



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FERNANDA NOVI CORTEGOSO LOPES

**TERAPIA ANTIOXIDANTE E SUPLEMENTAÇÃO COM  
L-ARGININA NO COMBATE À HIPERTENSÃO EM ANIMAIS  
OBESOS:  
AVALIAÇÃO DE MECANISMOS PERIFÉRICOS E CENTRAIS**

---

Londrina  
2021

FERNANDA NOVI CORTEGOSO LOPES

**TERAPIA ANTIOXIDANTE E SUPLEMENTAÇÃO COM  
L-ARGININA NO COMBATE À HIPERTENSÃO EM ANIMAIS  
OBESOS:  
AVALIAÇÃO DE MECANISMOS PERIFÉRICOS E CENTRAIS**

Tese de doutorado apresentado ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas na associada Universidade Estadual de Londrina – UEL, como requisito parcial para o título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Marli Cardoso Martins Pinge

Londrina  
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

L864t    Lopes, Fernanda Novi Cortegoso.  
Terapia antioxidante e suplementação com L-arginina no combate à hipertensão em animais obesos : avaliação de mecanismos periféricos e centrais / Fernanda Novi Cortegoso Lopes. - Londrina, 2021.  
156 f. : il.

Orientador: Marli Cardoso Martins Pinge.  
Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2021.  
Inclui bibliografia.

1. Óxido nítrico - Tese. 2. Síndrome metabólica - Tese. 3. Atividade simpática - Tese. 4. Estresse oxidativo - Tese. I. Pinge, Marli Cardoso Martins . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 612

FERNANDA NOVI CORTEGOSO LOPES

**TERAPIA ANTIOXIDANTE E SUPLEMENTAÇÃO COM  
L-ARGININA NO COMBATE À HIPERTENSÃO EM ANIMAIS  
OBESOS:  
AVALIAÇÃO DE MECANISMOS PERIFÉRICOS E CENTRAIS**

Tese de doutorado apresentado ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas na associada Universidade Estadual de Londrina – UEL, como requisito parcial para o título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Marli Cardoso Martins  
Pinge  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Ernane Torres Uchoa  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Kesia Gemima Palma Rigo Wutzow  
Universidade Estadual de Maringá – UEM

---

Prof. Dr. Bruno Fernando Lucchetti  
Centro Universitário do Vale do Araguaia –  
UNIVAR

---

Profa. Dra. Natalia Veronez da Cunha Bellinati  
Universidade do Planalto Catarinense –  
UNIPLAC

Londrina, 24 de fevereiro de 2021.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, fonte criadora de tudo o que existe.

Aos meus pais, Ariel e Vera agradeço pela dedicação, esforço e suporte que me deram para eu chegar até aqui! Obrigado por terem dito sim à minha vida.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação Ciências Fisiológicas por possibilitar essa troca de conhecimentos entre alunos e professores de diversas Universidades.

À Universidade Estadual de Londrina, pela estrutura necessária, oportunidades e toda experiência desde minha graduação.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas que colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Aos ratos utilizados neste estudo, sem eles nada disso teria sido realizado.

À minha orientadora, profa. Dra Marli Cardoso Martins Pinge, que desde o início da minha vida acadêmica me acompanhou e me orientou da melhor maneira possível para eu alcançar meus objetivos. Sou muito grata por essa parceria de 10 anos.

Aos professores do departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina – UEL e professores das nucleadoras, que com seus ensinamentos contribuíram para meu crescimento acadêmico.

Aos professores colaboradores desta tese que me auxiliaram com as metodologias complementares: Prof. Dr. Waldiceu Verri e seu aluno Victor Fattori pela dosagem de estresse oxidativo; Prof. Dr. Phileno Pinge Filho, e o aluno Bruno Lucchetti pela dosagem de nitrito; Prof. Dr. Ernane Torres Uchoa e sua aluna Andressa Martins pelo processo de perfusão de cérebro.

Aos professores convidados para banca, obrigada pela presença e contribuições.

Aos meus colegas de laboratório Lorena, Fernanda, Jaqueline, Blenda, Gabriela, Bruno e Eric pela parceria e companheirismo ao longo da jornada.

À CAPES pelo apoio financeiro durante todo meu doutorado.

**“O SUCESSO NASCE DO QUERER, DA DETERMINAÇÃO E PERSISTÊNCIA EM SE CHEGAR A UM OBJETIVO. MESMO NÃO ATINGINDO O ALVO, QUEM BUSCA E VENCE OBSTÁCULOS, NO MÍNIMO FARÁ COISAS ADMIRÁVEIS.”  
(JOSÉ DE ALENCAR)**

LOPES, Fernanda Novi Cortegoso. **Terapia antioxidante e suplementação com L-arginina no combate à hipertensão em animais obesos: avaliação de mecanismos periféricos e centrais.** 2021. 151 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## RESUMO

A obesidade é uma condição fisiopatológica e um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV). Estudos mostram sua relação com a redução da produção de óxido nítrico (NO) e aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem contribuir para o aumento do tônus simpático levando à hipertensão. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar os parâmetros cardiovasculares e autonômicos e perfil oxidativo em ratos controle (CTR) e com obesidade (MSG) suplementados com L-arg e vitamina C. Ratos Wistar foram submetidos a indução da obesidade com injeções subcutâneas de glutamato monossódico (MSG). Este trabalho foi dividido em 2 estudos: Estudo 1) os ratos CTR e MSG foram suplementados com L-arginina ou veículo durante 30 dias e foram cateterizados para registros cardiovasculares e autonômicos e retirado tecidos para dosagens de NO. Como resultado ratos com obesidade aos 90 dias de vida apresentaram aumento do tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal comparado ao CTR e após suplementação com L-arg houve uma redução de ambos tecidos adiposos comparado ao grupo CTR L-arg. Ratos MSG água apresentaram hipertensão em relação ao CTR água no entanto após L-arg houve redução da PAM somente no grupo CTR L-arg em comparação ao CTR água. Ratos MSG apresentaram aumento no componente LF e redução no componente HF em relação ao CTR e após a L-arg mostrou redução do LF e aumento do HF. No barorreflexo espontâneo o grupo MSG L-arg apresentou maior ganho *up* em relação ao CTR L-arg. Ratos MSG L-arg apresentaram aumento de nitrito no coração em relação ao CTR L-arg; no fígado o grupo MSG água apresentou aumento de nitrito em relação ao CTR água e após L-arg houve aumento do CTR L-arg em relação ao CTR água. No plasma, o grupo MSG após a suplementação com L-arg apresentou maior aumento de nitrito em relação ao MSG água. Estudo 2: ratos CTR e MSG receberam microinjeção de salina, L-glutamato ou vit C na RVLM. Outros grupos CTR e MSG foram tratados com vit C por via oral durante 21 dias para avaliar o perfil oxidativo na RVLM e dosagem de NO em tecidos. Os resultados obtidos foram que ratos neonatos tratados com glutamato monossódico apresentaram obesidade e hipertensão aos 90 dias de vida, além de aumento da FC em comparação com o grupo CTR. Ratos MSG apresentaram maior resposta pressórica à microinjeção de L-glu e menor resposta à vit C na RVLM em comparação ao grupo CTR L-glu e vit C respectivamente. Ratos MSG apresentaram aumento do NBT e T-BARS na RVLM e adrenal e no rim aumento do NBT e redução do ABTS em comparação ao grupo CTR. Os grupos tratados com vit C houve aumento do ABTS na RVLM de ratos MSG vit C em relação ao CTR vit C, aumento de NBT em ratos MSG água comparado ao CTR água e, após o tratamento ocorreu redução do grupo MSG vit C em relação ao MSG água; houve redução do T-bars em ratos MSG vit C quando comparados ao MSG água. O tratamento com vit C promoveu aumento de nitrito no coração dos ratos do grupo MSG vit C comparado ao MSG água. Dessa forma, a conclusão do estudo 1 mostrou que a L-arg foi eficaz em reduzir tecido adiposo

podendo ter influenciado na melhora dos parâmetros autonômicos. Assim, o presente estudo sugere que através do uso da L-arginina ou tratamento com vit C em animais obesos é possível obter benefícios no tratamento da hipertensão e na própria condição de obesidade.

**Palavras-chave:** óxido nítrico; síndrome metabólica; atividade simpática; RVLM; estresse oxidativo, hipertensão.

LOPES, Fernanda Novi Cortegoso. **Antioxidant therapy and supplementation with L-arginine to treat hypertension in rats with obesity: evaluation of peripheral and central mechanisms.** 2021. 151 p. Thesis (doctoral in Physiological Sciences) – State University of Londrina, Londrina, 2021.

## ABSTRACT

Obesity is a pathophysiological condition and is currently one of the main risk factors for the development of cardiovascular diseases (CVD). Studies show its relationship with a reduction in the production of nitric oxide (NO) and an increase in reactive oxygen species (ROS) that can contribute to the increase in sympathetic tone leading to hypertension. Thus, this study aimed to evaluate cardiovascular and autonomic parameters and oxidative profile in control (CTR) and with obesity (MSG) rats supplemented with L-arg and vitamin C. The work was divided into 2 studies: Study 1) CTR and MSG rats were supplemented with L-arginine or vehicle for 30 days and were catheterized for cardiovascular and autonomic records and organs were removed for NO measurement. As a result, neonatal rats treated with monosodium glutamate at 90 days of life showed an increase in retroperitoneal and perigonadal fats compared to CTR and after supplementation with L-arg there was a reduction in both fats compared to the CTR L-arg group. MSG rats showed hypertension and after L-arg there were no statistical differences in mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) however there was a reduction in MAP in the CTR L-arg group compared to CTR water. In the autonomic evaluation of the heart rate variability (HRV) MSG rats showed increase in the LF component and a reduction in the HF component in relation to CTR, and after L-arg showed reduction of the LF and increase of the HF. In the spontaneous baroreflex the MSG L-arg group showed a greater bradycardic response to increases in BP (gain up) compared to CTR L-arg. MSG L-arg rats showed an increase in nitrite in the heart compared to CTR L-arg; in the liver the MSG water group showed increase in relation to CTR water and after L-arg there was an increase in CTR L-arg in relation to CTR water. In plasma, the MSG group after supplementation with L-arg showed a greater increase compared to MSG water. Study 2: CTR and MSG rats receive microinjection of saline, L-glutamate or vitamin C in the RVLM area. Another groups CTR and MSG had no surgical procedure and were treated with vit C orally for 21 days to evaluate the oxidative profile in RVLM and NO measurement. As a result, we obtained that neonatal rats treated with monosodium glutamate showed obesity and hypertension at 90 days of life, in addition to increased HR compared to the CTR group. MSG rats showed a higher arterial pressure response to L-glu microinjection and a lower response to vit C in RVLM compared to the CTR group. MSG rats showed increased NBT and T-BARS in RVLM and adrenal, and in the kidney an increase in NBT and reduction in ABTS compared to the CTR group. For the groups treated with vit C, there was an increase in ABTS in the RVLM of MSG vit C rats in relation to CTR vit C, an increase in NBT in rats MSG compared to CTR water, and after the treatment there was a reduction in the group MSG vit C in relation to MSG water. The treatment with vit C reduced T-bars in MSG rats when compared to MSG water. The treatment with vit C promoted an increase of nitrite in the heart of rats in the MSG vit C group compared to MSG water. Thus, the present study suggests that through the use of L-arginine or

treatment with vit C in animals with obesity it is possible to obtain benefits in the treatment of hypertension and in the obesity condition itself.

