

UNESP - Universidade Estadual Paulista
"Julio de Mesquita Filho"
Campus de Botucatu

Priscila Cristina Pereira

**Efeitos da obesidade induzida por dieta
sobre a resposta vascular adaptativa ao
estresse agudo em ratos**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Cordellini

Botucatu - SP

2011

UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Julio de Mesquita Filho”
Campus de Botucatu

Priscila Cristina Pereira

Efeitos da obesidade induzida por dieta sobre a resposta vascular adaptativa ao estresse agudo em ratos

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências de Botucatu, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para a
obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas (Área de Concentração: Farmacologia)

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Cordellini

**Botucatu - SP
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Pereira, Priscila Cristina.

Efeitos da obesidade induzida por dieta sobre a resposta vascular adaptativa
ao estresse agudo em ratos / Priscila Cristina Pereira. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista, 2011

Orientadora: Sandra Cordellini

Capes: 21002002

1. Obesidade. 2. Rato. 3. Endotélio vascular.

Palavras-chave: Dieta hipercalórica; Endotélio; Estresse agudo; Obesidade;
Reatividade vascular.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

*Aos meus pais, **Edson e Lúcia**, que compartilharam os meus ideais e os
alimentaram me incentivando sempre a prosseguir;*

*Ao meu irmão **Junior** pelo companheirismo e pelos momentos
de distração;*

*Ao meu namorado **Ronney** pela compreensão,
paciência, motivação, apoio e ajuda em
todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

A Deus, pois sem Ele nada disso seria possível;

A minha orientadora, professora Dra Sandra Cordellini, não só pela constante orientação neste trabalho e pelas oportunidades de crescimento geradas, mas, sobretudo pela sua amizade, compreensão, apoio, paciência e carinho de mãe que por vezes superaram o papel de orientadora;

Ao professor Dr. Antônio Carlos Cicogna por suas contribuições e por ter disponibilizado o biotério da Clínica Médica;

A minha amiga Rafaela que se tornou mais do que uma irmã para mim, agradeço por todos os momentos que passamos juntas;

Aos meus colegas do laboratório, Rafaela, Thiago, Nathalia, Martina e Amanda que contribuíram direta ou indiretamente para a construção deste trabalho;

Aos docentes do Departamento de Farmacologia da UNESP pelas contribuições em minha formação.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia e da Clínica Médica;

A CAPES, pela bolsa de Mestrado.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher”

Cora Coralina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Foto das dietas hipercalóricas utilizadas para a indução da obesidade.	31
Figura 2-	Foto do tubo metálico com o rato contido em seu interior.	35
Figura 3-	Evolução do peso corpóreo dos animais submetidos às dietas padrão e dieta hipercalórica durante 15 semanas.	47
Figura 4-	Ingestão calórica semanal de ratos que receberam dieta padrão e dieta hipercalórica durante 15 semanas.	48
Figura 5-	Pressão arterial sistólica caudal realizada durante as 15 semanas de indução de obesidade.	49
Figura 6-	Teste de tolerância à insulina dos animais submetidos às dietas padrão e dieta hipercalórica durante 15 semanas	50
Figura 7-	Teste de tolerância à glicose dos animais submetidos às dietas padrão e dieta hipercalórica durante 15 semanas.	51
Figura 8-	Curvas concentração-efeito à noradrenalina obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, da mesma aorta torácica isolada de ratos controles e obesos submetidos ou não ao estresse agudo de imobilização.	52
Figura 9-	Curvas concentração-efeito a noradrenalina obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, da mesma aorta torácica isolada de ratos controles e obesos submetidos ou não ao estresse agudo de imobilização na presença de L-NAME (3×10^{-4} M).	54
Figura 10-	Curvas concentração-efeito a noradrenalina obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, da mesma aorta torácica isolada de ratos controles e obesos submetidos ou não ao estresse agudo de imobilização na presença de prazosim (10^{-8} M).	56
Figura 11-	Curvas concentração-efeito ao cálcio obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, da mesma aorta torácica isolada de ratos controles e obesos submetidos ou não ao estresse agudo de imobilização.	58
Figura 12-	Curvas concentração-efeito ao KCl obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, da mesma aorta torácica isolada de ratos controles e obesos submetidos ou não ao estresse agudo de imobilização.	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Composição de macro e micronutrientes das rações (%).....	32
Quadro 2-	Perfil de aminoácidos das rações (%).....	33
Quadro 3-	Perfil de carboidratos das rações (%).....	34

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Perfil nutricional dos grupos de animais que receberam dieta padrão e dieta hipercalórica durante 15 semanas. **46**
- Tabela 2-** Valores médios da resposta máxima e concentração eficaz 50% à noradrenalina em curvas concentração-efeito obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, da mesma aorta torácica isolada de ratos machos adultos controles e obesos submetidos ou não ao estresse agudo de imobilização. **53**
- Tabela 3-** Valores médios da resposta máxima e concentração eficaz 50% à noradrenalina em curvas concentração-efeito obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, na presença de L-NAME da mesma aorta torácica isolada de ratos machos adultos controles e obesos submetidos ou não ao estresse agudo de imobilização. **55**
- Tabela 4-** Valores médios da resposta máxima e concentração eficaz 50% à noradrenalina em curvas concentração-efeito obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, na presença de prazosim da mesma aorta torácica isolada de ratos machos adultos controles e obesos submetidos ou não ao estresse agudo de imobilização. **57**
- Tabela 5-** Valores médios da resposta máxima e concentração eficaz 50% ao cálcio em curvas concentração-efeito obtidas em dois anéis, com e sem endotélio da mesma aorta torácica isolada de ratos machos adultos controles e obesos submetidos ou não ao estresse agudo de imobilização. **59**
- Tabela 6-** Valores médios da resposta máxima e concentração eficaz 50% ao KCl em curvas concentração-efeito obtidas em dois anéis, com e sem endotélio da mesma aorta torácica isolada de ratos machos adultos controles e obesos submetidos ou não ao estresse agudo de imobilização. **61**

A obesidade, assim como o estresse, constituem-se em fatores de risco para a mortalidade e morbidade cardiovasculares. Embora haja relatos sobre alterações de reatividade vascular em indivíduos obesos e expostos ao estresse, isoladamente, torna-se imprescindível, para a avaliação de risco cardiovascular, o conhecimento da resposta vascular adaptativa ao estresse em condição de obesidade estabelecida. Assim, o objetivo foi avaliar os efeitos da obesidade induzida por dieta sobre a resposta vascular adaptativa ao estresse agudo de imobilização em ratos adultos. Para tanto, foram utilizados ratos machos Wistar, separados em 4 grupos: controle e estresse que receberam dieta padrão; e obeso e obeso/estresse que receberam dieta hipercalórica durante 15 semanas. A obesidade foi determinada pelo índice de adiposidade: $[(\text{gorduras epididimal} + \text{retroperitoneal} + \text{visceral}) / \text{peso corpóreo final}] \times 100$. O peso corpóreo foi avaliado semanalmente. O consumo das dietas foi calculado diariamente para a determinação da ingestão alimentar, ingestão calórica e eficiência alimentar. A pressão arterial sistólica foi aferida durante o protocolo de obesidade. Foi realizado também o teste de tolerância à insulina e à glicose. Após o período de 15 semanas os animais do grupo estresse e obeso/estresse foram submetidos ao estresse agudo de imobilização por 2 horas. Imediatamente após o término da sessão de estresse, os animais foram decapitados e a aorta torácica, as gorduras epididimal, retroperitoneal e visceral foram retiradas. Curvas à noradrenalina, na presença ou ausência de prazosin ou L-NAME, curvas ao KCl e curvas ao cálcio foram obtidas em anéis de aorta torácica, com (+E) e sem endotélio (-E). Avaliou-se a reatividade vascular: resposta máxima (RM) e concentração eficaz de 50% (EC50). O índice de adiposidade, a ingestão calórica, a eficiência alimentar, e o peso das gorduras epididimal, retroperitoneal e visceral foram maiores nos animais que ingeriram a dieta hipercalórica. A obesidade não determinou alterações de pressão arterial e do perfil glicêmico avaliado no teste de tolerância à insulina e à glicose. O estresse, mas não a obesidade, determinou diminuição da RM à noradrenalina em aorta +E, sem alterar os valores de EC50. A obesidade e a presença de L-NAME, mas não a presença de prazosin, aboliram as alterações de RM à noradrenalina induzidas pelo estresse. O estresse determinou resposta vascular adaptativa, caracterizada por hiporreatividade à noradrenalina, dependente da integridade do endotélio e abolida pela obesidade. Esta resposta adaptativa resultou, provavelmente, de um aumento da atividade do sistema óxido nítrico endotelial via ativação de adrenocetores- α_2 pela noradrenalina e ativação dos canais de K_{Ca} endoteliais pelo óxido nítrico. Ainda, o aumento na biodisponibilidade do óxido nítrico parece resultar em uma diminuição do Ca^{2+} intracelular através da estimulação da Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático independente de GMPc. A capacidade de gerenciar a resposta vascular ao estresse mostra-se comprometida em condição de obesidade estabelecida o que pode resultar em aumento do risco cardiovascular nessas condições em associação.

Palavras-chave: obesidade, dieta hipercalórica, estresse agudo, reatividade vascular, endotélio.

ABSTRACT

Obesity, as well as stress, constitute a risk factors for cardiovascular morbidity and mortality. Although there are reports on vascular reactivity alterations in obese subjects and those exposed to stress, isolated, it becomes essential for the cardiovascular risk assessment, the knowledge of the circulatory adaptation to acute stress and its mechanisms in subjects with established obesity. Thus, the objective was to evaluate the effects of diet-induced obesity on vascular adaptive response to acute immobilization stress in adult rats. In this way, male Wistar rats were separated into 4 groups: control and stressed that received standard diet, and obese and obese/stress that received high calorie diet during 15 weeks. Obesity was determined by the adiposity index: [(epididymal fat + retroperitoneal fat + visceral fat) / final body weight] x100. Body weight was measured weekly. The consumption of diets was calculated daily to determine food intake, energy intake and feed efficiency. Systolic blood pressure was measured during the protocol of obesity. The glicemic profile was investigated by the glucose tolerance test and the insulin resistance test. After 15 weeks the animals in group stress and obese/stress were subjected to acute immobilization stress for 2 hours. The animals were decapitated and the thoracic aorta, epididymal fat, retroperitoneal fat and visceral fat were removed. Curves to noradrenaline, in the absence or presence of prazosin or L-NAME, KCl and calcium were obtained in rings of thoracic aorta with (+E) and without endothelium (-E). We evaluated the vascular reactivity: maximum response (MR) and effective concentration 50% (EC50). The index of adiposity, calorie intake, feed efficiency and weight of epididymal fat, retroperitoneal and visceral fat were higher in rats consuming the high calorie diet. Obesity did not determine changes in blood pressure and glucose profile measured in tolerance insulin and glucose tests. Stress, but not obesity, measurement change from RM to noradrenaline in aorta +E, without altering the EC50 values. Obesity and the presence of L-NAME, but not the presence of prazosin, abolished the changes of RM to noradrenaline induced by stress. This vascular adaptive response to stress was shown to be dependent on endothelium integrity and seems to be a result of increased endothelial nitric oxide activation through α_2 -adrenoceptors and subsequent activation of K_{Ca} channels by the endothelial nitric oxide. Moreover, the increase in nitric oxide bioavailability induces decrease in intracellular Ca^{2+} through sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase stimulation, independent of cGMP. In conclusion, the way to cope with the vascular response to stress is impaired in established obesity, resulting in increased cardiovascular risk during these conditions in association.

Keywords: obesity, diet hipercaloric, acute stress, vascular reactivity, endothelium.

Introdução.....	22
Objetivos.....	28
Material e Métodos.....	30
Animais experimentais.....	30
Indução da obesidade.....	30
<i>Composição das rações padrão e hipercalórica.....</i>	<i>31</i>
Indução do estresse - Imobilização aguda.....	34
Perfil nutricional.....	35
<i>Peso e gordura corporal.....</i>	<i>35</i>
<i>Caracterização da obesidade.....</i>	<i>36</i>
<i>Ingestão calórica e eficiência alimentar.....</i>	<i>36</i>
Pressão arterial sistólica.....	36
Resistência à insulina.....	37
Intolerância à glicose.....	38
Reatividade vascular.....	38
Análise estatística.....	39
Resultados.....	42
Discussão.....	63
Conclusões.....	71
Referências Bibliográficas.....	73

A obesidade é uma doença crônica metabólica caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo em relação à massa magra tecidual, tal doença pode afetar desfavoravelmente a saúde. Atualmente a obesidade é vista como um dos maiores problemas de saúde pública e não se acha confinada apenas em países da Europa e América, mas também na Ásia, África e Oceania, ou seja, afeta tanto países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (Kopelman, 2000; O' Brien and Dixon, 2002; Ogden, 2006). O número de indivíduos com sobrepeso vem crescendo mundialmente e já representa mais de um bilhão de pessoas, desta população mais de 30% podem ser consideradas obesas (World Health Organization, 2006). No Brasil, aproximadamente 40 milhões de pessoas apresentam sobrepeso, e dentre elas 10,5 milhões são obesas. Estima-se que em 2020 mais de 20% da população do Brasil estará acima do peso, sendo que nos Estados Unidos a situação é ainda mais grave e poderá chegar a mais de 40% (Kopelman, 2000; IBGE, 2003).

A obesidade está vinculada ao aumento da mortalidade (Flegal et al., 2007) redução na expectativa de vida (Fontaine, 2003) e pode acarretar em diversas disfunções: diabetes mellitus tipo 2, aumento de certos tipos de câncer, complicações respiratórias (apnéia do sono), osteoartrites (Kopelman, 2000) aumento de leptina plasmática (Kuniyoshi et al., 2003), dislipidemia (Kopelman and Albon, 1997), doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, fibrilação atrial (Malnick and Knobler, 2006; Poirier et al., 2006), retenção de sódio e expansão do fluído extracelular (Hall, 1997; Pawloski et al., 1992).

