e renal foi avaliada pela dosagem plasmática de metabólitos e enzimas específicas. Resultados: Os ratos submetidos à dieta hiperlipídica associada à frutose apresentaram maior ganho de peso corporal, aumento da gordura epididimal; menor tolerância à glicose e aumento de triglicérides. Nas artérias, foram observadas redução da resposta de relaxamento dependente de endotélio, sem prejuízo do relaxamento independente de endotélio. Em contrapartida, a avaliação histológica não apresentou diferenças entre a estrutura dos vasos de ratos magros e obesos. Os rins não apresentaram alteração funcional ou morfológica enquanto que o fígado apresentou alterações morfológicas compatíveis com esteatose hepática, sem alteração de função. Conclusão: Nossos dados sugerem que a dieta induziu disfunção endotelial, sem alterações funcionais ou estruturais da musculatura lisa vascular. Neste modelo de obesidade, a função e morfologia renal foram preservadas enquanto que no tecido hepático as alterações histológicas são sugestivas de esteatose. Assim, nosso estudo foi eficiente em produzir um modelo de obesidade animal e doença vascular.

Palavras-chave: Obesidade; Disfunção vascular; Ratos; Dieta hiperlipídica; Frutose.

ABSTRACT

Obesity is a worldwide problem of public health which is taking epidemic proportions in the world. One of the main consequences of obesity is the development of cardiovascular diseases, which in turn, is the main cause of death in Brazil and in the world. Aim: To evaluate the vascular reactivity and morphological changes in the mesenteric artery in obesity induced by high fat diet plus fructose. Methods: Male Wistar rats were submitted to a normolipidic diet (3.8% of fat – control group) or hyperlipidic diet (59% fat – diet group) plus fructose in the drinking water (100 mg/ml) during 12 weeks, starting at the 4th week of life. It was evaluated initial and final body weight, glucose tolerance, lipidic profile, epididimal fat and the aorta and mesenteric arteries were removed for functional and histological evaluation. Kidney and liver were also collected for histological evaluation. Renal and hepatic functions were measured by plasma levels of specific metabolites and enzymes. Results: Rats submitted to high fat diet plus fructose presented higher body weight gain, increased epididimal fat, smaller glucose tolerance and higher triglycerides levels. In the arteries, it was observed reduced endothelium dependent induced relaxation, with no changes in the endothelium independent relaxation. On the otherhand, the histological evaluation was not different between the vessels of both strains. The kidney did not present functional and histological changes whereas the liver presented morphological changes compatible with steatosis, with no changes on its function. Conclusion: Our data suggest that the high fat diet plus fructose induced an endothelial dysfunction with no functional or structural changes on the vascular smooth muscle. In this model of obesity, renal function and morphology were preserved while in the hepatic tissue histological changes are suggestive of steatosis. Hence, our study was efficient in producing an animal model of obesity and vascular disease.

Keywords: Obesity, vascular dysfunction, rats, hyperlipidic diet, fructose.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ALT - alanina aminotransferase
CaM - calmodulina
COX - ciclooxigenase
EDHF - fator de hiperpolarização derivado do endotélio
eNOS - sintase endotelial do óxido nítrico
EROs - espécies reativas de oxigênio
ET-1 - endotelina1
HE - hematoxilina-eosina
iNOS - sintase induzível do óxido nítrico
IP3 - inositol trifosfato
L-Arg - L-Arginina
LDL-c - lipoproteína de baixa densidade-colesterol
L-NAME - N-nitro-L-arginina-metil ester
MLCK - quinase da cadeia leve de miosina
nNOS - sintase neuronal do óxido nítrico
NO - óxido nítrico
NOS - sintase do óxido nítrico
PKG - proteína quinase G
SOD-1 - superóxido dismutase-1

LISTA DE FIGURAS

FIGURA01- Peso corporal dos ratos dos grupos controle e obesos	15
FIGURA 02- Gordura epididimal dos ratos dos grupos controle e obesos	16
FIGURA 03- Glicemia de jejum e teste de tolerância à glicose	17
FIGURA 04- Avaliação hematológica (leucócitos e plaquetas)	18
FIGURA 05- Avaliação hematológica (hemácias; hemograma; hematócrito)	19
FIGURA 06- Dosagem do colesterol total e triglicérides	20
FIGURA 07- Curva de concentração/efeito à acetilcolina nas artérias mesentérica e aorta	21
FIGURA 08- Relaxamento induzido pelo nitropussiato de sódio (SNP) nas artérias mesentérica e aorta	22
FIGURA 09- Corte histológico da artéria mesentérica e aorta de ratos controle e obesos.....	23
FIGURA 10- Dosagem do nível plasmático de albumina e alanina aminotransferase (ALT)	24
FIGURA 11- Corte histológico do fígado de ratos controle e obesos	25
FIGURA 12- Avaliação da função renal de ratos controle e obesos	26
FIGURA 13- Corte histológico do rim de ratos do grupo controle e obesos	27

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	1
1.1 Obesidade.....	1
1.2 Fisiologia da Contração e Relaxamento Vascular.....	2
1.3 Disfunção Vascular e Endotelial	8
2- JUSTIFICATIVA	9
3- OBJETIVO	10
4- MATERIAIS E MÉTODOS	11
4.1 Animais e Protocolos Experimentais	11
4.2 Modelo Experimental – Ratos Obesos	11
4.3 Teste de Tolerância à Glicose e Perfil Lipídico.....	12
4.4 Avaliação da Função Hepática e Renal.....	12
4.5 Avaliação Funcional das Artérias Aorta e Mesentérica Superior.....	13
4.6 Avaliação Morfológica da Artéria Mesentérica, Rim e Fígado.....	13
4.7 Análise Estatística.....	14
5- RESULTADOS	15
5.1 Peso Corporal Inicial e Final.....	15
5.2 Gordura Epididimal	16
5.3 Teste de Tolerância a Glicose (TTG).....	17
5.4 Avaliação Hematológica.....	18
5.5 Perfil Lipídico.....	20
5.6 Reatividade da Artéria Mesentérica e Aorta.....	21
5.7 Avaliação da Função Hepática.....	24
5.8 Avaliação da Função Renal.....	26
6- DISCUSSÃO	28
7- CONCLUSÃO	31
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	32

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

A obesidade tem sido descrita como um importante problema de saúde pública da atualidade e vem ganhando destaque no cenário epidemiológico mundial. Sua prevalência aumentou nas últimas décadas em todo o mundo, inclusive nos países em desenvolvimento, como o Brasil, onde anteriormente predominava os problemas relacionados à desnutrição (ENES & SLATER, 2010).

Caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo localizado em todo corpo, a obesidade é uma doença crônica que frequentemente provoca prejuízos à saúde. Essa doença pode ser causada por múltiplos fatores relacionados à ingestão excessiva de alimentos pouco saudáveis, diminuição progressiva da atividade física, fatores genéticos, metabólicos, sociais, comportamentais e culturais. A classificação de obesidade em adultos é indicada pelo índice de massa corpórea (IMC), representado pela razão entre o peso (expresso em quilogramas) dividido pelo quadrado da estatura (expressa em metros) (SANTOS *et al*, 2012). Desta forma, a obesidade é caracterizada por um IMC igual ou superior a 30 kg/m² (SILVA *et al*, 2006).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) também subdivide a obesidade em termos de gravidade, classificando-a em: obesidade grau I (moderado excesso de peso, no qual o IMC encontra-se entre 30 e 34,9 kg/m²); obesidade grau II (obesidade leve ou moderada, com IMC entre 35 e 39,9 kg/m²) e obesidade grau III (obesidade grave ou mórbida, na qual o IMC apresenta-se com valores superiores a 40 kg/m²) (WHO, 1995).

Essa doença também acarreta danos psicossociais relacionados ao estigma e discriminação em decorrência da alteração da imagem corporal, o que resulta em diminuição da autoestima e o surgimento de sintomas depressivos e de ansiedade. Portanto, a obesidade tornou-se um problema de saúde pública, com consequências negativas para a saúde do indivíduo, tanto físicas quanto psicológicas, e que comprometem a qualidade de vida (SANTOS *et al*, 2012).

No Brasil, a análise da tendência secular indica que a obesidade entre adultos está em expansão e atingiu em 2008 a 2009, pelo menos 10% da população em todas as regiões. A trajetória de expansão da obesidade no Brasil é menos intensa entre mulheres, entre grupos socioeconômicos mais ricos ou escolarizados e nas regiões mais desenvolvidas do país (CONDE & BORGES, 2011).

Assim, a obesidade está sendo considerada uma epidemia mundial, atingindo indivíduos de todas as faixas etárias, de diferentes níveis sociais, acarretando um grande fator de risco para várias doenças degenerativas não-transmissíveis como: Diabetes Mellitus tipo II, doenças cardiovasculares e hipertensão arterial. Em pessoas que apresentam excesso de gordura corporal são frequentes as alterações no perfil lipídico, com aumento nos níveis plasmáticos de colesterol total (CT), triglicérides (TG), lipoproteína de baixa densidade-colesterol (LDL-c) e diminuição nos níveis de lipoproteína de alta densidade-colesterol (HDL-c). As alterações nos níveis circulantes dessas biomoléculas podem levar ao desenvolvimento de doenças coronarianas, tanto em adultos quanto em crianças (RINALD *et al*, 2012).

1.2 Fisiologia da Contração e Relaxamento Vascular

1.2.1 Regulação do tônus da musculatura lisa vascular

A contração e o relaxamento do músculo liso vascular são controlados pela concentração citoplasmática de cálcio ($[Ca^{2+}]_c$) que, em condições basais, é de aproximadamente 100 nM, enquanto que no meio extracelular é de 1 a 3 mM. Este gradiente químico de cerca de 10.000 vezes entre o meio intracelular e extracelular que favorece o influxo de Ca^{2+} . Além disso, o meio intracelular é mais eletronegativo que o meio extracelular, favorecendo o influxo de Ca^{2+} (MISSIAEN *et al*, 1991). Para manter essa concentração de Ca^{2+} em níveis basais, a célula possui mecanismos de controle, como a troca de Na^+/Ca^{2+} e a $Ca^{2+}/ATPase$ da membrana plasmática e do retículo sarcoplasmático.

O principal determinante do tônus vascular é o nível de fosforilação da cadeia leve da miosina, que é controlado pela quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), dependente de Ca^{2+} -calmodulina, e pela fosfatase da cadeia leve da miosina (HARTSHORNE, 1987). A contração das células do músculo liso vascular inicia com o aumento da $[Ca^{2+}]_c$, que pode ocorrer por aumento do influxo de Ca^{2+} do espaço extracelular através dos canais para Ca^{2+} operados por receptores ou da liberação de Ca^{2+} dos estoques do retículo sarcoplasmático. Subsequentemente, ocorre a ligação do Ca^{2+} à calmodulina, formando o complexo Ca^{2+} -calmodulina, que leva à ativação da MLCK, a enzima responsável pela fosforilação da cadeia leve da miosina. A fosforilação da cadeia leve da miosina permite que a miosina interaja com a actina e o trifosfato de adenosina (ATP), resultando na ligação

da ponte cruzada da miosina com a actina. Isto gera um estado de ligação forte entre essas duas proteínas, produzindo a contração vascular. A redução da $[Ca^{2+}]_c$ desfaz o complexo Ca^{2+} -calmodulina, que inativa a MLCK, e ativa a fosfatase da miosina, que é a enzima que desfosforila a cadeia leve da miosina, removendo os fosfatos de alta energia, promovendo assim o relaxamento muscular (WEBB, 2003).

O aumento da fosforilação da cadeia leve da miosina e a capacidade da célula em produzir tensão em níveis sub-ótimos de Ca^{2+} é um mecanismo conhecido como sensibilização ao Ca^{2+} , sendo a inibição da fosfatase da miosina o principal fator que contribui para este fenômeno (KUBOTA *et al.*, 1992; SOMLYO & SOMLYO, 1994; 2000).