**Key words:** nitric oxide; metabolic syndrome; sympathetic activity; RVLM; oxidative stress, hypertension.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração do delineamento experimental de ratos CTR e MSG suplementados com L-arg.....	41
Figura 2. Caracterização da obesidade.....	46
Figura 3. Parâmetros cardiovasculares da suplementação de L-arginina.....	48
Figura 4. Análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS). ....	50
Figura 5. Análise espectral da variabilidade do intervalo de pulso (IP) .....	52
Figura 6. Análise do barorreflexo espontâneo.....	54
Figura 7. Dosagem de nitrito. Efeitos da suplementação oral com L-arginina na produção de NO <sub>2</sub> -.....	56
Figura 8. Esquema delineamento experimental de microinjeção de drogas na RVLM em ratos CTR e MSG.....	69
Figura 9. Esquema do protocolo de estresse oxidativo em ratos CTR e MSG .....	70
Figura 10. Esquema do protocolo de tratamento com vitamina C em ratos CTR e MSG. ....	70
Figura 11. Caracterização da obesidade.....	76
Figura 12. Parâmetros cardiovasculares.....	78
Figura 13. Corte histológico e diagrama da região bulbar.....	79
Figura 14. Efeitos da microinjeção de salina na área RVLM.....	80
Figura 15. Efeitos da microinjeção de L-glutamato na área RVLM .....	81
Figura 16. Efeitos da microinjeção de vitamina C na RVLM. ....	82
Figura 17. Caracterização da obesidade induzida por glutamato monossódico – MSG. ....	84
Figura 18. Efeitos da obesidade no estresse oxidativo na área RVLM. ....	86
Figura 19. Efeitos da obesidade no estresse oxidativo no coração.....	87
Figura 20. Efeitos da obesidade no estresse oxidativo no rim. ....	88
Figura 21. Efeitos da obesidade no estresse oxidativo na glândula adrenal.....	89
Figura 22. Caracterização da obesidade induzida por glutamato monossódico – MSG. ....	91
Figura 23. Efeito do tratamento crônico com vitamina C na área RVLM.....	93
Figura 24. Efeitos do tratamento crônico com vitamina C nas concentrações de nitrito em órgãos de ratos controle (CTR) e com obesidade (MSG) .....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANG II	Angiotensina II
ARC	Núcleo arqueado do hipotálamo
BH <sub>4</sub>	(-6R) 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina
CAT	Enzima catalase
CNA	Comprimento nasoanal
CTR	Controle
CVLM	Área caudoventrolateral
DCV	Doenças cardiovasculares
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FC	Frequência cardíaca
FMN	Flavina mononucleótido
FRAP	Poder antioxidante de reduzir o ferro
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GH	Hormônio do crescimento
GPx	Glutathione peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HF	<i>High Frequency</i>
IL1- $\beta$	Interleucina 1-beta
IL-6	Interleucina 6

IMC	Índice de massa corporal
IML	Coluna intermediolateral da medula espinhal
INF- $\gamma$	Interferon gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP	Intervalo de pulso
i.p.	Intraperitoneal
L-arg	L-arginina
L-glu	L-glutamato
LF	<i>Low Frequency</i>
LPL	Lipase lipoproteica
MSG	Glutamato monossódico
mtNOS	Óxido nítrico sintase induzível mitocondrial
NA	Núcleo ambíguo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT	Nitroazul de tetrazólio
NDV	Núcleo motor dorsal do vago
nNOS	Óxido nítrico sintase induzível neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Enzima óxido nítrico sintase
NTS	Núcleo do trato solitário
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
OH <sup>-</sup>	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
OZR	Ratos Zucker obesos

PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
RVLM	Área rostroventrolateral do bulbo
SBR	Sensibilidade barorreflexa
SM	Síndrome metabólica
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso parassimpático
SNS	Sistema nervoso simpático
SOD	Enzima superóxido dismutase
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
T-bars	Substâncias reativas ao ácido barbitúrico
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
VFC	Variabilidade da frequência cardíaca
v.im	Via de administração intramuscular
v.o	Via de administração oral
Vit C	Vitamina C
VLF	<i>Very Low Frequency</i>
VMH	Hipotálamo ventromedial

# SUMARIO

SUMARIO.....	12
1 INTRODUÇÃO .....	15
1.1 Obesidade .....	15
1.2 Modelos experimentais de obesidade .....	17
1.3 Obesidade induzida por glutamato monossódico .....	18
1.4 Regulação neural da pressão arterial.....	20
1.5 Óxido nítrico e a função cardiovascular .....	22
1.6 Inflamação e obesidade .....	26
1.7 Estresse oxidativo e obesidade .....	28
1.8 Estresse oxidativo na área RVLM .....	30
2. JUSTIFICATIVA .....	34
3. OBJETIVOS .....	35
3.1 Objetivo geral.....	35
Estudo 1. Efeito da suplementação oral com L-arginina nos parâmetros cardiovasculares e autonômicos de ratos controle e com obesidade MSG.....	35
3.2 Objetivos específicos.....	35
Estudo 2. Avaliação do perfil oxidativo da área Rostroventrolateral do bulbo (RVLM) em ratos controle e obesos e os efeitos do tratamento com vit c. ....	36
3.3 Objetivos específicos.....	36
Estudo 1: Efeito da suplementação oral com L-arginina nos parâmetros cardiovasculares e autonômicos de ratos controle e com obesidade MSG. ....	37
4. Materiais e métodos .....	38
4.1 Animais.....	38
4.2 Indução e avaliação dos parâmetros da obesidade .....	38
4.3 Grupos experimentais .....	39
4.4 Suplementação oral com L-arginina.....	39
4.5 Cateterização da artéria femoral .....	39
4.6 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca.....	40
4.7 Delineamento experimental .....	40
4.8 Dosagem de nitrito (óxido nítrico) .....	41
4.9 Análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) e intervalo de pulso (IP) .	42
4.10 Análise do barorreflexo espontâneo.....	43
4.11 Análise estatística.....	44
5. RESULTADOS .....	45

5.1 Caracterização da obesidade induzida por glutamato monossódico – MSG.....	45
5.2 Parâmetros de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).....	47
5.3 Análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) e intervalo de pulso (IP) .	49
5.3.1 Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica - PAS .....	49
5.3.2 Análise da variabilidade do intervalo de pulso - IP .....	51
5.4 Análise do barorreflexo espontâneo.....	53
5.5 Dosagem de nitrito no coração, fígado, rim, plasma e tecido adiposo.....	55
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>Estudo 2. Avaliação do perfil oxidativo da área Rostroventrolateral do bulbo (RVLM) em ratos controle e obesos e os efeitos do tratamento com vit c.....</b>	<b>65</b>
<b>7. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>66</b>
7.1 Grupos experimentais .....	66
7.2 Tratamento com vitamina C.....	66
7.3 Cirurgias.....	66
7.3.1 Cateterização da artéria e veia femoral .....	66
7.3.2 Implante de cânulas-guia direcionadas à RVLM.....	67
7.4 Registro da pressão arterial e frequência cardíaca.....	67
7.5 Delineamento experimental .....	68
7.5.1 Protocolo de estudo funcional .....	68
7.5.2 Protocolo de análise molecular.....	69
7.6 Marcação e Histologia do cérebro .....	71
7.7 Avaliação do estresse oxidativo .....	71
7.8 Dosagem de nitrito (óxido nítrico) .....	73
7.9 Análise estatística.....	73
8.1 Caracterização da obesidade induzida por glutamato monossódico – MSG.....	75
8.2 Parâmetros basais da pressão arterial média e frequência cardíaca .....	77
8.3 Confirmação da região de microinjeção na área RVLM .....	79
8.4 Microinjeção unilateral de salina, L-glutamato e vitamina C na área RVLM .....	80
8.5 Avaliação do estresse oxidativo .....	83
8.6 Tratamento crônico com vitamina C.....	90
8.7 Dosagem de NO - quantificação de nitrito.....	94
<b>9. Discussão.....</b>	<b>96</b>
<b>10. Conclusão Geral.....</b>	<b>107</b>
<b>11. referências bibliográficas.....</b>	<b>108</b>
<b>Apêndice A – Lista de dados Estudo 1.....</b>	<b>125</b>
1. Caracterização da obesidade .....	125

2.	Pressão arterial média e frequência cardíaca.....	126
3.	Variabilidade da frequência cardíaca – PAS.....	127
4.	Variabilidade da frequência cardíaca – IP.....	128
5.	Barorreflexo espontâneo.....	129
6.	Dosagem de Nitrito.....	130
<b>Apêndice B – Lista de dados Estudo 2.....</b>		<b>131</b>
7.	Caracterização da obesidade.....	131
8.	Pressão arterial média e frequência cardíaca basal.....	132
9.	Delta pressão arterial média e frequência cardíaca após microinjeção de salina, L-glutamato e vitamina C.....	133
10.	Caracterização da obesidade para o grupo de estresse oxidativo.....	134
11.	Dosagem de estresse oxidativo.....	135
12.	Caracterização da obesidade - Tratamento com vitamina C por 21 dias.....	139
13.	Dosagem estresse oxidativo na RVLM – Tratamento com vitamina C por 21 dias.....	140
14.	Dosagem de nitrito (óxido nítrico) - Tratamento com vitamina C por 21 dias.....	141
Anexo A – carta de aprovação do comitê de ética em uso de animais da Universidade estadual de Londrina.....		142
.....		142

