



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NATALIA VERONEZ DA CUNHA

**ENVOLVIMENTO DAS PROSTAGLANDINAS NOS
PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E INFLAMATÓRIOS
EM RATOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR GLUTAMATO
MONOSSÓDICO**

NATALIA VERONEZ DA CUNHA

**ENVOLVIMENTO DAS PROSTAGLANDINAS NOS
PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E INFLAMATÓRIOS
EM RATOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR GLUTAMATO
MONOSSÓDICO**

Dissertação apresentada no Curso de pós-Graduação Stricto Sensu em Patologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra Marli Cardoso Martins Pinge

Co-orientador: Prof. Dr. Phileno Pinge Filho

Londrina
2010

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C972e Cunha, Natalia Veronez da.

Envolvimento das prostaglandinas nos parâmetros cardiovasculares e inflamatórios em ratos com obesidade induzida por glutamato monossódico / Natalia Veronez da Cunha. – Londrina, 2010.

47 f. : il.

Orientador: Marli Cardoso Martins Pinge.

Co-orientador: Phileo Pinge Filho.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Obesidade – Teses. 2. Pressão arterial – Teses. 3. Prostaglandinas – Teses. 4. Óxido nítrico – Teses. 5. Glutamato monossódico – Teses. 6. Rato como animal de laboratório – Teses. I. Pinge, Marli Cardoso Martins. II. Pinge Filho, Phileo. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 616-092

NATALIA VERONEZ DA CUNHA

**ENVOLVIMENTO DAS PROSTAGLANDINAS NOS PARÂMETROS
CARDIOVASCULARES E INFLAMATÓRIOS EM RATOS COM
OBESIDADE INDUZIDA POR GLUTAMATO MONOSSÓDICO**

Dissertação apresentada no Curso de pós-Graduação Stricto Sensu em Patologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Marli Cardoso Martins Pinge
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Corrêa
FMRP – Ribeirão Preto - SP

Prof^ª. Dra. Gislaine Garcia Pelosi Gomes
UEL – Londrina - PR

Londrina, 23 de Fevereiro de 2010.

*Ao amor da minha vida, Raphael,
que, com muito apoio e compreensão,
nunca mediu esforços e sempre me
encorajou, todo meu amor, meu carinho e
meu respeito.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me concedido a graça de concluir mais uma etapa da minha caminhada.

Às duas pessoas mais importantes da minha vida: Celso e Marizete, meus pais, que sempre me apoiam e se alegram por verem meus sonhos sendo concretizados, mesmo não sabendo muito bem para que serve tudo isso.

À minha orientadora, Prof. Dra Marli Cardoso Martins Pinge, pela dedicação, incentivo e doação dispensados para a elaboração deste trabalho e, acima de tudo, por sua amizade, me mostrando que vale a pena fazer sempre o melhor.

Ao Prof. Dr. Phileo Pinge Filho, meu co-orientador e amigo, pela oportunidade, ensinamentos e experiências.

A todos meus amigos e companheiros incansáveis do laboratório pelo trabalho em equipe: Samantha, Alexandro, Ozahyr, Hiviny, Rosi, Thiago e Juliana. Em especial a minha amiga-irmã Marlusa, pela intensa amizade em todos os momentos. Obrigada por tudo!

Aos amigos Ana Cristina, Cláudia, Carol, Fran, Mateus, Pâmela, Samantha, Silas, Paula, Tânia, Thais e professores do curso de pós-graduação em Patologia Experimental, pelas ricas, muitas vezes sofridas, mas sempre inesquecíveis experiências compartilhadas.

A todos dos Departamentos de Ciências Patológicas e Ciências Fisiológicas que colaboraram, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho.

Aos meus “gordinhos”, pois sem eles a realização desse trabalho não seria possível.

***Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
a presença distante das estrelas!***

Mário Quintana

CUNHA, Natalia Veronez da. **Envolvimento das prostaglandinas nos parâmetros cardiovasculares e inflamatórios em ratos com obesidade induzida por glutamato monossódico**. 2010. 47 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

A obesidade é considerada uma epidemia mundial, estando associada a diferentes fatores de riscos, entre eles a hipertensão. A literatura tem mostrado que os níveis circulantes de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas e citocinas, estão elevados em indivíduos obesos. Além disso, dados clínicos e experimentais apóiam uma ligação entre a disfunção endotelial e inflamação. O modelo de obesidade hipotalâmica induzido por glutamato monossódico (MSG) tem sido extensivamente investigado do ponto de vista metabólico, porém a fisiopatologia cardiovascular e a modulação autonômica envolvida não estão totalmente compreendidas. Como resultado deste tratamento um número de anormalidades endócrinas e comportamentais como distúrbios no crescimento, hipogonadismo e obesidade têm sido reportadas. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do bloqueio farmacológico da COX-2 sobre os níveis de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e pressão arterial em animais não anestesiados e os níveis de prostaglandinas (PGE₂) e óxido nítrico (NO) plasmáticos em ratos obesos MSG. A obesidade foi induzida pela administração intradérmica de 4 mg/g de peso corporal de glutamato monossódico ou salina equimolar nos 5 primeiros dias de vida de ratos wistar. Aos 60 dias iniciou-se o tratamento com celecoxibe (50 mg/kg) ou salina 0,9%. Aos 90 dias de vida, os animais foram anestesiados para cateterismo da artéria femoral e após 24 horas, em estado consciente, foi realizado o registro da PAM e FC por uma hora. O registro foi utilizado para análise espectral da VFC. Ao final do experimento, amostras de sangue heparinizado foram coletadas e o plasma obtido foi utilizado para dosagem de NO por meio da quantificação de nitrito após tratamento da amostra com cádmio e dosagem de prostaglandinas através do método ELISA por competição, utilizando um kit comercial. Fragmentos do fígado foram processados para análise histopatológica. Ratos obesos MSG apresentaram hipertensão arterial em comparação com os animais controle, que foi atenuada após o tratamento com celecoxibe, sem alterações na FC. A obesidade induzida por MSG promoveu aumento do componente LF nas unidades absolutas e normalizadas e uma diminuição no HF normalizado na análise da VFC no domínio da frequência, sem alteração pelo tratamento com celecoxibe. Os níveis de PGE₂ foram maiores nos animais obesos e o tratamento com celecoxibe diminuiu esses valores em ambos os grupos. Os níveis de NO não se mostraram diferentes entre os grupos. A análise histopatológica mostrou que os animais MSG apresentaram esteatose hepática não alcoólica, que foi modificada pelo tratamento com o inibidor da COX-2. Esses resultados demonstram uma forte associação entre pressão arterial e produtos do metabolismo da COX-2 e sugerem um possível papel para as PGE₂ na fisiopatologia da hipertensão derivada da obesidade hipotalâmica, além de uma maior ativação simpática e esteatose hepática não alcoólica.

Palavras-chave: Glutamato monossódico. Celecoxibe. Prostaglandina. Pressão arterial. Frequência cardíaca.

CUNHA, Natalia Veronez da. **Involvement of prostaglandins in inflammatory and cardiovascular parameters in rats with obesity induced by monosodium glutamate**. 2010. 47 p. Dissertation (Master in Experimental Pathology) – State University of Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

The obesity is considered a worldwide epidemic and is associated with different risk factors, including hypertension. The literature has shown that circulating levels of inflammatory mediators such as prostaglandins and cytokines, are elevated in obese individuals. Furthermore, clinical and experimental data support a link between endothelial dysfunction and inflammation. The model of hypothalamic obesity induced by monosodium glutamate (MSG) has been extensively investigated the metabolic point of view, but the pathophysiology of cardiovascular and autonomic modulation involved are not fully understood. As a result of this treatment a number of endocrine abnormalities, and behavioral and growth disorders, hypogonadism and obesity have been reported. The objective of this study was to evaluate the effects of pharmacological blockade of COX-2 on the levels of mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR), heart rate variability (HRV) and blood pressure in unanesthetized animals and the levels prostaglandin (PGE₂) and nitric oxide (NO) plasma levels in MSG obese rats. Obesity was induced by intradermal administration of 4 mg / g body weight of monosodium glutamate or saline equimolar within the first 5 days of life of Wistar rats. At 60 days started treatment with celecoxib (50 mg / kg) or saline 0.9%. At 90 days of life, the animals were anesthetized for catheterization of the femoral artery and after 24 hours in conscious state, there was the record MAP and HR for an hour. The record was utilized for spectral analysis of HRV. At the end of the experiment, heparinized blood samples were collected and the plasma obtained was used for measurement of NO by quantifying nitrite after treatment of cadmium and dosage of prostaglandins by the ELISA test by competition, using a commercial kit. Fragments of liver were processed for histopathological analysis. MSG obese rats had hypertension compared with control animals, which was attenuated after treatment with celecoxib, with no changes in HR. The MSG-induced obesity promoted increased LF component in absolute and normalized units and a decrease in normalized HF HRV in the frequency domain, without change by treatment with celecoxib. The levels of PGE₂ were higher in obese animals and treatment with celecoxib reduced these values in both groups. NO levels were not different between groups. The analysis showed that the MSG animals showed NAFLD, which was modified by treatment with a COX-2. These results demonstrate a strong association between blood pressure and metabolic products of COX-2 and suggest a possible role for PGE₂ in the pathophysiology of hypertension derived from hypothalamic obesity, and increased sympathetic activity and NAFLD.

Keywords: Monosodium glutamate. Celecoxib. Prostaglandin. Blood pressure. Heart rate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema global das reações envolvidas na determinação de nitrito plasmático empregando-se o método de Cádmio-Cobre seguido da reação de Griess.....	25
Figura 2 - Reação catalisada pela acetilcolinesterase.....	26
Figura 3 - Distribuição da placa de ELISA.....	26
Figura 4 - Esquema da reação para detecção de PGE ₂ por ELISA de competição.....	27
Figura 5 - Evolução temporal do peso corporal dos ratos dos grupos controle e MSG pré-tratados com salina e celecoxibe	30
Figura 6 - Efeitos da obesidade hipotalâmica sobre a pressão arterial média (PAM) (A) e frequência cardíaca (FC) (B) em ratos acordados tratados ou não com celecoxibe	32
Figura 7 - Níveis plasmáticos de prostaglandinas (PGE ₂) em todos os grupos estudados.....	35
Figura 8 - Os níveis plasmáticos de nitrito em todos os grupos estudados.....	35
Figura 9 - Fotomicrografia do fígado de todos os grupos estudados.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos da administração de MSG neonatal em ratos adultos pré-tratados com salina ou celecoxibe	30
Tabela 2 - Parâmetros espectrais do intervalo de pulso.....	33
Tabela 3 - Parâmetros espectrais da pressão arterial sistólica	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AchE	Acetilcolinesterase
ATP	Adenosina trifosfato
B0	Ligação máxima
Blk	Em branco
CNA	Comprimento naso-anal
COX	Cicloxigenase
COX-1	Cicloxigenase 1
COX-2	Cicloxigenase 2
DCV	Doenças cardiovasculares
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis nitrobenzóico
eNOs	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FC	Frequência cardíaca
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HE	Hematoxilina-eosina
HF	Frequência alta
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
iNOs	Enzima óxido nítrico sintase induzível
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LF	Frequência baixa
MSG	Glutamato monossódico
nNOS	Enzima óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NSB	Ligação não específica
O₂⁻	Ânion superóxido
OMS	Organização mundial de saúde
OONO	Ânion peroxinitrito
PA	Pressão arterial pulsátil
PAI-1	Ativador de plasminogênio –1
PAM	Pressão arterial média
PGE₂	Prostaglandina