A elevação da demanda metabólica induzida pelo excesso de peso corporal causa alterações hemodinâmicas, como aumento da frequência cardíaca, do volume total sanguíneo, do retorno venoso, do débito cardíaco e alterações vasculares (Schmieder and Messerli, 1987; Poirier et al., 2006). Dentre as alterações vasculares estão: a redução de óxido nítrico (NO), o aumento de endotelina-1 e a alteração de músculo liso vascular tanto a agentes vasoconstritores quanto vasodilatadores (Acree et al., 2007). A disfunção endotelial está relacionada com a resistência à insulina, que acarreta diminuição da biodisponibilidade de NO (Hsueh and Quinones, 2003). O grau de disfunção endotelial é proporcional a severidade da resistência à insulina (Schnyder et al., 2001). Estudos desenvolvidos em animais mostraram que a dieta hipercalórica provoca alterações no perfil lipídico e acarreta um desequilíbrio nas respostas vasculares de relaxamento (Naderali et al., 2001). Corroborando estes achados, Moraes et al. (2008) mostraram disfunção nas respostas à acetilcolina em anéis de artéria mesentérica. Ainda, Fatani et al. (2007) relataram que animais expostos à alimentação hipercalórica desenvolvem hiperreatividade vascular à noradrenalina.

A angiotensina II (ANG II) é um importante fator para desenvolvimento da hipertensão e o aumento do efeito vasoconstritor e dos níveis plasmáticos de ANG II tem sido mostrado em humanos e animais obesos (Jeunemaitre et al., 1992; Nielsen et al., 2004; Zhang et al., 2005). Ratos submetidos à dieta hipercalórica mostraram um aumento de reatividade da aorta à ANG II (Mundy et al., 2007). Ainda, indivíduos obesos mostram atividade nervosa simpática aumentada e fluxo sanguíneo muscular diminuído (Ribeiro et al., 2001). Estas

evidências sugerem a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e do sistema nervoso autônomo simpático como chave dos mecanismos da hipertensão arterial na obesidade e de outras desordens cardiometabólicas (Sharma and Engeli, 2006). Atualmente, a obesidade é reconhecida como uma das maiores causas da hipertensão arterial, e o ganho de peso pode determinar importantes variações na resposta pressórica (Hall et al., 2000).

O estresse é um componente inevitável da vida humana e, assim como a obesidade, se constitui num fator de risco para a mortalidade e morbidade cardiovasculares (Wilson et al., 2002; Player et al., 2007). Entre as respostas adaptativas ao estresse são descritos: diminuição da reatividade vascular à noradrenalina (Manukhina et al., 1991; Navarro-Oliveira et al., 2000) e reatividade aumentada à acetilcolina (Cordellini and Vassilieff, 1998) diminuição dos níveis de arginina no plasma (Milakofsky et al., 1993), aumento do RNAm para a óxido nítrico sintase (NOS) no núcleo paraventricular e córtex da adrenal em ratos (Calzá et al., 1993; Tsuchiya et al., 1997) e aumento da biodisponibilidade de NO na circulação renal de coelhos (De Moraes et al., 2004). As alterações de reatividade vascular induzidas pelo estresse mostram-se dependentes da integridade do endotélio e da hiperatividade do sistema óxido nítrico endotelial (Cordellini and Vassilieff, 1998; Navarro-Oliveira et al., 2000; Lanza Júnior et al., 2007).

A literatura relata que, na presença de obesidade associada, as respostas fisiológicas e comportamentais ao estresse podem estar aumentadas, reduzidas, ou mesmo inalteradas quando comparadas às respostas na ausência desta condição (Levin et al., 2000; Buwalda et al., 2001; Agapitov et

al., 2002; Legendre and Harris, 2006; Benson et al., 2008). Devido a estes dados conflitantes, a relação entre o estresse e a obesidade merece maiores considerações, principalmente no que diz respeito à resposta vascular.

Com exceção de alguns estudos, poucos são os dados abordando possíveis efeitos da obesidade sobre as respostas cardiovasculares adaptativas ao estresse. Dentre estes efeitos foram descritos: recuperação tardia da frequência cardíaca e da pressão diastólica pós-estresse em mulheres obesas (Benson et al., 2008) e ratos espontaneamente hipertensos (Sedová et al., 2004); e aumento da atividade do nervo simpático muscular e da resistência vascular durante o estresse mental em indivíduos obesos (Kuniyoshi et al., 2003). Estes resultados sugerem que a obesidade pode alterar significativamente o impacto de experiências estressogênicas sobre o sistema cardiovascular. Entretanto, os mecanismos envolvidos nestas alterações permanecem por ser elucidados.

Investigações abordando os efeitos da obesidade sobre as respostas cardiovasculares adaptativas ao estresse em uma amostra de indivíduos suficientemente grande para produzir resultados significativos tornam-se por vezes impraticável. Mesmo podendo ser realizada, esta investigação demanda muito tempo antes dos resultados estarem disponíveis. Em tais situações, um modelo animal representa uma alternativa racional para o estudo dos efeitos da obesidade sobre a resposta vascular adaptativa ao estresse e, embora não possa ser utilizado para fazer declarações inequívocas sobre os efeitos em seres humanos, pode acrescentar de forma significativa para o conjunto de evidências. Dessa maneira, o *National Institutes of Health* - USA, 2004

reconhece a relevância de pesquisas em modelos animais para diferentes aspectos da obesidade. Seu plano estratégico para pesquisas nesta área inclui a seguinte meta: "uso de modelos animais para determinar se a redução sustentada de peso corpóreo após obesidade estabelecida afeta a morbidade e a mortalidade, bem como o papel de macro e micronutrientes na dieta sobre o metabolismo energético, vias de regulação centrais, apetite, composição corpórea, entre outros". Ainda, a obesidade induzida por dieta em ratos tem se mostrado útil como modelo para a obesidade humana, uma vez que estes animais compartilham muitas características da obesidade em humanos (Levin et al., 1997).

Pelo exposto, o presente estudo tem por objetivo investigar possíveis alterações na resposta vascular adaptativa ao estresse em ratos obesos e não obesos e assim determinar se a habilidade de gerenciar o estresse difere em condição de obesidade. Tal estudo poderá contribuir para a avaliação de risco cardiovascular nestas condições em associação.

Investigar os efeitos da obesidade induzida por dieta sobre a resposta vascular adaptativa ao estresse agudo de imobilização em ratos. Ainda, avançar na compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta vascular adaptativa ao estresse de ratos obesos e não obesos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com 30-45 dias de idade, condicionados ao laboratório e provenientes do Biotério da UNESP-Botucatu. Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura controlada ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro (12-12 h). As ofertas de ração e água foram *ad libitum*.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do IB-UNESP-Botucatu (protocolo 102/2009-CEEA), por estarem de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Indução da obesidade

Ratos de 30-45 dias pesando 150 g em média foram, ao acaso, separados em 04 grupos: controle, estresse, obeso, obeso/estresse. Os animais dos grupos controle e estresse receberam, a partir deste momento, ração padrão (RC Focus 1765) e os do grupo obeso e obeso/estresse receberam um ciclo de 04 dietas hipercalóricas (RC Focus 2413, 2414, 2415 e 2416, Agrocere®, Rio Claro, São Paulo, Brasil) nos sabores: queijo, chocolate, bacon e baunilha (Figura 1) que foram oferecidas de forma rotativa diária durante 15 semanas. O protocolo alimentar foi adaptado de resultados obtidos no Laboratório Experimental de Cardiologia do Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antônio Carlos Cicogna. O consumo das dietas foi controlado diariamente.



Figura 1- Foto das dietas hipercalóricas utilizadas para a indução da obesidade

Composição das rações padrão e hipercalórica

As rações experimentais estão de acordo com as especificações do guia “Nutrient requirements of the laboratory rat” (The National Academy of Sciences, 1995) para ratos de laboratório. As dietas idealizadas no Laboratório Experimental de Cardiologia do Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, foram padronizadas pela empresa Agrocere[®] Nutrição Animal, Rio Claro, SP, Brasil. A ração padrão RC Focus 1765 é composta dos seguintes ingredientes: fosfato bicálcico, óleo de soja degomado, cloreto de sódio, milho moído, aditivo antioxidante, farelo de soja, farelo de trigo, farinha de carne e ossos, farinha de peixe, premix mineral e vitamínico. As quatro dietas hipercalóricas apresentam a mesma composição nutricional, sendo constituídas de cloreto de sódio, caseína, soro de leite em pó, concentrado protéico de soja, milho integral moído, farinha de bolacha, fosfato bicálcico, carbonato de cálcio, aditivo emulsificante, óleo de milho, aditivos antioxidante, premix mineral e vitamínico, entretanto diferem entre si pelo composto flavorizante adicionado (queijo, chocolate, bacon e baunilha). A

análise nutricional foi realizada no Laboratório de Bromatologia (Agrocere[®] Nutrição Animal, Rio Claro, SP, Brasil) e estão apresentadas nos quadros a seguir:

Quadro 1- Macronutrientes e micronutrientes das rações (%)

Componentes	Rações	
	Padrão	Hipercalórica*
Proteína	22,0	20,0
Carboidrato	42,7	26,4
Gordura	4,0	20,0
Minerais	9,0	10,0
Fibras	8,0	9,0
Umidade	12,0	12,5
Cálcio	1,5	1,4
Fósforo	0,8	0,7
Calorias (Kcal/g)	2,95	3,65
% Calorias da proteína	29,8	21,9
% Calorias do carboidrato	57,9	28,9
% Calorias da gordura	12,3	49,2

*A dieta hipercalórica foi composta por rações hipercalóricas idênticas nutricionalmente, com exceção do aditivo flavorizante adicionado (queijo, bacon, chocolate ou baunilha).

Quadro 2- Perfil de aminoácidos das rações (%)

Aminoácidos	Rações	
	Padrão	Hipercalórica
Ácido Aspártico	10,81	9,92
Ácido Glutâmico	20,12	18,99
Serina	5,23	5,06
Glicina	4,48	4,32
Histidina	2,50	2,43
Arginina	7,47	7,07
Treonina	3,38	4,01
Alanina	4,53	4,69
Prolina	5,93	5,80
Tirosina	3,34	3,48
Valina	5,05	5,33
Metionina	1,89	2,43
Cistina	1,63	1,85
Isoleucina	4,22	4,38
Leucina	7,78	7,96
Fenilalanina	5,01	5,01
Lisina	5,62	6,59
Triptofano	1,01	0,68

Quadro 3- Perfil de carboidratos das rações (%)

Carboidratos	Rações	
	Padrão	Hipercalórica
Raffinose	1,74	0,81
Maltose	1,07	1,60
Glicose Livre	0,82	1,63
Glicose	46,58	42,37
Frutose Livre	0,62	0,96
Frutose	20,93	16,46
Sacarose	8,83	11,57
Lactose	0,65	4,48
Fucose	0,17	0,15
Arabinose	5,55	6,78
Galactose	4,55	6,08
Xilose	5,47	4,27
Rhamnose	0,22	0,26
Manose	2,80	2,58

Indução do estresse - imobilização aguda

Ao final das 15 semanas, os grupos de animais estresse e obeso/estresse foram contidos, individualmente, em tubos metálicos à temperatura ambiente de 25°C, por 2h (Figura 2). Nesta condição há uma intensa restrição dos movimentos do animal, permanecendo somente os movimentos respiratórios. A exposição aguda em sessão única ao estresse foi realizada entre 11:00 e 13:00 h. Durante o período da sessão de estresse, os animais que não foram submetidos ao estresse (controle e obeso) permaneceram em suas gaiolas à temperatura ambiente de 25° C, sem ração e água. Ao término da sessão os

animais foram mortos em guilhotina para a remoção da gordura corporal e aorta torácica.



Figura 2- Foto do tubo metálico com o rato contido em seu interior

Perfil nutricional

Peso e gordura corporal

O peso e a gordura corporal foram utilizados para a determinação do índice de adiposidade. O peso corporal foi avaliado antes do início da introdução das dietas, padrão e hipercalórica, e semanalmente até a morte dos animais utilizando-se uma balança digital Mettler® modelo Spider 2 (Toledo do Brasil Industria de Balanças Ltda, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil). A gordura corporal dos ratos de todos os grupos foi analisada ao final das 15 semanas de indução da obesidade. Após os animais serem decapitados, os tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e visceral foram dissecados e pesados. A gordura corporal total foi caracterizada pela soma dos três depósitos de gordura.

Caracterização da obesidade

A obesidade foi determinada utilizando-se o índice de adiposidade. O índice de adiposidade foi calculado através da relação: gordura corporal total x 100/peso corporal final. Diversos autores utilizam este índice para avaliar a quantidade de gordura corporal em roedores (Levin et al., 2000; Carroll et al., 2006; Boustany-Kari et al., 2007). Este método é facilmente realizado e permite analisar os depósitos de gordura corporal de maneira consistente.

Ingestão calórica e eficiência alimentar

A ingestão calórica refere-se à quantidade em kcal consumida pelo animal. Este parâmetro é obtido multiplicando-se o consumo semanal de ração pelo valor calórico de cada dieta, respectivamente, 2,95 e 3,65 kcal para a dieta padrão e hipercalórica.

A eficiência alimentar reflete a relação entre a energia ingerida e aquela estocada. Assim, este parâmetro foi calculado considerando-se a soma total das gorduras (visceral, epididimal e retroperitoneal) ÷ ingestão calórica total.