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 OBESIDADE

A obesidade é uma condição fisiopatológica que se apresenta de forma cada vez mais comum em nossa sociedade. É considerada uma doença de proporções epidêmicas tanto em países do primeiro mundo quanto de países em desenvolvimento (WHO,2020). A prevalência da obesidade vem aumentando entre adultos, tanto nos países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento. A Organização mundial da saúde (OMS) estima que houve aproximadamente 650 milhões de pessoas com sobrepeso e 1.9 bilhões obesas (11% homens e 15% mulheres) em 2016. A prevalência mundial triplicou entre os anos de 1975 e 2016. Além da obesidade aumentar nos adultos as taxas de prevalência neste mesmo período também aumentaram entre as crianças e adolescentes com idades entre 5-19 anos de 4% para 18%. No Brasil, pesquisa realizada pelo IBGE em 2008/09 aponta aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade no Brasil, atingindo os valores de aproximadamente 49% e 15% da população respectivamente. Globalmente há mais pessoas com obesidade que desnutridas. O sobrepeso e a obesidade estão associados com mais mortes que a desnutrição, fator que preocupa, pois mais de 4 milhões de pessoas morrem por ano desta doença ou sobrepeso de acordo com a global burden disease (SEIDELL; HALBERSTADT, 2015).

A obesidade é caracterizada pelo excesso de tecido adiposo corpóreo devido a erros no metabolismo e na utilização de nutrientes ou por balanço energético positivo, que é quando há maior consumo calórico em relação ao seu gasto, resultando em aumento dos estoques energéticos e peso corporal (WHO,2012). A origem da obesidade, no entanto, é determinada por múltiplas causas que podem ser dadas pelas interações entre fatores biológicos, genéticos, psicológicos, socioeconômicos,

históricos, ecológicos, econômicos, sociais, culturais e políticos (WHO,2020).

Atualmente a obesidade é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV), podendo ocorrer de forma independente ou concomitante com outros fatores de risco como apneia do sono, doenças musculoesqueléticas, diversos tipos de câncer e problemas psicossociais (WHO,2020). Ela também está relacionada à síndrome metabólica (SM), uma condição 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 (RANA et al., 2007).

Em 2012 a Associação Europeia elaborou recomendações para prevenção e tratamento da obesidade com a premissa que a redução de peso pode ser benéfica contribuindo para redução de todos os fatores que a contemplam incluindo controle da pressão sanguínea. Seravalle e Grassi (2017) descrevem as recomendações que se resumem basicamente em:

1. Abordagem não farmacológica: mudança no estilo de vida e dieta balanceando qualidade da comida e das calorias.
2. Abordagem farmacológica associada com o item 1: drogas vêm sendo testadas não somente com o intuito de perda de peso, mas também redução da pressão arterial como sibutramina, liraglutida e associação de fentermina com topiramato.
3. Abordagem cirúrgica: a cirurgia bariátrica tem sido efetiva em reduzir o peso corpóreo e a pressão sanguínea acompanhada pela redução da resistência à insulina e melhora no barorreflexo (SERAVALLE; GRASSI, 2017).

Corroborando com as recomendações de 2012, Schultz e colaboradores (2019)

ressaltam que o tratamento para a obesidade deve incluir atividade física, abordagens sistemática para resolução de problemas e redução de estresse, aconselhamento psicológico, psiquiátrico e educação ao indivíduo para que ele possa ter condições de mudar sua estrutura social. Ainda ressalta que o estigma que a doença pode gerar no indivíduo pode levar a consequências como aumento do risco de depressão, baixa autoestima, mais ganho de peso, recusa de acompanhamento médico e em último estágio levar ao suicídio (DURRER SCHUTZ et al., 2019).

## **1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE OBESIDADE**

Considerando a necessidade de se estudar a fisiopatologia da obesidade, diversos modelos experimentais têm sido propostos para esse fim:

Modelos de mutação gênica:

- ✓ Camundongos ob/ob: não produzem o hormônio leptina que desenvolvem a obesidade pela hiperfagia e resistência à insulina (PERFIELD et al., 2013);
- ✓ camundongos db/db e ratos Zucker que possuem mutação no receptor de leptina levando à obesidade, hiperfagia e hipertensão (IIDA et al., 1996; SIWY et al., 2012);

Modelos de dieta:

- ✓ ratos suplementados com dieta hiperlipídica ou hipercalórica: aumentam o ganho calórico desenvolvendo obesidade e hipertensão (CHEN; CHAM; BADOER, 2010);
- ✓ ratos que recebem dieta rica em frutose: administração de solução de frutose 10% na água de bebedouros levando a obesidade e síndrome metabólica (GUIMARAES et al., 2014);

Modelo de obesidade Neuroendócrina:

- ✓ Redução de ninhada: filhotes são submetidos à redução de ninhada apresentam alterações na estrutura e função de áreas hipotalâmicas com a área ventromedial além de promover programação metabólica que leva à hiperalimentação e à obesidade (RINALDI et al., 2012).
- ✓ ratos que submetidos à administração subcutânea de glutamato monossódico (MSG) nos 5 primeiros dias de vida leva ao desenvolvimento de obesidade, SM e hipertensão (HIRATA et al., 1997; KIZER; NEMEROFF; YOUNGBLOOD, 1977).

### **1.3 OBESIDADE INDUZIDA POR GLUTAMATO MONOSSÓDICO**

Em modelos experimentais, a obesidade neuroendócrina tem sido descrita como um modelo que em grande parte mimetiza a síndrome metabólica que é caracterizada por obesidade abdominal, hipertensão arterial, resistência à insulina, dislipidemias, hiperglicemia e estado pró-inflamatório sistêmico e foi utilizada em nosso trabalho pois se assemelha à obesidade em humanos que também podem desenvolver a SM (LAMBERT et al., 2010). Essa obesidade pode ser desenvolvida em ratos por meio da administração subcutânea de glutamato monossódico (MSG), um aminoácido excitatório lesivo ao sistema nervoso central (KIZER; NEMEROFF; YOUNGBLOOD, 1977) e sua administração no período neonatal tem sido extensivamente estudada (BALBO et al., 2000; DOLNIKOFF et al., 2001; MACHO et al., 2000; OLNEY, 1969; PERELLÓ et al., 2003).

A administração de MSG durante o período neonatal provoca destruição de corpos celulares e neurônios localizados no sistema nervoso central (SNC) e próximos da região dos ventrículos, devido à sua passagem pela barreira hematoencefálica, a

qual nesse momento não está totalmente desenvolvida. Estudos indicam que animais MSG apresentam necrose de células neuronais do núcleo ventromedial hipotalâmico e principalmente do núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) que tem de 80 a 90% de seus neurônios destruídos (OLNEY, 1969).

A lesão no ARC, que é uma região responsável pela secreção de neurotransmissores, peptídeos e hormônios que estão ligados ao crescimento, desenvolvimento e metabolismo, afeta diferentes funções como balanço energético e funcionamento do eixo hipotálamo - hipófise, induzindo a uma situação de desnervação funcional dentro do eixo hipotálamo – hipófise e do eixo hipotálamo - tecido adiposo (DAWSON et al., 1997). Devido a estas alterações, os ratos MSG possuem concentrações aumentadas de corticosterona (MATYSKOVÁ et al., 2008), assim como de leptina, decorrentes do acúmulo de gordura visceral e da insulina, conseqüente à resistência à insulina (HERNÁNDEZ-BAUTISTA et al., 2014; NAGATA et al., 2006) redução do crescimento corporal, obesidade, produção diminuída de esperma, puberdade tardia, aumento da adiposidade, intolerância à glicose e aumento de triglicérides (BALBO et al., 2000; DOLNIKOFF et al., 2001; FERNANDES et al., 2012).

Segundo Dawson e colaboradores (1997), ocorre destruição dos neurônios para leptina no ARC o que pode diminuir o feedback pela leptina circulante levando ao desequilíbrio do nível de adiposidade que é mediada pela própria leptina, o que explicaria o mecanismo de desenvolvimento da obesidade pelo MSG (DAWSON et al., 1997).

Voltera e colaboradores (2008) mostraram que ratos MSG anestesiados ou não anestesiados com medidas não invasivas apresentaram alterações na hemodinâmica sistêmica como aumento da frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM)

e resistência periférica total (RPT) (VOLTERA et al., 2008).

Trabalhos realizados em nosso laboratório avaliando os parâmetros cardiovasculares de forma direta em animais não anestesiados mostraram que ratos com obesidade MSG apresentam hipertensão na idade adulta, seguido por um aumento no componente simpático da modulação autonômica evidenciada pela análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca e atividade nervosa simpática renal aumentada (DA CUNHA et al., 2011; DA SILVA MATTOS et al., 2012), além de sensibilidade barorreflexa alterada (KARLEN-AMARANTE et al., 2012). Cunha e colaboradores (2010) mostraram que o modelo MSG induz a aumento de lipoperoxidação plasmática, comprovando que a obesidade é geradora de estresse oxidativo. Nesse modelo também foi evidenciado que a produção de NO endotelial está diminuída e o estresse oxidativo está aumentado (CUNHA et al., 2010), podendo levar à injúria celular e tecidual nos vasos sanguíneos.

A literatura mostra também que o aumento da atividade simpática na obesidade pode ser o resultado de um conjunto de alterações sistêmicas como aumento da insulina, leptina, ácidos graxos livres e maior ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), aumento da inflamação e do estresse oxidativo que, de forma conjunta contribuem para o desenvolvimento da hipertensão e elevando a atividade do sistema nervoso simpático (KURUKULASURIYA et al., 2011; LOHMEIER; ILIESCU, 2013).