PGHS-2	Enzima prostaglandina-endoperóxido sintase-2
PGIS	Enzima PGI ₂ sintase
PI	Intervalos de pulso
PNSN	Pesquisa nacional sobre saúde e nutrição
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
SM	Síndrome metabólica
SNC	Sistema nervoso central
TA	Atividade total
TNF-α	Fator de necrose tumoral
VFC	Variabilidade da frequência cardíaca
VLF	Frequência muito baixa
WHO	World health organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1	ANIMAIS	22
3.2	INDUÇÃO DA OBESIDADE	22
3.3	PESO CORPORAL.....	22
3.4	BLOQUEIO FARMACOLÓGICO DA PRODUÇÃO DE PROSTAGLANDINAS	23
3.5	CANULAÇÃO DA ARTÉRIA E VEIA FEMORAIS	23
3.6	REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA.....	24
3.7	VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA (VFC)	24
3.8	DETERMINAÇÃO DE NITRITO PLASMÁTICO COMO ESTIMATIVA DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICA DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).	24
3.9	DOSAGEM DE PROSTAGLANDINA E ₂ (PGE ₂)	25
3.10	ANÁLISE HISTOLÓGICA DO FÍGADO	27
3.11	DROGAS UTILIZADAS.....	28
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4	RESULTADOS	29
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE MSG	29
4.2	VALORES DE PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA	31
4.3	ANÁLISE ESPECTRAL DO INTERVALO DE PULSO E PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA	33
4.4	NÍVEIS DE PROSTAGLANDINAS PLASMÁTICAS	34
4.5	NÍVEIS INDIRETOS DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)	35
4.6	ESTEATOSE HEPÁTICA	36
5	DISCUSSÃO	37

6 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada uma epidemia mundial independentemente de condições econômicas e sociais, sendo um importante fator de risco para uma série de doenças crônicas, como diabetes, doenças cardiovasculares e câncer.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 10% da população mundial de indivíduos adultos está obesa, e em alguns países do ocidente a porcentagem de obesos é ainda maior (25% ou mais) (OGDEN *et al.*, 2006). No Brasil, de acordo com dados da Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição (PNSN), o excesso de peso está presente em 27 milhões de indivíduos. Desses, 6,8 milhões são classificados como obesos. Esta não é uma doença restrita aos adultos, já que pelo menos 20 milhões de crianças até os cinco anos de idade estão com sobrepeso.

A obesidade caracteriza-se pelo excesso de gordura corpórea, que pode ser desencadeada por erros no metabolismo e na utilização dos nutrientes ou por balanço energético positivo, que ocorre quando o valor calórico ingerido é superior ao gasto, promovendo aumento dos estoques de energia e peso corporal (WHO – World Health Organization, 1997).

Apesar de a obesidade ser o maior fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV), os mecanismos pelos quais ela contribui não são completamente esclarecidos. A obesidade também está relacionada à síndrome metabólica (SM), uma entidade clínica complexa que consiste de obesidade abdominal, resistência à insulina, intolerância à glicose, hipertensão e hipertrigliceridemia e/ou redução dos níveis de colesterol – HDL, estando associada com a alta incidência de DCV.

Há apenas um século atrás as doenças infecciosas eram as maiores causas de mortalidade, enquanto hoje as doenças crônicas são as grandes causas de morte no mundo. As DCV causaram 17 milhões de morte em 2002, principalmente decorrentes de isquemias e infartos. A prevalência global de todas as doenças crônicas está aumentando, com a maioria delas ocorrendo em países em desenvolvimento e projetadas para aumentar nas próximas décadas (RANA *et al.*, 2007).

Em animais de experimentação é descrito um modelo que mimetiza,

pelo menos em parte, a situação clínica de síndrome metabólica rotulada como obesidade neuroendócrina. Assim, essa obesidade pode ser conseguida em ratos por meio da administração subcutânea de glutamato monossódico (MSG), um aminoácido neuroexcitatório lesivo ao sistema nervoso central (KIZER *et al.*, 1978).

O efeito da administração de MSG no período neonatal foi estudado extensivamente (PERELLO *et al.*, 2003; DOLNIKOFFI *et al.*, 2001; MACHEO *et al.*, 2000; BALBO *et al.*, 2000; OLNEY, 1969). Um número de anormalidades endócrinas e comportamentais, tais como distúrbios do crescimento, obesidade, disfunção sexual e parada no crescimento tem sido descritas como resultado deste tratamento (MARTINS *et al.*, 2004; PERELLO *et al.*, 2003; de CARVALHO *et al.*, 2002; HIRATA *et al.*, 1997).

A administração subcutânea de MSG em ratos durante o período neonatal provoca a destruição de corpos celulares de neurônios localizados no sistema nervoso central (SNC) devido ao fato de que a barreira hematoencefálica não está totalmente desenvolvida. A lesão ocorre principalmente em neurônios localizados no núcleo arqueado do hipotálamo, uma área intimamente envolvida na regulação de diferentes funções, como balanço energético e funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise, induzindo a uma situação de desnervação funcional dentro desse eixo e do eixo hipotálamo-tecido adiposo (DAWSON *et al.*, 1997). As extensas lesões no SNC e os consequentes déficits potenciais têm sido usados por diferentes autores para explicar as respostas neuroendócrinas alteradas encontradas neste modelo (PERELLO *et al.*, 2003).

Quando a ingestão de alimento excede o gasto energético resulta em um estado de excesso de nutrientes que pode disparar respostas em vários tecidos: células endoteliais (vascular); hepatócitos (fígado); miócitos (músculos); adipócitos (gordura) e monócitos e macrófagos (componentes do sistema imunológico inato) que elevam as disfunções metabólicas (WISSE *et al.*, 2008).

Um das respostas celulares adversas para o excesso de nutrientes é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas moléculas são geradas durante a oxidação de metabólitos energéticos como glicose e ácidos graxos que ocorre nas mitocôndrias e por outros processos metabólicos intracelulares. A produção excessiva dessas moléculas gera “estresse oxidativo”, que pode provocar a injúria celular e tecidual, e estimular a resposta inflamatória, onde as prostaglandinas (PGE₂) têm um papel. Essa resposta ativa padrões de sinalização

celular (como c-Jun N-quinase terminal e o inibidor do fator de transcrição NF-Kappa B) que promovem a inflamação (HOTAMISLIGIL, 2006).

As prostaglandinas são hormônios locais, presentes em todos os tecidos animais, responsáveis por uma série de funções patológicas e fisiológicas. São formadas a partir do ácido araquidônico pela ação da enzima cicloxigenase (COX). Duas formas dessa enzima foram descobertas e são conhecidas como COX-1 e COX-2, ambas convertem o ácido araquidônico em prostaglandinas, mas elas diferem na biodistribuição e ações fisiológicas. A COX-1 é a forma predominante da enzima, sendo expressa em todo o corpo e exercendo várias funções fisiológicas homeostáticas, como a manutenção da mucosa gástrica, o fluxo sanguíneo e a agregação de plaquetas. Por outro lado, a COX-2 é expressa principalmente como resposta a estímulos inflamatórios, estando envolvida na produção de prostaglandinas que mediam a dor e a inflamação (GOODMAN & GILMAN, 1996).

Em um trabalho que utiliza o modelo de obesidade induzida por um aumento do teor de gordura na alimentação, há evidências que sugerem que a COX-2 pode ser diferencialmente responsável pela produção de PGE₂ sistêmica e a geração de espécies reativas de oxigênio, enquanto que a COX-1 medeia a síntese de tromboxano (HSIEH *et al.*, 2009). Contrariamente, HODNETT e colaboradores (2009) mostraram que em ratos obesos Zucker, a síntese de prostaglandinas e outros mecanismos de síntese podem estar prejudicadas devido à nitração aumentada de resíduos de tirosina da enzima PGI₂ sintase (PGIS) responsáveis pela síntese de PGI₂, resultando numa atenuação da hiperemia funcional.

A obesidade hoje tem sido vista como um estado inflamatório de baixa intensidade, e as citocinas vêm sendo exploradas de forma especulativa dentre os potenciais mecanismos envolvidos no aumento da atividade simpática na obesidade. Sabe-se que os adipócitos do tecido adiposo branco produzem uma variedade de citocinas inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e leptina na proporção de seus volumes, e a obesidade está associada com o aumento de vários destes peptídeos pró-inflamatórios (MATHIEU *et al.*, 2009; MORRIS, 2008; LOPES, 2007; ANEJA *et al.*, 2004).

Há vários mecanismos para poder explicar a atividade inflamatória relacionada com a adiposidade. Recentes estudos mostram que o tecido adiposo é um órgão parácrino e endócrino muito ativo. O tecido adiposo perivascular também parece exercer essas ações secretoras e sinalizadoras, sendo muito ativo na

produção de citocinas. A adiponectina é uma proteína de 30 kDa também secretada pela gordura branca que aumenta a sensibilidade à insulina e estimula a oxidação dos ácidos graxos musculares. Os níveis sanguíneos de adiponectina estão reduzidos na obesidade. (MORRIS, 2008). A adiponectina também é um fator relaxante, sendo protetor contra hipertensão e DCV. Todavia, na obesidade pode haver reversão de seu papel benéfico com queda na produção de fatores vasodilatadores afetando a tensão e função vascular (MORRIS, 2008; GUZIK *et al.*, 2007).

Outro ponto importante é que o aumento de tecido adiposo tem relação com a resistência à insulina, que, por sua vez, tem relação com doenças cardiovasculares. Os mecanismos fisiopatológicos para a resistência à insulina que levam à doença cardiovascular são vários: *a)* a intolerância à glicose e a hiperglicemia facilitam a formação de produtos glicosados, que interagem com receptores para produtos glicosados e promovem diretamente a aterosclerose por meio da modificação da função endotelial, de macrófagos e células musculares lisas; *b)* aumento da concentração de apoproteína B e aumento da proporção da fração de partículas de LDL-colesterol pequena e densa, redução do HDL-colesterol e aumento de triglicérides; *c)* a resistência à insulina reduz a produção de óxido nítrico, prejudicando a vasodilatação mediada pelo endotélio; *d)* a resistência à insulina contribui para o desenvolvimento da hipertensão, que é um fator de risco para doenças cardiovasculares; *e)* a resistência à insulina aumenta o risco de trombose por meio do mecanismo que envolve aumento inibidor do ativador de plasminogênio -1 (PAI-1); *f)* a resistência à insulina, per si, é caracterizada por um estado pró-inflamatório, pois está associada à elevada concentração de marcadores inflamatórios (MATHIEU *et al.*, 2009; LOPES, 2007).

A associação da obesidade com um estado de inflamação crônica pode ser constatada pelo fato de observamos infiltrados de macrófagos no tecido muscular e adiposo (WELLEN & HOTAMISLIGIL, 2005) e produção anormal de mediadores pró-inflamatórios como o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) (MATHIEU *et al.*, 2009; MORRIS, 2008; ANEJA *et al.*, 2004) e ativação da óxido nítrico sintase induzível (iNOs) (PERREAULT & MARRETE, 2001). Este estado inflamatório está associado a um déficit de energia na forma de ATP (WLODEK & GONZALES, 2003) e à superprodução simultânea de gordura e leptina (MUNZBERG & MYERS, 2005). Assim sendo, a inflamação parece ser um evento

importante na obesidade. É possível que a relação entre obesidade e doenças vasculares dependa, em parte, do aumento da produção e liberação desses mediadores inflamatórios do tecido adiposo (ANEJA *et al.*, 2004).