Acredita-se que a ativação da fosfatase da miosina ocorra pela via do NO/GMPc, reduzindo a fosforilação da cadeia leve da miosina, levando à dessensibilização ao Ca^{2+} (WU *et al.*, 1996; LEE *et al.*, 1997). Entretanto, a base molecular para a ativação da fosfatase da miosina não é completamente entendida.

1.2.2 Óxido nítrico (NO)

O NO está envolvido em uma série de funções fisiológicas, incluindo relaxamento de músculo liso e neurotransmissão no sistema nervoso central e autônomo (MONCADA *et al.*, 1991; GARTHWAITE, 1995), sendo a maior parte de seus efeitos mediada pela estimulação direta da guanililciclase solúvel (LUCAS *et al.*, 2000).

As enzimas responsáveis pela geração de NO são conhecidas como óxido nítrico sintases (NOS) e catalizam a oxidação do nitrogênio do grupamento guanidinoda L-Arginina (L-Arg), formando NO e L-citrulina em duas etapas, com a formação do intermediário N^{ω} -hidroxi-L-arginina (MARLETTA, 1988, 1993; MARLETTA *et al.*, 1988; FELDMAN *et al.*, 1993; FUKUTO & CHAUDHURI, 1995; IGNARRO & MURAD, 1995; KERWIN *et al.*, 1995).

Três isoformas de NOS (NOS I, II e III) são codificadas por três genes diferentes e podem ser classificadas em duas famílias: NOS constitutiva (NOS I e NOS III) e NOS induzível (NOS II). As NOS constitutivas foram primeiramente caracterizadas em neurônios (NOS I ou nNOS) e em células endoteliais (NOS III ou eNOS), respectivamente, sendo reguladas pelo complexo Ca^{2+} /calmodulina (CaM). Estas isoformas produzem pequenas quantidades de NO por curtos períodos de tempo (segundos a minutos), e, neste caso, o NO parece desempenhar funções regulatórias na

neurotransmissão e no sistema cardiovascular. A NOS II (iNOS) foi primeiramente isolada de macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo e interferon- γ . Esta enzima é essencialmente Ca^{2+} -independente e pode produzir NO por longos períodos (horas a dias) após sua expressão (KNOWLES & MONCADA, 1994; FÖRSTERMANN *et al.*, 1994; 1998; FÖRSTERMANN & KLEINERT, 1995; IGNARRO & MURAD, 1995).

As NOS são ativas na forma de homodímeros de pesos moleculares entre 250-300 kDa. A ligação da CaM reforça a transferência de elétrons no domínio redutase e permite a redução do grupamento heme com consequente ativação da NOS (MATSUOKA *et al.*, 1994; ABU-SOUD *et al.*, 1994).

O L-NAME, um análogo da L-Arg substituído no grupamento guanidino (N^0), inibe todas as isoformas da NOS. Outros análogos da L-Arg substituídos no mesmo grupamento também são capazes de inibir a atividade da NOS. Neste caso, a inibição ocorre em graus variáveis e mecanismos distintos, porém todos envolvem a ocupação do sítio ligante para o substrato (MAYER & ANDREW, 1998; BOUCHER *et al.*, 1999).

A guanililciclase solúvel é expressa no citoplasma de quase todas as células de mamíferos e medeiam várias funções, como inibição da agregação plaquetária, relaxamento do músculo liso, vasodilatação, transdução de sinais em neurônios e imunomodulação (COLLIER & VALLANCE, 1989). A guanililciclase solúvel é um heterodímero composto de subunidades α e β , com massas moleculares de 77 e 70 kDa, respectivamente (KOESLING *et al.*, 1991; SCHULZ *et al.*, 1991; HOBBS, 1997). Cada subunidade contém um domínio regulatório N-terminal (grupo prostético heme e região de dimerização) e um domínio catalítico C-terminal. A expressão das duas subunidades é necessária para atividade catalítica (HARTENECK *et al.*, 1990; BUECHLER *et al.*, 1991).

A presença do grupo prostético heme é necessária para ativação da guanililciclase solúvel pelo NO (GERZER *et al.*, 1982; IGNARRO *et al.*, 1982; OHLSTEIN *et al.*, 1982). O grupo heme corresponde a um anel de cinco membros, contendo quatro átomos de nitrogênio que circundam um átomo de ferro na posição central, o qual pode encontrar-se como Fe^{2+} (forma reduzida) ou Fe^{3+} (forma oxidada). O quinto membro do anel na guanililciclase solúvel é um ligante axial imidazólico na posição His105 (STONE & MARLETTA, 1994). A mutação deste aminoácido, localizado próximo ao N-terminal da subunidade β_1 , determina a incapacidade da guanililciclase solúvel de se ligar ao grupo heme, resultando em uma enzima insensível ao NO (WEDEL *et al.*, 1994).

O NO ativa a guanililciclase solúvel por ligar-se diretamente ao grupo heme formando um complexo heme-ferrosonitrosil. A ligação do NO promove a quebra da ligação entre a His105 axial e o ferro, resultando em um anel onde o NO está presente na quinta posição, criando assim uma mudança conformacional capaz de ativar a guanililciclase solúvel (TRAYLOR & SHARMA, 1992; STONE *et al.*, 1995; LUCAS *et al.*, 2000). Esta ativação causa elevação nos níveis de GMPc, o qual é clivado a partir do GTP pela guanililciclase solúvel (RAPOPORT & MURAD, 1983; LUCAS *et al.*, 2000). São propostos vários mecanismos para explicar a atividade relaxante resultante de um aumento nos níveis de GMPc induzido pelo NO (WALDMAN & MURAD, 1987; LUCAS *et al.*, 2000). Estes incluem: (1) inibição da geração de IP₃; (2) aumento do sequestro de Ca²⁺ citossólico; (3) desfosforilação da cadeia leve da miosina; (4) inibição do influxo de Ca²⁺; (5) ativação de proteínas quinases; (6) estimulação da Ca²⁺-ATPase de membrana e (7) abertura de canais para K⁺.

1.2.3 Fator de hiperpolarização derivado do endotélio (EDHF)

As células endoteliais liberam diferentes substâncias que regulam o tônus das células do músculo liso vascular. Dependendo do leito vascular, o NO, a prostaciclina, os ácidos epoxieicosatrienóico e o EDHF podem agir como mediadores da hiperpolarização dependente do endotélio.

Em 1984, foi demonstrado, em artéria mesentérica de cobaia, que o agonista muscarínico carbacol causa hiperpolarização dependente do endotélio (BOLTON *et al.*, 1984). Este fenômeno foi confirmado em outros leitos vasculares de diferentes espécies animais. Logo surgiram estudos demonstrando que o efeito hiperpolarizante podia ser parcial ou totalmente resistente aos inibidores da ciclooxigenase (COX) e da NOS, e que estas respostas não eram acompanhadas por aumento dos níveis de AMPc ou GMPc nas células do músculo liso vascular (BÉNY & BRUNET, 1988; TAYLOR *et al.*, 1988a; RICHARD *et al.*, 1990; COWAN & COHEN, 1991; MÜGGE *et al.*, 1991; ILLIANO *et al.*, 1992; NAGAO *et al.*, 1992; NAGAO & VANHOUTTE, 1992a,b; ZYGMUNT *et al.*, 1994; GARCIA-PASCUAL *et al.*, 1995). Surgiu, assim, o conceito da existência de um *Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio*, denominado EDHF, diferente do NO e da prostaciclina, capaz de promover hiperpolarização do músculo liso e relaxamento vascular.

A hiperpolarização envolve o aumento da condutância ao potássio, sendo o grau de hiperpolarização inversamente proporcional à concentração extracelular dos íons potássio (NAGAO

& VANHOUTTE, 1992a,b; VAN DE VOORDE *et al.*, 1992). Além disso, postula-se que o EDHF seja importante no início do relaxamento do músculo liso por reduzir indiretamente o movimento do cálcio através dos canais para cálcio dependentes de voltagem. Desta forma, sugere-se que o EDHF tem um papel predominante nas artérias de pequeno calibre onde, comparadas às artérias de maior calibre, as células do músculo liso são mais dependentes do influxo do cálcio extracelular durante a contração (NILSSON *et al.*, 1994).

Sabe-se que o EDHF é de grande importância no controle do tônus vascular, uma vez que pequenas mudanças (poucos mV) no potencial de membrana podem resultar numa alteração substancial do diâmetro do vaso (NELSON & QUAYLE, 1995; BRAYDEN & NELSON, 1992). Entretanto, os tipos de canais para potássio envolvidos na resposta mediada pelo EDHF ainda não foram bem caracterizados. Em leito mesentérico de rato (ADEAGBO & TRIGGLE, 1993), artéria coronária bovina e de porco (HECKER *et al.*, 1994), artéria oviductal bovina (GARCIA-PASCUAL *et al.*, 1995) e em artéria mesentérica de coelho (MURPHY & BRAYDEN, 1995), o efeito do EDHF é bloqueado pela apamina, sugerindo o envolvimento dos canais para potássio dependentes de cálcio. Por outro lado, em artéria carótida de cobaia, mesentérica de rato e coronária de porco, a combinação da apamina com a caribdotoxina (inibidores dos canais para potássio dependentes de cálcio de baixa e de alta condutância, respectivamente) foi necessária para abolir a hiperpolarização resistente aos inibidores da NOS e da COX (CORRIU *et al.*, 1996; CHATAIGNEAU *et al.*, 1998 a, b).

1.2.4. Canais para cálcio no controle do tônus muscular

A disfunção endotelial leva à redução da biodisponibilidade do NO que resulta em aumento na ativação dos canais para Ca^{2+} nas células do músculo liso vascular. Níveis elevados de GMPc promovem um relaxamento que, em parte, é devido à redução do influxo de Ca^{2+} através dos canais para Ca^{2+} voltagem-dependente do tipo L. O NO inibe estes canais para uma maneira indireta e direta. A primeira se dá pela ativação da proteína quinase G, que causa a abertura dos canais para K^+ e polariza a célula, resultando em desativação dos canais para Ca^{2+} voltagem-dependente. A maneira direta ocorre através da fosforilação da PKG ou das fosfoproteínas regulatórias, no próprio canal de Ca^{2+} , diminuindo a abertura destes canais, independentemente de voltagem (BLATTER & WIER, 1994; CLAPP & GURNEY, 1991; TEWARI & SIMARD, 1997).

Diversos estudos têm associado a hipertensão arterial e a disfunção do endotélio com alterações no aparato contrátil e na sensibilidade ao Ca^{2+} . Em 1998, SIMARD *et al.* demonstraram que as correntes geradas pela abertura dos canais para Ca^{2+} estão aumentadas em células de músculo liso cerebral de ratos hipertensos, e atribuíram este efeito à diminuição da biodisponibilidade do NO, diminuindo o antagonismo fisiológico entre NO e os canais para Ca^{2+} . No entanto, o mesmo grupo demonstrou que, na vigência de dano endotelial, além de aumento das correntes de Ca^{2+} , há um aumento na densidade dos canais para Ca^{2+} , indicando que a integridade do endotélio é fundamental na regulação da disponibilidade destes canais em células de músculo liso (SIMARD & Li, 2000). Similarmente, XIAO & MACARDLE (1994) demonstraram um aumento da densidade e alteração das propriedades farmacológicas das correntes de Ca^{2+} dos canais para Ca^{2+} tipo L em cardiomiócitos ventriculares de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) durante o desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda.