#### **1.4 REGULAÇÃO NEURAL DA PRESSÃO ARTERIAL**

O sistema cardiovascular atua de forma a manter a homeostasia do organismo e uma das formas é controlando a pressão arterial. A pressão pode ser modulada a longo prazo, através do controle humoral, onde substâncias como angiotensina, óxido

nítrico, bradicinina, renina e aldosterona são liberadas para restabelecer o equilíbrio pressórico. A modulação a curto prazo é feita pelo sistema nervoso autônomo (SNA) que corrige a pressão através da ativação de receptores (sensores) que estão localizados em regiões como arco aórtico e seio carotídeo que detectam variações na pressão arterial como os barorreceptores, pressão de oxigênio pelos quimiorreceptores e alterações de volume pelos receptores cardiopulmonares (AIRES, 2008).

Diversas áreas centrais estão envolvidas neste controle como o núcleo do trato solitário (NTS) denominada de primeira estação sináptica para onde todos os receptores citados acima convergem. O NTS envia projeções para áreas supra bulbares como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) que tem importante papel no controle da pressão arterial. Mas o NTS também se projeta para áreas bulbares como o núcleo ambíguo (NA) e núcleo motor dorsal do vago (NMDV) onde se encontram neurônios pré-ganglionares parassimpáticos que estão envolvidos no tônus parassimpático para o coração, e, para o bulbo caudolateral (CVLM), envolvido no tônus simpático cardiovascular através de projeções gabaérgicas (inibitórias) para os neurônios pré-simpáticos do bulbo rostroventrolateral (RVLM) que determinam o tônus simpático devido a suas projeções diretas para os neurônios pré-ganglionares na coluna intermediolateral da medula espinhal (CARDOSO et al., 2006; COLOMBARI et al., 2001; DAMPNEY, 1994).

De forma conjunta esses núcleos modulam as atividades simpática e parassimpática a cada momento para minimizar as mudanças bruscas da pressão arterial (PA) que ocorrem nos leitos vasculares garantindo assim correto aporte sanguíneo. Quando ocorre aumento da PA rapidamente, o sistema nervoso autônomo, através dos barorreceptores aumenta a resposta vagal (parassimpática) e

reduz o tônus simpático promovendo aumento da capacitância venosa, redução da frequência cardíaca, contratilidade cardíaca e queda da resistência periférica total. Assim sendo, o SNA tem papel fundamental no sistema cardiovascular atuando de forma tônica e reflexa no controle da PA (CARDOSO et al., 2006; DAMPNEY, 1994).

## **1.5 ÓXIDO NÍTRICO E A FUNÇÃO CARDIOVASCULAR**

O óxido nítrico (NO) tem sido estudado com ênfase desde os anos de 1980 devido à sua descoberta inicial na função do endotélio vascular (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Ele é caracterizado como um gás lipossolúvel com meia vida de aproximadamente 4-10 segundos e produzido por praticamente todas as células do organismo (LI; POULOS, 2005).

O papel do óxido nítrico (NO) hoje está bem estabelecido na literatura estando envolvido com processos fisiológicos como vasodilatação, memória, neuroproteção, peristaltismo, defesa imunológica, ereção peniana, secreções endócrinas e exócrinas bem como participa de vários sistemas como o cardiovascular, reprodutivo, sistema imune e sistema nervoso central (SNC)(SHINDE; MEHTA; GOYAL, 2000).

A via clássica de formação do NO depende de enzimas especializadas chamadas sintases de óxido nítrico ou NOS. As enzimas NOS possuem uma estrutura dimérica e com múltiplos domínios que permitem sintetizar NO através do oxigênio molecular ( $O_2$ ) e da L-arginina e requer cofatores como tetrahydrobiopterina ( $BH_4$ ), ferro heme, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleótido (FMN) e cálcio ( $Ca^{2+}$ /calmodulina (RAJAPAKSE; HEAD; KAYE, 2016; TEJERO; SHIVA; GLADWIN, 2019).

São descritas 4 isoformas da NOS:

a) nNOS (NOS neuronal ou NOS I) encontrada em neurônios periféricos e centrais e

células gliais, células endoteliais, fibroblastos adventiciais, cardiomiócitos, células musculares lisas e algumas células epiteliais. É expressa de forma constitutiva e sua taxa de produção é maior que da eNOS, é regulada pelo complexo cálcio/calmodulina ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ) e muito susceptível à inibição pelo próprio NO. A nNOS produz NO de forma pulsátil o que ajuda a regular a neurotransmissão, a regulação central da pressão sanguínea, relaxamento do músculo liso e a vasodilatação através dos nervos nitrérgicos periféricos. Por outro lado, também está envolvida com morte neuronal no derrame cerebrovascular (FÖRSTERMANN et al., 1994).

Apesar da nNOS ser menos expressa que a eNOS nos vasos sanguíneos, aumentam as evidências de importantes funções neste local como o estudo de Pelligrino e colaboradores (1993) que observaram efeitos tônicos na regulação do fluxo sanguíneo cerebral (PELLIGRINO; KOENIG; ALBRECHT, 1993) e de Cacanyiova e colaboradores (2009) mostrando que a inibição seletiva da nNOS levou ao aumento da pressão sanguínea e diminuição da resposta à acetilcolina em ratos Wistar normotensos (CACANYIOVA et al., 2009) e ainda a nNOS pode ser ativada em resposta a tensão de cisalhamento no leito vascular como forma de compensar a deleção da enzima eNOS em camundongos knockout (HUANG et al., 2002). Estudos em humanos mostraram que a nNOS também tem resposta vasodilatadora melhorando o fluxo sanguíneo, tônus microvascular e o fluxo coronário (KELLOGG; ZHAO; WU, 2008; SEDDON et al., 2009, 2008).

A deficiência de L-arginina ou  $\text{BH}_4$  pode induzir o desacoplamento da nNOS e ao invés de sintetizar NO a enzima sintetiza superóxido contribuindo para aumentar as espécies reativas de oxigênio (ERO). Katakam e colaboradores (2012) reportaram desequilíbrio na sinalização de NO devido ao desacoplamento da

nNOS em artérias cerebrais de ratos obesos e como consequência gerou estresse oxidativo e vasoconstrição (KATAKAM et al., 2012).

b) iNOS (NOS induzível ou NOS II): presente em células nucleadas como macrófagos, neutrófilos, células do músculo liso vascular, fibroblastos, células endoteliais e epiteliais e células da glia (SM et al., 2020); A via induzível, iNOS, não depende de cálcio para sua síntese e necessita de um indutor para iniciar sua produção podendo ser uma endotoxina, citocina ou um micro-organismo invasor (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997). Apesar de ser liberada principalmente em situações inflamatórias, estudos também mostraram que a iNOS também pode ser expressa sob situações fisiológicas (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; JIA et al., 2006).

A iNOS quando comparada às outras duas isoformas produz grandes quantidades de NO e sua atividade se mantém até a completa utilização do seu substrato. Devido a essa extensiva e prolongada produção de NO juntamente com o superóxido formado por ele ou por outras fontes, pode levar a produção de exacerbada de peroxinitrito que é uma molécula altamente oxidante e tóxica levando à injúria celular (BECKMAN; KOPPENOL, 1996; DOBUTOVI et al., 2011; ESCH; STEFANO, 2002; TEJERO; SHIVA; GLADWIN, 2019).

c) eNOS (NOS endotelial ou NOS III) encontrada nas células endoteliais, plaquetas, eritrócitos, cardiomiócitos e nas células musculares lisas. No entanto, é expressa predominantemente no endotélio. É uma isoforma constitutiva e o NO produzido por ela além de regular o fluxo sanguíneo basal nos vasos sanguíneos, atua de forma tônica inibindo a ativação de plaquetas e a adesão de moléculas inflamatórias no endotélio (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; MONCADA; HIGGS, 1993; SOUTHAN; SZABÓ; THIEMERMANN, 1995).

Estudos mostraram que a deleção da eNOS em camundongos machos provocou efeitos na pressão sanguínea e vasodilatação e como forma de compensar esses efeitos foi observado aumento da produção de nNOS e prostaglandinas (HUANG et al., 2002; SUN et al., 1999).

As células endoteliais regulam a sinalização de NO disforma leito vascular e estudos recentes apontam que os eritrócitos também têm papel na regulação da sinalização endócrina do NO modulando tanto a pressão sanguínea quanto as lesões no miocárdio. Os eritrócitos parecem ser tonicamente regulados pela disponibilidade de L-arginina que é um substrato da eNOS (YANG et al., 2013).

Diversas circunstâncias podem levar a mudanças no ciclo da produção do NO e a enzima ao invés de produzir NO exacerba a produção de superóxido que é uma molécula altamente reativa e pode causar danos celulares. Esse processo é conhecido como desacoplamento da eNOS (TEJERO; SHIVA; GLADWIN, 2019).

- d) A NOS mitocondrial (mtNOS) é um novo membro da família NOS. Foi identificada como isoforma da NOS I e está presente no interior da membrana mitocondrial (ELFERING; SARKELA; GIULIVI, 2002). O NO é produzido localmente na mitocôndria porém a produção intramitocondrial excessiva inibe a atividade do complexo I e IV na cadeia respiratória produzindo ERO mitocondrial (BROOKES, 2004).

Outra via de produção de NO estudada é a formação a partir do nitrito como precursor. O nitrato é adquirido pela ingestão de vegetais folhosos, porém mamíferos precisam de uma bactéria oral para reduzir nitrato em nitrito na saliva (JANSSON et al., 2008). O nitrito é absorvido para a circulação e estudos apontam que cerca de metade desse nitrito presente no plasma é originário da dieta e a outra metade advém

da oxidação do NO produzido principalmente pela eNOS através da atividade oxidativa da ceruloplasmina (ferro II) no plasma (SHIVA et al., 2006). De forma inversa, a eNOS também reduz nitrito em NO principalmente em condições de anoxia (VANIN et al., 2007).

Quando o nitrito está no plasma ocorre a redução para se converter em NO através de diversas proteínas que geralmente contém o grupo heme ou molibdopterina como cofator e que podem ser encontradas em várias células sanguíneas, vasos sanguíneos e tecido cardíaco (TEJERO; SHIVA; GLADWIN, 2019). Outras moléculas inorgânicas também possuem a capacidade de reduzir nitrito em NO como os polifenóis e o antioxidante ácido ascórbico (vitamina C) (DEJAM et al., 2007; GAGO et al., 2007).