O óxido nítrico (NO) é um radical produzido a partir da L-arginina, por uma reação mediada pela enzima NO-sintase. Até o presente, momento foram identificadas três isoformas da NOS: neuronal NOS (nNOS ou NOS I), presente no cérebro, medula espinhal, gânglios simpáticos, nervos periféricos, células epiteliais do estômago, útero, pulmão e músculo esquelético; endotelial NOS (eNOS ou NOS III), encontrada em células endoteliais, músculo liso vascular e músculo cardíaco, sendo estas duas isoformas expressas constitutivamente dentro de condições fisiológicas; e uma terceira isoforma induzível da NOS (iNOS ou NOS II), cujas fontes podem ser células endoteliais, células epiteliais, macrófagos, neutrófilos, células do músculo liso vascular e fibroblastos (MONCADA, 1993; RANDOMSKI *et al.*, 1990; MAYER & ANDREW, 1998; COLASANTI & SUZUKI, 2000).

O NO participa da inflamação de duas formas diferentes. O NO produzido pela via induzível, como o que ocorre em macrófagos, tem ações pró-inflamatórias (o qual é estimulado por TNF- α , IL-1 e IL-6), enquanto que o NO produzido pela via endotelial e neuronal parecem possuir ações antiinflamatórias (DAS, 2001).

A disfunção endotelial é uma característica comum de muitos fatores de risco cardiovasculares, tais como a hipertensão, diabetes, resistência à insulina, obesidade e hiperlipidemia, sendo uma via final importante comum pela qual esses fatores aumentam o risco de aterosclerose. Pode ocorrer como resultado de toxinas metabólicas, tais como ácidos graxos livres e citocinas inflamatórias, incluindo IL-6 e TNF- α . Hiperglicemia, produtos avançados de glicação e outras anormalidades metabólicas podem alterar vias endoteliais de sinalização intracelulares, como a via PI3K-Akt. Finalmente, espécies reativas de oxigênio, particularmente o superóxido, podem retirar o NO vascular e impedir o relaxamento do músculo liso vascular (ZHANG, 2008; JONK *et al.*, 2007; SEMENKOVICH, 2006; KIM *et al.*, 2004). O NO produzido pela eNOS pode ser rapidamente inativado pela reação com superóxido (O_2^-) para formar ânion peroxinitrito ($OONO^-$) (PACHER *et al.*, 2007). O superóxido pode ser formado por NADPH oxidase ou eNOS desacoplada (GRIENGLING *et al.*, 2000; COSENTINO *et al.*, 1998). Assim, há vários mecanismos que podem levar à disfunção endotelial. No entanto, a característica comum é uma redução na

biodisponibilidade de NO, que normalmente serve para proteger o vaso dos eventos moleculares que levam à aterosclerose.

Considerando que a obesidade é uma condição precursora de várias fisiopatologias, dentre elas a hipertensão, o sistema nervoso simpático apresenta-se como um importante candidato dentre os principais mecanismos envolvidos (SHIBAO *et al.*, 2007). O aumento da atividade simpática é uma característica comum à obesidade em humanos e em modelos animais. Esse aumento pode levar ao aumento da pressão arterial via vasoconstrição periférica e aumento da reabsorção tubular renal de sódio (RAHMOUNI *et al.*, 2005).

Esse aumento da atividade simpática no indivíduo obeso está relacionado com outras modificações sistêmicas que resultam em hipertensão. Existem situações que de forma isolada ou interagindo com o sistema nervoso simpático contribuem para a manutenção da pressão elevada no indivíduo obeso. Dentre essas alterações, podem-se destacar a hiperinsulinemia, a hiperleptinemia e o aumento dos ácidos graxos (MATHIEU *et al.*, 2009; MORRIS, 2008; LOPES, 2007; RAHMOUNI *et al.*, 2005; ANEJA *et al.*, 2004).

A análise espectral para o estudo da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) é um instrumento não invasivo valioso usado como marcador quantitativo da atividade autonômica. Com a disponibilidade de gravadores electrocardiográficos multi-canal de alta frequência, a VFC tem potencial para fornecer conhecimentos adicionais valiosos para condições fisiológicas e patológicas, e para reforçar a estratificação de risco cardiovascular (MALLIANI & MONTANO, 2002).

A análise espectral é uma ferramenta que decompõe os sinais cardiovasculares em frequência de componentes e quantifica a potência de cada um desses componentes. Três componentes principais são caracterizados em um registro de curto período, como gravações de 2 a 5 minutos: frequência muito baixa (VLF), frequência baixa (LF) e frequência alta (HF). A distribuição da potência e da frequência central de LF e HF não é fixa, podendo variar em relação às alterações na modulação autonômica cardíaca. A explicação fisiológica do componente VLF não está muito bem definida, e a existência de um processo fisiológico específico atribuível a alterações cardíacas deste período ainda é questionada. Assim VLF avaliada a partir de um registro de curto período é uma medida duvidosa e deve ser evitada ao interpretar os espectros (Task Force of the European Society of

Cardiology the North American Society of Pacing Electrophysiology, 1996; KAMATH & FALLEN, 1993).

A medida dos componentes VLF, LF e HF normalmente são dadas em valores absolutos de potência, porém, LF e HF podem ser medidos em unidades normalizadas, que representam o valor relativo de cada componente em relação ao total, descontando-se o componente VLF (Task Force of the European Society of Cardiology the North American Society of Pacing Electrophysiology, 1996).

A atividade vagal é a principal contribuinte para o componente HF, como visto em observações clínicas e experimentais de manobras autonômicas como a estimulação elétrica vagal, bloqueio dos receptores muscarínicos e vagotomia. Porém, existe um desacordo em relação ao componente LF. Alguns estudos sugerem que LF, quando expresso em unidades normalizadas, é um marcador quantitativo para modulações simpáticas, em outros estudos LF é visto como refletindo tanto atividade simpática quanto vagal. Esta discrepância se deve ao fato de que em algumas condições, associadas com excitação simpática, uma diminuição na potência absoluta do componente LF é observada. Conseqüentemente, a relação LF/HF é considerada por alguns pesquisadores como retrato do equilíbrio simpato-vagal ou reflexo das modulações simpáticas (MONTANO *et al.*, 1994; MALLIANI *et al.*, 1991). Distúrbios no controle autonômico da VFC, incluindo diminuição do tônus vagal, com ou sem aumento no tônus simpático, têm sido evidenciados na obesidade (QUILLOT *et al.*, 2001; GAO *et al.*, 1996).

A obesidade também tem sido associada com a doença hepática gordurosa não alcoólica (esteatose hepática), que é uma condição inflamatória crônica do fígado, cujo espectro de apresentação varia desde uma simples infiltração hepática de gordura (esteatose), passando pelo estabelecimento de um processo inflamatório (esteatoepatite) até a fibrose hepática. Entre os mecanismos fisiopatológicos atualmente relacionados ao desenvolvimento da doença hepática gordurosa não alcoólica em indivíduos obesos estão a resistência insulínica, o estresse oxidativo e a resposta inflamatória (HSIEH *et al.*, 2009; BUQUÉ *et al.* 2008; MANTENA *et al.*, 2008).

O estado de resistência insulínica, frequentemente associado à obesidade, leva ao aumento dos ácidos graxos livres circulantes, que são captados e depositados dentro do hepatócito. Esse depósito ativa a cascata inflamatória,

modulada por uma série de citocinas, incluindo as adipocitocinas, e resulta em exacerbação do estresse oxidativo – processo fundamental para a progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica para fibrose (HSIEH *et al.*, 2009; BUQUÉ *et al.* 2008; MANTENA *et al.*, 2008).

As principais características histológicas da doença hepática gordurosa não alcoólica incluem esteatose macrovesicular e infiltração inflamatória com leucócitos polimorfonucleares e/ou neutrófilos. Corpúsculos de Mallory também podem ser encontrados, bem como degeneração dos hepatócitos e aumento da morte celular. Esta inflamação crônica do fígado pode induzir o desenvolvimento de fibrose em graus diferentes, podendo degenerar em cirrose e hepatocarcinoma (RUBIN *et al.*, 2006). Um estudo mostrou que 80% dos indivíduos obesos têm esteatose hepática, 33% inflamação portal, 24% fibrose e 3% cirrose (BUQUÉ *et al.*, 2008).

Recentes descobertas sugerem que a ativação da cicloxigenase-2 (COX-2) mediada pela inflamação da gordura visceral é importante para o desenvolvimento da resistência à insulina e esteatose hepática em ratos obesos induzidos por alto teor de gordura na alimentação (HSIEH *et al.*, 2009).

Embora os efeitos metabólicos, bioquímicos e mesmo moleculares da administração de MSG em ratos Wistar durante o período neonatal já tenham sido estudados, pouco se sabe sobre os efeitos deste modelo de obesidade neuroendócrina sobre o sistema cardiovascular, especialmente no que se refere ao controle da circulação sistêmica e da função cardíaca. Um trabalho recente realizado com ratos (VOLTERA *et al.*, 2008) mostrou que esse modelo de obesidade apresenta hipertensão e taquicardia, mas a medida foi realizada em animais anestesiados, que conhecidamente podem ter seus níveis pressóricos alterados, em decorrência do uso da anestesia (NEUKIRCHEN e KIENBAUM, 2008).

Dessa forma, a proposta desta dissertação foi avaliar os efeitos do tratamento crônico com celecoxibe, um inibidor seletivo da COX-2, no desenvolvimento da hipertensão no modelo de obesidade hipotalâmica induzida por MSG neonatal, através de medições diretas de pressão arterial e frequência cardíaca em animais adultos conscientes; análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial; dosagem de PGE₂ e de NO no plasma em ratos obesos e controle.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem como objetivo principal investigar os efeitos do bloqueio farmacológico da COX-2 sobre parâmetros cardiovasculares, inflamatórios e autonômicos em animais obesos MSG não anestesiados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Caracterizar os parâmetros basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos obesos MSG não anestesiados, tratados ou não com celecoxibe;
- 2- Realizar a análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial nos ratos obesos tratados ou não com celecoxibe e comparar com os animais controle;
- 3- Quantificar os níveis plasmáticos de NO e prostaglandinas (PGE₂) de todos os animais experimentais;
- 4- Analisar o efeito do pré-tratamento com celecoxibe sobre o índice de Lee e peso das gorduras retroperitoneal e perigonadal;
- 5- Analisar a histologia do fígado dos animais experimentais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Departamento de Ciências Fisiológicas (CIF) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade (CEEA, processo nº 05921).

3.1 ANIMAIS

Para esta pesquisa foram utilizados ratos Wistar, obtidos a partir de cruzamentos realizados no biotério setorial do departamento de Ciências Fisiológicas. Aos 21 dias de vida, esses animais foram desmamados e mantidos em gaiolas coletivas (máximo de cinco animais) à temperatura constante de 21 ± 2 °C, com ciclo claro/escuro de 12 horas. Água e ração foram fornecidas “*ad libitum*”.

3.2 INDUÇÃO DA OBESIDADE

Ratos Wistar receberam durante os cinco (5) primeiros dias de vida injeções intradérmicas de glutamato monosódico (4mg/g) e os controles receberam salina equimolar. A obesidade foi avaliada aos 90 dias pelo cálculo do Índice de Lee [peso corporal (g) $1/3$ / comprimento nasoanal (cm) x (1000)] e peso das gorduras retroperitoneal e perigonadal.

3.3 PESO CORPORAL

A partir dos 21 dias de vida, os ratos dos grupos controle e experimental foram avaliados diariamente para determinação da massa corporal. Essa avaliação ocorreu até os 90 dias de vida dos animais. Os dados coletados foram utilizados para elaboração de curvas de crescimento.