Em modelo experimental, a bandagem da aorta leva à hipertrofia ventricular esquerda, a qual é atenuada pelo tratamento crônico com propranolol. Neste modelo, a bandagem da aorta leva a alterações hemodinâmicas e diminui a atividade da ATPase de Ca^{2+} da miosina, além de reduzir tanto a liberação como a captação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. Estes efeitos estão relacionados com aumento do RNAm da cadeia pesada da miosina e diminuição da SERCA2, a proteína responsável pela captação do cálcio do meio intracelular para o retículo sarcoplasmático (TAKEO *et al.*, 2000). Neste estudo, o tratamento crônico com o propranolol e verapamil promove uma “melhora” da função cardíaca e normaliza a atividade da Ca^{2+} -ATPase da miosina e a expressão do RNAm da cadeia pesada da miosina e da SERCA2. Isto sugere que, além do β -adrenoceptor, os canais para Ca^{2+} do tipo L desempenham um papel importante na modulação da transição do Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático e distribuição da miosina através da regulação da expressão do gene no coração. Além disso, MARANO *et al.* (2002) demonstraram que o mecanismo pelo qual o propranolol previne a hipertrofia é independente do bloqueio do adrenoceptor β , uma vez que os enantiômeros D e L do propranolol, isômeros inativo e ativo do propranolol, respectivamente, também são capazes de prevenir a hipertrofia ventricular esquerda. Os efeitos do tratamento com os enantiômeros do propranolol foram similares aos efeitos do tratamento com a disopirâmida, uma droga anti-arrítmica com propriedade estabilizadora de membrana.

1.3. Disfunção Vascular e Endotelial

Disfunção endotelial refere-se a um desequilíbrio na produção endotelial de mediadores que regulam o tônus vascular, agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise, sendo o tônus vascular o aspecto mais estudado. A disfunção endotelial também é freqüentemente referida como piora no relaxamento dependente do endotélio, causado pela perda da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), muito embora a produção de outras substâncias vasoativas derivadas do endotélio, como a PGI₂, EDHF, ET-1, Ang II, TXA₂, também possa estar alterada (CARVALHO *et al*, 2006).

Dentre várias funções, o endotélio vascular é responsável pela síntese de fatores vasoconstritores e vasodilatadores, sendo o NO um dos fatores relaxantes derivados do endotélio de maior importância, diretamente relacionado à integridade da função endotelial. O NO possui ainda várias propriedades antiaterogênicas, que incluem inibição do monócito, leucócito e adesão plaquetária, propriedades antioxidantes e inibição da proliferação de células musculares lisas. A redução da biodisponibilidade de NO - disfunção endotelial - parece estar presente nas doenças cardiovasculares (GHISI *et al*, 2010).

Estudos têm demonstrado que a vasodilatação mediada pelo endotélio vascular é reduzida inicialmente no processo de aterosclerose, até mesmo antes de mudanças morfológicas angiográficas. Essa vasodilatação progressivamente diminui à medida que a severidade da aterosclerose aumenta e também em razão de fatores de risco associados, como hipertensão, dislipidemia e sedentarismo (GHISI *et al*, 2010).

A disfunção endotelial está presente em diversas doenças metabólicas e/ou cardiovasculares, como na obesidade, intolerância à glicose, hiperglicemia (diabetes mellitus), hipertensão arterial e dislipidemia. Em todas essas condições ocorre resistência insulínica, a qual se apresenta como um distúrbio metabólico que se manifesta por redução na utilização da glicose pelo músculo esquelético periférico, e tem sido fortemente associada à disfunção endotelial, que tem se mostrado ocorrer precocemente (CARVALHO *et al*, 2006).

Assim, a disfunção endotelial e vascular pode ocorrer como consequência da obesidade, seja pela formação de placas de ateroma nas paredes dos vasos, que pode interferir com a homeostasia local e prejudicar sua função, seja pela alteração da biodisponibilidade do NO e suas consequências.

2. JUSTIFICATIVA

A obesidade é um problema de saúde pública em nosso país e vários outros países no mundo. O tratamento para a obesidade inclui mudanças no estilo de vida, com a adoção de uma dieta pobre em gorduras saturadas e a adesão a programas de atividade física. No entanto, é comum que pessoas obesas respondam de forma inadequada à dieta de baixa caloria, além de apresentarem problemas na tolerância ao esforço, prejudicando o desempenho durante a atividade física, o que leva à fadiga com menores cargas de trabalho e desestimulam os pacientes. Em consequência da obesidade, são observadas disfunções orgânicas que representam grande risco à saúde e diminuem a qualidade de vida destes pacientes. Entre elas, a disfunção vascular tem sido associada à menor biodisponibilidade de substâncias vasodilatadoras como o NO e há evidências de que a reduzida biodisponibilidade destas substâncias está associada a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). O NO atua fisiologicamente ativando a miosina fosfatase, que desfosforila a quinase da cadeia leve de miosina (MLCK) favorecendo o relaxamento dos músculos lisos vasculares. Desta forma, a deficiência de NO prejudica o relaxamento vascular aumentando a probabilidade de desenvolvimento de fatores de risco para a doença cardiovascular como a hipertensão arterial, entre outros. Assim, existe a necessidade do desenvolvimento de modelos experimentais que simulem a obesidade induzida por uma dieta com balanço energético positivo, para que o tratamento das disfunções orgânicas induzidas pela obesidade possa ser estudado. O objetivo deste estudo foi avaliar a reatividade vascular e alterações morfológicas da artéria de ratos feitos obesos por uma dieta hiperlipídica associada ao consumo de frutose. A frutose foi adicionada com o objetivo de manter a glicemia e potencializar os efeitos do excesso de lipídeos da dieta no acúmulo de gordura corporal. Devido ao alto metabolismo hepático e renal estimulado pela dieta hiperlipídica e a associação com a frutose, também foi avaliado o efeito desta dieta sobre os tecidos renal e hepático, na sua morfologia e função.

3. OBJETIVO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar as alterações morfofuncionais das artérias aorta e mesentérica superior de ratos feitos obesos por uma dieta hiperlipídica associada à frutose. Paralelamente, avaliamos o efeito desta dieta na função e morfologia renal e hepática.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar o efeito da dieta hiperlipídica associada à frutose sobre o relaxamento dependente e independente do endotélio e sobre a histoarquitetura destes leitos vasculares;
- Avaliar a consequência de uma dieta hiperlipídica para a função e estrutura do tecido hepático e renal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais e Protocolos Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar a partir da quarta semana de vida, provenientes do Centro Multiinstitucional de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - UNICAMP, Campinas, SP), os quais ficaram alojados pelo menos por uma semana no biotério da Universidade São Francisco em gaiolas coletivas. Água e ração padrão ou hiperlipídica foram fornecidas *ad libitum*. O biotério dispõe de ciclo claro/escuro (12/12 h). Os protocolos experimentais encontram-se aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade São Francisco (protocolo nº 004.06.11).

4.2. Modelo Experimental – Ratos Obesos

4.2.1 Indução da obesidade por dieta hiperlipídica associada à sobrecarga de frutose

A obesidade foi induzida pela associação de uma dieta hiperlipídica e uma sobrecarga de frutose (100 mg/ml – *Synth*). A dieta hiperlipídica foi adquirida comercialmente (Prag Soluções Biotecnológicas, Jau, SP) e forneceu 5,5 Kcal/g, sendo 59% sob a forma de lipídeos, 18% sob a forma de proteínas e 23 % sob a forma de carboidratos. Como padrão foi utilizada ração para animais de laboratório Labina (Purina) que forneceu 3 Kcal/g sendo 40% sob a forma de carboidratos, 3,8 % sob a forma de lipídeos e 26,5% sob a forma de proteínas. Os animais foram tratados com dieta hiperlipídica + frutose a partir da 4ª. semana de vida. A dieta hiperlipídica foi oferecida por um total de 12 semanas. O peso corporal foi controlado semanalmente e a ingestão alimentar e hídrica diariamente. Ao final do estudo, foi feita a avaliação do peso corporal total dos animais e após o sacrifício, a gordura epididimal foi isolada e pesada para análise do acúmulo de tecido adiposo dos grupos.

4.3. Teste de Tolerância à Glicose e Perfil Lipídico

O teste de tolerância à glicose foi realizado após jejum de 14 horas. Durante o período de jejum, os animais tiveram livre acesso à água de beber, sem adição de frutose.

Para o teste de tolerância à glicose, foi coletado sangue capilar, a partir da cauda dos ratos. Foi feita a primeira coleta em jejum. Em seguida foi feita a administração de uma dose de dextrose e amostras de sangue foram então coletadas 10, 20, 30, 40 e 60 minutos após a sobrecarga com dextrose. As concentrações de glicose foram medidas através de um glicosímetro (ACCUCHEK OneTouch Ultra; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EUA).

Para a avaliação do perfil lipídico, os animais foram anestesiados com halotano e através de uma incisão longitudinal no abdômen do animal foi coletado o sangue arterial (7ml), pelo ramo descendente da artéria aorta. O sangue foi coletado em heparina para obtenção do plasma, ou em tubo seco para obtenção do soro. Sangue total coletado em heparina foi utilizado para contagem de células sanguíneas da série vermelha e branca. A contagem de hemácias, hemoglobina, plaqueta e leucócitos foram realizados em contador hematológico (Coulter T540, Sysmedlab, EUA). A contagem de hematócrito foi realizada após centrifugação do capilar contendo a amostra, em escala de porcentagem com graduação de 1%. Os níveis de colesterol total (CT) e triglicerídeos (TG) foram medidos por método enzimático utilizando-se kit específico (LABTEST, Lagoa Santa, MG, Brasil). Em modelos animais de obesidade, a gordura epididimal tem sido correlacionada com a gordura abdominal em humanos.

4.4 Avaliação da Função Hepática e Renal

As amostras de soro e plasma foram obtidas como descrito na seção anterior para a avaliação do perfil lipídico.

A função hepática foi avaliada pela dosagem dos níveis séricos de ALT e albumina, utilizando kits específicos (LABTEST, Lagoa Santa, MG, Brasil).

A função renal foi avaliada pela dosagem dos níveis plasmáticos de creatinina e ureia, também através de kits específicos (LABTEST, Lagoa Santa, MG, Brasil).

4.5. Avaliação Funcional das Artérias Aorta e Mesentérica Superior

As artérias aorta e mesentérica superior foram isoladas e imediatamente colocadas em solução de Krebs-Ringer. Após remoção dos tecidos gordurosos e conjuntivo, cortes transversais foram feitos para a obtenção de anéis das artérias.

As artérias isoladas foram montados em miógrafos para órgão isolado de 5 ml contendo solução de Krebs-Ringer (composição em mM: NaCl: 118; NaHCO₃: 25; glicose 5,6; KCl: 4,7; KH₂PO₄: 1,2; MgSO₄.7H₂O: 1,17 e CaCl₂.2H₂O: 2,5), aquecida a 37°C e borbulhada com 95% de O₂ e 5% de CO₂. Os tecidos foram montados entre dois ganchos de metal, sendo um deles fixo e o outro conectado a um transdutor de força. Foi aplicada uma tensão inicial de acordo com os tecidos e periodicamente ajustada até a estabilização de tensão dos mesmos. As alterações de tensão foram medidas por transdutores isométricos e registradas em sistema PowerLab de aquisição de dados (software versão 4.2, AD Instruments, MA, EUA).

Nas artérias, para avaliar o relaxamento dependente do endotélio, curvas concentração-efeito para o agonista acetilcolina (estimulador da liberação do NO endotelial) foram obtidas nos diferentes grupos experimentais. O relaxamento independente do endotélio foi avaliado através de uma dose única do doador de óxido nítrico, nitropussiato de sódio (1µM), em anéis de artéria aorta e de mesentérica sem remoção física do endotélio vascular. As respostas de relaxamento foram obtidas em anéis pré-contraídos com fenilefrina.

A curva concentração-efeito à acetilcolina foi obtida através do aumento cumulativo das concentrações da droga utilizada em meia unidade logarítmica entre doses sucessivas.

4.6 Avaliação Morfológica da Artéria Mesentérica, Rim e Fígado

Cortes de anéis de 3 a 5 mm da artéria mesentérica, o rim e fragmentos do fígado dos animais foram coletados e fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato (pH 7.4), “*overnight*”, e posteriormente desidratados em série crescente de etanol; 50% (1h), 70% (“*overnight*”), 80%, 95% e 100% (15 min. cada). Em seguida o material foi diafanizado em etanol + xilol (10 min.) e xilol 100% (15 min.), e infiltrado em xilol + parafina (15 min.), parafina pura (2h + 1h), para inclusão.