## **1.6 INFLAMAÇÃO E OBESIDADE**

A inflamação é uma resposta fisiológica necessária para restaurar a homeostase que foi alterada por diversos estímulos. No entanto, uma resposta inflamatória crônica ou excessiva, pode causar efeitos deletérios. A origem inflamatória pode ser por componentes genéticos ou fatores ambientais como fumo, estresse, poluentes ambientais e a supernutrição (PURKAYASTHA; CAI, 2013). Nos quadros de sobrepeso e obesidade existe um baixo grau de inflamação que pode ser gerado pela alimentação excessiva e os tecidos metabolicamente envolvidos responsáveis pelos gatilhos que iniciam o quadro inflamatório são o tecido adiposo, fígado e músculo (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ ET AL, 2013).

Foi observado no tecidos adiposo e fígado de humanos obesos um aumento da ativação de quinases como c-Jun N-terminal (JNK), o inibidor da quinase k (IKK) e a proteína quinase R (PKR) que permitem a indução da expressão de citocinas

inflamatórias (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ ET AL, 2013).

Além das citocinas ocorre também a ativação de um complexo proteico que faz parte do sistema imune inato chamado inflamassoma que atua como um sensor para iniciar a resposta inflamatória através de aumento da glicemia, espécies reativas de oxigênio, palmitato, lipopolissacarídeos, ácido úrico entre outros. O inflamassoma induz a ativação da caspase-1 que por sua vez induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Há fortes evidências indicando que esse complexo proteico seja a sinalização para o desenvolvimento da inflamação crônica (STIENSTRA et al., 2012).

No quadro de obesidade associada à inflamação crônica são produzidas citocinas pró-inflamatórias através de infiltrado de macrófagos no tecido adiposo, pancreático, hepático, cerebral e possivelmente muscular (EMANUELA et al., 2012; GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ ET AL, 2013; WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005). O principal marcador de inflamação na fase aguda é a proteína C-reativa (CRP) que é sintetizada pelo fígado e em condições fisiológicas é liberada em baixas concentrações (PEPYS; HIRSCHFIELD, 2003). Na fase crônica de inflamação as principais citocinas encontradas são fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6) (ambas regulam a liberação de CRP) e o inflamassoma (IL-1 $\beta$ )(GABAY; KUSHNER, 2008; PEPYS; HIRSCHFIELD, 2003; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ ET AL, 2013) além da liberação de óxido nítrico da via indutiva (iNOS) (PERREAULT; MARETTE, 2001).

O tecido adiposo é metabolicamente ativo e secreta substâncias que regulam aspectos metabólicos e cardiovasculares. A leptina é um hormônio liberado pelo tecido adiposo e atua centralmente diminuindo o apetite e aumentando o gasto calórico. Altas concentrações de leptina são encontrados no quadro de obesidade e

tem sido relacionada com aumento da atividade simpática e aumento do risco cardiovascular como infarto do miocárdio, derrame e hipertensão (HAYNES et al., 1997; MORRIS, 2008). Por outro lado, a adiponectina é uma proteína também secretada pelo tecido adiposo branco e tem papel de aumentar a sensibilidade à insulina e oxidação de ácidos graxos musculares e importante efeito vasodilatador pois estimula a oxido nítrico sintase da via endotelial (eNOS), promovendo controle do tônus vascular, inflamação e proliferação de células musculares lisas (HAYNES et al., 1997; MORRIS, 2008). Na obesidade é observado que esses mediadores tem efeito importante na sinalização e sensibilidade à insulina de forma sistêmica mas principalmente no fígado e músculos esqueléticos (HERNÁNDEZ BAUTISTA et al., 2019).

O aumento do tecido adiposo principalmente o visceral e abdominal está associado tanto com o quadro inflamatório sistêmico quanto com o aumento do estresse oxidativo (BALISTRERI, CR; CARUSO, 2010; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ ET AL, 2013). Além disso, o aumento de NADPH-oxidase e diminuição de enzimas antioxidantes também estão presentes no tecido adiposo (FURUKAWA et al., 2004; HERNÁNDEZ BAUTISTA et al., 2019).

## **1.7 ESTRESSE OXIDATIVO E OBESIDADE**

O estresse oxidativo é o resultado do desequilíbrio entre agentes oxidantes (radicais livres) e antioxidantes onde ocorre a predominância de agentes oxidantes, redução da produção de antioxidantes ou ambos (HOTAMISLIGIL, 2006). Moléculas e átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados podem ser classificados como radicais livres. Essa disposição dos elétrons faz com que sejam altamente instáveis, com meia vida extremamente curta e muito reativas (LOURDES PIRES

BIANCHI; MARIA GREGGI ANTUNES, 1999).

Os radicais livres são formados de maneira fisiológica e podem ser gerados pelo desacoplamento das enzimas NOS, pelas mitocôndrias através da cadeia transportadora de elétrons, membranas celulares, citoplasma e enzimas NADPH oxidases (NOX), ciclooxygenases, lipoxigenases e citocromo P450 redutases (HIROOKA, 2008a).

ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) são alguns exemplos dessas moléculas e estão relacionadas com a produção de energia, regulação do crescimento, fagocitose, imunidade e defesa celular entre outras funções fisiológicas.

ERO são moléculas altamente reativas e incluem o radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) que possui alta reatividade e reage próximo ao seu local de formação, superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que são menos reativos. São gerados por células principalmente pela conversão de oxigênio liberado da transferência de elétrons da cadeia mitocondrial durante a produção de energia pela via de fosforilação oxidativa (CHAN; CHAN, 2019). No entanto, estas moléculas quando produzidas em excesso podem levar à injúria celular, peroxidação dos lipídios de membrana e destruição das proteínas, enzimas, carboidratos e DNA (HERNÁNDEZ BAUTISTA et al., 2019) além de atuarem na gênese e progressão de DCV (TEJERO; SHIVA; GLADWIN, 2019).

Por outro lado, quando ocorre o desequilíbrio redox (aumento da produção de ERO/ ERN) desencadeia a liberação de enzimas antioxidantes como glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), peroxirredoxina, glutarredoxina, tireorredoxina, heme oxigenase e paraoxonase bem como pela degradação não enzimática como glutathione, lipoato, urato, ubiquinona e vitaminas como vitamina E e C para remover o excesso de ânion superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ), hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que não é um radical livre mas é altamente reativo,

hipoclorito ( $\text{ClO}^-$ ), peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e óxido nítrico ( $\text{NO}$ ) (HERNÁNDEZ BAUTISTA et al., 2019).

A vitamina C (ácido ascórbico), metabólito essencial para vários organismos, é um micronutriente hidrossolúvel atuando em diversas funções biológicas como cofator para várias enzimas, hidroxilação do colágeno, biossíntese de carnitina, conversão do neurotransmissor dopamina em noradrenalina e regula a absorção do ferro. No entanto, para os humanos e alguns primatas é necessário adquirir a vitamina através de alimentos pois falta uma enzima que leva à etapa final de sintetização no organismo. É um potente antioxidante pois reage com radicais livres como ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) neutralizando seu potencial dano celular (COVARRUBIAS-PINTO et al., 2015).

### **1.8 ESTRESSE OXIDATIVO NA ÁREA RVLM**

A área RVLM é uma região cerebral primária envolvida na geração da condução simpática e contém neurônios bulbo-espinhais que inervam neurônios pré-ganglionares simpáticos responsáveis pela regulação do tônus simpático cardiovascular (GUERTZENSTEIN; SILVER, 1974). A lesão ou inibição bilateral da RVLM reduz a pressão arterial a um nível que se assemelha ao produzido pela transecção medular (GRANATA; KUMADA; REIS, 1985; GUERTZENSTEIN; SILVER, 1974). Por outro lado, a ativação da RVLM aumenta a pressão arterial (GRANATA; KUMADA; REIS, 1985; ROSS et al., 1984; VARNER et al., 1989). Evidências anatômicas (MINSON et al., 1987; ROSS et al., 1984) e eletrofisiológicas (GUYENET; HASELTON; SUN, 1989; MINSON et al., 1987; MORRISON; MILNER; REIS, 1988) indicam que o tônus simpático pela RVLM é mediado por projeções bulbo espinhais diretas para coluna intermediolateral na medula espinhal torácica. A atividade

dos neurônios da RVLM é regulada por neurotransmissores excitatórios e inibitórios e alterações na excitação quanto na inibição destes neurônios influenciam diversos estados fisiológicos e fisiopatológicos (MUELLER, 2007; PATEL; LI; HIROOKA, 2001).

Na área RVLM foram encontrados as três isoformas da NOS: nNOS que está expressa em altas concentrações nos neurônios, eNOS expressa nas células endoteliais dos capilares e iNOS expressa nos neurônios e micróglia (CHAN et al., 2001a; MARTINS-PINGE et al., 2007; PATEL; LI; HIROOKA, 2001) sendo que cada uma delas exerce diferentes ações. Chan e colaboradores (2001/2003) mostraram que tanto a nNOS quanto a iNOs estão tonicamente ativas e que a eNOS parece não influenciar o tônus simpático (CHAN et al., 2001b; CHAN; WANG; CHAN, 2003).

As ações centrais do NO na RVLM podem ser controversos pois autores mostram resultados distintos com a mesma isoforma. O NO derivado da nNOS provoca simpatoexcitação pela ativação dos neurônios glutamatérgicos e o NO proveniente da iNOS provoca simpatoinibição pela ativação da neurotransmissão gabaérgica (CHAN; WANG; CHAN, 2003; HUANG; CHAN; HSU, 2003, 2004). A literatura mostra que em ratos anestesiados ou sem efeito da anestesia que em condições fisiológicas a nNOS está prevalecendo sobre a atividade da iNOS por isso a RVLM mantém esse tônus simpático vasomotor estabilizando a pressão arterial (CHAN et al., 2001b; MARTINS-PINGE et al., 2007). Em contrapartida, estudos mostram que a nNOS parece ter um papel simpatoinibitório através do aumento da atividade gabaérgica inibindo a atividade simpatoexcitatória dos neurônios glutamatérgicos (SEARS; ASHLEY; CASADEI, 2004; WANG; GOLLEDGE, 2013).