3.4 BLOQUEIO FARMACOLÓGICO DA PRODUÇÃO DE PROSTAGLANDINAS

Ratos Wistar que receberam o glutamato monossódico ou salina equimolar no período neonatal foram divididos em dois (2) grupos aleatoriamente e tratados pela via intraperitoneal ou com celecoxibe (inibidor seletivo de COX-2, 50mg/Kg) (TATAKIHARA *et al.*, 2008) ou salina 0,9% (controle). O celecoxibe foi dissolvido em solução salina. Os diferentes tratamentos tiveram início aos 60 dias de vida e foram administrados diariamente até que os animais completassem 90 dias de idade.

3.5 CANULAÇÃO DA ARTÉRIA E VEIA FEMORAIS

Os animais controle e MSG foram submetidos à cirurgia sob anestesia de pentobarbital sódico (50 mg/kg) por via intraperitoneal para implantação de uma cânula na artéria femoral com o objetivo de monitorização da pressão artéria. A cânula era constituída por segmento de polietileno PE-10 (4-5 cm) soldado a segmento de polietileno PE-50 (12-13 cm), previamente preenchido com solução salina 0,9% e anticoagulante (15 U/mL de heparina em solução salina) e obstruídos com um oclisor. Uma incisão de 1,0 cm foi feita na fossa ilíaca direita do animal e a artéria femoral direita dessecada. Uma linha de costura foi utilizada para se isolar a região distal da artéria femoral e uma pinça hemostática foi nela colocada, obstruindo temporariamente o fluxo arterial. Em seguida, um pequeno corte foi feito na artéria femoral e a cânula introduzida e cuidadosamente amarrada na artéria. Após esse procedimento, a cânula era exteriorizada na região dorsal do animal através de um trocater por via subcutânea e fixada à pele por sutura cirúrgica. Quando a administração endovenosa de drogas se fez necessária, um catéter similar foi introduzido na veia femoral.

Os animais foram mantidos em caixas individuais durante todo o período pós-operatório.

3.6 REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

Após 24 horas da canulação, os animais foram submetidos ao registro direto da pressão arterial e frequência cardíaca.

A cânula arterial do animal foi acoplada a um transdutor de pressão (MLT0380, ADInstruments) conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (Powerlab, 4/20T, ADInstruments), obtendo-se assim a pressão pulsátil (PA), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). Durante o período de registro, os animais foram mantidos dentro de caixas individuais em ambiente silencioso. Experimentos pilotos já evidenciaram que os procedimentos utilizados neste protocolo não causam reações dolorosas ou outro tipo de comportamento que interfira no registro cardiovascular.

Após 40 minutos de registro da PA e FC, o animal era desconectado do aparelho de registro e eutanasiado com uma dose letal de anestésico.

3.7 VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA (VFC)

O registro basal de pelo menos 10 minutos de gravações da FC nos grupos controle e experimental foram submetidos à análise da VFC no domínio da frequência. As gravações foram processadas utilizando-se o software informático, que se aplica um algoritmo para detectar a inflexão dos pontos ciclo-a-ciclo de uma onda periódica, determinando os valores de cada batimento das pressões sistólicas e diastólicas. Os intervalos de pulso (PI) de séries temporais também foram gerados para medir o intervalo de tempo entre as leituras adjacentes da pressão diastólica. A variabilidade global da PI foi avaliada com base na variância das séries temporais. A variabilidade do PI no domínio frequência foi avaliada pela análise espectral, de acordo com RUBINI *et al.*, 1993.

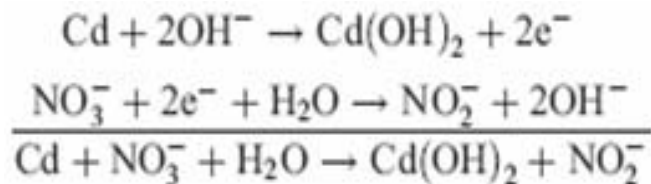
3.8 DETERMINAÇÃO DE NITRITO PLASMÁTICO COMO ESTIMATIVA DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICA DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).

Após 30 minutos da finalização do registro cardiovascular, amostras de sangue heparinizado (1,5 ml) foram coletadas dos animais controle e MSG através da cânula arterial. O sangue foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos a

4°C. O plasma obtido foi utilizado para dosagem de NO por meio da quantificação de nitrito após tratamento da amostra com cádmio e segundo método descrito por Navarro-Gonzalez e colaboradores (1998), adaptado por Panis (2009).

O método baseia-se na redução de nitrato a nitrito mediada por reações de óxi-redução ocorridas entre o nitrato presente na amostra e o sistema cádmio-cobre dos reagentes (Figura 1), com posterior diazotação e detecção colorimétrica do azocomposto formado pela adição do reagente de Griess em leitor de microplaca a 550 nm (modelo ELX-800, Biotek Instruments Inc.).

Figura 1 - Esquema global das reações envolvidas na determinação de nitrito plasmático empregando-se o método de Cádmio-Cobre seguido da reação de Griess.

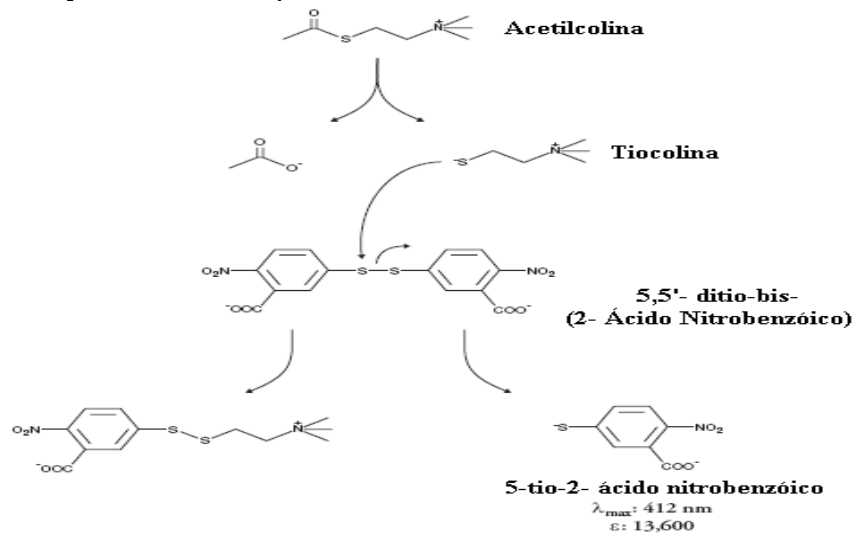


3.9 DOSAGEM DE PROSTAGLANDINA E₂ (PGE₂)

Alíquotas do plasma foram também utilizadas para a quantificação de PGE₂ através do método ELISA por competição, utilizando um kit comercial (Cayman Chemical Company).

O ensaio é baseado na competição entre a PGE₂ da amostra e PGE₂ ligada à acetilcolinesterase (AchE-PGE₂). Como a concentração de AchE-PGE₂ é constante e o conteúdo de PGE₂ da amostra é variável, a quantidade de AchE-PGE₂ capaz de se ligar no anticorpo monoclonal é inversamente proporcional à quantidade de PGE₂ da amostra. Este complexo liga-se ao anticorpo anti-IgG da placa pré-sensibilizada e, após a lavagem para remoção das moléculas não ligantes, adiciona-se o reagente de Ellman, substrato da acetilcolinesterase (AchE). Este reagente é composto por ácido 5,5-ditiobis nitrobenzoico (DTNB) e acetiltiocolina, cuja degradação pela AchE produz tiocolina, capaz de reagir com o DTNB formando ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (Figura 2). O produto desta reação enzimática apresenta coloração amarela e pode ser medido através da absorbância a 412 nm. A intensidade da cor medida espectrofotometricamente é proporcional à quantidade de AchE-PGE₂ e é inversamente proporcional à concentração de PGE₂ da amostra.

Figura 2 - Reação catalisada pela acetilcolinesterase



Basicamente, a preparação da placa e da reação pode ser descrita da seguinte maneira: após diluição dos reagentes liofilizados fornecidos pelo kit, as soluções foram adicionadas aos poços da placa segundo esquema abaixo (Figura 3):

Figura 3 - Distribuição da placa de ELISA

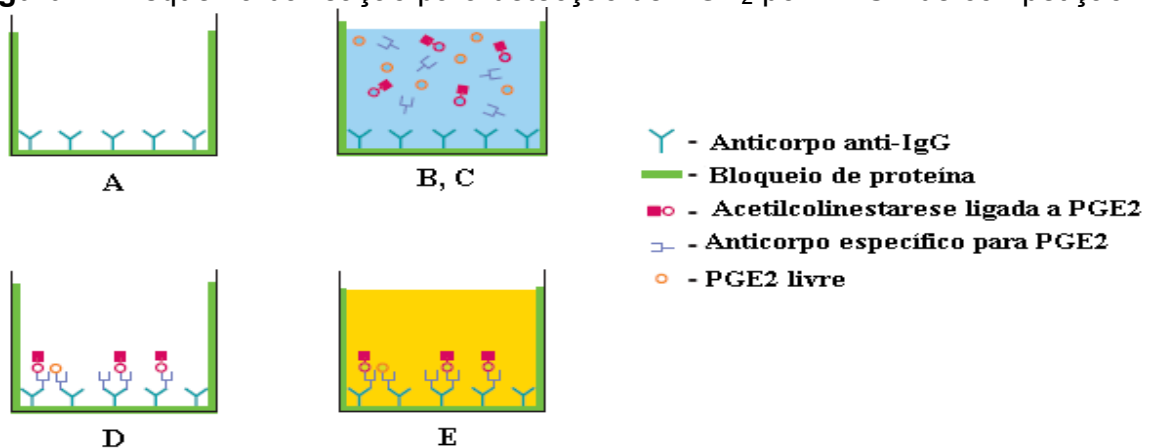
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	S1	S1	1	1	1	9	9	9	17	17	17
B	Blk	S2	S2	2	2	2	10	10	10	18	18	18
C	NSB	S3	S3	3	3	3	11	11	11	19	19	19
D	NSB	S4	S4	4	4	4	12	12	12	20	20	20
E	B ₀	S5	S5	5	5	5	13	13	13	21	21	21
F	B ₀	S6	S6	6	6	6	14	14	14	22	22	22
G	B ₀	S7	S7	7	7	7	15	15	15	23	23	23
H	TA	S8	S8	8	8	8	16	16	16	24	24	24

Blk – em branco
TA - Atividade Total
NSB - Ligação não-específica
B₀ -Ligação máxima
S1-SS - Padrões 1-8
1-24 - Amostras

Cada placa contém 2 brancos (Blk), 2 poços de ligação não específicos (NSB), 2 poços de ligação máxima (B₀) e oito pontos da curva padrão distribuídos em duplicata. Foram adicionados 100 µL do tampão de reação (EIA buffer) aos poços NSB e 50 µL aos poços B₀. Alíquotas de 50 µL dos padrões diluídos a concentrações variáveis de 15.6 a 2 pg/mL foram adicionadas na placa nas colunas 2 e 3. Em seguida, 50 µL da amostra foram adicionados a cada poço

em duplicata. AchE-PGE₂ foi adicionada em todos os poços (50 µL), com exceção dos poços TA e Blk. O anticorpo monoclonal foi adicionado a todos os poços (50 µL), com exceção dos poços TA, NSB e Blk. Em seguida, a placa foi incubada à temperatura ambiente por 60 minutos, com posterior adição do reagente de Ellman e 5 µL de marcador ao poço TA, com leitura da absorbância a 412 nm em leitor de microplaca (modelo Victor 3 –multilabel counter 1420, PerkinElmer).