Pressão arterial sistólica

Levando-se em consideração que os animais obesos podem apresentar hipertensão arterial sistêmica (Dobrian et al., 2000; Boustany et al., 2004; Smith et al., 2006) foi mensurada a pressão arterial sistólica (PAS). A PAS foi aferida indiretamente por plestimografia de cauda, utilizando-se electro-sphygmomanometer, Narco Bio-System®, modelo 709-0610 (International Biomedical, Inc, USA). Com a finalidade de produzir vasodilatação da artéria

caudal, os ratos foram previamente aquecidos, a temperatura de 40°C por 5 minutos, em uma caixa de madeira (50 x 40 cm) forrada com maravalha de Pinus autoclavada. Após o aquecimento, foi acoplado o sensor e o manguito em torno da cauda do animal. O manguito foi insuflado até atingir pressão de 200 mmHg e, posteriormente, desinsuflado. As pulsações arteriais foram registradas em polígrafo Gould RS 3200 (Gould Instrumenta Valley View, Ohio, USA). A PAS foi aferida 5 momentos durante o período de indução da obesidade. O valor da PAS considerado foi a média de três registros consecutivos obtidos a intervalos de 1 minuto.

Resistência sistêmica à insulina

Como os animais obesos podem apresentar resistência à ação da insulina (Akiyama et al., 1996; Relling et al., 2006; Smith et al., 2006), foi analisado o perfil glicêmico após uma sobrecarga de insulina. A partir deste teste foi possível constatar se os ratos obesos apresentavam níveis glicêmicos elevados em relação ao grupo de animais que ingeriram dieta padrão após infusão de insulina. As coletas sanguíneas, na artéria caudal, foram realizadas na condição basal após um período de jejum de 6 horas e após administração intraperitoneal de insulina regular (Novolin® R, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark), equivalente a 1,5 UI/kg. As amostras sanguíneas foram coletadas nos momentos 0, considerado condição basal e após 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos da administração da insulina. A mensuração dos níveis glicêmicos foi realizada com glicosímetro portátil Accu-Chek GO Kit (Roche Diagnostic Brazil Ltda, Sao Paulo, Brasil).

Intolerância à glicose

Como os animais obesos podem apresentar níveis glicêmicos normais em condições basais, foi analisado o perfil glicêmico após uma sobrecarga de glicose. A partir deste teste foi possível constatar se os ratos obesos desenvolveram intolerância a glicose, isto é, se apresentavam níveis de glicemia elevados em relação ao grupo que ingeriu dieta padrão após a sobrecarga de glicose. As coletas de sangue, na artéria caudal, foram realizadas na condição basal após um período de jejum de 6 horas e após administração intraperitoneal de glicose 25% (Sigma-Aldrich,® St Louis, MO, USA), equivalente a 2 g/kg. As amostras sanguíneas foram coletadas nos momentos 0, considerado condição basal, e após 15, 30, 60, 90, 120 e 240 minutos da infusão da glicose. A mensuração dos níveis glicêmicos foi realizada com glicosímetro portátil Accu-Chek Go Kit (Roche Diagnostic Brazil Ltda, São Paulo, Brasil).

Reatividade Vascular

Após serem mortos por decapitação, os animais foram submetidos a uma toracotomia, e em seguida procedeu-se ao isolamento da aorta torácica. Após a remoção do tecido adiposo, a aorta foi subdividida em quatro anéis. Indistintamente, dois dos anéis tiveram os endotélios removidos mecanicamente. Os anéis foram suspensos, em cuba para órgão isolado, contendo solução de Krebs-Henseleit modificado (composição em mM: NaCl 113,0; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄ 1,1; NaHCO₃ 25,0; Glicose 11,0; ácido ascórbico 0,11). A solução nutriente foi mantida a 37,0 ± 0,5°C e

saturada com carbogênio (95% O₂, 5% CO₂). Os anéis foram conectados a transdutores de força isométricos, acoplados a um fisiógrafo (Ugo Basile).

O período de estabilização foi de 1h, sob uma tensão inicial de 1,5 g mantida ao longo de todo o experimento, com trocas de solução nutriente e ajuste de tensão a cada 15 min. Ao se completar o período de estabilização de 1h, curvas concentração-efeito (CCEs) à noradrenalina (10⁻¹¹ a 10⁻⁴ M) foram obtidas em anéis de aorta isolados de ratos agrupados nos grupos: controle, obeso, estresse e estresse/obeso. Quando pertinente, CCE à noradrenalina foram obtidas na presença de prazosim (10⁻⁸ M, antagonista reversível específico dos receptores α_1 -adrenérgicos) ou N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 3x10⁻⁴ M, inibidor inespecífico da óxido nítrico sintase, NOS), adicionados nos últimos 30 minutos do período de estabilização. Ao final das CCEs à noradrenalina doses únicas de ACh (10⁻⁶ M) e nitroprussiato de sódio (NP 10⁻⁴ M) foram utilizadas para testar a integridade da célula endotelial e da camada muscular lisa, respectivamente. As preparações foram lavadas e transcorridos 45 min após o término da 1ª CCE à NA, CCEs ao cálcio (0,2 a 10 mM) ou ao KCl (1 a 10 mM) foram obtidas.

Para estudar o papel do endotélio, as respostas aos agentes vasoconstritores foram obtidas em anéis de aorta com (+E) e sem (-E) endotélio, estudados em paralelo.

Análise estatística

O peso corpóreo, a ingestão alimentar, a ingestão calórica, a eficiência alimentar, as gorduras epididimal, retroperitoneal e visceral, gordura total e

índice de adiposidade, foram submetidos ao teste "t" de Student para amostras independentes (Norman, 1994).

A comparação do perfil glicêmico entre os grupos, visualizado tanto pelo teste de tolerância a insulina quanto pelo teste de tolerância a glicose, foi realizada pela análise de variância (ANOVA) no modelo de medidas repetidas para esquema de dois fatores independentes e complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni (Bayley, 1977).

A reatividade vascular foi avaliada através das alterações da resposta máxima e potência (concentração eficaz 50% - CE50) do tecido aos agentes vasoconstritores em experimentos individuais. A CE50 é definida como a concentração molar do agonista responsável pela obtenção de um efeito igual a 50% do efeito máximo. As CE50s foram medidas por determinação gráfica e as médias apresentadas como antilogaritmo da média aritmética dos log CE50 de cada experimento, com os respectivos intervalos de confiança (IC) de 95%.

A reatividade vascular (resposta máxima e CE50%) aos agentes vasoativos de aorta de ratos machos adultos foi comparada através da análise de variância multifatorial, com teste a posteriori de Tukey (SIGMASTAT 3.2). Os fatores para análise foram obesidade e exposição ao estresse agudo. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) ou intervalo de confiança de 95%, para a reatividade vascular e CE50% respectivamente. $P < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa.

Indução da obesidade

Considerando que o protocolo de indução de obesidade foi o mesmo utilizado para os grupos obeso e obeso/estresse, e que o estresse ocorreu somente após o final deste protocolo, os resultados referentes à obesidade foram agrupados de acordo com a dieta que os animais consumiram. Sendo assim, os grupos controle e estresse foram agrupados e denominados como “dieta padrão” e os animais dos grupos obeso e obeso/estresse como “dieta hipercalórica”.

A dieta hipercalórica mostrou-se eficiente em induzir a obesidade. O índice de adiposidade foi maior para os animais que ingeriram a dieta hipercalórica em relação aos animais que receberam a dieta padrão (Tabela 1).

Perfil nutricional

A Tabela 1 mostra o perfil nutricional dos animais que receberam dieta padrão (controle e estresse) e dieta hipercalórica (obeso e obeso/estresse).

Durante todo protocolo de indução de obesidade os animais dos grupos obeso e obeso/estresse ingeriram menor quantidade de dieta hipercalórica em relação à quantidade de dieta padrão consumida pelos animais dos grupos controle e estresse (Tabela 1). Entretanto, a ingestão calórica mostrou-se aumentada em ratos que receberam a dieta hipercalórica durante as 15 semanas em relação aos animais que consumiram a dieta padrão no mesmo período (Tabela 1, Figura 4). Além disso, a eficiência alimentar nos animais obeso e obeso/estresse foi estatisticamente maior em relação aos animais que ingeriram dieta padrão.

O peso corporal dos animais que foram submetidos ao protocolo de indução de obesidade atingiu valores superiores a partir da 6ª semana em relação aos animais que ingeriram dieta padrão e, manteve-se aumentado até o final das 15 semanas (Figura 3).

A dieta hipercalórica induziu aumento nos depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral, resultando em um aumento estatisticamente significativo na gordura corporal total dos animais do grupo obeso e obeso/estresse em relação aos animais que ingeriram dieta padrão (Tabela 1).

Efeitos da obesidade sobre a pressão arterial sistólica

A pressão arterial dos animais que ingeriram dieta hipercalórica não diferiu dos animais que consumiram dieta padrão durante o protocolo de indução de obesidade e ao término do mesmo (Figura 5). Assim, a obesidade induzida por dieta hipercalórica durante 15 semanas não acarretou em hipertensão arterial.

Efeitos da obesidade sobre o perfil glicêmico após sobrecarga de insulina

A figura 6 mostra o resultado do teste de tolerância à insulina, realizado nos grupos que receberam dieta padrão e dieta hipercalórica. A obesidade não alterou os níveis glicêmicos basais e também não alterou os níveis de glicose após a administração intraperitoneal de insulina.

Efeitos da obesidade sobre o perfil glicêmico após sobrecarga de glicose

A figura 7 mostra o resultado do teste de tolerância à glicose, realizado nos grupos que receberam dieta padrão e dieta hipercalórica. A obesidade não determinou alterações nos níveis glicêmicos basais e após a administração intraperitoneal de glicose.

Efeitos da obesidade associada ou não ao estresse agudo sobre a reatividade vascular de ratos machos adultos

A remoção do endotélio determinou desvio à esquerda da CCE e aumento de resposta máxima à noradrenalina que atingiu valores semelhantes em todos os protocolos experimentais.

Em anéis de aorta +E, o estresse agudo determinou redução da resposta máxima à noradrenalina sem alteração dos valores de EC50 (Figura 8 e Tabela 2). Contrariamente, nenhuma alteração de reatividade a este agente foi observada em aorta +E de ratos obesos submetidos ou não ao estresse (Figura 8 e Tabela 2). A análise multifatorial revelou interação entre os fatores, obesidade e estresse, para a resposta à noradrenalina.

A presença de L-NAME aboliu as alterações de resposta máxima à NA induzida pelo estresse em anéis de aorta +E (Figura 9 e Tabela 3). Ainda, a presença deste inibidor determinou desvio à esquerda da CCE e aumento de resposta máxima à noradrenalina em aorta +E, atingindo valores semelhantes em todos os grupos experimentais (Figura 9 e Tabela 3).

A presença do prazosim determinou desvio à direita da CCEs à noradrenalina em anéis de aorta com +E que atingiu valores semelhantes em

todos os grupos experimentais (Figura 10 e Tabela 4). Este bloqueador determinou ainda decréscimo da resposta máxima à NA em aorta +E de todos os grupos experimentais. Entretanto, a diferença de resposta máxima à noradrenalina observada na ausência de bloqueador em aorta com +E de ratos estressados quando comparada aos demais grupos não foi afetada pela presença de prazosim (Figura 10 e Tabela 4).

Independentemente da presença do endotélio, nenhuma alteração de reatividade (resposta máxima e CE50) ao cálcio foi observada entre os diferentes grupos experimentais (Figura 11 e Tabela 5).

Em anéis de aorta +E, o estresse agudo determinou redução da resposta máxima ao KCl sem alteração dos valores de EC50 (Figura 12 e Tabela 6). Contrariamente, nenhuma alteração de reatividade a este agente foi observada em aorta +E de ratos obesos submetidos ou não ao estresse (Figura 12 e Tabela 6). A análise multifatorial revelou interação entre os fatores, obesidade e estresse, para a resposta ao KCl.

Tabela 1. Perfil nutricional dos grupos de animais que receberam dieta padrão e dieta hipercalórica durante 15 semanas.