As secções histológicas (5 μm) obtidas foram desparafinizadas, hidratadas e coradas com Hematoxilina, por 5 min. e Eosina, por 3 min (HE). As lâminas foram lavadas em água de torneira e desidratadas em série crescente de etanol, montadas com Bálsamo do Canadá sintético e analisadas em microscópio óptico Olympus BX51-PH-III (Olympus OpticalCo., Tóquio, Japão).

4.7 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (S.E.M) para n experimentos. Quando apropriado, foram realizadas análises de variância (ANOVA *two-way*) para determinação das diferenças entre os grupos e pós-teste de Tuckey, utilizando o programa Graph Pad Prism 3.0, e foi adotado um nível de significância de $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 *Peso Corporal Inicial e Final*

Antes da administração da dieta hiperlipídica, os animais foram divididos aleatoriamente entre grupo controle e grupo dieta e o peso corporal inicial foi avaliado. O peso corporal dos animais no início do estudo foi de 113 ± 6 g para o grupo controle e de 110 ± 6 g para o grupo dieta hiperlipídica + frutose. Após as 12 semanas de estudo, o peso corporal do grupo controle foi de 414 ± 15 g enquanto que no grupo de ratos que receberam dieta hiperlipídica associada à ingestão de frutose o peso corporal final foi de 504 ± 17 g.

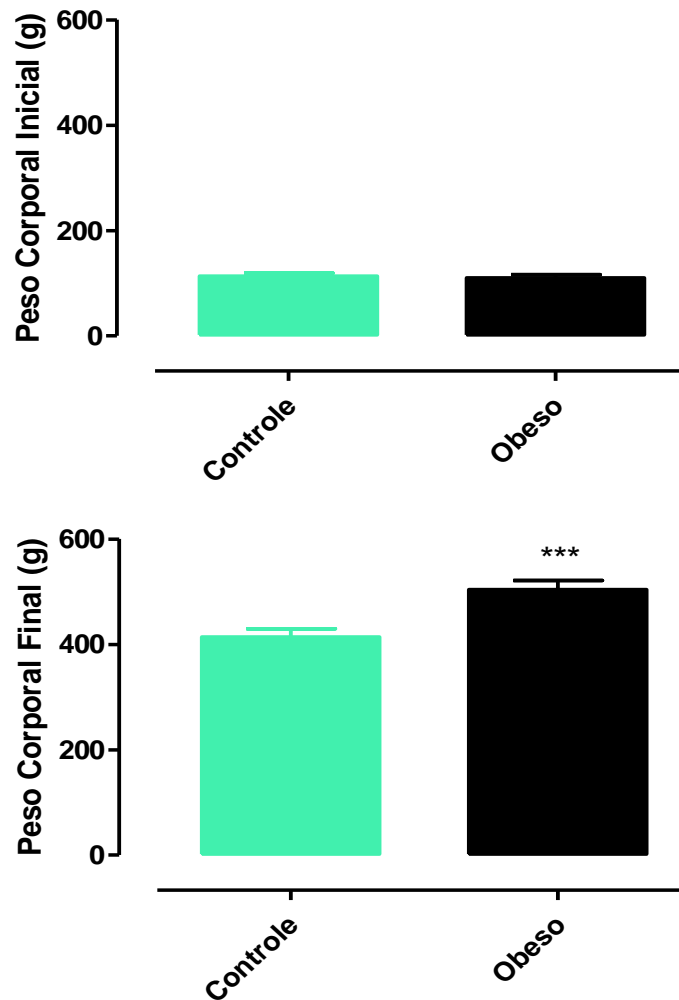


Figura 1. Peso corporal dos ratos dos grupos controle e obesos, antes e após 12 semanas de estudo. Os dados representam a média \pm EPM de 5 ratos. *** $P < 0.001$ comparado ao grupo controle.

5.2. Gordura Epididimal

Em modelos animais de obesidade, a gordura epididimal tem sido correlacionada com a gordura abdominal em humanos. Após o sacrifício, a gordura epididimal foi removida e pesada, como um índice do percentual da gordura corporal. Foi observado que a dieta hiperlipídica associada à frutose produziu aumento significativo da gordura epididimal ($18,76 \pm 2,11$ g para o grupo obeso), quando comparado ao grupo controle ($6,79 \pm 1,20$ g; Figura 1).

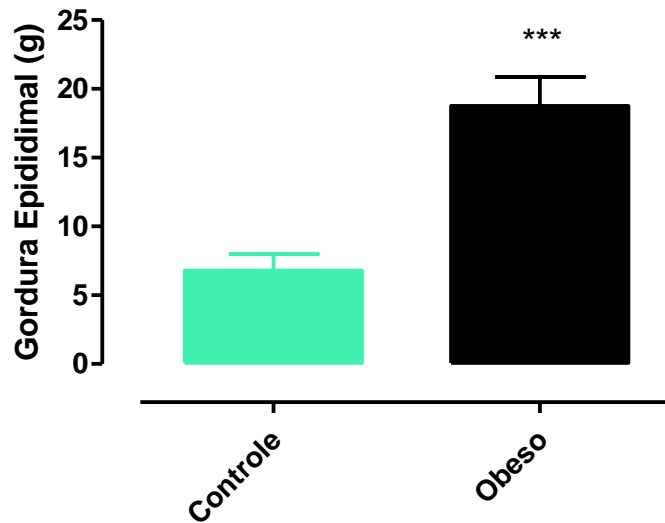


Figura 2. Gordura epididimal dos ratos dos grupos controle e obesos, após 12 semanas de estudo. Os dados representam a média \pm EPM de 5 ratos. ***P<0.001 comparado ao grupo controle.

5.3. Teste de Tolerância à Glicose (TTG)

Ao final do estudo e antes do sacrifício, os animais foram submetidos a um teste de tolerância à glicose. Observamos que a glicemia de jejum foi igual entre os grupos (92 ± 6 e 78 ± 17 mg/dl, para os grupos controle e obeso, respectivamente). Após a sobrecarga com dextrose, a glicemia foi mensurada após 10, 20, 30, 40 e 60 minutos da ingesta. A figura 3 mostra que o perfil da curva glicêmica é igual entre os grupos nos tempos de 10, 20, 30 e 40 minutos. No entanto, após 60 minutos da sobrecarga, a glicemia é significativamente maior no grupo obeso comparado ao grupo controle (Figura 3).

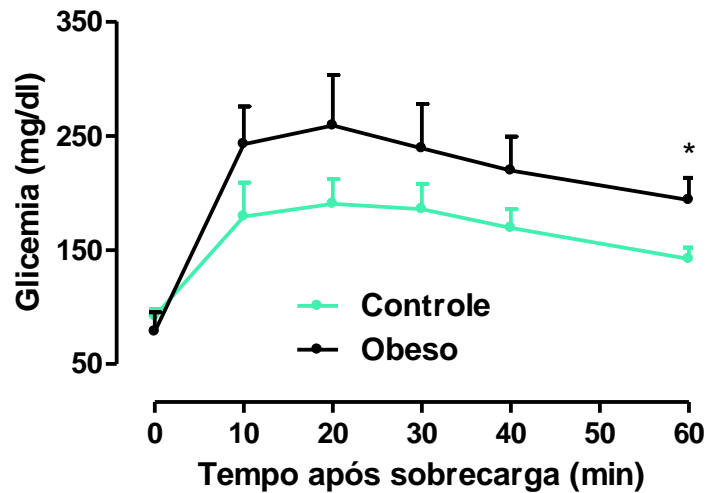


Figura 3. Glicemia de jejum e teste de tolerância à glicose nos ratos controle e obesos. Os dados representam a média \pm EPM de 5 ratos. * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle.

5.4 Avaliação Hematológica

Neste estudo também avaliamos a influência da dieta sobre a composição do sangue dos grupos controle e obesos. Observamos que o grupo obeso apresentou número similar de leucócitos e plaquetas (Figura 4) e redução significativa do número de hemácias, hemoglobina e hematócrito (Figura 5).

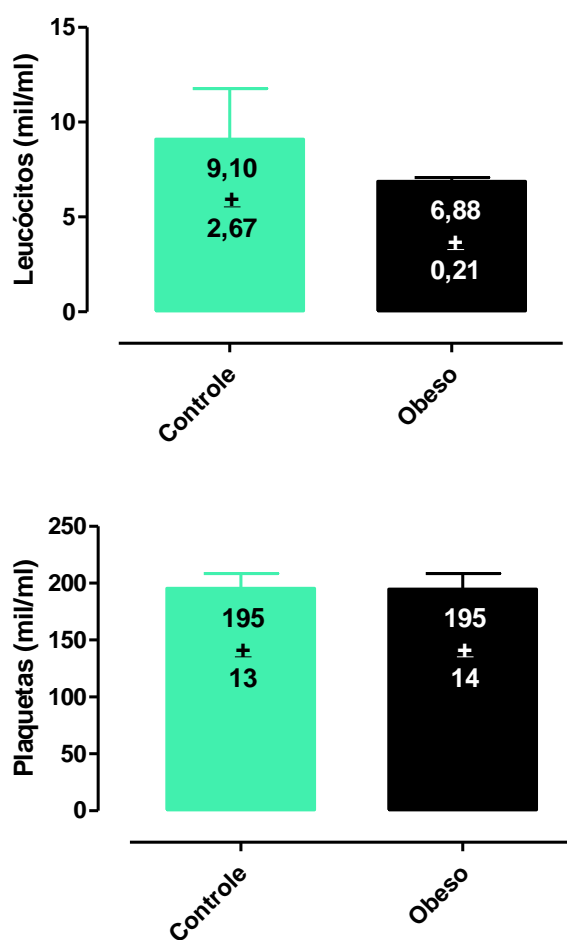


Figura 4. Contagem de leucócitos e plaquetas no sangue de ratos controle e obesos. Os dados representam a média \pm EPM de 4 ratos.

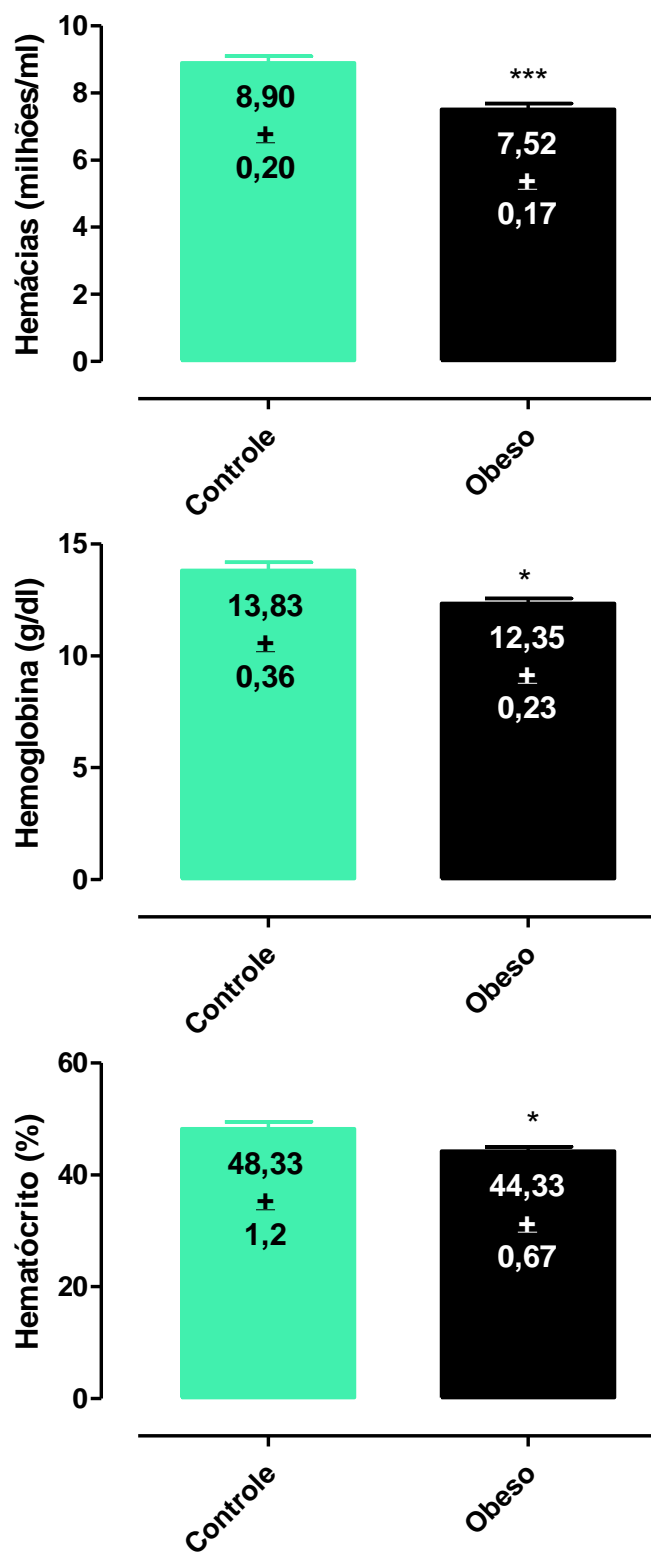


Figura 5. Contagem de hemácias, hemoglobina e hematócrito no sangue de ratos controle e obesos. Os dados representam a média \pm EPM de 4 ratos. * $P < 0.05$ e *** $P < 0.001$ comparado ao grupo controle.