Figura 4 - Esquema da reação para detecção de PGE₂ por ELISA de competição



- A- Placa pré-sensibilizada com anticorpo anti-IgG;
 B- Adição de amostra, anticorpo anti-PGE₂ e AchE-PGE₂;
 C- Reação do anti-PGE₂ com a PGE₂ da amostra ou com a AchE-PGE₂;
 D- Reconhecimento do complexo anticorpo-PGE₂ (marcada ou da amostra) pelos anti-IgG da placa;
 E- Revelação da placa com reagente de Ellman.

Os dados obtidos foram plotados em tabelas fornecidas pelo fabricante (www.caymanchem.com) e expressos em pg/mL.

3. 10 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO FÍGADO

Os animais eutanasiados foram submetidos à toracotomia, onde o fígado foi retirado para análise histopatológica.

Fragmentos do fígado foram fixados em solução de formalina tamponada 10% durante 24 horas, desidratados em concentrações crescentes de álcool e diafanizados em xilol. Em seguida, realizou-se a inclusão em parafina e

blocagem do material para corte. Os cortes obtidos por microtomia mecânica (5 μ m de espessura) foram fixados em lâminas de vidro, corados por hematoxilina-eosina (HE) e analisados por microscópio eletrônico com objetiva de 20x. As imagens foram obtidas por meio de capturador de imagens, acoplado ao fotomicroscópio Leica DMLB (programa Leica IM50).

3.11 DROGAS UTILIZADAS

Para este trabalho foram utilizadas as seguintes drogas:

- Celecoxibe (celebra, Pfizer Pharmaceuticals LLC – Caguas – Porto Rico);
- Cloreto de sódio P.A. (Casa Americana de produtos para laboratório – CAAL);
- Glutamato monossódico (Sigma co, St. Louis, MO, USA);
- Heparina sódica (Laboratórios Roche, Brasil);
- Pentobarbital sódico (Laboratórios Cristália, Brasil).

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa estatístico “INSTAT” (GraphPad, San Diego, CA). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As comparações feitas num mesmo animal ao longo do tempo foram analisadas por Análise de Variância (ANOVA), e as comparações entre os grupos controles e experimentais foram analisadas pelo teste t-Student não pareado, considerando as diferenças significantes para um valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

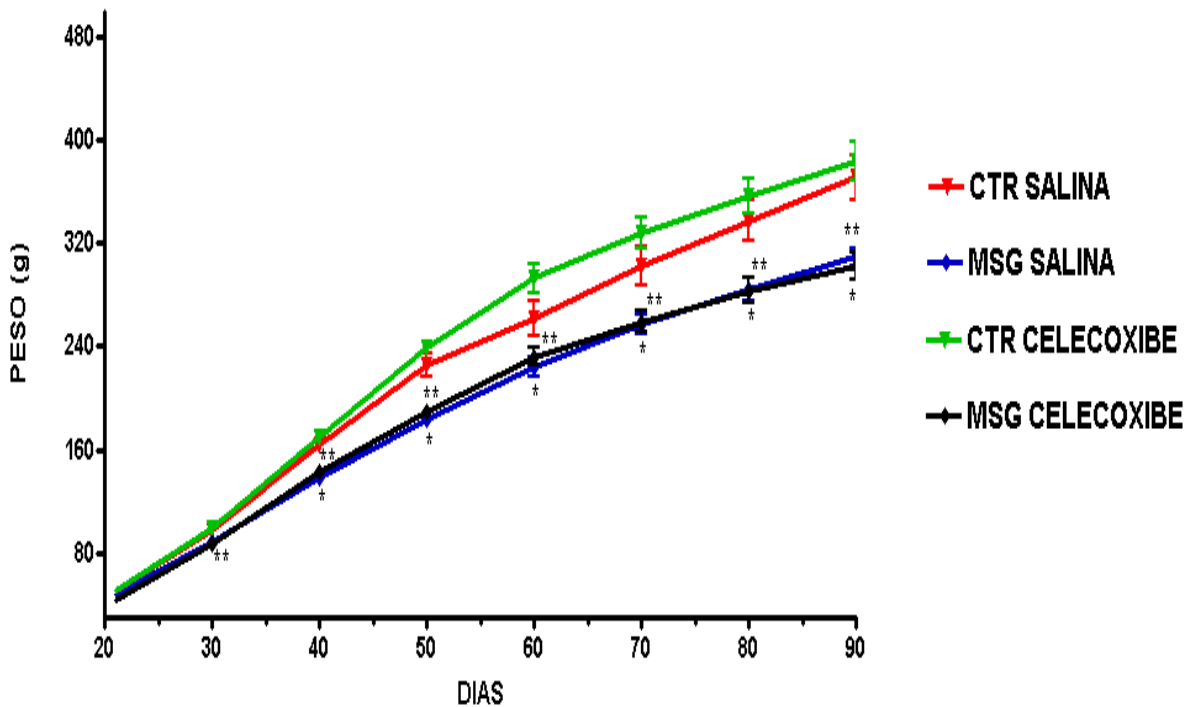
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE MSG

A partir do desmame, aos 21 dias de vida, foi feito o acompanhamento diário dos pesos corporais de todos os animais experimentais até aos 90 dias de vida. Nossa análise mostrou que os animais obesos têm um menor ganho de peso corporal comparado com os animais controle. No entanto, o ganho de peso corporal não foi influenciado pelo tratamento com celecoxibe em ambos os grupos estudados (Figura 5).

O tratamento com MSG durante os cinco primeiros dias de vida em filhotes de ratos Wistar induziu a obesidade em ratos adultos, como indicado por um aumento do índice de Lee nos grupos MSG quando comparados aos ratos do controle ($p < 0,05$). Os ratos MSG apresentaram um maior acúmulo de gordura retroperitoneal e perigonadal comparado aos controle, como mostrado na Tabela 1.

Ainda, ratos MSG mostraram um peso corporal e comprimento naso-anal (CNA) menor que os ratos controle. Essas observações constituem a caracterização da obesidade em ratos MSG, no entanto, o pré-tratamento com celecoxibe não modificou esses parâmetros.

Figura 5 - Evolução temporal do peso corporal dos ratos dos grupos controle e MSG pré-tratados com salina e celecoxibe.



*p<0,05 comparado ao grupo controle salina

** p<0,05 comparado ao grupo controle celecoxibe.

Cada ponto no gráfico representa a média \pm EPM do peso corporal para todos os grupos.

Tabela 1 - Efeitos da administração de MSG neonatal em ratos adultos pré-tratados com salina ou celecoxibe

	CTR SALINA (n=7)	MSG SALINA (n=8)	CTR CELECOXIBE (n=5)	MSG CELECOXIBE (n=7)
Peso (g)	374 \pm 16.17	316 \pm 6.94 *	384 \pm 15.51	312 \pm 11.12 *
Comp N-A (cm)	23 \pm 0.39	21 \pm 0.32 * 0.33 \pm 0.005	24 \pm 0.46	21 \pm 0.29 *
Índice Lee Gord Peri (g)	0.31 \pm 0.004	*	0.31 \pm 0.004	0.32 \pm 0.004 *
Gord Retro (g)	3.24 \pm 0.42	6.36 \pm 0.81 *	2.54 \pm 0.21	4.93 \pm 0.66 *
Gord Retro (g)	3.60 \pm 0.46	7.08 \pm 0.51 *	2.79 \pm 0.47	6.32 \pm 0.43 *

Comp N-A: comprimento naso-anal; Gord Peri: gordura perigonadal; Gord Retro: gordura retroperitoneal

Valores expressos como média \pm EPM

*p <0,05 comparado com o controle

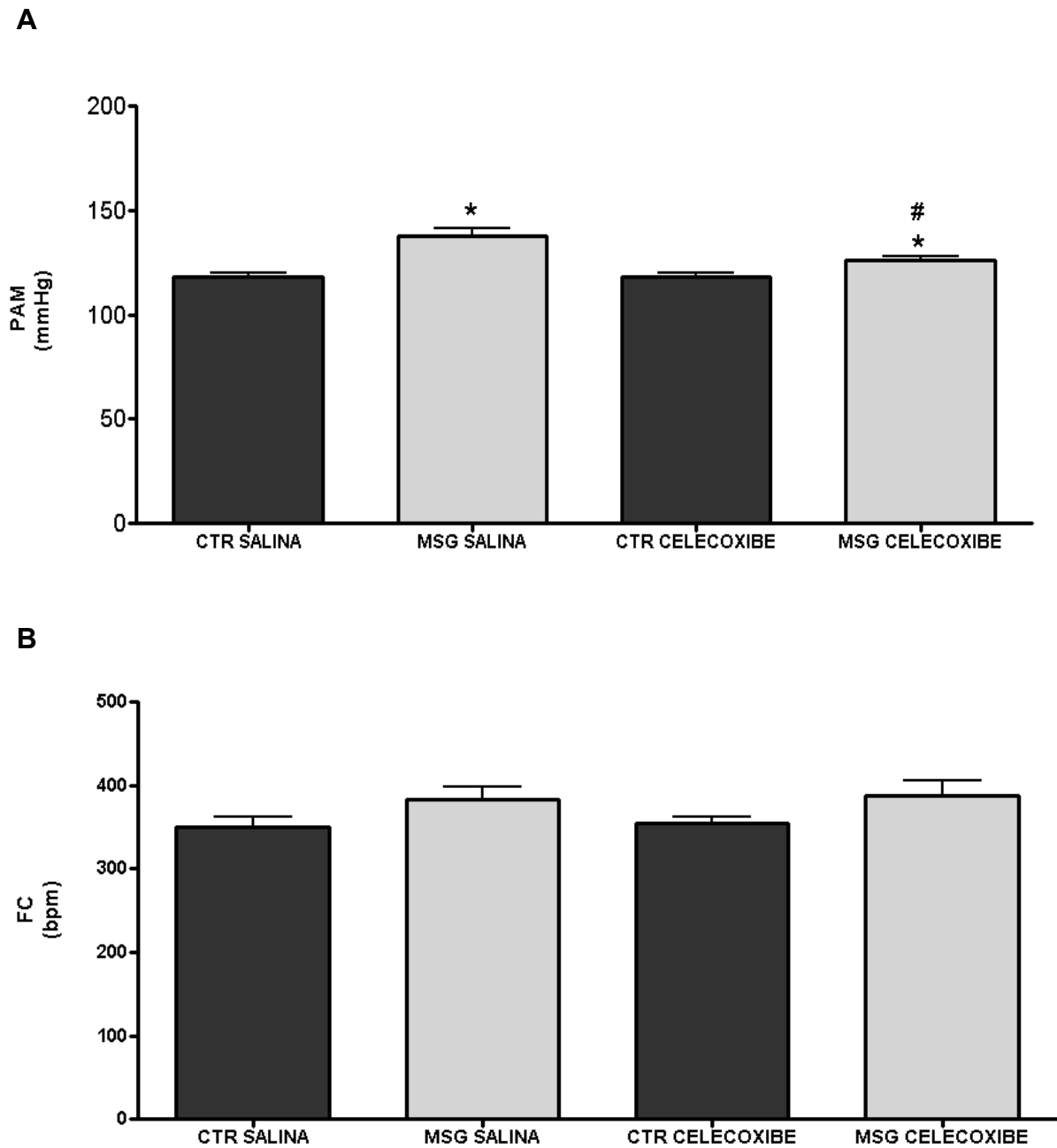
p > 0,05: CTR salina comparado com CTR celecoxibe

p > 0,05: MSG salina comparado com MSG celecoxibe

4.2 VALORES DE PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA

Os valores de referência para a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) para cada grupo foram obtidos como o valor médio do período de registro basal de 30 minutos para cada animal. No grupo controle pré-tratado com salina, os valores de referência foram: PAM: 118 ± 2 mmHg; FC: 350 ± 12 bpm (n = 7); já no grupo MSG pré-tratado com salina, foram: PAM: 138 ± 4 mmHg; FC: 384 ± 15 bpm (n = 8). Nossos dados mostraram que os animais MSG são hipertensos comparados com os controles, e o tratamento com celecoxibe atenuou a PAM apenas no grupo MSG, sem alteração na FC (Figura 6). Os valores obtidos no grupo controle pré-tratado com celecoxibe foram: PAM: 118 ± 2 mmHg; FC: 355 ± 8 bpm (n = 5); e no grupo MSG pré-tratado com celecoxibe foram: PAM: 126 ± 2 mmHg; FC: 387 ± 9 mmHg (n = 7).