	Dieta Padrão	Dieta Hipercalórica
Peso corporal final (g)	474,63 ($\pm$ 7,12)	500,80 ($\pm$ 9,11)*
Ingestão alimentar (g/dia)	27,25 ($\pm$ 0,24)	23,44 ($\pm$ 0,31)*
Ingestão calórica (kcal/dia)	55,21 ($\pm$ 0,73)	62,27 ($\pm$ 1,37)*
Eficiência alimentar x 10³(g/kcal)	4,33 ($\pm$ 0,15)	5,22 ($\pm$ 0,30)*
Gordura visceral (g)	8,04 ($\pm$ 0,32)	10,12 ($\pm$ 0,71)*
Gordura epididimal (g)	8,63 ($\pm$ 0,35)	11,35 ($\pm$ 0,80)*
Gordura retroperitoneal (g)	8,47 ($\pm$ 0,47)	12,82 ($\pm$ 1,10)*
Gordura corporal total (g)	25,14 ($\pm$ 1,03)	34,30 ($\pm$ 2,48)*
Índice de adiposidade (%)	5,28 ($\pm$ 0,17)	6,75 ($\pm$ 0,35)*

Os dados representam a média $\pm$ EPM. Número de animais = 31 - 32. *P < 0,05

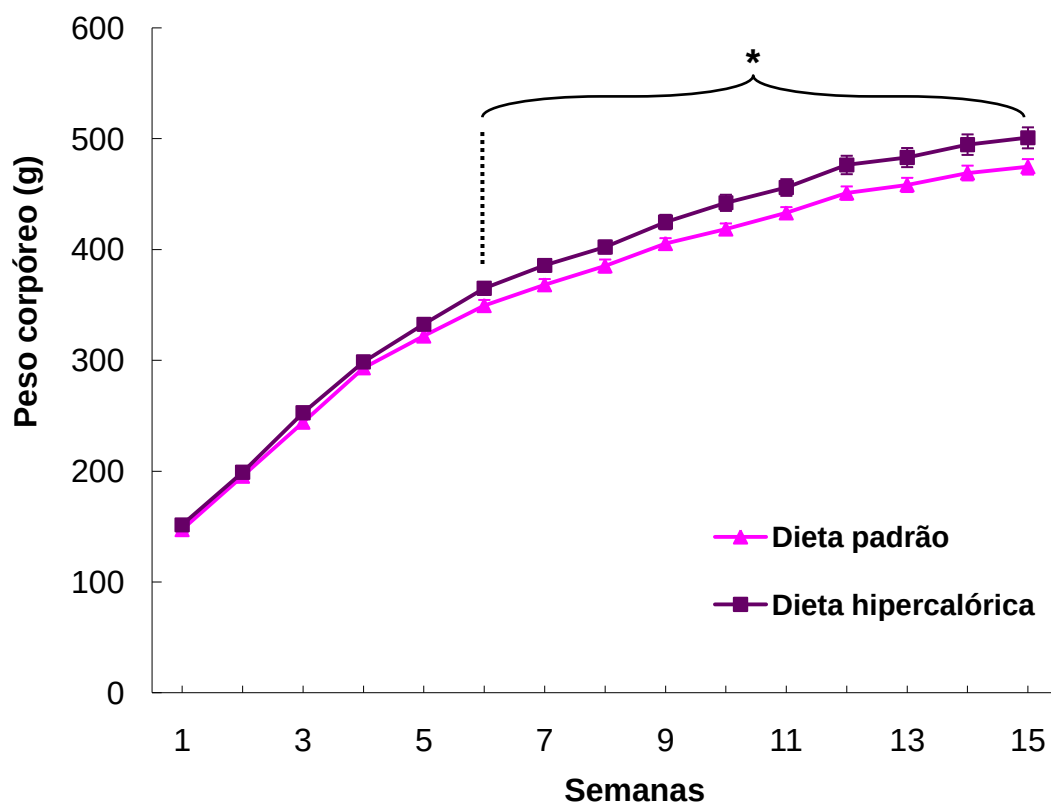


Figura 3. Evolução do peso corpóreo dos animais submetidos às dietas padrão ou dieta hipercalórica durante 15 semanas. Os valores são expressos em média $\pm$ EPM. Número de animais = 31- 32. * $P < 0,05$

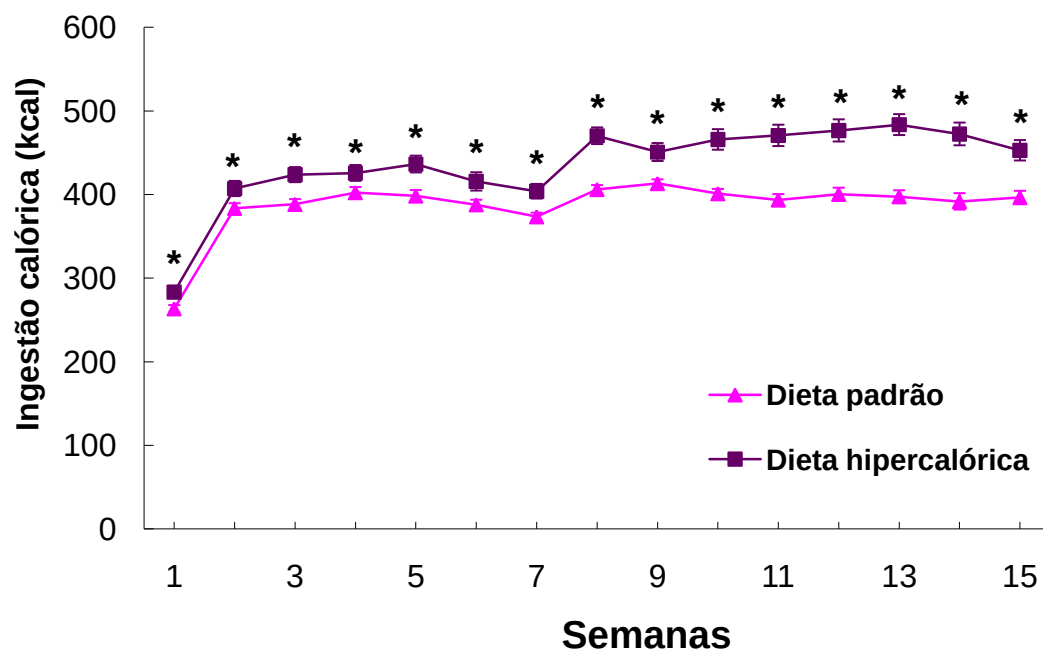


Figura 4. Ingestão calórica semanal de ratos que receberam dieta padrão ou dieta hipercalórica durante 15 semanas. Os valores representam a média $\pm$ EPM. Número de animais = 31-32. * $P < 0,05$

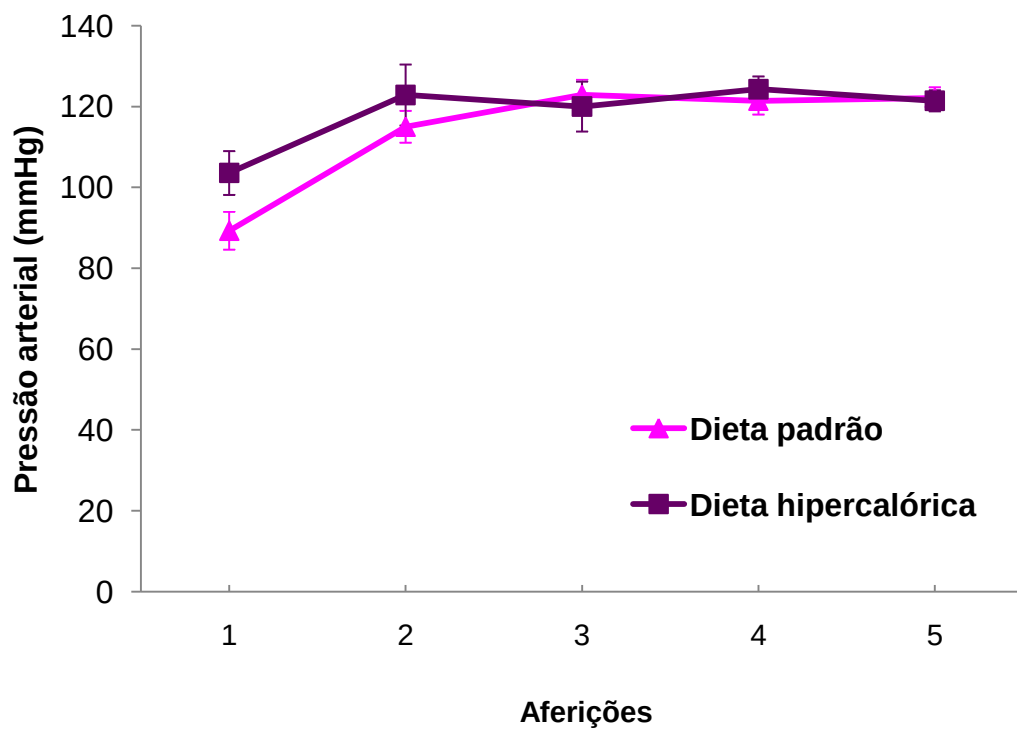


Figura 5. Pressão arterial sistólica caudal realizada durante as 15 semanas de indução de obesidade. A primeira aferição (1) foi feita um dia antes do protocolo de indução de obesidade. Valores expressos em média $\pm$ EPM. Número de animais = 10.

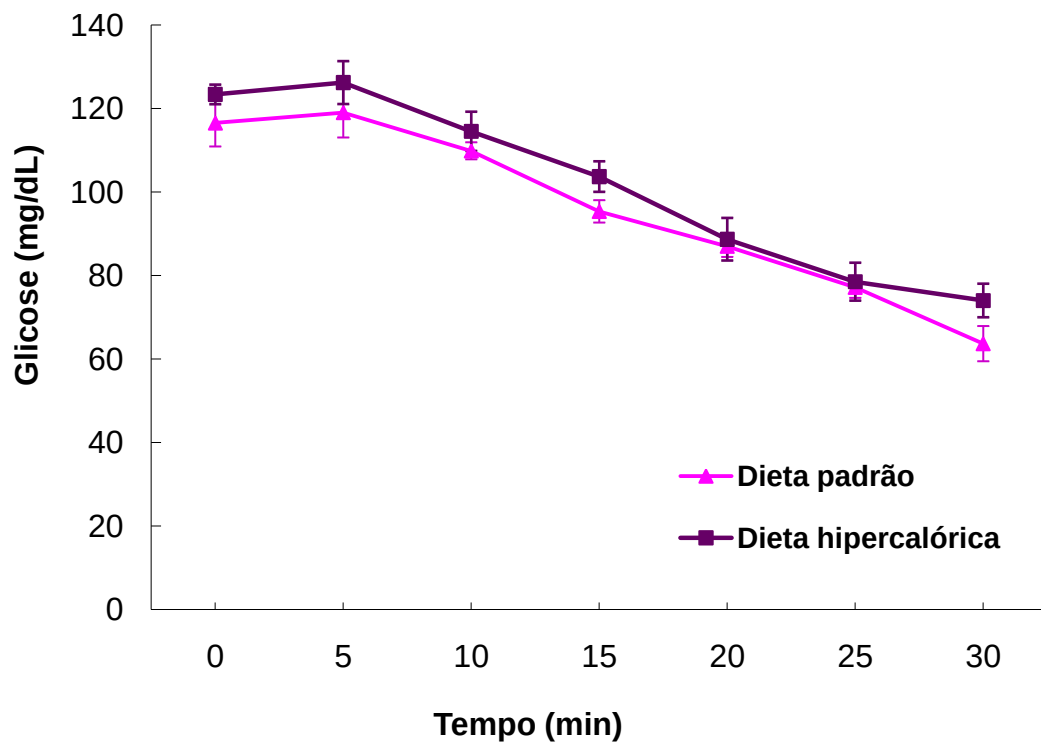


Figura 6. Teste de tolerância à insulina dos animais que receberam dieta padrão e dieta hipercalórica. Dados expressos em média $\pm$ EPM. Número de animais = 10.

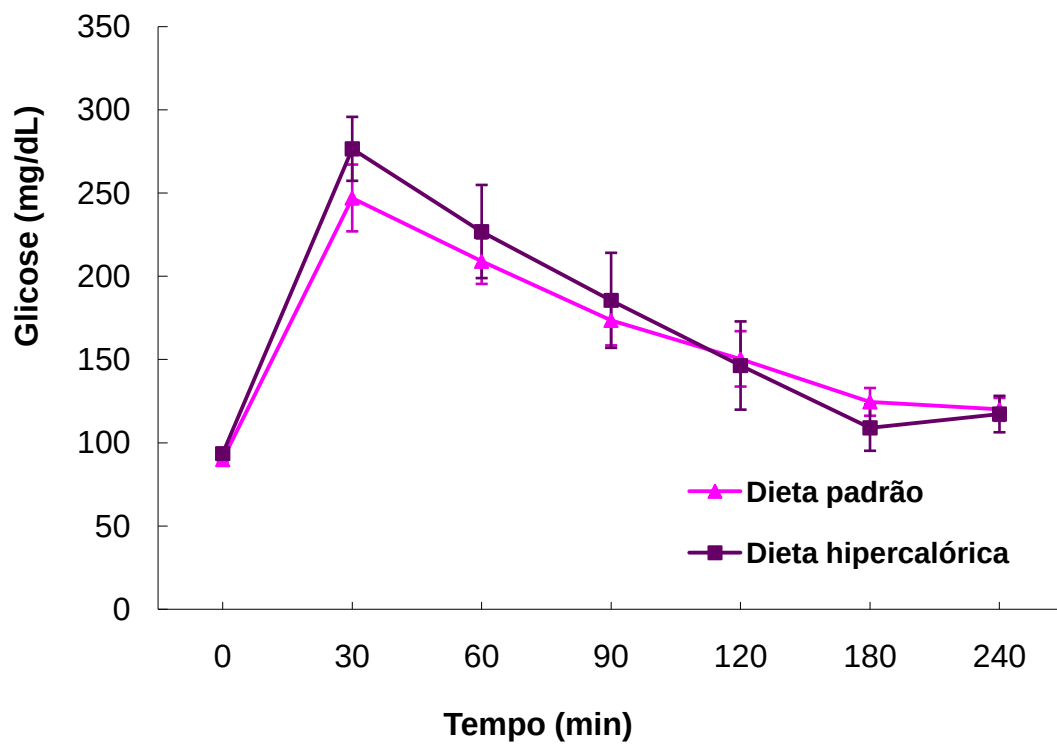


Figura 7. Teste de tolerância à glicose dos animais que receberam dieta padrão ou dieta hipercalórica. Dados expressos em media $\pm$ EPM. Número de animais = 10