5.5. Perfil Lipídico

Após 12 semanas de tratamento, não foi observada alteração no colesterol total (45 ± 4 e 39 ± 4 mg/dl, para controle e obeso, respectivamente). Entretanto, houve aumento significativo dos triglicérides do grupo obeso (81 ± 6 mg/dl) comparado ao grupo controle (55 ± 6 mg/dl; Figura 6).

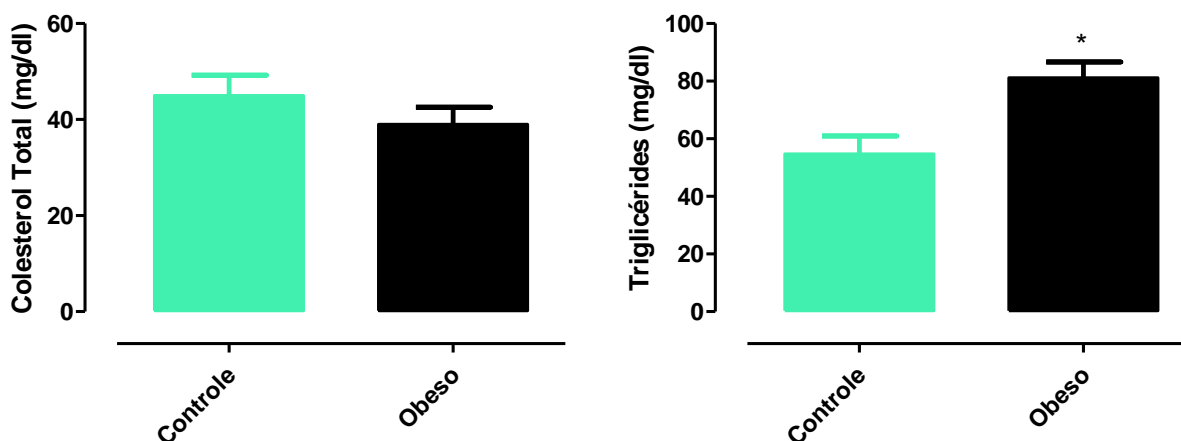


Figura 6. Dosagem do colesterol total e triglicérides. Os dados representam a média \pm EPM de 5 ratos. * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle.

5.6. Reatividade da Artéria Mesentérica e Aorta

A reatividade vascular foi avaliada através do relaxamento dependente de endotélio através da curva concentração-efeito à acetilcolina (1nM – 10 μ M; Figura 7) e do relaxamento independente de endotélio através da dose única de nitropussiato de sódio (1 μ M; Figura 8), na artéria mesentérica e aorta. Observamos que a dieta hiperlipídica associada à frutose produziu redução significativa da potência da acetilcolina na artéria mesentérica, mas não na artéria aorta. Similarmente, a resposta máxima da acetilcolina foi significativamente reduzida na artéria mesentérica do grupo obeso (E_{max} : $52 \pm 12\%$) comparado ao grupo controle (E_{max} : $100 \pm 13\%$). Não houve alteração de resposta máxima à acetilcolina na aorta dos animais (Controle: 95 ± 1 ; Obeso: 67 ± 15).

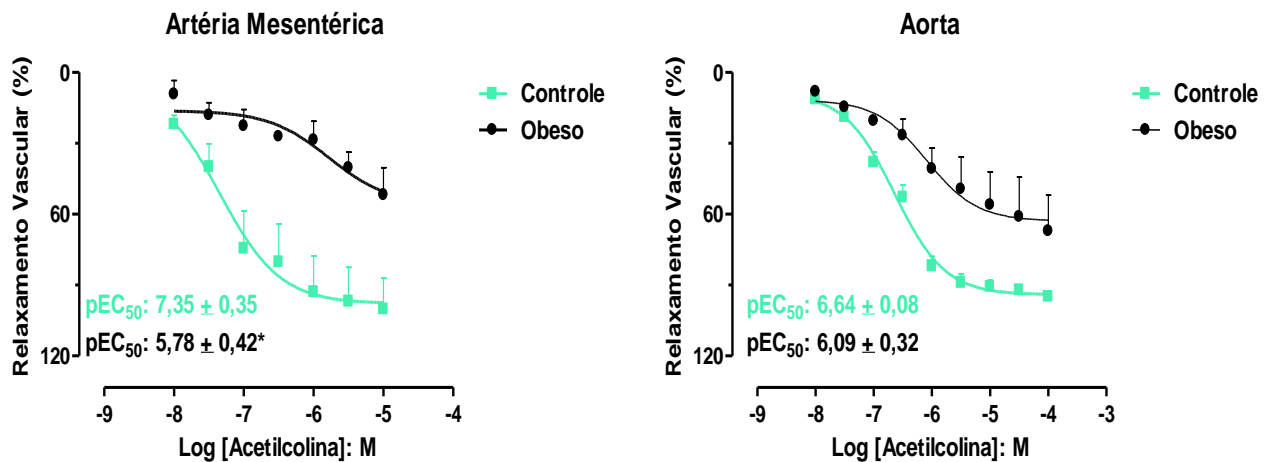


Figura 7. Curva concentração/efeito à acetilcolina nas artérias mesentérica e aorta de ratos controle e obesos. Os dados representam a média \pm EPM de 3 a 4 ratos.

O relaxamento máximo induzido pelo doador de NO, nitropussiato de sódio (SNP) não foi alterado nem na artéria mesentérica nem na aorta dos ratos tratados com a dieta hiperlipídica (Figura 8).

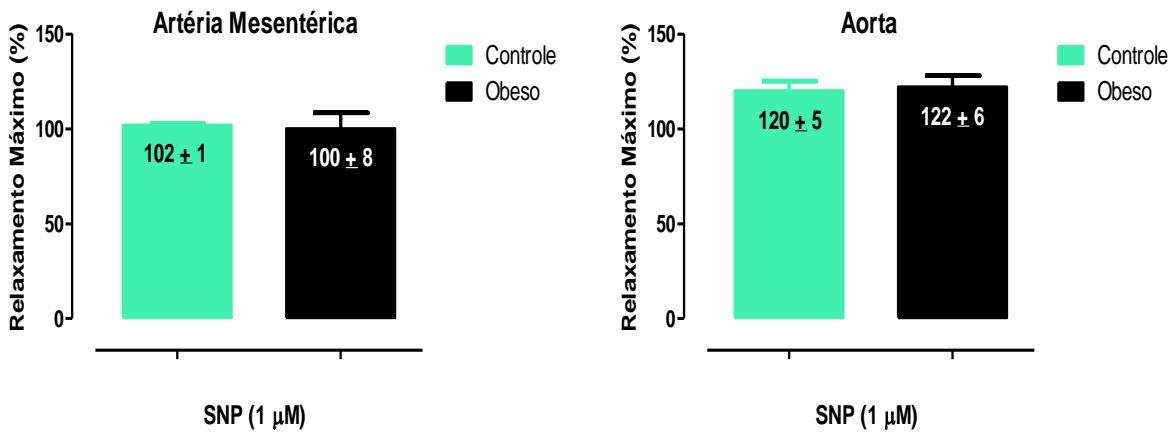


Figura 8. Relaxamento induzido pelo nitropussiato de sódio (SNP) nas artéria mesentérica e aorta de ratos controle e obesos. Os dados representam a média \pm EPM de 3 a 4 ratos.

5.6.1 Avaliação morfológica da artéria mesentérica

Em seguida, avaliamos a morfologia da artéria mesentérica de ratos do grupo controle e obesos. Não foram observadas alterações morfológicas em nenhuma das 3 túnicas da artéria mesentérica no grupo obeso em comparação ao grupo controle.

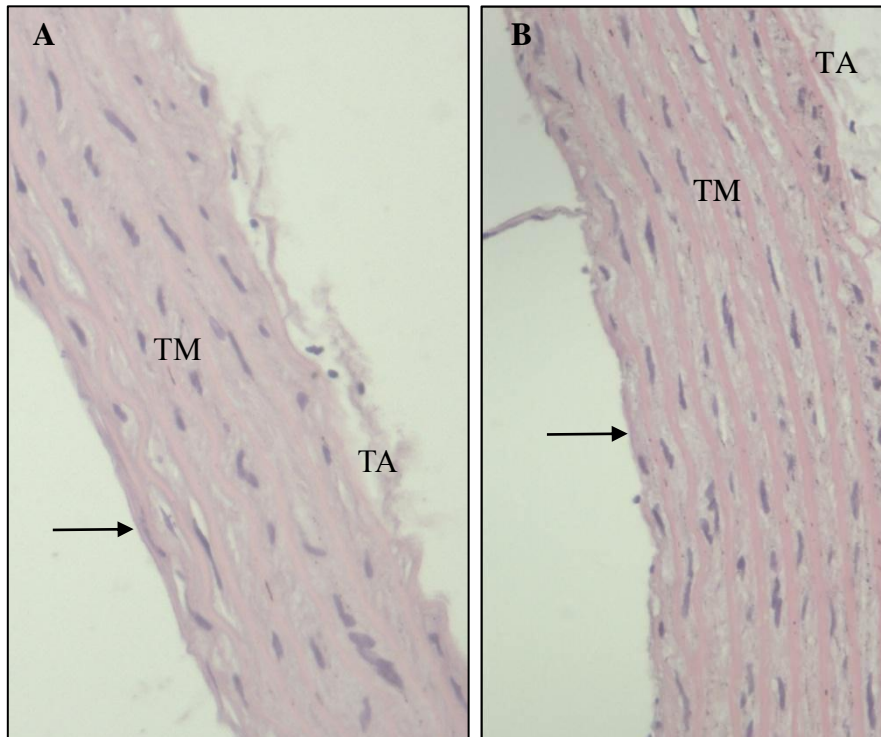


Figura 9. Corte histológico da artéria mesentérica e aorta de ratos controle (A) e obesos (B), mostrando as túnicas íntima (seta - endotélio vascular), média (TM - musculatura lisa vascular) e adventícia (TA - tecido conjuntivo). Aumento de 40x.

5.7 Avaliação da Função Hepática

Foi também avaliado o efeito da dieta hiperlipídica na função hepática dos ratos, através da dosagem dos níveis séricos de albumina e alanina aminotransferase (ALT). Os resultados da figura 9 mostram que a dieta hiperlipídica associada à frutose por 12 semanas não alterou os níveis séricos de albumina e ALT.