Há evidências que mostram que quando a biodisponibilidade do NO diminui pelo desacoplamento da enzima NOS não ocorre a produção de NO da forma correta

iniciando as disfunções endoteliais e o aumento de ERO vascular. Na RVLM estudos também mostram que o desacoplamento da iNOS levando a produção aumentada de ERO impacta de forma direta no desenvolvimento da hipertensão neurogênica (elevação crônica da pressão arterial que não é causada por lesões nos órgãos periféricos ou vasos sanguíneos) (CHAN; CHAN, 2019). Dessa forma fica evidente que a iNOS contribui para o aumento de estresse oxidativo na RVLM levando a simpatoexcitação na área.

A primeira evidência que sugere a sinalização de ERO na RVLM contribui para o tônus vasomotor simpático veio do estudo de Zanzinger e colaboradores (2000) no qual a microinjeção de SOD na RVLM de porcos anestesiados normotensos diminui a atividade nervosa simpática basal e a pressão arterial (ZANZINGER; CZACHURSKI, 2000). Da mesma forma, a aplicação de um scavenger de ânion  $O_2^-$  e tempol, reduz as descargas basais do nervo simpático e promove queda na pressão arterial (CAMPESE et al., 2004). Além disso, estudos mostram que ERO aumentam os estímulos excitatórios glutamatérgicos e atenua as vias inibitórias gabaérgicas na RVLM, aumentando assim os estímulos simpatoexcitatórios para os neurônios da RVLM (NISHIHARA et al., 2012; SHINOHARA et al., 2012). Por outro lado, autores defendem que a modulação da transmissão glutamatérgica diante do estresse oxidativo se comporta de forma distinta dependendo do tipo de receptor (AIZENMAN; HARTNETT; REYNOLDST, 1990; AIZENMAN; LIPTON; LORING, 1989), espécie reativa que está presente no tecido nervoso (KISHI et al., 2004; MORRISON, 2003; PELLEGRINI-GIAMPIETRO et al., 1990; ZHU et al., 1998; ZOCCARATO; VALENTE; ALEXANDRE, 2002), localização e efeito ou não da anestesia (CARDOSO et al., 2006) e em neurônios pré ou pós sinápticos (AVSHALUMOV; RICE, 2002; TROTTI; DANBOLT; VOLTERRA, 1998).

O desequilíbrio oxidativo na RVLM é caracterizado pelo aumento da formação de peroxinitrito, formado pelo superóxido e NO derivados da nNOS, e a origem desse aumento inclui redução da atividade da SOD2, disfunção da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e da ativação da NADPH oxidase, xantina oxidase e desacoplamento da NOS causando aumento da simpatoexcitação desenvolvendo a hipertensão (CHAN; CHAN, 2019; KISHI; HIROOKA, 2012). O papel do receptor AT<sub>1</sub> da angiotensina II (ANG II) também tem sido evidenciado como um fator para o aumento da NADPH oxidase (GAO et al., 2005; NOZOE et al., 2008) contribuindo para a hipertensão. Administração de ANG II diretamente na RVLM provoca resposta pressora pela ativação do sistema nervoso simpático (DAMPNEY et al., 2007) e o bloqueio do receptor AT<sub>1</sub> reduz a pressão pela simpatoinibição em ratos obesos hipertensos (KONNO et al., 2012). Na hipertensão induzida pela obesidade também foi visto que os neurônios da RVLM estão ativados (STOCKER; MEADOR; ADAMS, 2007) e que a leptina e insulina contribuem para o aumento da ativação simpática (HILZENDEGER et al., 2012; RAHMOUNI et al., 2005).

## 2. JUSTIFICATIVA

A obesidade além de ser considerada uma doença epidêmica presente em países desenvolvidos ou em desenvolvimento e que triplicou sua prevalência em um período de 40 anos, favorece o desenvolvimento de outras comorbidades como a hipertensão arterial. A literatura mostra que diversos fatores presentes no quadro de obesidade como o aumento do estresse oxidativo e inflamação, resistência à insulina, aumento do tecido adiposo, aumento da concentração de leptina e angiotensina II, e desequilíbrios na produção de óxido nítrico ocasionam maior modulação simpática e favorece o desenvolvimento da hipertensão. No entanto, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não estão esclarecidos.

Considerando que o modelo de obesidade MSG se assemelha em muitos aspectos com a obesidade desenvolvida em humanos como a presença da síndrome metabólica além dos fatores já citados que contribuem para o desenvolvimento da hipertensão, faz-se relevante investigar os efeitos da suplementação alimentar com L-arginina sobre parâmetros cardiovasculares e autonômicos, e avaliar a produção do estresse oxidativo na área RVLM e em tecidos periféricos bem como os efeitos após tratamento com Vitamina C. Vale ressaltar que encontram-se poucos estudos nessa área e nenhum trabalho até o presente momento abordou a área RVLM em ratos obesos não anestesiados.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Este trabalho tem como objetivo geral estudar os efeitos da suplementação com L-arginina (L-arg) ou vitamina C (vit C) sobre a fisiopatologia da hipertensão induzida pela obesidade em ratos, avaliando os parâmetros cardiovasculares, autonômicos, oxidativos e concentração de nitrito tecidual e plasmático.

**ESTUDO 1. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM L-ARGININA NOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E AUTONÔMICOS DE RATOS CONTROLE E COM OBESIDADE MSG.**

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**Todos os protocolos foram realizados em ratos controle (CTR) e com obesidade (MSG).**

1. Caracterizar os parâmetros de obesidade através do cálculo do índice de Lee e peso do tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal, em ratos suplementados ou não com L-arg;
2. Avaliar os parâmetros cardiovasculares em ratos CTR e MSG não anestesiados suplementados ou não com L-arg através da medida direta da PAM e FC;
3. Avaliar os parâmetros autonômicos de ratos CTR e MSG não anestesiados suplementados ou não com L-arg através da análise espectral da variabilidade cardíaca e do barorreflexo espontâneo;
4. Determinar a produção de óxido nítrico em ratos CTR e MSG pela quantificação de nitrito no plasma, coração, fígado, rim e tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal.

## **ESTUDO 2. AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO DA ÁREA ROSTROVENTROLATERAL DO BULBO (RVLM) EM RATOS CONTROLE E OBESOS E OS EFEITOS DO TRATAMENTO COM VIT C.**

### **3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**Todos os protocolos foram realizados em ratos controle (CTR) e com obesidade (MSG).**

1. Caracterizar os parâmetros de obesidade através do cálculo do índice de Lee e peso do tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal, em ratos tratados com água ou vit C;
2. Investigar os efeitos da microinjeção do L-glu e da vit C na área RVLM nas respostas cardiovasculares em ratos não anestesiados;
3. Obter o perfil molecular oxidativo da RVLM, coração, rim e adrenal através da dosagem de Abts, Frap, Nbt e T-bars;
4. Avaliar o efeito crônico do tratamento com vit C na área RVLM sobre o perfil oxidativo pelo Abts, Frap, Nbt e T-bars;
5. Avaliar o efeito crônico do tratamento com vit C na produção de NO através da quantificação de nitrito no coração, fígado, rim, aorta e plasma.

**ESTUDO 1: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM L-ARGININA  
NOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E AUTONÔMICOS DE  
RATOS CONTROLE E COM OBESIDADE MSG.**

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 ANIMAIS**

Todos os procedimentos foram realizados em acordo com as diretrizes éticas do CONCEA e aprovados pela comissão de ética no uso de animais (CEUA), processo de número: 19678.2016.07.

Para este estudo utilizamos ratos Wistar adultos (90 dias) provenientes de acasalamentos no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas (CIF), a partir de matrizes provenientes do biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL). No biotério setorial do CIF os ratos foram mantidos em caixas de polipropileno (45x25x25cm) em sala com temperatura controlada ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) em ciclo claro/escuro de 12/12 horas com ração (Nuvilab CR-1; Nuvital®, Colombo, Paraná, Brasil) e água vontade.

### **4.2 INDUÇÃO E AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DA OBESIDADE**

A prole macho recebeu tratamento para indução da obesidade nos primeiros cinco dias de vida com injeções subcutâneas de glutamato monossódico na concentração de 4mg/g (sigma Co., MO, USA) ou salina equimolar (DE FREITAS MATHIAS et al., [s.d.]) uma vez ao dia. A obesidade foi caracterizada pelo cálculo do índice de Lee que é representado pela fórmula  $\sqrt[3]{\text{peso corporal (g)}/\text{comprimento nasoanal (cm)}} \times 100$  além do peso do tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal (BERNARDIS; PATTERSON, 1968).

### **4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Os ratos foram divididos em: Grupo controle (CTR): suplementado com L-arginina (L-arg) ou veículo (água de torneira) e Grupo com obesidade (MSG): suplementado com L-arg ou veículo, totalizando quatro grupos.

### **4.4 SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM L-ARGININA**

A suplementação oral com L-arg (Sigma-Aldrich CO®, Saint Louis MO, USA) foi administrada em ratos CTR e MSG durante 30 dias consecutivos pelo tubo gástrico (via gavagem) preparada diariamente em dose única de 62,5 mg/ml/rato/dia diluída em água de torneira e administrada 1ml/rato/dia. Para os grupos que receberam somente o veículo foi administrado 1ml/rato/dia (VALGAS DA SILVA et al., 2015; YANG; COOTE, 1998). A suplementação com L-arg começou quando os ratos tinham 59 dias de vida e foi até os 89 dias quando foi realizada a cateterização da artéria femoral.

### **4.5 CATETERIZAÇÃO DA ARTÉRIA FEMORAL**

Ao 89º dia de vida, os ratos foram submetidos à cirurgia sob anestesia de cloridrato de cetamina (100 mg/kg, i.p.) e cloridrato de xylasina (6,7 mg/kg, i.p.) (ambas da Ceva Santé Animale, São Paulo, Brasil), para cateterização da artéria femoral com o objetivo de monitorização da pressão arterial pulsátil de forma direta. Foi inserido um cateter de polietileno PE-10 conectado a um segmento de PE-50 na artéria do rato, que ao final foi fechado com oclusor para impedir a saída do fluxo sanguíneo. Foi exteriorizada na região dorsal com a fixação na pele através de sutura e finalizando com sutura no local de acesso à artéria também.