Figura 6 – Efeitos da obesidade hipotalâmica sobre a pressão arterial média (PAM) (A) e frequência cardíaca (FC) (B) em ratos acordados tratados ou não com celecoxibe. CTR (controle); MSG (obesos MSG).



* $p < 0,05$, comparado com o controle

$p < 0,05$, comparado com MSG salina.

4.3 ANÁLISE ESPECTRAL DO INTERVALO DE PULSO E PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

A modulação do sistema nervoso autônomo pela análise espectral mostrou que a obesidade induzida por glutamato monossódico (MSG) promoveu aumento do componente LF nas unidades absolutas e normalizadas e uma diminuição no HF normalizado na análise da variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência (Tabela 2). Nenhuma diferença estatística foi encontrada na análise da pressão arterial sistólica (Tabela 3).

O pré-tratamento com celecoxibe não alterou nenhum dos parâmetros analisados.

Tabela 2 – Parâmetros espectrais do intervalo de pulso

PARÂMETROS	CTR SALINA (n=7)	MSG SALINA (n=8)	CTR CELECOXIBE (n=5)	MSG CELECOXIBE (n=7)
Variabilidade (ms ²)	18.46 ± 4.94	24.98 ± 4.79	30.46 ± 4.59	24.36 ± 4.06
LF(ms ²)	2.85 ± 1.11	6.91 ± 1.46 *	2.87 ± 1.13	9.32 ± 2.15 *
LF um	18.30 ± 5.69	38.49 ± 6.27 *	13.64 ± 4.54	41.41 ± 7.34 *
HF (ms ²)	9.51 ± 2.42	9.85 ± 2.23	11.66 ± 2.07	9.01 ± 2.37
HF um	71.48 ± 6.22	50.94 ± 7.03 *	85.17 ± 4.24	48.70 ± 7.52 *
LF/HF	0.43 ± 0.17	1.18 ± 0.42	0.35 ± 0.22	1.42 ± 0.45

LF: faixa de baixa frequência absoluta; LFun: faixa de baixa frequência normalizada; HF: faixa de alta frequência absoluta; HFun: faixa de alta frequência normalizada; LF/HF: razão entre LF e HF.

Valores expressos como média ± EPM

*p<0,05 comparado ao controle

p> 0,05: CTR salina comparado com CTR celecoxibe

p> 0,05: MSG salina comparado com MSG celecoxibe

Tabela 3 – Parâmetros espectrais da pressão arterial sistólica

PARÂMETROS	CTR SALINA (n=7)	MSG SALINA (n=8)	CTR CELECOXIBE (n=5)	MSG CELECOXIBE (n=7)
Variabilidade (ms ²)	13.63 ± 1.82	17.11 ± 2.12	37.84 ± 13.39	19.97 ± 3.67
LF(ms ²)	7.91 ± 1.44	11.08 ± 1.56	24.40 ± 9.23	11.84 ± 3.22
LF um	64.13 ± 8.75	71.36 ± 5.66	75.59 ± 4.01	64.66 ± 6.72
HF (ms ²)	3.77 ± 1.23	3.77 ± 1.02	6.51 ± 1.72	4.45 ± 0.94
HF um	35.87 ± 8.75	28.50 ± 5.69	24.41 ± 4.01	35.34 ± 6.72
LF/HF	3.41 ± 0.90	4.70 ± 1.06	7.20 ± 3.03	4.04 ± 1.52

LF: faixa de baixa frequência absoluta; LFun: faixa de baixa frequência normalizada; HF: faixa de alta frequência absoluta; HFun: faixa de alta frequência normalizada; LF/HF: razão entre LF e HF.

Valores expressos como média ± EPM

*p<0,05 comparado ao controle

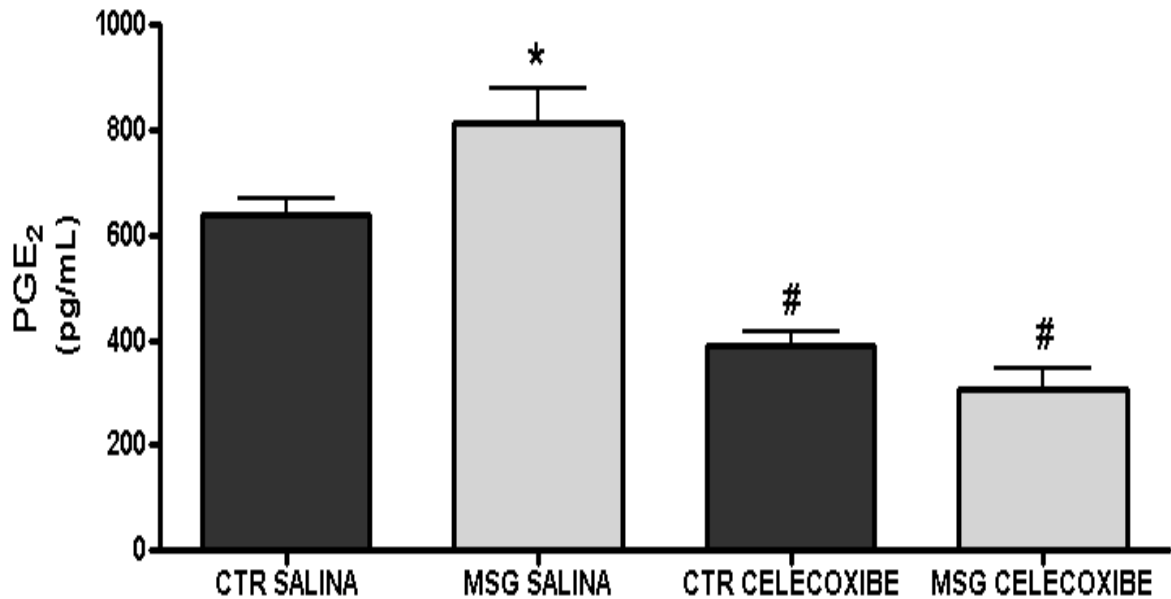
p> 0,05: CTR salina comparado com CTR celecoxibe

p> 0,05: MSG salina comparado com MSG celecoxibe

4.4 Níveis de Prostaglandinas Plasmáticas

Os níveis plasmáticos de prostaglandinas foram medidos em todos os animais e foi observado um aumento no grupo MSG comparado com controle (Figura 7). O tratamento com celecoxibe atenuou os níveis de PGE₂ nos dois grupos, porém a diminuição nos animais MSG foi maior.

Figura 7 – Níveis plasmáticos de prostaglandinas (PGE_2) em todos os grupos estudados. CTR (controle); MSG (obesos MSG).

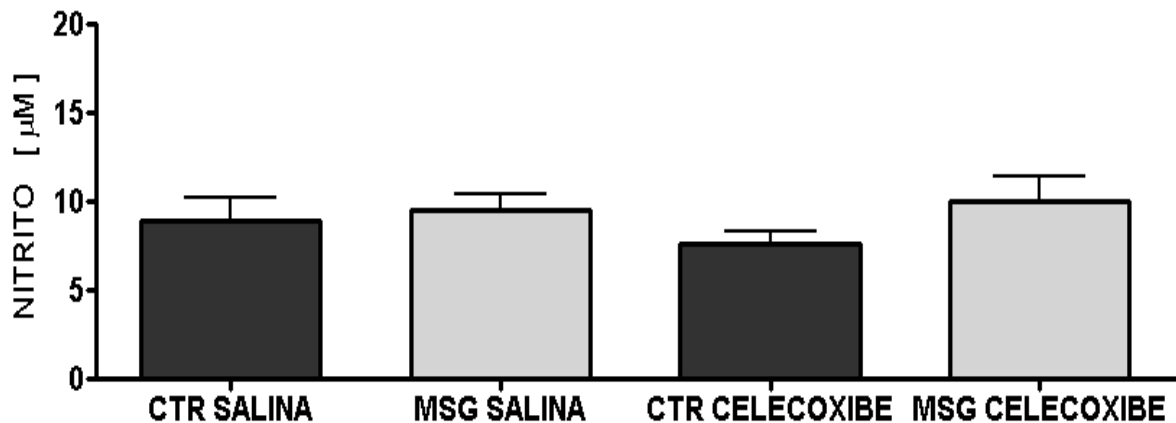


* $P < 0,05$ comparado com o CTR salina;
$p < 0,001$ em comparação com grupos salina.

4.5 NÍVEIS INDIRETOS DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

O NO foi avaliado através de determinação indireta por meio da quantificação do nitrito no plasma de todos os grupos de animais, e foi observado que os ratos obesos MSG tratados ou não com o celecoxibe não diferiram do grupo controle (Figura 8).

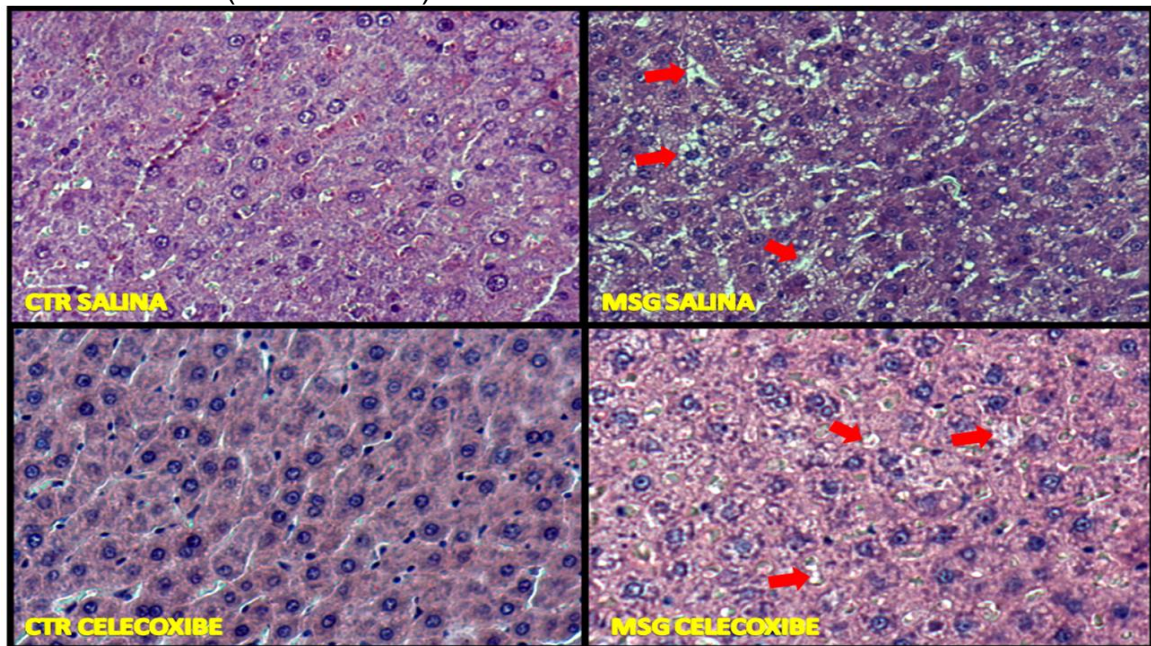
Figura 8 – Níveis plasmáticos de nitrito em todos os grupos estudados. CTR (controle); MSG (obesos MSG).