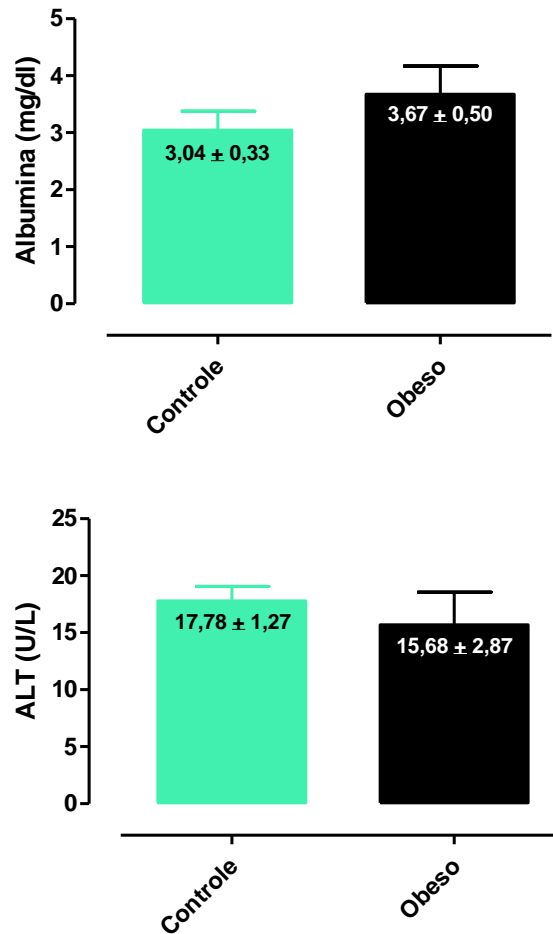


Figura 10. Dosagem do nível plasmático de albumina e alanina aminotransferase (ALT) em ratos controle e obesos, como indicativo da função hepática. Os dados representam a média \pm EPM de 5 ratos.

5.7.1. Avaliação morfológica do fígado

Além da função hepática, foi avaliada a histologia do tecido hepático. Foi observado acúmulo lipídico no fígado dos animais obesos (seta) (Figura 11).

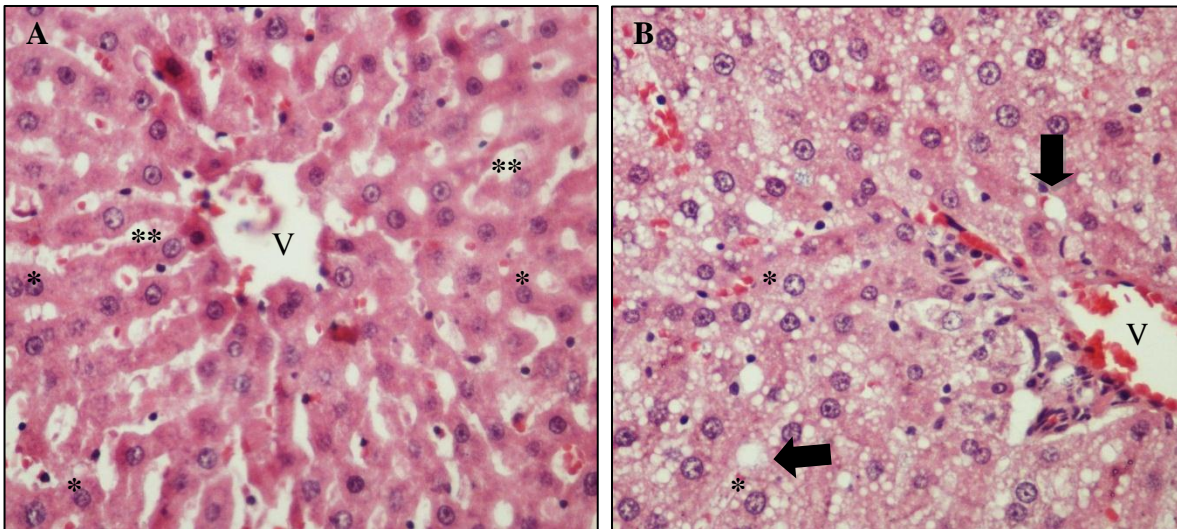


Figura 11. Corte histológico do fígado de ratos controle (A) e obesos (B), mostrando o acúmulo de lipídeos no fígado dos ratos obesos (seta). * Hepatócito, (V) veia centrolobular, ** capilar sinusóide. Aumento de 40x.

5.8. Avaliação da Função Renal

Os níveis plasmáticos de creatinina e ureia foram dosados como índice da função renal para avaliação do efeito da dieta hiperlipídica sobre os rins. Não foram observadas alterações nos níveis plasmáticos de creatinina e ureia (Figura 12).

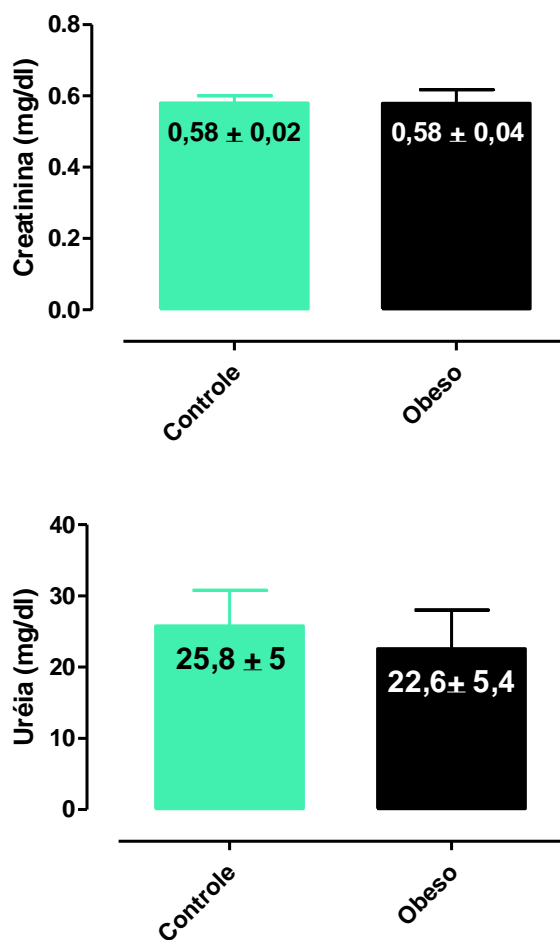


Figura 12. Avaliação da função renal de ratos do grupo controle e obesos. Os dados representam a média ± EPM de 5 ratos.

5.8.1. Avaliação morfológica dos rins

Além da função renal, foi avaliada a histologia dos corpúsculos e glomérulos renais. A dieta hiperlipídica não produziu alteração estrutural no tecido renal avaliado (Figura 13).

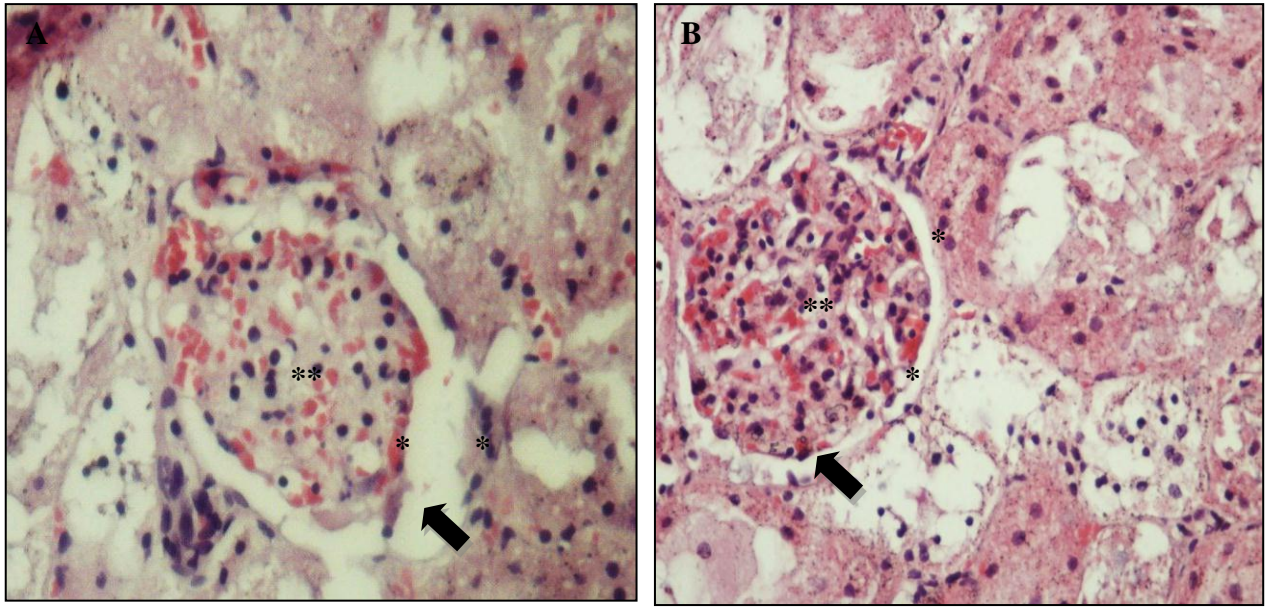


Figura 13. Corte histológico do rim de ratos do grupo controle (A) e obesos (B) mostrando o corpúsculo renal: espaço subcapsular (seta), folheto parietal e visceral da cápsula de Bowman (*), glomérulo renal (**). Aumento de 40x.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos o efeito da obesidade induzida por uma dieta hiperlipídica associada à ingestão de frutose sobre a morfologia e reatividade vascular além de paralelamente avaliar o efeito desta dieta sobre a morfologia e função renal e hepática.

Ao final de 12 semanas de estudo foi observado maior ganho de peso corporal nos animais tratados com a dieta hiperlipídica, mostrando que a dieta hiperlipídica associada à frutose foi capaz de produzir um modelo experimental de obesidade baseado em um balanço energético positivo.

Além disso, após as 12 semanas de dieta e antes do sacrifício, os animais foram mantidos em jejum por 14 horas e então submetidos a um teste de tolerância à glicose. Observamos que a glicemia de jejum foi igual entre os grupos, indicando que o tratamento com a dieta hiperlipídica + frutose por 12 semanas induziu obesidade sem o aparecimento concomitante do diabetes, que seria revelado pela alta glicemia de jejum. Após a sobrecarga com glicose, a glicemia foi mensurada após 10, 20, 30, 40 e 60 minutos. Os resultados revelam que apenas após 60 minutos da sobrecarga, a glicemia é significativamente maior no grupo obeso, sugerindo o início da resistência à insulina após 12 semanas de tratamento com a dieta hiperlipídica + frutose. Isto é de particular interesse para se estudar os efeitos da obesidade, independente dos efeitos do diabetes.

Em modelos animais de obesidade, a gordura epididimal tem sido correlacionada com a gordura abdominal em humanos. Como a gordura abdominal é referência à propensão para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, o aumento da gordura epididimal sugere que este modelo pode ser propício aos distúrbios cardiovasculares decorrentes da obesidade. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese (TENG *et al*, 2011).

Neste estudo também avaliamos a contagem de células vermelhas, hematócrito e hemoglobina, além da contagem de leucócitos e plaquetas. Observamos redução nos parâmetros avaliados da série vermelha, sem alteração no número de leucócitos e plaquetas. Estudo recente demonstra que o tratamento com a eritropoietina, hormônio responsável pela síntese de hemácias, promove menor ganho de peso corporal em modelos de obesidade em camundongos, que possivelmente decorre de alterações no metabolismo da glicose e sensibilidade à insulina (KATZ *et al.*, 2010). Outro estudo mostrou que camundongos com deficiência de receptores de eritropoietina desenvolvem obesidade e resistência à insulina, sugerindo uma relação importante entre células sanguíneas vermelhas, metabolismo energético e composição corporal (TENG *et al*, 2011) e o tratamento com médias e altas

doses eritropoetina melhoram a glicemia de jejum e a tolerância à glicose (FOSKETT *et al.*, 2011). Desta forma, podemos especular que a menor quantidade de hemácias e hemoglobina pode, ao menos em parte, ter um papel importante no ganho de peso destes animais.