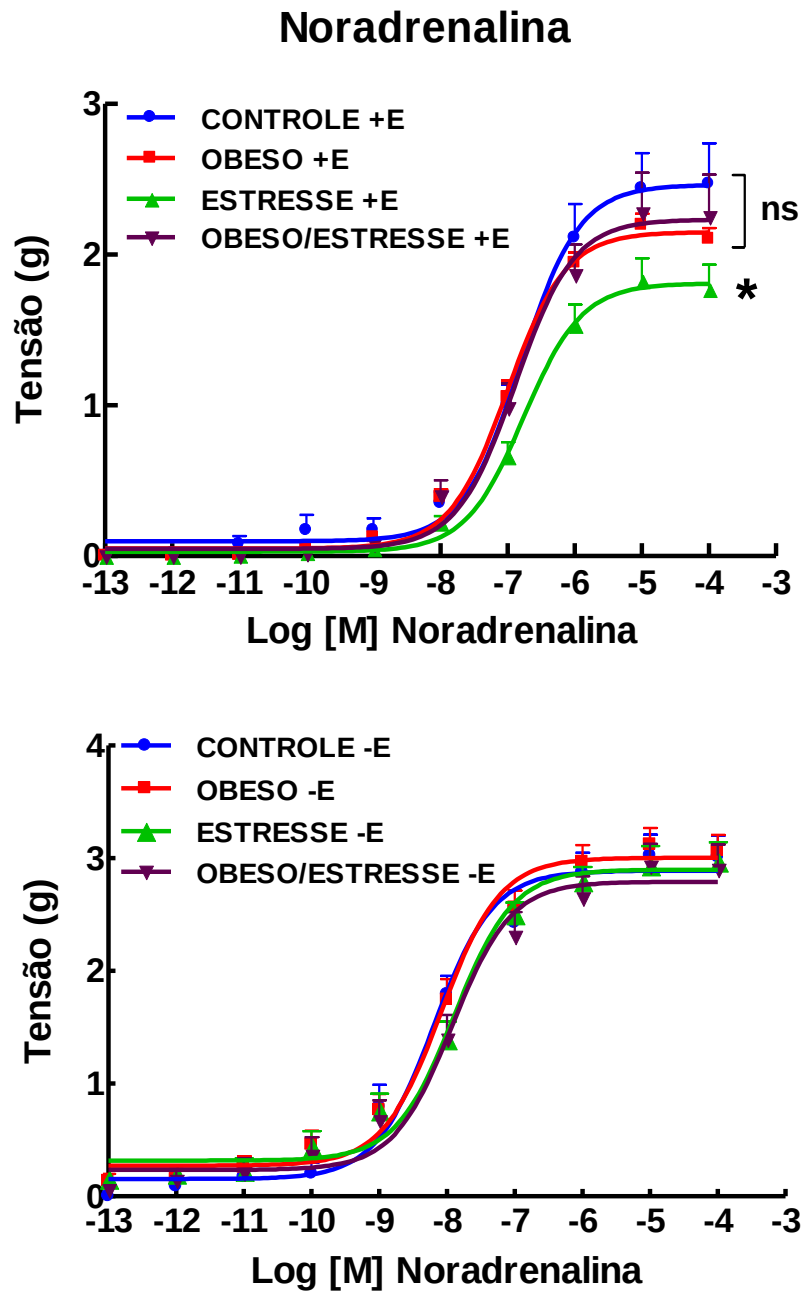


Figura 8. Curvas concentração-efeito à noradrenalina obtidas em dois anéis, com (+E) e sem (-E) endotélio, da mesma aorta torácica isolada de ratos controles e obesos submetidos ou não ao estresse agudo de imobilização. Dados expressos como média $\pm$ EPM. Número de animais 8-10. *P < 0,05 em relação ao controle.

Tabela 2. Valores médios da resposta máxima e concentração eficaz 50% à noradrenalina em curvas concentração-efeito obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, da mesma aorta torácica isolada de ratos machos adultos controles e obesos submetidos ou não ao estresse agudo de imobilização

Grupos	¹ Resposta Máxima (g tensão)		² CE50 x 10 ⁻⁷ (mM)	
	+E	-E	+E	-E
Controle	2,58 ± 0,24	3,09 ± 0,19 ⁺	1,00 (0,31 -3,32)	0,02 ⁺ (0,01 - 0,08)
Obeso	2,22 ± 0,07	3,14 ± 0,14 ⁺	1,06 (0,68 -1,66)	0,05 ⁺ (0,02 - 0,12)
Estresse	1,84 ± 0,16 *	2,98 ± 0,17 ⁺	2,03 (1,18 -3,49)	0,07 ⁺ (0,02 - 0,24)
Obeso/ Estresse	2,11 ± 0,19	2,94 ± 0,21 ⁺	1,45 (0,87 - 2,41)	0,11 ⁺ (0,03 - 0,40)

CCE 50%: concentração que determina 50% do efeito máximo. +E: aortas com endotélio intacto. -E: aortas sem endotélio. ¹Os dados representam a média ± EPM. ²Os dados representam a média, entre parênteses estão apresentados os intervalos de confiança 95%. Número de animais = 8-10. *P < 0,05 em relação ao controle com endotélio. ⁺P < 0,05 em relação às respectivas preparações sem endotélio.

Noradrenalina/L-NAME

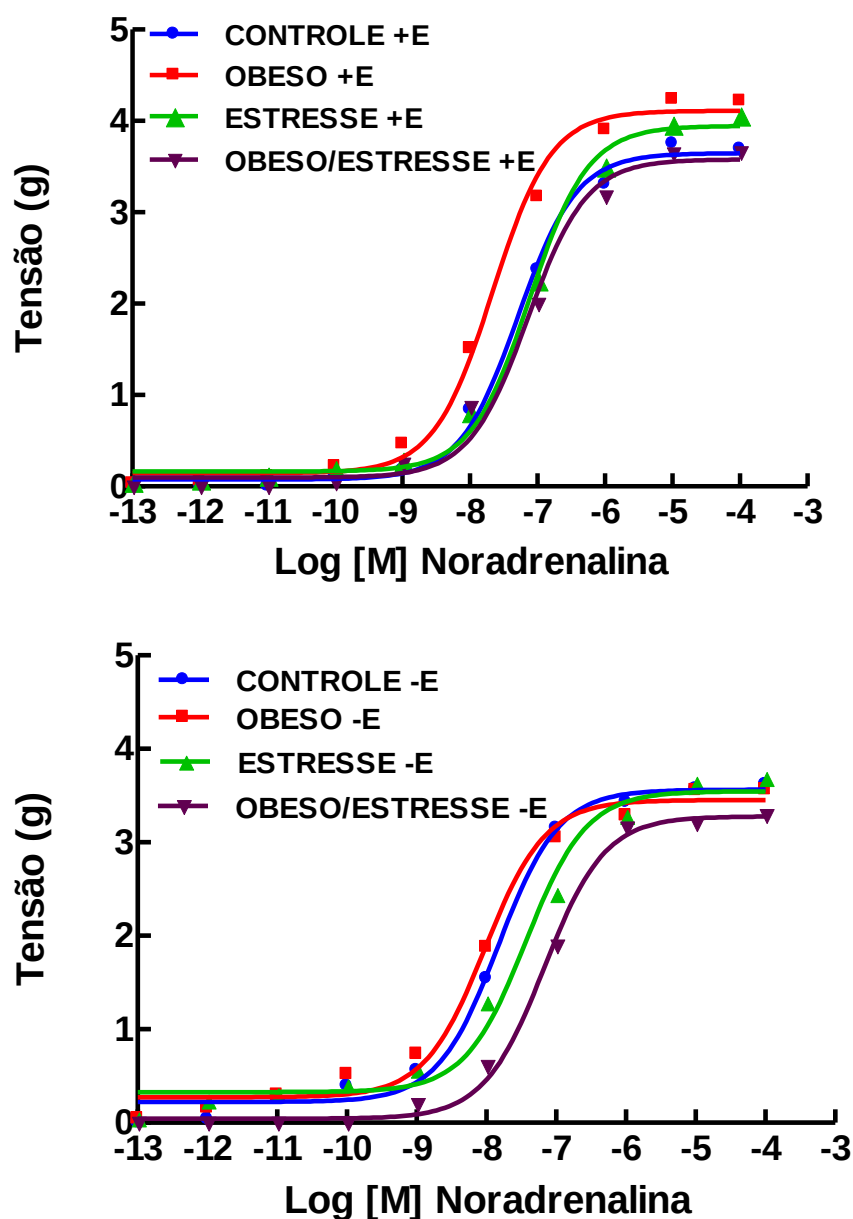


Figura 9. Curvas concentração-efeito a noradrenalina obtidas em dois anéis, com (+E) e sem (-E) endotélio, da mesma aorta torácica isolada de ratos controles e obesos submetidos ou não ao estresse agudo de imobilização na presença de L-NAME (3×10^{-4} M). Dados expressos como média $\pm$ EPM. Número de animais 8-10.

Tabela 3. Valores médios da resposta máxima e concentração eficaz 50% à noradrenalina em curvas concentração-efeito obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, na presença de L-NAME da mesma aorta torácica isolada de ratos machos adultos controles e obesos submetidos ou não ao estresse agudo de imobilização

Grupos	¹ Resposta Máxima (g tensão)		² CE50 x 10 ⁻⁷ (mM)	
	+E	-E	+E	-E
Controle	3,82 ± 0,27	3,65 ± 0,34	0,39 (0,13 - 5,01)	0,04 (0,003 - 0,58)
Obeso	4,26 ± 0,21	3,58 ± 0,28	0,28 (0,12 - 0,66)	0,06 (0,02 - 0,20)
Estresse	4,08 ± 0,19	3,71 ± 0,39	0,61 (0,22 - 1,66)	0,11 (0,01 - 0,94)
Obeso/ Estresse	3,77 ± 0,30	3,34 ± 0,47	0,75 (0,33 - 1,70)	0,52 (0,19 - 1,42)

CCE 50%: concentração que determina 50% do efeito máximo. +E: aortas com endotélio intacto. -E: aortas sem endotélio. ¹Os dados representam a média ± EPM. ²Os dados representam a média, entre parênteses estão apresentados os intervalos de confiança 95%. Número de animais = 8-10.

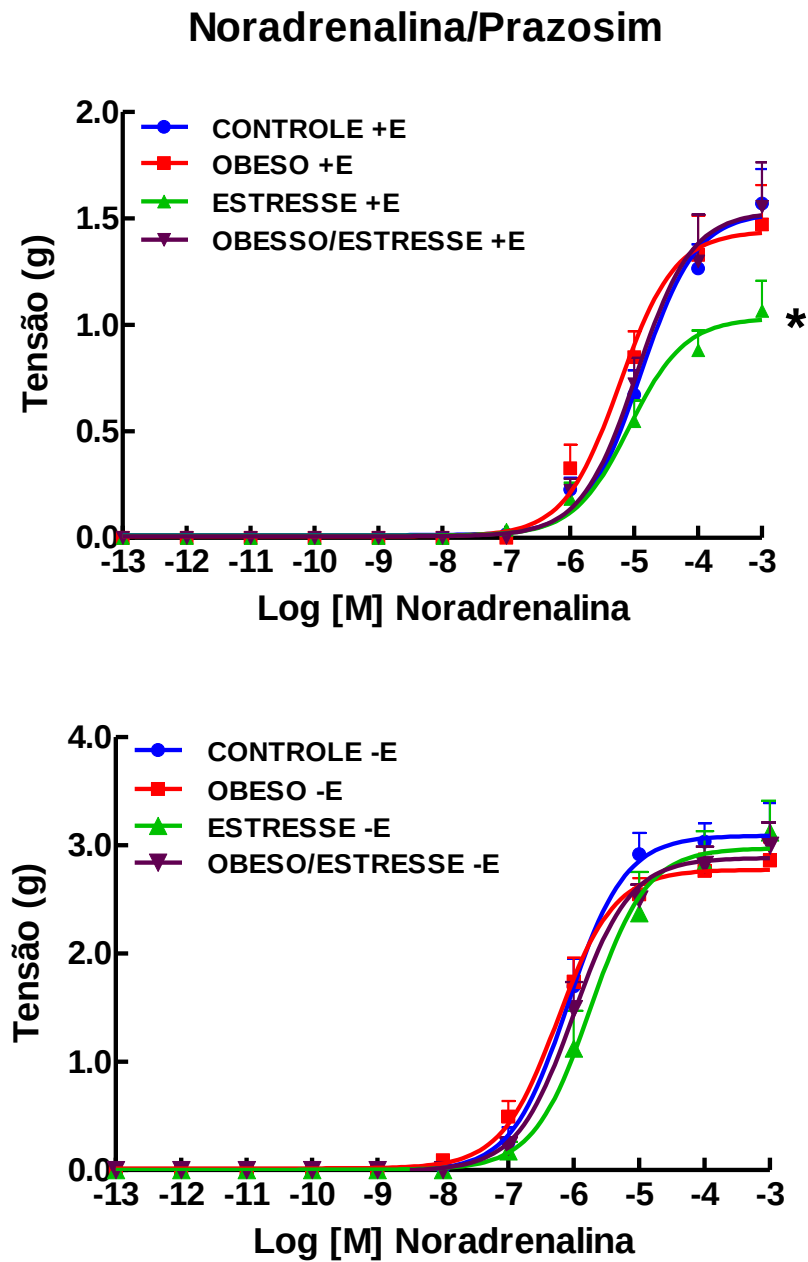


Figura 10. Curvas concentração-efeito a noradrenalina obtidas em dois anéis, com (+E) e sem (-E) endotélio, da mesma aorta torácica isolada de ratos controles e obesos submetidos ou não ao estresse agudo de imobilização na presença de prazosim (10^{-8} M). Dados expressos como média $\pm$ EPM. Número de animais 8-10. *P < 0,05 em relação ao controle.

Tabela 4. Valores médios da resposta máxima e concentração eficaz 50% à noradrenalina em curvas concentração-efeito obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, na presença de prazosim da mesma aorta torácica isolada de ratos machos adultos controles e obesos submetidos ou não ao estresse agudo de imobilização

Grupos	¹ Resposta Máxima (g tensão)		² CE50 x 10 ⁻⁶ (mM)	
	+E	-E	+E	-E
Controle	1,74 ± 0,22	3,79 ± 0,14 ⁺	18,50 (5,26 – 65,01)	1,35 (0,60 – 3,04)
Obeso	1,47 ± 0,18	3,02 ± 0,17 ⁺	5,66 (0,94 – 33,96)	0,62 (0,29 – 1,34)
Estresse	1,06 ± 0,14*	2,99 ± 0,28 ⁺	13,52 (3,71 – 49,32)	1,30 (0,35 – 4,83)
Obeso/ Estresse	1,56 ± 0,21	3,00 ± 0,21 ⁺	15,16 (3,28 – 69,98)	0,96 (0,40 – 2,31)

CCE 50%: concentração que determina 50% do efeito máximo. +E: aortas com endotélio intacto. -E: aortas sem endotélio ¹Os dados representam a média ± EPM. ²Os dados representam a média, entre parênteses estão apresentados os intervalos de confiança 95%. Número de animais = 8-10. *P < 0,05 em relação ao controle com endotélio. ⁺P < 0,05 em relação às respectivas preparações com endotélio.