4.6 ESTEATOSE HEPÁTICA

Em nosso modelo de obesidade, a análise histopatológica do fígado mostrou que o grupo MSG apresentou uma distribuição difusa de vesículas de lipídios e repartição da arquitetura do tecido em hepatócitos, caracterizando a esteatose hepática não-alcóolica. Os vacúolos são arredondados, de limites claros e de tamanho variável. Os hepatócitos dos animais MSG mostraram alterações morfológicas, que foram atenuadas no grupo MSG tratados com celecoxibe, mostrando um aspecto rendilhado do citoplasma, em vez de microvacuolização. Os grupos controle tratados e não tratados não apresentaram alterações histopatológicas (Figura 9).

Figura 9 – Fotomicrografia do fígado de todos os grupos estudados. CTR (controle); MSG (MSG obesos) tratados ou não com celecoxibe.



Coloração: HE. Objetiva: 20x.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que a administração de MSG no período neonatal em ratos, além da indução da obesidade neuroendócrina, ocasiona um nível moderado de hipertensão na idade adulta, a qual foi acompanhada pelo aumento dos níveis plasmáticos de PGE₂ e esteatose hepática não alcoólica, que foram atenuados após o tratamento com celecoxibe, um inibidor seletivo da COX-2. Também foi demonstrado um aumento no componente LF e diminuição do HF na variabilidade da frequência cardíaca nos animais obesos. O tratamento com o inibidor da COX-2 não alterou os efeitos no balanço autonômico observado nos animais tratados com salina.

Embora seja conhecido na literatura como um modelo de obesidade neuroendócrina, dados deste trabalho confirmaram que os ratos que receberam MSG nos cinco primeiros dias de vida, em vez de um aumento no peso corporal, tiveram sim um grande aumento da gordura visceral. Vale comentar que o menor peso do início ao fim dos ratos obesos MSG provavelmente se deve ao menor tamanho desses animais, o que poderia ser consequência das alterações endócrinas descritas nesse modelo relacionado com a menor secreção do hormônio de crescimento (ROMAGNANO *et al.*, 1982). O tratamento com MSG parece diminuir a produção do hormônio de crescimento, resultando em uma redução do comprimento do corpo e atrofia da hipófise, das gônadas e os nervos ópticos (ŽELEZNÁ *et al.*, 2008).

O aumento da gordura corporal, sem qualquer alteração do peso corporal nos animais obesos MSG, pode ser explicada por uma menor taxa metabólica e não por uma elevada ingestão de alimento observado em outros estudos (ŽELEZNÁ *et al.*, 2008; MALETÍNSKÁ *et al.*, 2006).

Um trabalho recente de Voltera e colaboradores (2008) demonstrou que os níveis da PAM nos animais MSG não foram diferentes do controle quando a aferição da pressão arterial foi realizada por método indireto através da mensuração por manguito na cauda. No entanto, quando os animais foram anestesiados para mensuração direta da pressão arterial, o grupo MSG apresentou-se hipertenso. Em nosso estudo, a avaliação dos parâmetros cardiovasculares foi feita através da mensuração direta em ratos acordados, o que prevê uma avaliação sem a interferência da anestesia.

Assim, entendemos que este é o primeiro trabalho que avalia os efeitos pressores diretos em ratos obesos MSG em estado consciente, ou seja, não anestesiado, além de revelar o envolvimento de prostaglandinas na hipertensão associada com esta condição e a modulação pelo sistema nervoso autônomo.

A hiperatividade simpática é proposta como um dos elos da hipertensão à doença cardiovascular (DA SILVA, *et al.*, 2009; GRASSI *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2008). A ativação simpática está implicada na patogênese da hipertensão essencial através de modificações da frequência cardíaca e débito cardíaco, aumento da resistência vascular periférica e retenção de sódio renal (GRASSI, *et al.*, 2006; TENTOLOURIS, *et al.*, 2006).

Recentemente foi proposto que a determinação do equilíbrio simpatovagal é um dos testes mais importantes para a análise da função autonômica e a análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) é um indicador muito sensível da modulação simpática para estabelecer a avaliação, o diagnóstico e o prognóstico de doenças que ocorrem devido a disfunções autonômicas, como na obesidade (PAL *et al.*, 2009).

Trabalhos da literatura que utilizaram a análise espectral como ferramenta para avaliação da modulação autonômica mostraram que há maior ativação simpática na obesidade em humanos (PASCHOAL *et al.*, 2009; KAUFMAN *et al.*, 2007). Esses dados estão de acordo com os encontrados em nosso trabalho, mostrando que os animais obesos MSG apresentam uma maior ativação do sistema nervoso simpático, representado pelo componente LF da VFC. No entanto, outros pesquisadores observaram resultados diferentes dos nossos no mesmo modelo, porém utilizando métodos diversos de avaliação (análise de catecolaminas) (SCOMPARIN *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2004).

A inflamação induz a expressão de uma variedade de proteínas, incluindo prostaglandina-endoperóxido sintase-2 (PGHS-2) – também conhecida como cicloxigenase (COX-2), a enzima chave no metabolismo dos eicosanoides. O gene da COX-2 e proteínas imunoreativas foram documentados estarem altamente expressos com o aumento do tecido adiposo (BOLDUC, *et al.* 2004; FAIN *et al.*, 2002). No entanto, o papel potencial da inflamação mediada pela COX-2 no desenvolvimento da obesidade hipotalâmica não está bem documentado. Em um trabalho recente foi demonstrado que o aumento de insulina plasmática dependente do tempo, glicose, 8-isoprostanos, e os níveis de leptina em ratos obesos induzidos

por alimentação com alto teor de gordura foram significativamente revertidos nos animais co-tratados com um inibidor seletivo da COX-2 (HSIEH *et al.*, 2009).

Nossos dados sugerem que as prostaglandinas podem ter, pelo menos em parte, participação na hipertensão observada no modelo MSG. No entanto, os mecanismos pelos quais a COX-2 pode influenciar na fisiopatologia da hipertensão arterial em ratos MSG ainda são desconhecidos.

Citocinas circulantes têm efeitos bem reconhecidos no cérebro, mediado pela indução da atividade da COX-2 na microvasculatura cerebral (RIVEST *et al.*, 2000; ERICSSON *et al.*, 1997). A prostaglandina E₂ (PGE₂), o principal produto da COX-2, ativa o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). PGE₂ é tanto um mediador de citocinas de efeitos pró-inflamatórias (ERICSSON *et al.*, 1997) quanto um estímulo independente para atividade simpática de forma indireta (ZHANG *et al.*, 2003; OKUNO *et al.*, 1982; HOFFMAN & SCHMID, 1979). Um estudo sugere que a PGE₂ inibe os neurônios GABAérgicos que, normalmente, restringem a atividade dos neurônios pré-simpáticos no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (FERRI & FERGUSON, 2005). Independentemente do mecanismo, a administração central de PGE₂ induz uma resposta proeminente simpatoexcitatória (ZHANG *et al.*, 2003; HOFFMAN & SCHMID, 1979), mimetizando a resposta simpática à administração sistêmica de TNF- α (ZHANG *et al.*, 2003). De acordo com as evidências acima, seria possível que o aumento de PGE₂ observado nos animais MSG em nosso estudo possa ser o responsável pelo aumento na simpatoexcitação central. No entanto, as alterações na modulação autonômica deste estudo encontradas no animal MSG não foram modificadas pelo bloqueio com celecoxibe. Acreditamos que estudos que analisem a atividade simpática de forma direta possam contribuir para esclarecer esse mecanismo. Além disso, é possível que neste modelo de obesidade, a participação das prostaglandinas em aumentar a pressão arterial se deva a outro mecanismo que não o aumento da atividade simpática.

Em nosso estudo, os níveis de NO plasmático não se mostraram diferentes entre os animais controles e obesos MSG, tratados ou não com celecoxibe. No entanto, como os níveis de prostaglandinas estão alterados, uma possível explicação para esta discrepância seria um desequilíbrio entre a produção de NO através de células endoteliais, que parece estar menos ativo em animais obesos (BOURGOIN *et al.*, 2008) e uma superprodução de NO produzido pela via indutiva, levando à produção de radicais livres e iniciando a cascata de eventos

inflamatórios. O bloqueio farmacológico seletivo da NO sintase constitutiva e indutiva nesses grupos experimentais poderia viabilizar o esclarecimento deste fenômeno.

Um estudo da Nakanishi e colaboradores (2008) mostrou evidências de que o tratamento com MSG em camundongos é um promotor de inflamação do fígado e displasia. Em nosso estudo observamos que ratos adultos obesos MSG apresentaram esteatose hepática, e o tratamento com celecoxibe melhorou essa condição. Em nosso ponto de vista, este é o primeiro trabalho que sugere uma relação entre a COX-2 e obesidade MSG.

Em resumo, neste estudo foi observado que o modelo de obesidade induzida pelo MSG induz a um nível moderado de hipertensão, observado de forma direta nos animais acordados, e que sugere a participação das prostaglandinas e o envolvimento do sistema nervoso simpático. Ademais, juntamente com os níveis aumentados de prostaglandinas, a presença de esteatose hepática nos animais obesos e sua atenuação pelo tratamento com celecoxibe sugerem que a inflamação faça parte dos processos fisiopatológicos envolvidos no modelo de obesidade MSG.

6 CONCLUSÃO

O trabalho apresentado nos permite concluir que:

- A obesidade induzida por MSG no período neonatal foi acompanhada por um nível moderado de hipertensão na idade adulta através de verificação por medida direta e sem o uso de anestesia;

- O tratamento com celecoxibe atenuou os níveis pressóricos dos animais obesos, sem alteração da frequência cardíaca;

- Os animais obesos apresentaram um aumento do componente LF e uma diminuição do HF para o intervalo de pulso, sugerindo a participação do sistema nervoso autônomo nesse modelo de obesidade. No entanto, esses efeitos não foram modificados pelo tratamento com celecoxibe;

- Os níveis plasmáticos de prostaglandinas estavam aumentados nos animais obesos, e o tratamento com celecoxibe atenuou esses parâmetros, sugerindo um envolvimento das prostaglandinas nos efeitos fisiopatológicos do modelo MSG;

- Na análise histopatológica do fígado observamos a presença de esteatose hepática, a qual parece ter, ao menos em parte, a participação das prostaglandinas, já que foi atenuada pelo tratamento com celecoxibe.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANEJA, A. et al. Hypertension and Obesity. **Recent Progress in Hormone Research**. v. 59, p. 169-205. 2004.
- BALBO, S. L. et al. Vagotomy reduces obesity in MSG-treated rats. **Research Communications in Molecular Pathology & Pharmacology**. v.108, p. 291-6. 2000.
- BOLDUC, C. et al. Adipose tissue transcriptome by serial análisis of gene expresión. **Obesity Research**. v. 12, p. 750-757. 2004.
- BOURGOIN, F. et al. Endothelial and vascular dysfunctions and insulin resistance in rats fed a high-fat, high-sucrose diet. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**. v. 295, p. 1044-55. 2008.
- BUQUÉ, X.; ASPICHUETA, P.; OCHOA, B. Molecular basis of obesity-related hepatic steatosis. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**. v. 100, p. 565-578. 2008.
- COLASANTI, M.; SUZUKI, H. The dual personality of NO. Trends of Pharmacology. **Science**. v. 21, p. 249-252. 2000.
- COSENTINO F. et al. Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. **Journal of Clinical Investigation**. v. 101, p. 1530–1537. 1998.
- DA SILVA A.A. et al. The role of the sympathetic nervous system in obesity-related hypertension. **Current Hypertension Reports**. v. 11, p. 206-11. 2009.
- DAS, U.N. Is Obesity an Inflammatory Condition? **Nutrition**. v.17, p. 953–966. 2001.
- DAWSON, R. et al. Attenuation of leptin-mediated effects by monosodium glutamate-induced arcuate nucleus damage. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**. v. 273, p. 202-6. 1997.
- DE CARVALHO PAPA, P. et al. GLUT4 protein is differently modulated during development of obesity in monosodium glutamate-treated mice. **Life Sciences**. v. 71, p. 1917-28. 2002.
- DOLNIKOFF, M. et al. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. **International Journal of Obesity**. v. 25, p. 426-33. 2001.
- ERICSSON, A.; ARIAS, C.; SAWCHENKO, P. E. Evidence for an intramedullary prostaglandin-dependent mechanism in the activation of stress-related neuroendocrine circuitry by intravenous interleukin-1. **Journal of Neuroscience**. v. 17, p. 7166–7179. 1997.
- FAIN, J.N.; KANU, A; BAHOUTH, S.W. Comparison of PGE2, prostacyclin and leptin release by human adipocytes versus explants of adipose tissue in primary culture. **Prostaglandins Leukot Essent Acids**. v. 67, p. 467-473. 2002.