Após o término do procedimento cirúrgico e estando os ratos mantidos em ambiente aquecido para total recuperação da anestesia, foi administrado uma dose

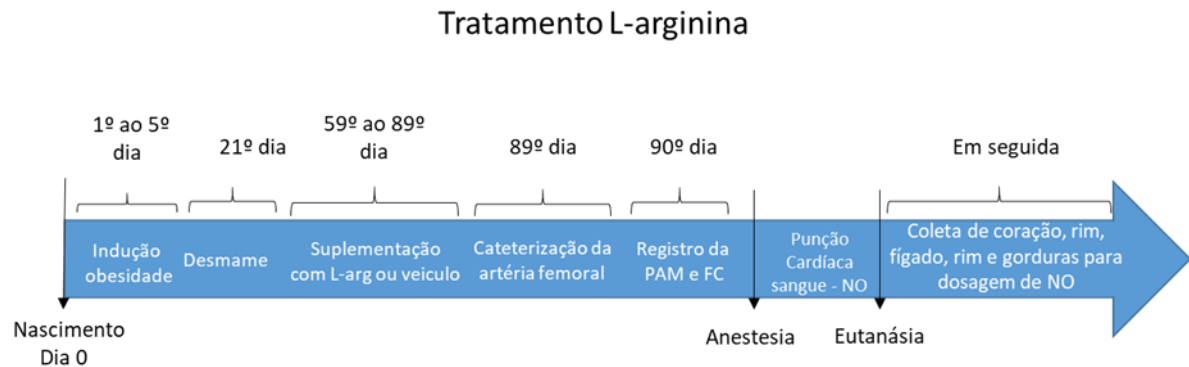
de 100 mg/kg, (v.o.) de analgésico (Paracetamol®, Teuto). Em seguida, os ratos retornaram ao biotério para recuperação por 24 horas, quando se iniciou o protocolo experimental.

#### **4.6 REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA**

O registro da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) ocorreu 24 horas após recuperação da cirurgia de cateterização. Foi realizado através da medida direta da pressão arterial (PA) com os ratos não anestesiados e com livre movimentação. A cânula arterial do rato foi acoplada ao transdutor de pressão (Powerlab modelo MLT0380) conectado a um sistema de registro computadorizado (Powerlab/ ADInstruments). O sinal captado era da pressão arterial pulsátil, cujo sinal era automaticamente processado pelo sistema de aquisição de dados para obtermos os valores de PAM e FC. Durante o período de registro os ratos foram mantidos dentro de caixas individuais em ambiente silencioso.

#### **4.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

Neste estudo foi registrado os valores basais dos 4 grupos experimentais avaliando a suplementação prévia de 30 dias consecutivos de L-arg ou veículo. Após o registro os ratos foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg, i.p.) e cloridrato de xylasina (6,68 mg/kg, i.p) para coleta de sangue através de punção cardíaca para posterior obtenção do plasma. Após a punção cardíaca foi realizada a medida do comprimento nasoanal, coleta e pesagem das tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal, para caracterização da obesidade e coleta de órgãos como coração, fígado e rim para posterior dosagem de nitrito (óxido nítrico). A figura 1 ilustra o delineamento experimental desse estudo.



**Figura 1. Ilustração do delineamento experimental de ratos CTR e MSG suplementados com L-arg.** Ratos receberam injeções subcutâneas de glutamato monossódico para indução da obesidade do 1º ao 5º dia pós natal, aos 21 dias foi realizado o desmame e do 59º ao 89º dia receberam L-arg por via oral. Aos 90 dias iniciou-se o protocolo de cateterização da artéria femoral para posteriormente aferição da PAM e FC de forma direta. Após o registro foi realizada a eutanásia com sobredose de anestésico e coleta de tecidos para parâmetros corporais e dosagem de nitrito.

#### 4.8 DOSAGEM DE NITRITO (ÓXIDO NÍTRICO)

A dosagem indireta da concentração de NO foi realizada por meio da quantificação de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) em amostras de coração, rim, fígado e plasma de ratos CTR e MSG. Para a obtenção do plasma foi retirado 2 ml de sangue através de punção cardíaca, centrifugado em 3000 rpm, por 10 minutos em 4°C. Todos os tecidos foram armazenados em freezer -80°C até o início do protocolo de dosagem.

O método foi realizado pela dosagem de nitrito como descrito por (NAVARRO-GONZÁLVIZ; GARCÍA-BENAYAS; ARENAS, 1998; PANIS et al., 2011) com algumas modificações: grânulos de cádmio foram utilizados para converter todo nitrato em nitrito permitindo maior sensibilidade a quantidade total de NO na amostra. Foi preparada uma curva de calibração através da diluição de  $\text{NaNO}_2^-$  em água destilada estéril na escala de 0 a 125  $\mu\text{M}$ ; 100  $\mu\text{L}$  de reagente de Griess foram adicionados em triplicata em microplacas. A absorbância foi lida em 505 nm usando leitor de placas

padronizado (Multiskan EX, LabSystems®, Minnesota USA). Todos os reagentes foram obtidos da Sigma Chemical Co. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  de nitrito.

#### **4.9 ANÁLISE ESPECTRAL DA VARIABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS) E INTERVALO DE PULSO (IP)**

Para esta análise foi utilizado inicialmente o programa computacional LabChart 7.0 (ADInstruments, Bela Vista, Austrália) que detecta pontos de inflexão nos pulsos de pressão e gera series batimento a batimento, com valores de PAS e IP para cada ciclo cardíaco (DUTRA et al., 2013; TEZINI; DIAS; SOUZA, 2013). Posteriormente esses dados de PAS e IP foram convertidos para outro programa computacional Cardioseries v2.4 ([www.danielpenteado.com](http://www.danielpenteado.com)) que analisa essas series temporais batimento a batimento e as reamostra em 10 Hz (1 valor a cada 100 ms) por interpolação cúbica do tipo spline para regularizar o intervalo de tempo entre batimentos. As series com valores interpolados foram divididas em segmentos de 512 valores cada com sobreposição de 50% (Protocolo Welch). Foi examinado visualmente cada segmento e aqueles considerados com artefatos ou transientes foram excluídos.

Os segmentos considerados adequados foram integrados em bandas de baixa frequência (LF; 0,20 - 0,75 Hz) que representa a modulação pelo tônus simpático do SNA, alta frequência (HF; 0,75 - 3,00 Hz) que representa a modulação pelo tônus parassimpático do SNA e a banda de frequência muito baixa (VLF <0,20Hz) que apesar de não ter uma explicação fisiológica bem estabelecida representa ações da regulação hormonal, vasomotora e de temperatura além da atividade do sistema renina-angiotensina. Os resultados foram expressos em unidades absolutas ( $\text{ms}^2$  ou  $\text{mmHg}^2$ ) e normalizadas (un). Os valores normalizados foram obtidos por meio do cálculo da potência relativa das bandas de LF e HF levando em consideração a

potência total de espectro menos a potência VLF. Para avaliar o balanço simpátovagal cardíaco que representa as alterações absolutas e relativas entre os componentes simpático e parassimpático, calculou-se a razão entre a potência das bandas de LF e HF (LF/HF) do espectro do IP (DUTRA et al., 2013; TEZINI; DIAS; SOUZA, 2013).

#### **4.10 ANÁLISE DO BARORREFLEXO ESPONTÂNEO**

Foi utilizado o Método da Sequência para avaliar a sensibilidade barorreflexa (SBR) que foi avaliada no domínio da frequência através das series temporais batimento a batimento com os valores de PAS e IP utilizando o programa computacional CardioSeries v2.4 ([www.danielpenteadocom.com](http://www.danielpenteadocom.com)). As séries foram analisadas em busca de sequência de 4 ou mais batimentos (rampa) onde aumentos progressivos de PAS foram acompanhados de aumentos progressivos de IP (ganho up) ou reduções progressivas de PAS foram acompanhadas de reduções progressivas de IP (ganho down), bem como o ganho total que reflete a quantificação de ambas as medidas. Além disso foi avaliado a efetividade (Bei) que mostra o quão efetiva é a atividade dos barorreceptores em responder aos aumentos e diminuições da pressão arterial.

Foram utilizados limiares de 0 mmHg e 0 ms para detectar alterações da PAS e IP respectivamente. Após a detecção de uma rampa de PAS o programa computacional buscou por alterações no IP sem qualquer intervalo, ou seja, *delay* de zero batimento. Uma sequência barorreflexa foi utilizada somente quando o coeficiente de correlação ( $r$ ) entre os valores de PAS e IP for maior ou igual a 0,8. A SBR foi determinada a partir da média de inclinação da reta da regressão linear entre os valores de PAS e IP de cada sequência barorreflexa encontrada.