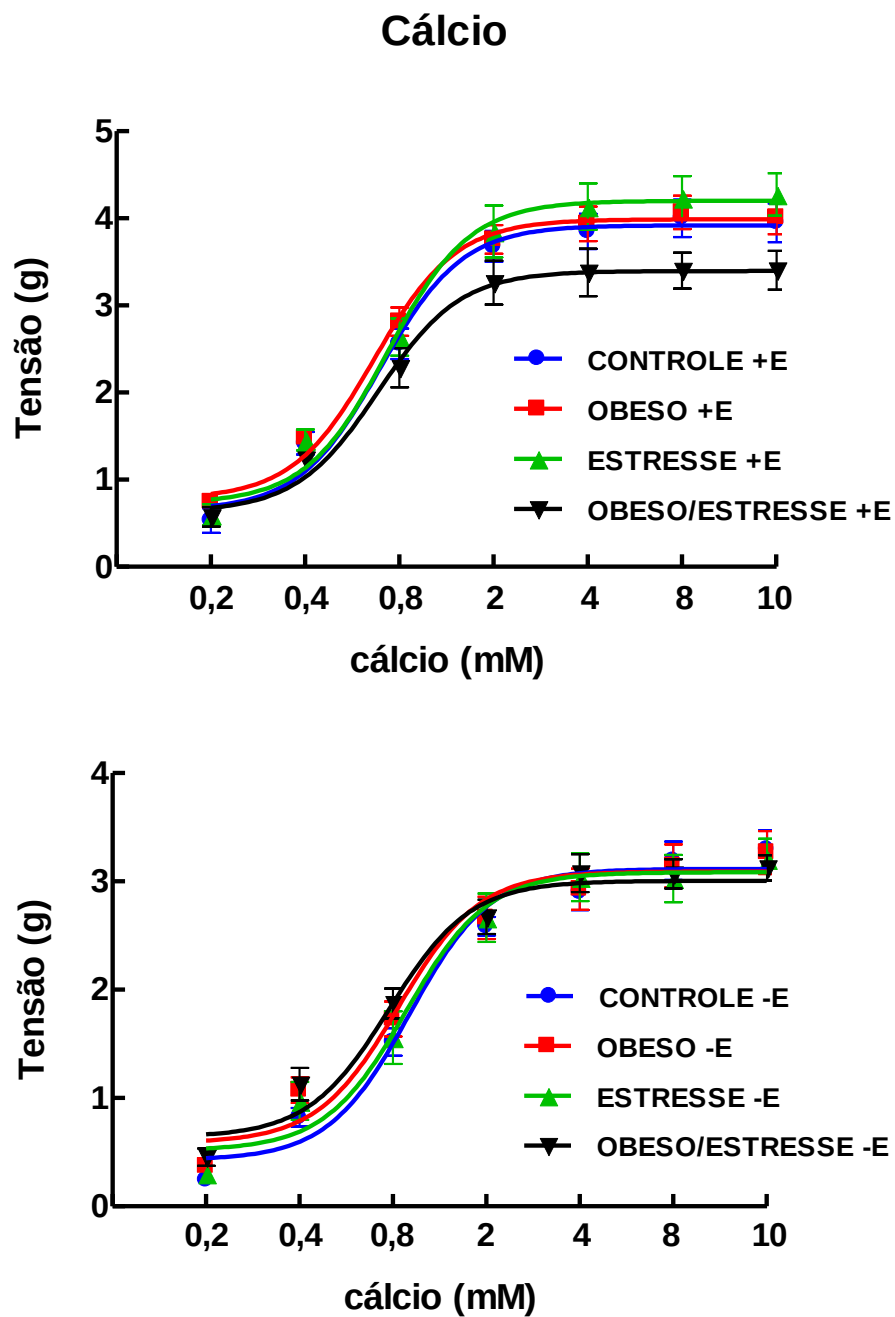


Figura 11. Curvas concentração-efeito ao cálcio obtidas em dois anéis, com (+E) e sem (-E) endotélio, da mesma aorta torácica isolada de ratos controles e obesos submetidos ou não ao estresse agudo de imobilização. Dados expressos como média $\pm$ EPM. Número de animais 8-10.

Tabela 5. Valores médios da resposta máxima e concentração eficaz 50% ao cálcio em curvas concentração-efeito obtidas em dois anéis, com e sem endotélio da mesma aorta torácica isolada de ratos machos adultos controles e obesos submetidos ou não ao estresse agudo de imobilização

Grupos	¹ Resposta Máxima (g tensão)		² CE50 (mM)	
	+E	-E	+E	-E
Controle	4,05 ± 0,21	3,38 ± 0,18	0,49 (0,43 - 0,57)	0,96 (0,73 - 1,25)
Obeso	4,10 ± 0,20	3,26 ± 0,20	0,46 (0,42 - 0,52)	0,75 (0,59 - 0,96)
Estresse	4,30 ± 0,25	3,20 ± 0,20	0,56 (0,45 - 0,70)	1,02 (0,61 - 1,72)
Obeso/ Estresse	3,81 ± 0,29	3,44 ± 0,18	0,59 (0,47 - 0,73)	0,69 (0,54 - 0,88)

CCE 50%: concentração que determina 50% do efeito máximo. +E: aortas com endotélio intacto. -E: aortas sem endotélio ¹Os dados representam a média ± EPM. ¹Os dados representam a média ± EPM. ²Os dados representam a média, entre parênteses estão apresentados os intervalos de confiança 95%. Número de animais = 8-10. *P < 0,05 em relação ao controle.

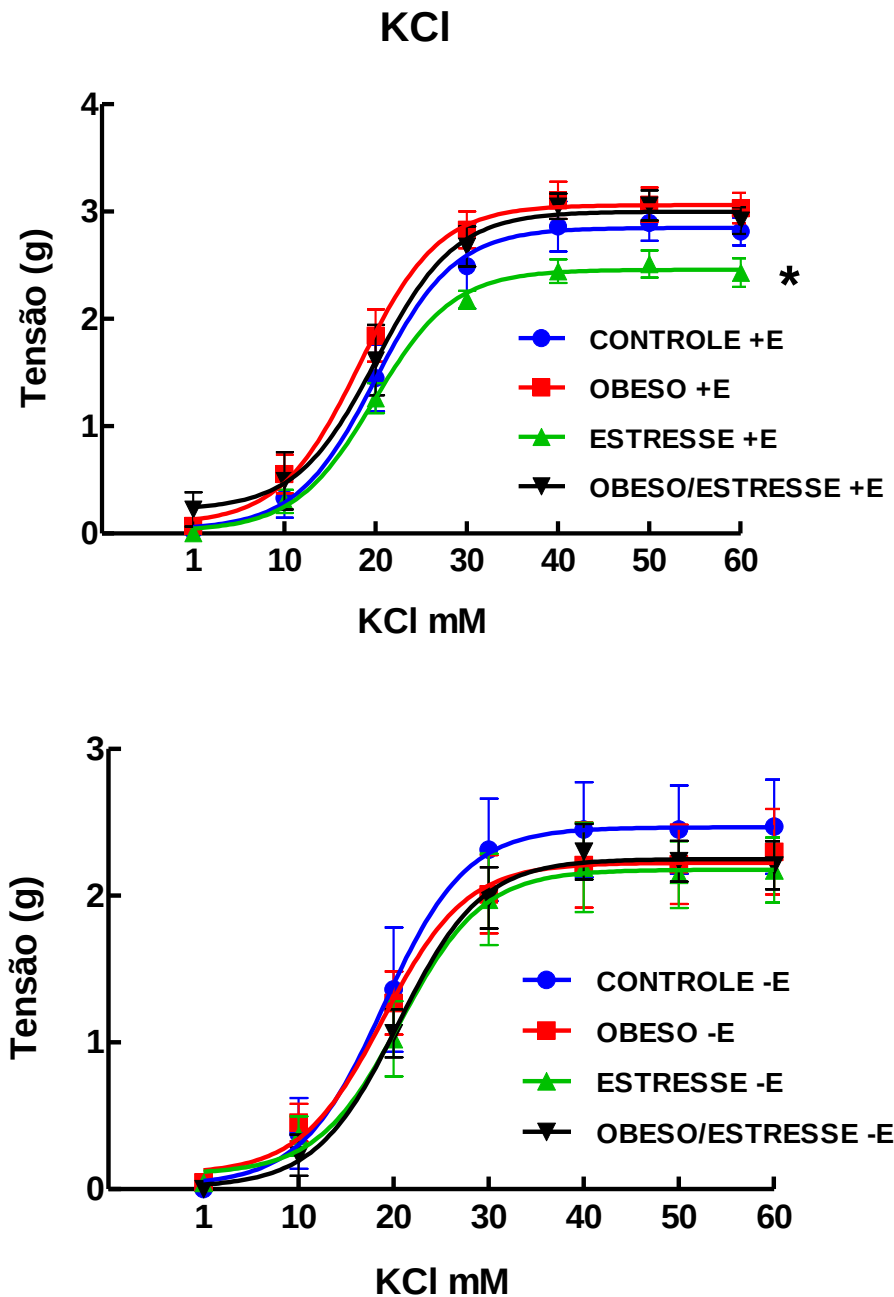


Figura 12. Curvas concentração-efeito ao KCl obtidas em dois anéis, com (+E) e sem (-E) endotélio, da mesma aorta torácica isolada de ratos controles e obesos submetidos ou não ao estresse agudo de imobilização. Dados expressos como média $\pm$ EPM. Número de animais 8-10. *P < 0,05 em relação ao controle.

Tabela 6. Valores médios da resposta máxima e concentração eficaz 50% ao KCl em curvas concentração-efeito obtidas em dois anéis, com e sem endotélio da mesma aorta torácica isolada de ratos machos adultos controles e obesos submetidos ou não ao estresse agudo de imobilização

Grupos	¹ RM (g tensão)		² CE50 (mM)	
	+E	-E	+E	-E
Controle	3,02 ± 0,15	2,46 ± 0,33	20,08 (14,66 - 27,48)	20,98 (13,68 - 32,14)
Obeso	3,19 ± 0,16	2,33 ± 0,28	17,13 (14,19 - 20,70)	17,72 (14,03 - 22,39)
Estresse	2,49 ± 0,11*	2,31 ± 0,24	18,62 (15,49 - 22,39)	18,78 (11,67 - 30,20)
Obeso/ Estresse	2,86 ± 0,19	2,6 ± 0,31	16,36 (11,30 - 23,71)	22,38 (18,53 - 27,04)

CCE 50%: concentração que determina 50% do efeito máximo. +E: aortas com endotélio intacto. -E: aortas sem endotélio ¹Os dados representam a média ± EPM. ²Os dados representam a média, entre parênteses estão apresentados os intervalos de confiança 95%. Número de animais = 8-10. *P < 0,05 em relação ao controle.

Em humanos, um dos critérios utilizados para definir obesidade é o índice de massa corporal (IMC, relação entre a altura ao quadrado e o peso corpóreo). Entretanto, este critério não é válido para modelos experimentais (Thibault et al., 2004). Assim, alguns dos critérios utilizados para a determinação de obesidade em animais de laboratório levam em consideração os depósitos de gordura visceral e subcutânea (Woods et al., 2003; Thibault et al., 2004; Dourmashkin et al., 2005), gordura corporal total (Woods et al., 2003; Levin et al., 2003, Thibault et al., 2004) e também o peso corporal (Woods et al., 2003). Entretanto, alguns estudos mostram que o peso corporal pode não ser um bom indicador de classificação de obesidade em animais (Nascimento et al., 2008; Woods et al., 2003). No presente estudo, o critério utilizado para determinar a obesidade foi o índice de adiposidade, o qual levou em consideração a soma de três depósitos de gordura, a saber, visceral, epididimal e retroperitoneal.

A literatura mostra que a ingestão de dieta hipercalórica pode resultar em aumento nos depósitos de gordura (Bellaver et al., 2001; Gaíva et al., 2001 Nascimento et al., 2008), bem como, no peso corpóreo (Shirayev, et al., 2009). Corroborando estes achados, os dados do presente estudo mostraram que a ingestão de dieta hipercalórica induziu aumento nos depósitos de gordura, e promoveu aumento significativamente maior no peso corpóreo absoluto a partir da 6ª semana do protocolo de indução da obesidade.

A eficiência alimentar e os depósitos de gorduras visceral, epididimal e retroperitoneal mostraram-se significativamente aumentados nos ratos que receberam a dieta hipercalórica em relação àqueles que receberam a dieta

padrão. Uma vez que a eficiência alimentar reflete a relação entre energia ingerida e a energia estocada, estes resultados sugerem que a capacidade de converter kcal ingeridas em gordura é maior nos animais que receberam a dieta hipercalórica em relação aos animais que receberam a dieta padrão. De fato, a literatura mostra que a dieta hipercalórica aumenta a eficiência metabólica e alimentar no grupo obeso (Lauterio et al., 1998; Schrauwen and Westerterp, 2000; Gaíva et al., 2001; Estadella et al., 2004; Nascimento et al., 2008).

A pressão arterial sistólica não se alterou com a obesidade. Os resultados concordam com os trabalhos de Carroll et al. (2005) e Relling et al. (2006) e divergem de outros que mostraram elevação dos níveis da pressão arterial sistólica (du Toit et al., 2005, Boustani-Kari et al., 2007).