FERRI, C.C.; FERGUSON, A.V. Prostaglandin E2 mediates cellular effects of interleukin-1 on parvocellular neurones in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Journal of Neuroendocrinology**. v. 17, p. 498–508. 2005.

GAO, Y.Y. et al. Autonomic activity assessed by heart rate spectral analysis varies with fat distribution in obese women. **Obesity Research**. v. 4, p. 55-63. 1996.

GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9 ed. Santiago: Salesianos S.A, 1996.

GRASSI, G. Sympathetic overdrive and cardiovascular risk in the metabolic syndrome. **Hypertension Research**. v. 29, p. 839–847. 2006.

GRASSI, G. et al. Heart rate, sympathetic cardiovascular influences, and the metabolic syndrome. **Progress in Cardiovascular Diseases**. v. 52, p. 31-7. 2009.

GRIENGLING, K.K. et al. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v. 20, p. 2175–2183. 2000.

Guzik, T.J. et al. Perivascular adipose tissue as a messenger of the brain-vessels axis: Role in vascular inflammation and dysfunction. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 58, p. 551-560. 2007.

HIRATA, A.E. et al. Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 30, p. 671-4. 1997.

HODNETT, B.L. et al. Attenuated PGI₂ synthesis in obese Zucker rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 296, p.715–721. 2009.

HOFFMAN, W.E.; SCHMID, P.G. Cardiovascular and antidiuretic effects of central prostaglandin E2. **Journal of Physiology**. v. 288, p. 159–169. 1979.

HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**. v. 14, p. 860-7. 2006.

HSIEH P.S. et al. COX-2-mediated inflammation in fat is crucial for obesity-linked insulin resistance and fatty liver. **Obesity**. v. 17, p. 1150-7. 2009.

JONK, A.M. et al. Microvascular dysfunction in obesity: A potential mechanism in the pathogenesis of obesity associated insulin resistance and hypertension. **Physiology**. v. 22, p. 252-260. 2007.

KAMATH, M.V.; FALLEN, E.L. Power spectral analysis of heart variability: a noninvasive signature of cardiac autonomic function. **Critical Reviews in Biomedical Engineering**. v. 21, p. 245-311. 1993.

KAUFMAN, C.L. et al. Relationships of Cardiac Autonomic Function with Metabolic Abnormalities in Childhood Obesity. **Obesity**. v. 15, p. 1164 –1171. 2007.

- KIM, J.A. et al. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. **Circulation**. v. 113, p. 1888–1904. 2006.
- KIZER J.S.; NEMEROFF C.B.; YOUNGBLOOD W.W. Neurotoxic amino acids and structurally related analogs. **Pharmacological Reviews**. v. 29, p. 301-18. 1978.
- LOPES, H. F. Hipertensão e inflamação: papel da obesidade. **Revista Brasileira de Hipertensão**. v. 14, p. 239-244. 2007.
- MACHEO, L. et al. Late effects of postnatal administration of monosodium glutamate on insulin action in adult rats. **Physiological Research**. v. 49, p. S79-85. 2000.
- MALETÍNSKÁ, L. et al. Effect of cholecystokinin on feeding is attenuated in monosodium glutamate obese mice. **Regulatory Peptides**. v. 136, p. 58–63. 2006.
- MALLIANI, A.; MONTANO, N. Heart rate variability as a clinical tool. **Italian Heart Journal**. v. 3, p. 439-45. 2002.
- MALLIANI, A. et al. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. **Circulation**. v. 84, p.1482-1494. 1991.
- MANTENA, S.K. et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 44, p. 1259–1272. 2008.
- MARTINS, A.C. et al. Adrenal medullary function and expression of catecholamine-synthesizing enzymes in mice with hypothalamic obesity. **Life Sciences**. v. 74, p. 3211-22. 2004.
- MATHIEU, P. et al. Visceral Obesity: the link among inflammation, hypertension, and cardiovascular disease. **Hypertension**. v. 53, p. 577-584. 2009.
- MAYER, B.; ANDREW, P. Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. v. 358, p. 127-133. 1998.
- Ministério da Saúde. Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição. Brasília: Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição; 1989.
- MONCADA S.; HIGGS, E.A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **New England Journal of Medicine**. v. 329, p. 2002-2012. 1993.
- MONTANO, N. et al. Power spectral analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt. **Circulation**. v. 90, p. 1826-1831. 1994.
- Morris, M.J. Cardiovascular and metabolic effects of obesity. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. v. 35, p. 416–419. 2008.
- MUNZBERG, H.; MYERS, M.G.Jr. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. **Nature Neuroscience**. v. 8, p. 566-70. 2005.

NAKANISHI, Y. et al. Monosodium glutamate (MSG): a villain and promoter of liver inflammation and dysplasia. **Journal of Autoimmune Diseases**. v. 30, p. 42-50. 2008.

NAVARRO-GONZÁLVEZ, J.A.; GARCIA-BENTAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clinical Chemistry**. v. 44, p. 679-681. 1998.

NEUKIRCHEN, M.; KIENBAUM, P. Sympathetic nervous system – Evaluation and importance for clinical general anesthesia. **Anesthesiology**. v.109, p.1113-1131. 2008.

OGDEN, C.L. et al. Prevalence of Overweight and Obesity in the United States, 1999-2004. **JAMA**. v. 295, p. 1549-1555. 2006.

OKUNO, T.; LINDHEIMER, M.D.; OPARIL, S. Central effects of prostaglandin E2 on blood pressure and plasma renin activity in rats. Role of the sympathoadrenal system and vasopressin. **Hypertension**. v. 4, p. 809–816. 1982.

OLNEY, J.W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**. v. 164, p. 719-21. 1969.

PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological Reviews**. v. 87, p. 315–424. 2007.

PAL, G.K. et al. Spectral analysis of heart rate variability (HRV) may predict the future development of essential hypertension. **Medical Hypotheses**. v. 72, p. 183–185. 2009.

PANIS, Carolina. **Papel antagônico das isoformas óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS) e induzida (iNOS) em camundongos nocautes para 5-lipoxigenase infectaves com Trypanosoma cruzi**. 2009. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

PASCHOAL, M.A.; TREVIZAN, P.F.; SCODELER, N.F. Variabilidade da Frequência Cardíaca, Lípidos e Capacidade Física de Crianças Obesas e Não- Obesas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 93, p.239-246. 2009.

PERELLO, M. et al. Adrenal enucleation in MSG-damaged hyperleptinemic male rats transiently restores adrenal sensitivity to leptin. **Neuroendocrinology**. v. 78, p. 176-84. 2003.

PERREAULT, M.; MARETTE, A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. **Nature Medicine**. v. 7, p. 1138-43. 2001.

QUILLOT, D. et al. Impaired autonomic control of heart rate and blood pressure in obesity: role of age and of insulin-resistance. **Clinical Autonomic Research**. v. 11, p. 79-86. 2001.

RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. v. 87, p.10043-10047. 1990.

RAHMOUNI K. et al. Obesity-associated hypertension: new insights into mechanisms. **Hypertension**. v. 45, p. 9-14. 2005.

RANA, J.S. et al. Cardiovascular metabolic syndrome – an interplay of obesity inflammation, diabetes and coronary heart disease. **Diabetes, Obesity and Metabolism**. v. 9, p. 218-232. 2007.

RIVEST, S. et al. How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. 223: 22–38. 2000.

ROMAGNANO, M.A. et al. Distribution of somatostatin in the mouse brain: effects of neonatal MSG treatment. **Brain Research**. v. 234, p. 387-98. 1982.

RUBIN, E. et al. **Rubin's - Patologia: Bases Clínico patológicas da Medicina**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

RUBINI, R. et al. Power spectrum analysis of cardiovascular variability monitored by telemetry in conscious unrestrained rats. **Journal of the Autonomic Nervous System**. v. 45, p.181–190. 1993.

SCOMPARIN, D.X. et al. Swim training applied at early age is critical to adrenal medulla catecholamine content and to attenuate monosodium L-glutamate-obesity onset in mice. **Life Sciences**. v. 79, p. 2151–2156. 2006.

SHIBAO, C. et al. Autonomic Contribution to Blood Pressure and Metabolism in Obesity. **Hypertension**. v. 49, p. 27-33. 2007

SEMENKOVICH, C.F. Insulin resistance and atherosclerosis. **Journal of Clinical Investigation**. v. 116, p. 1813–1822. 2006.

SOUZA H.C. et al. Heart rate and arterial pressure variability in the experimental renovascular hypertension model in rats. **Autonomic Neuroscience**. v. 139, p. 38-45. 2008.

Task Force of the European Society of Cardiology the North American Society of Pacing Electrophysiology. Heart rate variability - Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. **European Heart Journal**. v.17, p. 354-381. 1996.

TATAKIHARA, V.L. et al. Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 52, p. 47-58. 2008.

TENTOLOURIS, N.; LIATIS, S.; KATSILAMBROS, N. Sympathetic system activity in obesity and metabolic syndrome. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1083, p. 129–152. 2006.

VOLTERA, A.F. et al. O Efeito da indução de obesidade neuroendócrina sobre a hemodinâmica sistêmica e a função ventricular esquerda de ratos normotensos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**. v. 52, p. 47-54. 2008.

WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, stress and diabetes. **Journal of Clinical Investigation**. 2005. 115(5):1111-9.

WISSE, B.E.; KIM, F.; SCHWARTZ, M.W. An integrative view of obesity. **Science**. v. 318, p. 928-929. 2007.

WLODEK, D.; GONZALES, M. Decreased energy levels can cause and sustain obesity. **Journal of Theoretical Biology**. v. 225, p. 33-44. 2003

World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: World Health Organization. (Report of a WHO Consultation on Obesity). 1997.

ZELEZNÁ, B. et al. Anorexigenic effect of cholecystokinin is lost but that of CART (cocaine and amphetamine regulated transcript) peptide is preserved in monosodium glutamate obese mice. **Physiological Research**. 2008.

ZHANG, C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. **Basic Research in Cardiology**. v. 103, p. 398-406. 2008.

ZHANG, Z.H. et al. Cardiovascular and renal sympathetic activation by blood-borne TNF-alpha in rat: the role of central prostaglandins. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 284, p. 916-927. 2003.