Adicionalmente, dietas ricas em carboidratos ou gorduras estão associadas à elevação de lipídeos séricos (TENG *et al.*, 2011). Nossos dados mostram que os ratos tratados com dieta hiperlipídica + frutose apresentaram elevação nos níveis de triglicérides sem alteração na concentração de colesterol total. Embora muitos estudos correlacionem dietas hiperlipídicas e hipercalóricas ao aumento dos lipídeos séricos, outro estudo em ratos mostrou que uma dieta hiperlipídica alterou parâmetros cardiovasculares sem alterar os níveis de colesterol total, das frações HDL e LDL e de triglicérides (ÁGUILA *et al.*, 1997). Nós especulamos que o aumento dos triglicérides observado seja em função do tipo de lipídeo contido na dieta.

A obesidade também representa um risco para o desenvolvimento de doenças renais e hepáticas. O risco de desenvolvimento de doença renal crônica com a obesidade pode ocorrer em função da ocorrência de outras comorbidades, como diabetes mellitus e hipertensão arterial, ou pode ser considerada como fator de risco renal independente (GUEDES *et al.*, 2010). No nosso estudo, nós avaliamos a função renal através da concentração plasmática de creatinina e ureia, produtos de excreção metabólica que são filtradas pelo rim, cujo acúmulo plasmático representa má filtração renal e, portanto, deficiência renal. Também avaliamos a morfologia dos rins. Não foi observada alteração funcional ou morfológica nos rins dos ratos tratados com a dieta hiperlipídica associada à frutose, o que sugere que a ocorrência de lesão renal em consequência da obesidade é tardia e provavelmente secundária a outras ocorrências não observadas neste grupo de animais obesos. Adicionalmente, avaliamos funcional e morfológicamente o fígado dos animais submetidos à dieta hiperlipídica + frutose. Dados da literatura revelam que a obesidade é um importante fator de risco para a doença hepática gordurosa (esteatose) não alcoólica (BITENCOURT *et al.*, 2007). Avaliamos os níveis séricos de albumina e ALT, como marcadores de disfunção hepática. Não foi observada alteração nos níveis de albumina e ALT nos animais submetidos à dieta hiperlipídica. Por outro lado, houve aumento na gordura observada através dos cortes histológicos de fígado dos ratos obesos. Dados com humanos obesos e submetidos à cirurgia bariátrica mostram redução dos níveis séricos de albumina e aumento dos níveis séricos de ALT em fígados com esteatose hepática não alcoólica (BITENCOURT *et al.*, 2007). Nossos dados sugerem o desenvolvimento da esteatose hepática não alcoólica em ratos obesos, mas ainda sem o comprometimento da sua função, que provavelmente é um evento tardio.

Além da função renal e hepática, a reatividade vascular foi avaliada através do relaxamento dependente de endotélio através da curva concentração-efeito à acetilcolina (1nM – 10 μ M) e do relaxamento independente de endotélio através da dose única de nitropussiato de sódio (1 μ M), na artéria mesentérica e aorta. Observamos que a dieta hiperlipídica associada à frutose produziu redução significativa da potência da acetilcolina na artéria mesentérica, mas não na artéria aorta. Similarmente, a resposta máxima da acetilcolina foi significativamente reduzida na artéria mesentérica (mas não na aorta) do grupo obeso. Por outro lado, o relaxamento independente de endotélio produzido pela dose única de nitropussiato de sódio não foi alterado pelo tratamento com a dieta hiperlipídica. Estes dados mostram que a obesidade induziu disfunção vascular que não está associada a danos ou distúrbios na resposta intracelular da musculatura lisa, uma vez que a resposta independente de endotélio não foi prejudicada pelo tratamento com a dieta hiperlipídica. Este dado corrobora estudos prévios que mostram redução do relaxamento dependente do endotélio sem alteração do relaxamento independente de endotélio, em modelos de obesidade (DE MORAES *et al.*, 2007; 2008) e outros modelos de fatores de risco para a doença cardiovascular, como hipertensão arterial (PRIVIERO *et al.*, 2007) e diabetes (ZECCHIN *et al.*, 2008). Adicionalmente, a análise morfológica da artéria mesentérica mostra que a camada média do vaso estava preservada no grupo obeso, comparado ao controle. Além disso, a camada íntima da artéria mesentérica também estava preservada no grupo obeso, o que sugere que o relaxamento dependente do endotélio prejudicado no grupo obeso não está associado a danos na camada endotelial, mas provavelmente a uma redução na biodisponibilidade do óxido nítrico. Estudo prévio mostrou redução dos níveis da enzima antioxidante SOD-1 na artéria mesentérica de ratos tratados com dieta hipercalórica (DE MORAES *et al.*, 2008). Mais estudos avaliando a expressão de enzimas oxidantes e antioxidantes devem ser realizados para tentar elucidar as causas da redução do relaxamento dependente de endotélio.

Em resumo, nossos dados mostram que a dieta hiperlipídica associada à frutose induziu obesidade, associada a um maior acúmulo de tecido adiposo e ao surgimento de esteatose hepática não alcoólica, sem comprometimento da função hepática. Também foi observado um prejudicado relaxamento vascular dependente do endotélio, antes do surgimento do diabetes ou hipercolesterolemia.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, nosso tratamento foi eficiente em produzir um modelo de obesidade em ratos, com disfunção vascular não relacionada à diabetes ou desenvolvimento de aterosclerose. Mais estudos estão sendo realizados para avaliar as alterações estruturais/ morfológicas deste tratamento, no tecido vascular e hepático.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-SOUD HM, YOHO LL, STUEHR DJ (1994) Calmodulin controls neuronal nitric-oxide synthase by a dual mechanism. Activation of intra- and interdomain electron transfer. *J. Biol. Chem.*, **269**: 32047-32050.

ADEAGBO AS, TRIGGLE CR. (1993) Varying extracellular [K⁺]: a functional approach to separating EDHF- and EDNO-related mechanisms in perfused rat mesenteric arterial bed. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **21**: 423-9.

ÁGUILA MB, APFEL MIR, MANDARIM-DE-LACERDA CA. (1997) Comparação Morfológica e Bioquímica entre Ratos Envelhecidos Alimentados com Dieta Hiperlipídica e com Óleo de Canola. *Arq Bras Cardiol*, **68**: 155-161.

BENY JL, BRUNET PC. (1988) Neither nitric oxide nor nitroglycerin accounts for all the characteristics of endothelially mediated vasodilatation of pig coronary arteries. *BloodVessels*, **25**: 308-11.

BITENCOURT AGV, COTRIM HP, ALVES E, ALMEIDA AM, BARBOSA DBV, SANTOS AS, LOBO AP, ATHAYDE LGM, RIOS A, GOUVEIA M, FREITAS LAR (2007) Doença hepática gordurosa não alcoólica: características clínicas e histológicas em obesos graves submetidos à cirurgia bariátrica. *ActaGastroenterol Latinoam*, **37**: 224-230.

BLATTER LA, WIER WG. (1994) Nitric oxide decreases [Ca²⁺]_i in vascular smooth muscle by inhibition of the calcium current. *Cell Calcium*, **15**: 122-31.

BOLTON TB, LANG RJ, TAKEWAKI T. (1984) Mechanisms of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery. *J. Physiol.*, **351**: 549-72.

BOUCHER JL, MOALI C, TENU JP (1999) Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol. Life Sci.*, **55**: 1015-1028.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Obesidade. Brasília. Ministério da Saúde. Cadernos de Atenção Básica, n. 12. Série A. Normas e Manuais Técnicos; 2006. p. 108.

BRAYDEN JE, NELSON MT. (1992) Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science*, **256**: 532-5.

BUECHLER WA, NAKANE M, MURAD F (1991) Expression of soluble guanylatecyclase activity requires both enzyme subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **174**: 351-357.

CARVALHO MHC, COLAÇO AL, FORTES ZB. (2006) Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab*, **50**: 304-312

CHATAIGNEAU T, FELETOU M, DUHAULT J, VANHOUTTE PM. (1998a) Epoxyeicosatrienoic acids, potassium channel blockers and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery. *Br. J. Pharmacol.*, **123**: 574-80.

CHATAIGNEAU T, FELETOU M, THOLLON C, VILLENEUVE N, VILAINE JP, DUHAULT J, VANHOUTTE PM. (1998b) Cannabinoid CB1 receptor and endothelium-dependent hyperpolarization in guinea-pig carotid, rat mesenteric and porcine coronary arteries. *Br. J. Pharmacol.*, **123**: 968-74.

CLAPP LH, GURNEY AM. (1991) Modulation of calcium movements by nitroprusside in isolated vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch.*, **418**: 462-70.

COLLIER J, VALLANCE P (1989) Second messenger role for NO widens to nervous and immune systems. *Trends Pharmacol. Sci.*, **10**: 427-431.

CONDE WL, BORGES C. (2011) O risco de incidência e persistência da obesidade entre adultos brasileiros segundo seu estado nutricional ao final da adolescência. *Rev. Bras Epidemiol*, **14**: 71-79.

CORRIU C, FELETOU M, CANET E, VANHOUTTE PM. (1996) Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *Br. J. Pharmacol.*, **119**: 959-64.

COWAN CL, COHEN RA. (1991) Two mechanisms mediate relaxation by bradykinin of pig coronary artery: NO-dependent and -independent responses. *Am. J. Physiol.*, **261**: H830-5.

- DA SILVA MP, JORGE Z, DOMINGUES A, LACERDA NOBRE E, CHAMBEL P, JACOME DE CASTRO J. (2006) Obesidade e qualidade de vida. *Acta Med Port.*, **19**: 247-9.
- DE MORAES C, CAMARGO EA, ANTUNES E, DE NUCCI G, ZANESCO A. (2007) Reactivity of mesenteric and aortic rings from trained rats fed with high caloric diet. *CompBiochemPhysiol A*,**147**: 788-92.
- DE MORAES C, DAVEL AP, ROSSONI LV, ANTUNES E, ZANESCO A.(2008) Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. *BMC Physiol*, **8**: 12.
- ENES CC, SLATER B. (2010) Obesidade na adolescência e seus principais fatores determinantes. *Rev. Bras. Epidemiol*, 13: 163-171.
- FELDMAN PL, GRIFFITH OW, HONG H & STUEHR DJ (1993) Irreversible inactivation of macrophage and brain nitric oxide synthase by L-NG-methylarginine requires NADPH-dependent hydroxylation. *J. Med. Chem.*, **36**: 491-496.
- FÖRSTERMANN U, BOISSEL JP, KLEINERT H (1998) Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J.*, **12**: 773-790.
- FÖRSTERMANN U, CLOSS EI, POLLOCK JS, NAKANE M, SCHWARZ P, GATH I & KLEINERT H (1994) Nitric oxide synthase isozymes.Characterization, purification, molecular cloning, and functions.*Hypertension*, **23**: 1121-1131.
- FÖRSTERMANN U, KLEINERT H (1995) Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *NaunynSchmiedebergs Arch. Pharmacol.*,**352**: 351-364.
- FOSKETT A, ALNAEELI M, WANG L, TENG R, NOGUCHI CT. (2011) The effects of erythropoietin dose titration during high-fat diet-induced obesity. *J Biomed Biotechnol.*,**2011**: 373781.
- FUKUTO JM, CHAUDHURI G (1995) Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*,**35**: 165-194.

GARCIA-PASCUAL A, LABADIA A, JIMENEZ E, COSTA G. (1995) Endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in bovine oviductal arteries: mediation by nitric oxide and changes in apamin-sensitive K⁺ conductance. *Br. J. Pharmacol.*, **115**: 1221-30.