No presente estudo, os animais que ingeriram dieta hipercalórica não apresentaram intolerância à glicose e resistência à insulina, embora estas comorbidades sejam relatadas em condições de obesidade (Li et al., 2006; Nivoit et al., 2009; Shiraev, et al., 2009).

A obesidade é atualmente uma doença altamente prevalente e de elevada morbimortalidade para as populações industrializadas (Ogden et al., 2003). Tal risco é particularmente atribuído às implicações cardiovasculares relacionadas à obesidade (Hubert et al., 1983; Jonsson et al., 2002).

Na maioria das doenças vasculares como a aterosclerose, diabetes, envelhecimento e particularmente em pacientes obesos, a bioatividade do óxido nítrico (NO) é reduzida (Barton et al., 1998; Schulman, et al. 2006). Além disso, a obesidade determina aumento nos níveis de fatores de contração

como, por exemplo, a angiotensina e a endotelina que induzem a contração do músculo liso vascular (Zemel et al., 1990; Cox and Kikta, 1992; Harker et al., 1993; Hopfner et al., 1998).

Entretanto, o protocolo de obesidade utilizado não determinou qualquer alteração da reatividade vascular aos diferentes agentes agonistas, a saber, noradrenalina, cálcio e KCl. O mesmo foi observado por Subramanian et al. (2003) que demonstraram que as respostas contráteis à noradrenalina, à endotelina-1 e ao KCl, em anéis de aorta com endotélio íntegro, não são alteradas em ratos obesos Zucker. Segundo estes autores as divergências de respostas são ocasionadas às diferenças de idade dos animais. Assim, a literatura mostra que em ratos obesos com idade superior a 20 semanas geralmente não são observadas alterações de reatividade vascular, ou se estas se fazem presentes, correspondem a uma diminuição na sensibilidade vascular para agonistas de receptores α -adrenérgicos e KCl (Cox and Kikta, 1992; Harker et al., 1993; Sexl et al., 1995; Turner and White, 1996). Por sua vez, estudos em animais obesos de 10 a 16 semanas de idade mostram respostas contrárias, como acima relatado.

O estresse, assim como a obesidade, apresenta estreita relação com as doenças cardiovasculares. Diminuição de reatividade da aorta à noradrenalina e aumento à acetilcolina são algumas das respostas adaptativas ao estresse já estabelecidas na literatura (Webb et al., 1987; Lapshin et al., 1991; Manukhina et al., 1991 e Cordellini and Vassilieff, 1998). Além disso, sabe-se que, em ratos, o estresse de imobilização desencadeia um aumento generalizado de NO (Leza et al. 1988), e induz a expressão da enzima óxido nítrico sintase

induzível e a superprodução de NO no córtex cerebral (Olivenza et al., 2006). No presente estudo, o estresse determinou resposta vascular adaptativa, caracterizada por hiporreatividade da aorta à noradrenalina, dependente da integridade do endotélio e abolida na presença de L-NAME, sugerindo a participação da via NO endotelial na resposta vascular adaptativa ao estresse, corroborando os dados da literatura acima relatados.

A literatura mostra que a resposta dependente do endotélio a diversas catecolaminas envolve a estimulação de adrenoreceptores- α_2 presentes no endotélio vascular. Ao lado da liberação de fatores de relaxamento endoteliais pela estimulação de adrenoreceptores- α_2 , as catecolaminas estimulam ainda adrenoreceptores- α_2 pós-juncionais no músculo liso vascular, os quais ativam o processo contrátil à semelhança da estimulação de adrenoreceptores- α_1 pós-juncionais (Angus et al., 1986; Vanhoutte and Miller 1989; Noda et al., 1995; Carter et al., 2002; Kanagy, 2005). Dessa maneira, justifica-se a resposta diminuída à noradrenalina, agonista de adrenoreceptores α_1 e α_2 , observada em aorta dos diferentes grupos experimentais na presença de prazosim, uma vez que nesta condição a interação com adrenoreceptores- α_1 está diminuída aumentando a probabilidade de interação com adrenoreceptores- α_2 . Poderíamos assim argumentar que o aumento da interação da noradrenalina com os adrenoreceptores- α_2 endoteliais possibilitaria um aumento na liberação de fatores de relaxamento endoteliais comprometendo a resposta máxima do tecido.

O presente estudo mostrou ainda que a presença de prazosim não afetou a resposta vascular adaptativa ao estresse, uma vez que a hiporreatividade à noradrenalina observada em aorta de ratos estressados

manteve-se presente na presença deste antagonista. Este achado, juntamente com a observação de que a presença de L-NAME abole a hiporreatividade à noradrenalina em aorta de ratos estressados, leva-nos a inferir que a resposta vascular adaptativa ao estresse surge como consequência de um aumento da atividade do sistema óxido nítrico endotelial via ativação de adrenorreceptores- α_2 .

Por sua vez, a obesidade impediu o desenvolvimento da resposta vascular adaptativa ao estresse uma vez que não foi observada hiporreatividade à noradrenalina em aorta de ratos estressados com obesidade estabelecida. Assim, a capacidade de gerenciar a resposta vascular ao estresse mostrou-se comprometida em condição de obesidade.

Ao lado da contribuição do NO, da prostaciclina PGI_2 e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) para a vasodilatação endotélio dependente (Flammer and Lüscher, 2010), há evidências para uma vasodilatação por hiperpolarização EDHF-símile como proposto por Grgic et al. (2009). Tal vasodilatação é consequência de eventos biofísicos, baseados no acoplamento elétrico direto entre o endotélio e o músculo liso vascular, via *gap-junctions* mioendoteliais (Grgic et al., 2009). Adicionalmente e não menos importante temos a ativação dos canais de K^+ sensíveis ao cálcio (K_{Ca}) no endotélio que levam à hiperpolarização e relaxamento do músculo liso vascular. Dessa maneira, após a estimulação da célula endotelial tem-se um aumento de cálcio intracelular que abre os canais de K_{Ca} e consequentemente aumenta o K^+ no espaço entre o endotélio e o músculo liso ativando canais de K^+ retificadores de influxo e/ou bomba Na^+/K^+ (Na^+/K^+ ATPase) que finalmente levam à hiperpolarização e relaxamento do músculo liso vascular (Grgic et al.,

2009). Deve-se ainda considerar que concentrações elevadas de K^+ ativam a óxido nítrico sintase (Oberleithner et al., 2009), além do NO ativar os K_{Ca} (Wrzosek, 2009).

Semelhantemente ao observado à noradrenalina, a obesidade não afetou a resposta vascular ao K^+ , entretanto, o estresse determinou resposta vascular adaptativa a este agente, caracterizada por hiporreatividade dependente da integridade do endotélio. Ainda, a obesidade estabelecida aboliu a resposta vascular adaptativa ao estresse observada para este vasoconstritor.

Considerando-se que o estresse determinou aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico endotelial poderíamos inferir que em aorta de ratos estressados este efeito pudesse determinar uma maior ativação dos canais de K_{Ca} endoteliais, com conseqüente aumento do K^+ no espaço entre o endotélio e o músculo liso que ativaria os canais de K^+ retificadores de influxo e/ou bomba Na^+/K^+ (Na^+/K^+ ATPase). Este efeito resultaria em hiperpolarização do músculo liso vascular diminuindo a despolarização em resposta a concentrações crescentes de K^+ em aorta de ratos estressados, justificando a resposta máxima reduzida ao K^+ nesta condição.

Segundo Van Hove et al. (2009), uma das vias pela qual o NO induz relaxamento na aorta de rato envolve a estimulação da guanilato ciclase pelo NO, com a subseqüente elevação da guanosina monofosfato cíclico (GMPc) induzindo o relaxamento, sem apresentar alterações detectáveis nas concentrações de cálcio intracelular. Esta via parece estar relacionada com o influxo de Ca^{2+} pelos canais do tipo-L, e o relaxamento é provavelmente

ocasionado pela dessensibilização do aparato contrátil ao Ca^{2+} (Carvajal et al., 2000). Entretanto, o mecanismo desta dessensibilização permanece por ser elucidado.

Consequentemente, intervenções que reduzam ou aumentem o influxo de cálcio durante a contração poderiam influenciar a capacidade dilatadora do NO. Entretanto, diferentemente do observado para a noradrenalina e para o K^+ , nenhuma alteração na resposta ao cálcio foi observada em aorta dos diferentes grupos experimentais, quer na presença ou ausência de endotélio íntegro. Uma vez que a resposta contrátil ao cálcio no músculo liso vascular está relacionada com o influxo deste íon através dos canais de Ca^{2+} tipo-L, podemos inferir que tanto a obesidade quanto o estresse não causaram alterações no influxo deste íon e também não promoveram dessensibilização do aparato contrátil ao Ca^{2+} . Dessa maneira, a hiporreatividade à noradrenalina e ao K^+ observada em aorta de ratos estressados, como consequência do aumento da biodisponibilidade de NO induzida pelo estresse, envolveria possivelmente a diminuição do Ca^{2+} intracelular através da estimulação da Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático independente de GMPc (Van Hove et al., 2009).

Finalmente, considerando-se o aumento da função endotelial como adaptação benéfica ao estresse, poderíamos concluir que a habilidade de gerenciar o estresse fica comprometida em condição de obesidade, o que conseqüentemente poderá aumentar o risco cardiovascular nestas condições em associação.

- ❖ A obesidade induzida por dieta hipercalórica isoladamente não alterou a reatividade da aorta torácica aos agentes vasoconstritores. Por sua vez, a exposição ao estresse agudo de imobilização determinou resposta vascular adaptativa caracterizada por hiporreatividade aos agentes vasoconstritores noradrenalina e KCl.
- ❖ Os mecanismos envolvidos na resposta vascular adaptativa ao estresse parecem estar relacionados a um aumento da atividade do sistema óxido nítrico endotelial via ativação de adrenocetores- α_2 e ativação dos canais de K_{Ca} endoteliais pelo óxido nítrico. Ainda, o aumento na biodisponibilidade do óxido nítrico parece resultar em uma diminuição do Ca^{2+} intracelular através da estimulação da Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático independente de GMPc.
- ❖ A capacidade de gerenciar a resposta vascular ao estresse mostra-se comprometida em condição de obesidade estabelecida o que pode resultar em aumento do risco cardiovascular nessas condições em associação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acree LS, Comp PC, Whitsett TL, et al. The influence of obesity on calf blood flow and vascular reactivity in older adults. *Dyn. Med.* 2007, 6:4-11.

Agapitov AV, Correia ML, Sinkey CA, Dopp JM, Haynes WG. Impaired skeletal muscle and skin microcirculatory function in human obesity. *J. Hypertens.* 2002, 20 (7):1401-1405.

Akiyama T, Tachibana I, Shirohara H, Watanabe N, Otsuki M. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. *Diabetes Res Clin Pract.* 1996, 31:27-35.

Angus JA, Cocks TM, and Satoh K. The alpha adrenoceptors on endothelial cells. *Fed Proc.* 1986, 45:2355-2359.

Barton M, Haudenschild CC, d'Uscio LV, Shaw S, Munter K, Luscher TF. Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95:14367-72.

Bayley BJR. Tables of the Bonferroni "t" statistic. *J Am Stat Assoc.* 1977, 72:469-78.

Benson S, Arck PC, Tan S, Mann K, Hahn S, Janssen OE, Schedlowski M, Elsenbruch S. Effects of obesity on neuroendocrine, cardiovascular, and immune cell responses to acute psychosocial stress in premenopausal women. *Psychoneuroendocrinol.* 2008, 34:181-189.

Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004, 287(4):R943-9.

Boustany-Kari CM, Gong M, Akers WS, Guo Z, Cassis LA. Enhanced vascular contractility and diminished coronary artery flow in rats made hypertensive from diet-induced obesity. *Int J Obes.* 2007, 31(11):1652-9.

Buwalda B, Blom WAM, Koolhaas JM, Dijk GV. Behavioral and physiological responses to stress are affected by high-fat feeding in male rats. *Physiol. Behav.* 2001, 73:371-377.

Calzá L, Giardino L, Ceccatelli S. NOS mRNA in the paraventricular nucleus of young and old rats after immobilization stress. *Neuro Report.* 1993, 4:627-630.

Carroll JF, Tyagi SC. Extracellular matrix remodeling in the heart of the homocysteinemic obese rabbit. *Am J Hypertens.* 2005, 18(5):692-698.

Carroll JF, Zenebe WJ, Strange T. Cardiovascular function in rat model of diet-induced obesity. *Hypertension.* 2006, 48(1):65-72.

Carter RW, Begaye M, Kanagy NL. Acute and chronic NOS inhibition enhances α 2-adrenoreceptor-stimulated RhoA and Rho kinase in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002, 283:H1361-H1369.

- Cordellini S, Vassiliev VS. Decreased endothelium-dependent vasoconstriction to noradrenaline in acute-stressed rats is potentiated by previous chronic stress: nitric oxide involvement. *Gen Pharmacol*. 1998, 30:79-83.
- Cox RH, Kikta DC. Age-related changes in thoracic aorta of obese Zucker rats. *Am. J. Physiol*. 1992, 262:H1548-H1556.
- De Moraes R, Gioseffi G, Nobrega AC, et al. Effects of exercise training on the vascular reactivity of the whole kidney circulation in rabbits. *J. Appl. Physiol*. 2004, 97(2):683-688.
- Dobrian AD, Davies MJ, Prewitt RL, Lauterio TJ. Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension*. 2000, 35(4):1009-1015.
- du Toit EF, Nabben M, Lochner A. A potential role for angiotensin II in obesity induced cardiac hypertrophy and ischaemic/reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*. 2005, 100(4):346-54.
- Fatani S, Pickavance LC, Sadler CJ, et al. Differential vascular dysfunction in response to diets of differing macronutrient composition: a phenomenological study. *Nut. Metab*. 2007, 4:15.
- Flammer AJ, Lüscher TF. Human endothelial dysfunction: EDRFs. *Pflugers Arch*. 2010, 459(6):1005-13.
- Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH. Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *JAMA*. 2007, 298: 2028-2037.
- Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. Years of Life lost due to obesity. *JAMA*. 2003, 289:187-193.
- Grgic I, Kaistha BP, Hoyer J, Köhler R. Endothelial Ca²⁺-activated K⁺ channels in normal and impaired EDHF-dilator responses – relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery. *British Journal of Pharmacology*. 2009, 157:509-526.
- Hall JE. Mechanisms of abnormal renal sodium handling in obesity hypertension. *Am. J. Hypertens*. 1997, 10:49S-55.
- Hall JE, Brands MW, Hildebrandt DA, Kuo J, Fitzgerald S. Role of sympathetic system and neuropeptides in obesity hypertension. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 2000, 33:605-618.
- Harker CT, O'Donnell M, Kasiske BL, Keane WF, Katz SA. The renin-angiotensin system in the Type II diabetic obese Zucker rat. *J. Am. Soc. Nephrol*. 1993, 4:1354-1361.
- Hopfner RL, McNeill JR, Gopalakrishnan V. Vanadate treatment normalizes exaggerated vascular smooth muscle responses in the obese Zucker rat. *Eur. J. Pharmacol*. 1998, 357:61-65.
- Hsueh WA, Quinones MJ. Role of endothelial dysfunction in insulin resistance. *Am. J. Cardiol*. 2003, 300(92):10J-17.

Hubert HB, Feinleib M, MacNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 1983, 67:970-7.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Antropometria e análise do estado nutricional de crianças e adolescentes no Brasil. *Pesquisa de Orçamentos Familiares*, 2003,140 p.

Jeunemaitre, X; Soubrier, F; Kotelevtsev, YV; et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell*. 1992, 71:169-180.

Jonsson S, Hedblad B, Engstrom G, Nilsson P, Berglund G, Janzon L. Influence of obesity on cardiovascular risk. Twenty-three-year follow-up of 22,025 men from an urban Swedish population. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002, 26(8):1046-53.

Kanagy NL. α 2-Adrenergic receptor signaling in hypertension. *Clinical Science*. 2005, 109:431-437.

Kopelman, PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000, 404:635-643.

Kopelman PG, Albion L. Obesity, non-insulin-dependent diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *Br. Med. Bull*. 1997, 53(2):322-340.

Kuniyoshi FHS, Trombetta IC, Batalha LT, et al. Abnormal neurovascular control during sympathoexcitation in obesity. *Obesity Res*. 2003, 11 (11):1411-1419.

Lanza Júnior U, Cordellini S. Differential vascular adaptive response to stress exposure in male and female rats: Role of gonadal hormones and endothelial cells. *Stress*. 2007,10(1):27-36.

Lapshin AV, Manukhina EB, Meerson FZ. Adaptation to short stress exposures prevents the enhancement of the endothelium-dependent reactions of the aorta in myocardial infarct. *Fiziol Z Imeni I M Sec*. 1991, 77(3), 70–78.

Lauterio TJ, Barkan A, DeAngelo M, DeMott-Friberg R, Ramirez R. Plasma growth hormone secretion is impaired in obesity-prone rats before onset of diet induced obesity. *Am J Physiol*. 1998, 275(1):E6-11.

Legendre A, Harris RBS. Exaggerated response to mild stress in rats fed high-fat diet. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 2006, 291:R1288-1294.

Levin BE, Richard D, Michel C, Servatius R. Differential stress responsivity in diet-induced obese and resistant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000, 279(4):R1357-64.

Levin BE, Dunn-Meynell AA, Balkan B, Keesey RE. Selective breeding for diet-induced obesity and resistance in Sprague-Dawley rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 1997, 273:725-730.

Leza JC, Salas E, Sawicki G, Russell JC, Radomski MW. The effects of stress on homeostasis in JCR-LA-cp rats: the role of nitric oxide. *J Pharmacol Exper Ther*. 1988, 286:1397-1403.

Li L, Yang G, Li Q, Tang Y, Li K. High-fat- and Lipid-induced insulin resistance in rats: the comparison of glucose metabolism, plasm resistin and adiponectin levels. *Ann Nutr Metab.* 2006, 50(6):499-505.

Malnick SD, Knobler H. The medical complications of obesity. *QJM.* 2006, 99(9):565-579.

Manukhina EB, Lapshin AV, Meerson FZ. Effect of adaptation to periodic hypoxia on post-infarction fall of blood pressure and hyperactivation of the endothelium. *Fiziol Z Imeni I M Sec.* 1991, 37(3):98-105.

Milakofsky L, Harris N, Vogel WH. Effects of repeated stress on plasma arginine levels in young and old rats. *Physiol. Behav.* 1993, 54:725-728.

Moraes C, Davel APC, Rossoni LV, et al. Exercise training improves relaxation response and SOD-I expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. *BMC Physiol.* 2008, 8, p.12-18.

Mundy AL, Haas E, Bhattacharya I, et al. Fat intake vascular responsiveness and receptor expression of vasoconstrictors: Implications for diet-induced obesity. *Cardiovasc. Res.* 2007, 73:368-375.

Naderali EK, Brown MJ, Pickavance LC, et al. Dietary obesity in the rat induces endothelial dysfunction without cause insulin resistance: a possible role for triacylglycerols. *Clin. Sci.* 2001, 5:499-506.

Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Nogueira CR, Novelli EL, et al. Misclassification probability as obese or lean in hypercaloric and normocaloric diet. *Biol Res.* 2008, 41(3):253-9.

Navarro-Oliveira CM, Vassiliev VSO, Cordellini S. The sympathetic adrenomedullary system, but not the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, participates in aorta adaptive response to stress: nitric oxide involvement. *J. Aut. Nerv. System.* 2000, 83:140-147.

Nielsen S, Halliwill JR, Joyner MJ, et al. Vascular response to angiotensin II in upper body obesity. *Hypertens.* 2004, 44: 435-441,.

Nivoit P, Morens C, Van Assche FA, Jansen E, Poston L, Remacle C, et al. Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. *Diabetologia.* 2009, 52(6):1133-42.

Noda M, Yasuda-Fukazawa C, Moriishi K, Kato T, Okuda T, Kurokawa K, Takuwa Y. Involvement of rho in GTP gamma S-induced enhancement of phosphorylation of 20 kDa myosin light chain in vascular smooth muscle cells: inhibition of phosphatase activity. *FEBS Lett.* 1995, 367:246-250.

Norman GR, Streiner DI. *Biostatistics: The bare essentials.* St. Louis (Mosby) 1994.

O' Brien PE, Dixon JB. The extent of the problem of obesity. *Am. J. Surg.* 2002, 184:4S-8.

Oberleithner H, Callies C, Kusche-Vihrog K, Schillers H, Shahina V, Riethmuller C, MacGregor GA, de Wardener HE. Potassium softens vascular endothelium and increases nitric oxide release. *PNAS*. 2009, 106 (8):2829–2834.

Ogden CL, Carroll MD, Flegal KM. Epidemiologic trends in overweight and obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2003, 32(4):741-60.

Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, et al. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA*. 2006, 295:1549-1555.

Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Fernández AP, Rodrigo J, Schulman IH, Zhou MS, Raji L. Interaction between nitric oxide and angiotensin II in the endothelium: role in atherosclerosis and hypertension. *J Hypertens*. 2006, 24:S45–50.

Pawloski CM, Kanagy NL, Mortensen LH, et al. Obese Zucker rats are normotensive on normal and increased sodium intake. *Hypertens*. 1992, 19:190-195.

Player MS, King DE, Mainous AG, Geesey ME. Psychosocial factors and progression from prehypertension to hypertension or coronary heart disease. *Ann. Fam. Med*. 2007, 5:403-411.

Poirier P, Giles TD, Bray GA, et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Circulation*. 2006, 113: 898-918.

Relling DP, Esberg LB, Fang CX, Johnson WT, Murphy EJ, Carlson EC, et al. High fat diet induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of foxo3a transcription factor independent of lipotoxic and apoptosis. *J Hypertens*. 2006, 24(3):549-61.

Ribeiro, MM; Trombetta, IC; Batalha, LT; et al. Muscle sympathetic nerve activity and hemodynamic alterations in middle-age obese women. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 34, p. 475-478, 2001.

Schmieder RE; Messerli, FH. Obesity hypertension. *Med. Clin. North Am*. 1987, 71(5):991-1001.

Schnyder B, Pittet M, Durand J, Schnyder-Candrian, S. Rapid effects of glucose on the insulin signaling of endothelial NO generation and epithelial Na transport. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 2001, 282:E87-94.

Sedová L, Bérubé J, Gaudet D, et al. Diet-induced obesity delays cardiovascular recovery from stress in spontaneously hypertensive rats. *Obesity Res*. 2004,12(12): 1951-1958.

Sexl V, Mancusi G, Raberger G, Schutz W. Age-related changes in vascular reactivity in genetically diabetic rats. *Pharmacology*.1995, 50:238-246.

Sharma, AM; Engeli, S. The role of renin-angiotensin system blockade in the management of hypertension associated with the cardiometabolic syndrome. *J. Cardiometab. Syndr.*, v.1(1), p.29-35, 2006.

Shiraev T, Chen H, Morris MJ. Differential Effects of Restricted Versus Unlimited High-Fat Feeding in Rats on Fat Mass, Plasma Hormones and Brain Appetite Regulators. *Journal of Neuroendocrinology*. 2009, 21:602-609.

Smith AD, Brands MW, Wang MH, Dorrance AM. Obesity-induced hypertension develops in young rats independently of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Exp Biol Med*. 2006, 231(3):282-7.

Subramanian R, MacLeod KM. Age-dependent changes in blood pressure and arterial reactivity in obese Zucker rats. *Eur J Pharmacol*. 2003 477:143-152.

The National Academy of Sciences. Nutrient requirements of the laboratory rat. Washington, 4th Ed., 1995.

Tsuchiya T, Kishimoto J, Koyama J, et al. Modulatory effect of L-NAME, a specific nitric oxide synthase (NOS) inhibitor, on stress-induced changes in plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and corticosterone levels in rats: physiological significance of stress-induced NOS activation in hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain Res*. 1997, 776:68-74.

Turner NC, White P. Effects of streptozotocin-induced diabetes on vascular reactivity in genetically hyperinsulinemic obese Zucker rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 1996, 27:884–890.

U.S. Department of health and human services - National Institutes of Health. Strategic Plan for NIH Obesity Research. Publication No. 04-5493, 2004, 90p.

Vanhoutte PM, Miller VM. Alpha 2-adrenoceptors and endothelium-derived relaxing factor. *Am J Med*. 1989, 87(3C):1S-5S.

Webb RC, Vander AJ, Henry JP. Increased vasodilator responses to acetylcholine in psychosocial hypertensive and genetically hypertensive rats. *Hypertension*. 1987, 24 (6): 739-746.

Wilson PWF, D'Agostino RB, Sullivan L, Parise H, Kannel, WB. Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk. *Arch. Inter. Med*. 2002, 162:1867-1872.

Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio DA, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr*. 2003,133(4):1081-1087.

World Health Organization. Obesity and Overweight. Access: 27/02/2010. Available from: <http://www.who.int>

Wrzosek A. Endothelium as target for large-conductance calcium-activated potassium channel openers. *Acta Biochimica Polonica*. 2009, 56 (3):393-404.

Zemel MB, Reddy S, Shehin SE, Lockette W, Sowers JR. Vascular reactivity in Zucker obese rats: role of insulin resistance. *J. Vasc. Med. Biol*. 1990, 2:81-85.

Zhang C, Knudson JD, Setty S, et al. Coronary arteriolar vasoconstriction to angiotensin II is augmented in prediabetic metabolic syndrome via activation of AT1 receptors. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2005, 288:H2154-2162.

Bellaver L, Vital M.A, Arruda AM, Bellaver C. Efeitos da dietilpropiona, energia da dieta e sexo sobre o ganho de peso corporal, peso dos órgãos e deposição de tecidos em ratos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. 2001, 45 (2):167-72,.

Dourmashkin JT, Chang GQ, Gayles EC, Hill JO, Fried SK, Julien C, et al. Different forms of obesity as a function of diet composition. *Int J Obes Rel Met Disord*. 2005, 9:1-11.

Estadella D, Oyama LM, Dâmaso AR, et al. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition*. 2004, 20:218-24.

Gaíva MHG, Couto RC, Oyama LM, et al. Polyunsaturated fatty acidrich diets: effect on adipose tissue metabolism in rats. *Br J Nutr*. 2001, 86:371-7.

Levin BE, Dunn-Meynell AA, McMinn JE, Alperovich M, Cunningham-Bussel A, Chua Jr SC. A new obesity-prone, glucose-intolerant rat strain (F.DIO). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003, 285:R1184-91.

Schrauwen P, Westerterp KR. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. *Br J Nutr*. 2000, 84:417-27.

Thibault L, Woods SC, Westerterp-Plantenga MS. The utility of models of human energy homeostasis. *Br J Nutr*. 2004, 92:S41-5.

Van Hove CE, Van der Donckt C, Herman AG, Bult H, Franssen P. Vasodilator efficacy of nitric oxide depends on mechanisms of intracellular calcium mobilization in mouse aortic smooth muscle cells. *BJP*. 2009, 158:920-930.

Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-torfa JP, Weiner CP. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *Journal of cellular physiology*. 2000, 184:409-420.

Schulman IH, Zhou MS, Raj L. Interaction between nitric oxide and angiotensin II in the endothelium: role in atherosclerosis and hypertension. *J Hypertens*. 2006, 24:S45–50.