GARTHWAITE J (1995) Neural nitric oxide signalling. *Trends Neurosci.*, **18**: 51-52.

GERZER R, RADANY EW, GARBERS DL (1982) The separation of the heme and apoheme forms of soluble guanylatecyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**: 678-686.

GUEDES AM, CABRITA A, PINHO AT, SILVA AP, LOPES A, SANTOS V, NEVES PL. (2010) O risco renal da obesidade. *Acta Med Port*, **23**: 853-858

HARTENECK C, KOESLING D, SOLING A, SCHULTZ G, BOHME E (1990) Expression of soluble guanylylcyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits. *FEBS Lett.*, **272**: 221-223.

HARTSHORNE DJ. Biochemistry of the contractile process in smooth muscle. In: Johnson LR, ed. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. New York, NY: Raven Press, 1987: 432-482

HECKER M, BARA AT, BAUERSACHS J, BUSSE R. (1994) Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J. Physiol.*, **481**: 407-14.

HECKER M, BARA AT, BAUERSACHS J, BUSSE R. (1994) Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J. Physiol.*, **481**: 407-14.

HOBBS AJ (1997) Soluble guanylatecyclase: the forgotten sibling. *Trends Pharmacol. Sci.*, **18**: 484-491.

IGNARRO LJ, DEGNAN JN, BARICOS WH, KADOWITZ PJ, WOLIN MS (1982) Activation of purified guanylatecyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. *Biochim. Biophys. Acta*, **718**: 49-59.

IGNARRO LJ, MURAD F (eds), *Nitric Oxide: Biochemistry, Molecular Biology, and Therapeutic Implications*. Advances in Pharmacology, Volume 34, pp. 1-516, Academic Press, 1995.

- ILLIANO S, NAGAO T, VANHOUTTE PM. (1992) Calmidazolium, a calmodulin inhibitor, inhibits endothelium-dependent relaxations resistant to nitro-L-arginine in the canine coronary artery. *Br. J. Pharmacol.*, **107**: 387-92.
- KATZ O, STUIBLE M, GOLISHEVSKI N, LIFSHITZ L, TREMBLAY ML, GASSMANN M, MITTELMAN M, NEUMANN D. (2010) Erythropoietin treatment leads to reduced blood glucose levels and body mass: insights from murine models. *J Endocrinol.*,**205**: 87-95.
- KERWIN JF JR, LANCASTER JR JR, FELDMAN PL (1995) Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J. Med. Chem.*, **38**: 4343-4362.
- KNOWLES RG, MONCADA S (1994) Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem. J.*, **298**: 249-258.
- KOESLING D, BOHME E, SCHULTZ G (1991) Guanylylcyclases, a growing family of signal-transducing enzymes.*FASEB J.*, **5**: 2785-2791.
- KUBOTA Y, NOMURA M, KAMM KE, MUMBY MC, STULL JT. (1992) GTP gamma S-dependent regulation of smooth muscle contractile elements. *Am J Physiol.*, **262**: C405-10.
- LEE MR, LI L, KITAZAWA T. (1997) Cyclic GMP causes Ca²⁺ desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem.*, **272**: 5063-8.
- LUCAS KA, PITARI GM, KAZEROUNIAN S, RUIZ-STEWART I, PARK J, SCHULZ S, CHEPENIK KP & WALDMAN SA (2000) Guanylylcyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol. Rev.*, **52**: 375-414.
- MARANO G, PALAZZESI S, FADDA A, VERGARI A, FERRARI AU. (2002) Attenuation of aortic banding-induced cardiac hypertrophy by propranolol is independent of beta-adrenoceptor blockade. *J Hypertens.*,**20**: 763-9.
- MARLETTA MA (1988) Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents.*Chem. Res. Toxicol.*, **1**: 249-257.
- MARLETTA MA (1993) Nitric oxide synthase structure and mechanism.*J. Biol. Chem.*, **268**: 12231-12234.

- MARLETTA MA, YOON PS, IYENGAR R, LEAF CD & WISHNOK JS (1988) Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*, **27**: 8706-8711.
- MATSUOKA A, STUEHR DJ, OLSON JS, CLARK P & IKEDA-SAITO M (1994) L-arginine and calmodulin regulation of the heme iron reactivity in neuronal nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, **269**: 20335-20339.
- MAYER B, ANDREW P (1998) Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. *NaunynSchmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **358**: 127-133.
- MISSIAEN L, WUYTACK F, RAEYMAEKERS L, DE SMEDT H, DROOGMANS G, DECLERCK I, CASTEELS R. (1991) Ca²⁺ extrusion across plasma membrane and Ca²⁺ uptake by intracellular stores. *PharmacolTher.* **50**: 191-232.
- MONCADA S, PALMER RMJ & HIGGS EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, **43**: 109-142.
- MUGGE A, LOPEZ JA, PIEGORS DJ, BREESE KR, HEISTAD DD. (1991) Acetylcholine-induced vasodilatation in rabbit hindlimb in vivo is not inhibited by analogues of L-arginine. *Am. J. Physiol.*, **260**: H242-7.
- MURPHY ME, BRAYDEN JE. (1995) Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. *J. Physiol.*, **486**: 47-58.
- NAGAO T, ILLIANO S, VANHOUTTE PM. (1992) Heterogeneous distribution of endothelium-dependent relaxations resistant to NG-nitro-L-arginine in rats. *Am. J. Physiol.*, **263**: H1090-4.
- NAGAO T, VANHOUTTE PM. (1992a) Characterization of endothelium-dependent relaxations resistant to nitro-L-arginine in the porcine coronary artery. *Br. J. Pharmacol.*, **107**: 1102-7.
- NAGAO T, VANHOUTTE PM. (1992b) Hyperpolarization as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery. *J. Physiol.*, **445**: 355-67.
- NELSON MT, QUAYLE JM. (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, **268**: C799-822.

- NILSSON H, JENSEN PE, MULVANY MJ. (1994) Minor role for direct adrenoceptor-mediated calcium entry in rat mesenteric small arteries. *J. Vasc. Res.*, **31**: 314-21.
- OHLSTEIN EH, WOOD KS, IGNARRO LJ (1982) Purification and properties of heme-deficient hepatic soluble guanylatecyclase: effects of heme and other factors on enzyme activation by NO, NO-heme, and protoporphyrin IX. *Arch. Biochem. Biophys.*, **218**: 187-198.
- PRIVIERO FB, TEIXEIRA CE, CLAUDINO MA, DE NUCCI G, ZANESCO A, ANTUNES E. (2007) Vascular effects of long-term propranolol administration after chronic nitric oxide blockade. *Eur J Pharmacol.*, **571**: 189-96.
- RAPOPORT RM, MURAD F (1983) Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ. Res.*, **52**: 352-357.
- RICHARD V, TANNER FC, TSCHUDI M, LUSCHER TF. (1990) Different activation of L-arginine pathway by bradykinin, serotonin, and clonidine in coronary arteries. *Am. J. Physiol.*, **259**: H1433-9.
- RINALDI W, RIBEIRO TAS, MARQUES AS, *et al.* (2012) Efeito da redução de ninhada sobre as respostas autonômicas e metabólicas de ratos Wistar. *Rev. Nutr.* **25**: 321-330.
- SANTOS AA, CARVALHO CC, CHAVES ECL, GOYATÁ SLT. (2012) Qualidade de pessoas com obesidade grau III: um desafio comportamental. *Rev. Soc. Bras. Clín.Méd*, **10**: 384-389.
- SCHULZ S, YUEN OS, GARBERS DL (1991) The expanding family of guanylylcyclases. *Trends Pharmacol. Sci.*, **12**: 116-120.
- SIMARD JM, LI X, TEWARI K. (1998) Increase in functional Ca²⁺ channels in cerebral smooth muscle with renal hypertension. *Circ Res.*, **82**: 1330-7.
- SIMARD JM, LI X. (2000) Functional integrity of endothelium determines Ca²⁺ channel availability in smooth muscle: involvement of nitric oxide. *Pflugers Arch*, **439**: 752-8.
- SOMLYO AP, SOMLYO AV. (1994) Smooth muscle: excitation-contraction coupling, contractile regulation, and the cross-bridge cycle. *Alcohol ClinExp Res.*, **18**: 138-43.

- SOMLYO AP, SOMLYO AV. (2000) Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol.*, **522**: 177-85.
- SOUZA CA, CARDOSO FL, SILVEIRA RA, WILTTKOPF PG. (2011) Importância do Exercício Físico no Tratamento da Disfunção Erétil. *Rev. Bras Cardiol.*, **24**: 180-185
- STONE JR, MARLETTA MA. (1994) Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry*, **33**: 5636-40.
- STONE JR, SANDS RH, DUNHAM WR, MARLETTA MA. (1995) Electron paramagnetic resonance spectral evidence for the formation of a pentacoordinated nitrosyl-heme complex on soluble guanylate cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **207**: 572-7.
- TAKEO S, ELMOSELHI AB, GOEL R, SENTEX E, WANG J, DHALLA NS. (2000) Attenuation of changes in sarcoplasmic reticular gene expression in cardiac hypertrophy by propranolol and verapamil. *Mol Cell Biochem.*, **213**: 111-8.
- TAYLOR SH. (1988a) Celiprolol in hypertension. *Am Heart J.*, **116**: 1426-34.
- TAYLOR SH. (1988b) Celiprolol and the heart. *Am. J. Cardiol.* **61**: 34C-40C.
- TENG R, GAVRILOVA O, SUZUKI N, CHANTURIYA T, SCHIMEL D, HUGENDUBLER L, MAMMEN S, YVER DR, CUSHMAN SW, MUELLER E, YAMAMOTO M, HSU LL, NOGUCHI CT. (2011) Disrupted erythropoietin signalling promotes obesity and alters hypothalamus proopiomelanocortin production. *Nat Commun.*, **2**: 520.
- TEWARI K, SIMARD JM. (1997) Sodium nitroprusside and cGMP decrease Ca²⁺ channel availability in basilar artery smooth muscle cells. *Pflugers Arch.*, **433**: 304-11.
- TRAYLOR TG, SHARMA VS (1992) Why NO? *Biochemistry*, **31**: 2847-2849.
- VAN DE VOORDE J, VANHEEL B, LEUSEN I. (1992) Endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in aorta from control and renal hypertensive rats. *Circ. Res.*, **70**: 1-8.

WALDMAN SA, MURAD F (1987) Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol. Rev.*, **39**: 163-196.

WEBB RC (2003) Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv. Physiol. Educ.*, **27**: 201-6.

WEDEL B, HUMBERT P, HARTENECK C, FOERSTER J, MALKEWITZ J, BOHME E, SCHULTZ G & KOESLING D (1994) Mutation of His-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylylcyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 2592-2596.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Body mass index classification – report of a WHO consultation on obesity. Geneva: WHO; 1995. Technical Report Series 854.

WU X, SOMLYO AV, SOMLYO AP. (1996) Cyclic GMP-dependent stimulation reverses G-protein-coupled inhibition of smooth muscle myosin light chain phosphate. *BiochemBiophys Res Commun.*, **220**: 658-63.

XIAO YF, MCARDLE JJ. (1994) Elevated density and altered pharmacologic properties of myocardial calcium current of the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens.*, **12**: 783-90.

ZECCHIN HG, PRIVIERO FB, SOUZA CT, ZECCHIN KG, PRADA PO, CARVALHEIRA JB, VELLOSO LA, ANTUNES E, SAAD MJ. Defective insulin and acetylcholine induction of endothelial cell-nitric oxide synthase through insulin receptor substrate/Akt signaling pathway in aorta of obese rats. *Diabetes*. 2007 Apr;56(4):1014-24.

ZYGMUNT PM, GRUNDEMAR L, HOGESTATT ED. (1994) Endothelium-dependent relaxation resistant to N omega-nitro-L-arginine in the rat hepatic artery and aorta. *Acta Physiol. Scand.*, **152**: 107-14.