#### **4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

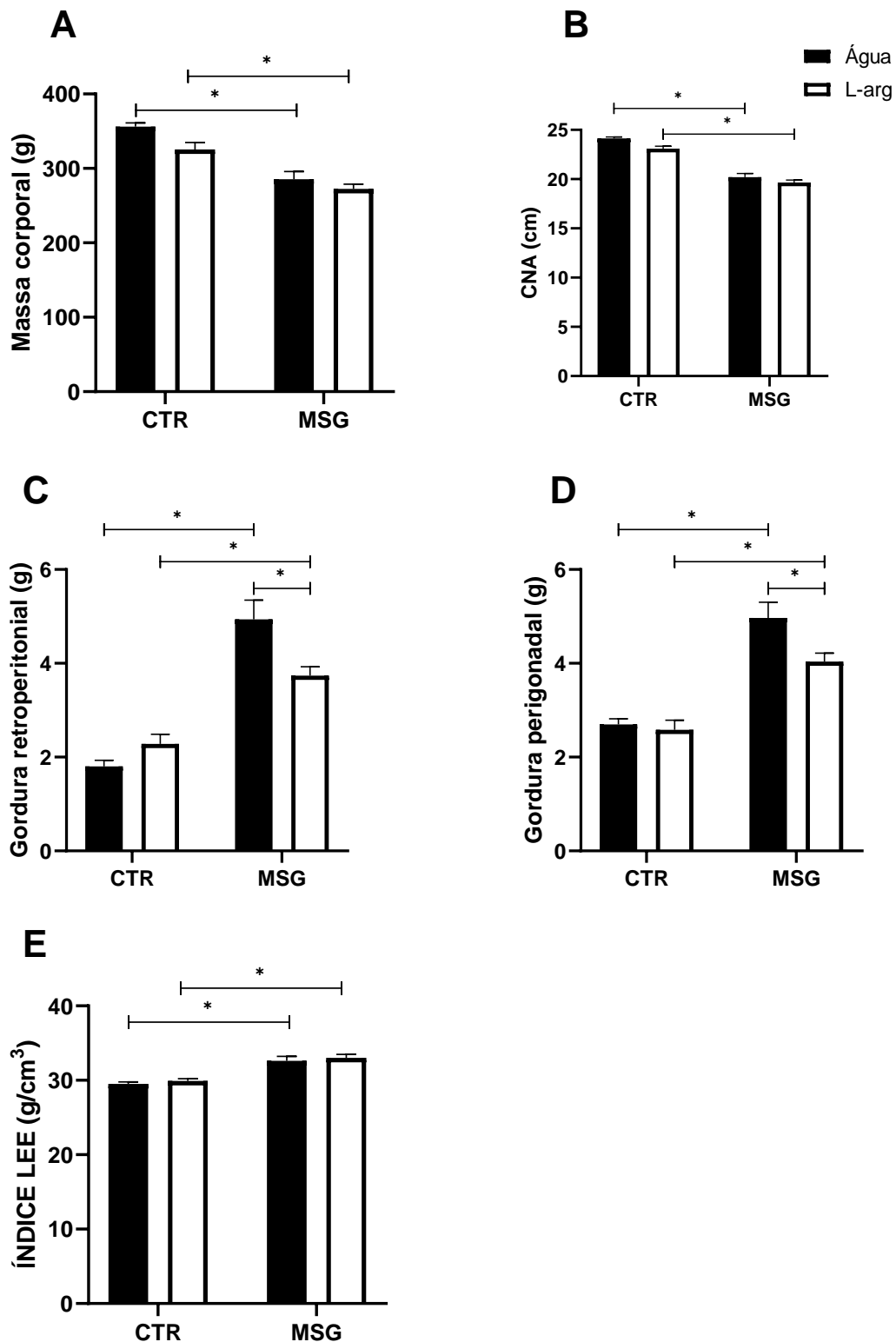
A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa estatístico Prisma<sup>®</sup> (GraphPad<sup>®</sup>, San Diego, CA). Foi realizada análise exploratória de cada variável avaliando a normalidade da distribuição com teste Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade através do teste de Bartlett. Para os dados que apresentaram variância normal e homogeneidade nas variâncias foi utilizado análise paramétrica com ANOVA Two-Way com pós teste de Sidak para comparação entre 4 grupos e os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Em todas as análises o nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE INDUZIDA POR GLUTAMATO MONOSSÓDICO – MSG

O tratamento subcutâneo com glutamato monossódico realizado do 1<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> dia de vida dos filhotes machos de ratos induziu o desenvolvimento da obesidade neuroendócrina na fase adulta (90 dias) observado no grupo MSG caracterizado por menor massa corporal (CTR água=356±5 vs MSG água=285±10\*; CTR L-arg=325±9 vs MSG L-arg=272±6\*, figura 2A) e comprimento nasoanal (CTR água=24±0,1 vs MSG água=20±0,4\*; CTR L-arg=23±0,2 vs MSG L-arg=20±0,2\*, figura 2B) quando comparado aos seus respectivos grupos CTR. A suplementação com L-arginina não promoveu alterações nesses parâmetros em comparação aos seus grupos controle.

O grupo MSG apresentou aumento do tecido adiposo retroperitoneal (CTR água=2±0,1g, MSG água=5±0,4\*; CTR L-arg=2±0,2 vs MSG L-arg=4±0,2\*, figura 2C) e perigonadal (CTR água=3±0,1, MSG água=5±0,3\*; CTR L-arg=2±0,2 vs MSG L-arg=4±0,2\*, figura 2D) em relação aos seus respectivos CTR. Nestes parâmetros, no entanto, a suplementação com L-arg nos animais MSG induziu a um menor acúmulo de ambas tecido adiposo em relação ao grupo MSG água: gordura retroperitoneal: MSG água=5±0,4 vs L-arg=4±0,2\*g, figura 2C; gordura perigonadal: MSG água=5±0,3 vs L-arg=4±0,2\*, figura 2D. Os dados mostraram um aumento do índice de Lee dos grupos MSG quando comparados com seus CTR, sem modificação pelo tratamento com L-arg (CTR água=30±0,2, MSG água=33±0,6\*; CTR L-arg=30±0,3 vs MSG L-arg=33±0,5\*, figura 2E). \*p<0,05, Anova One Way. Os valores estão expressos como média ± EPM. CTR água n=8, L-arg n= 11; MSG água n=10, L-arg n= 10.

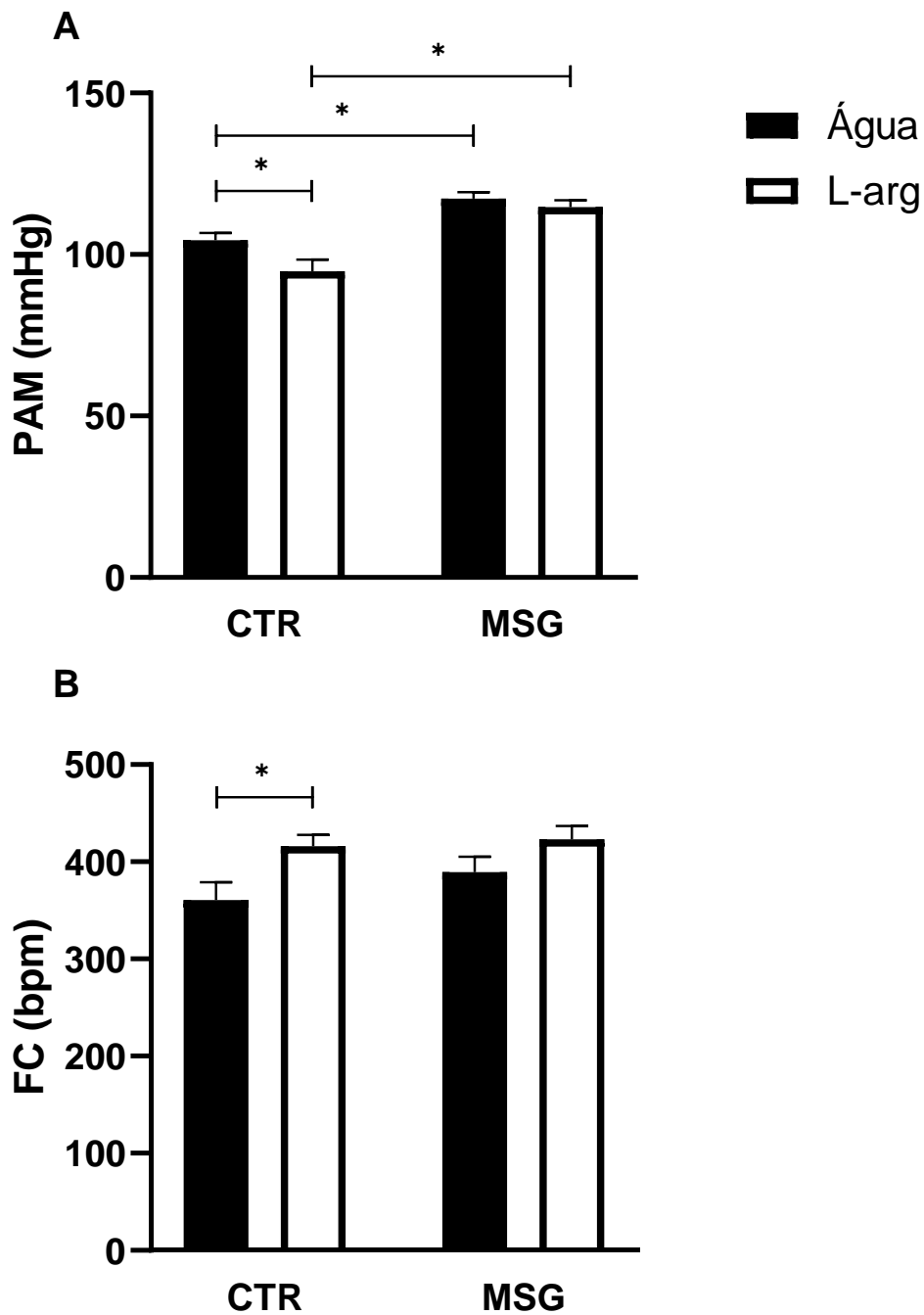


**Figura 2. Caracterização da obesidade.** Caracterização da obesidade aos 90 dias induzida pela administração subcutânea de glutamato monossódico ou veículo do 1<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> dia de vida em ratos Wistar. (A) Massa corporal; (B) Comprimento nasoanal; (C) Gordura perigonadal; (D) Gordura retroperitoneal; (E) Índice de Lee. \* $p < 0,05$ , Anova Two Way seguido do pós teste de Sidak e os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM,  $n=8-11$  ratos por grupo. Fonte: Fernanda N. C. Lopes, 2021.

## **5.2 PARÂMETROS DE PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC)**

Aos 90 dias de vida, os ratos foram submetidos ao protocolo experimental de cateterização e registro dos parâmetros cardiovasculares após 24 horas.

O grupo MSG água apresentou aumento da PAM em relação ao CTR água (CTR água=104±2 vs MSG água=117±2, figura 3A). A suplementação com L-arg nos animais CTR induziu a menores valores basais de PAM em relação ao CTR água (CTR água=104±2 vs CTR L-arg=93±4\*, figura 3A) e ao MSG L-arg (CTR L-arg=93±4 vs MSG L-arg=115±2\*, figura 3A). No entanto, a suplementação com L-arg nos ratos MSG não modificou esses parâmetros (MSG água=117±2 vs L-arg=114±2). Nos parâmetros da FC não foi observado diferenças estatísticas entre os grupos (CTR água=361±18, L-arg=416±13; MSG água=390±15, L-arg=423±14, figura 3B). Dados expressos como média ± EPM, \* p< 0,05. CTR água n=8, L-arg n= 11; MSG água n=10, L-arg n= 10.

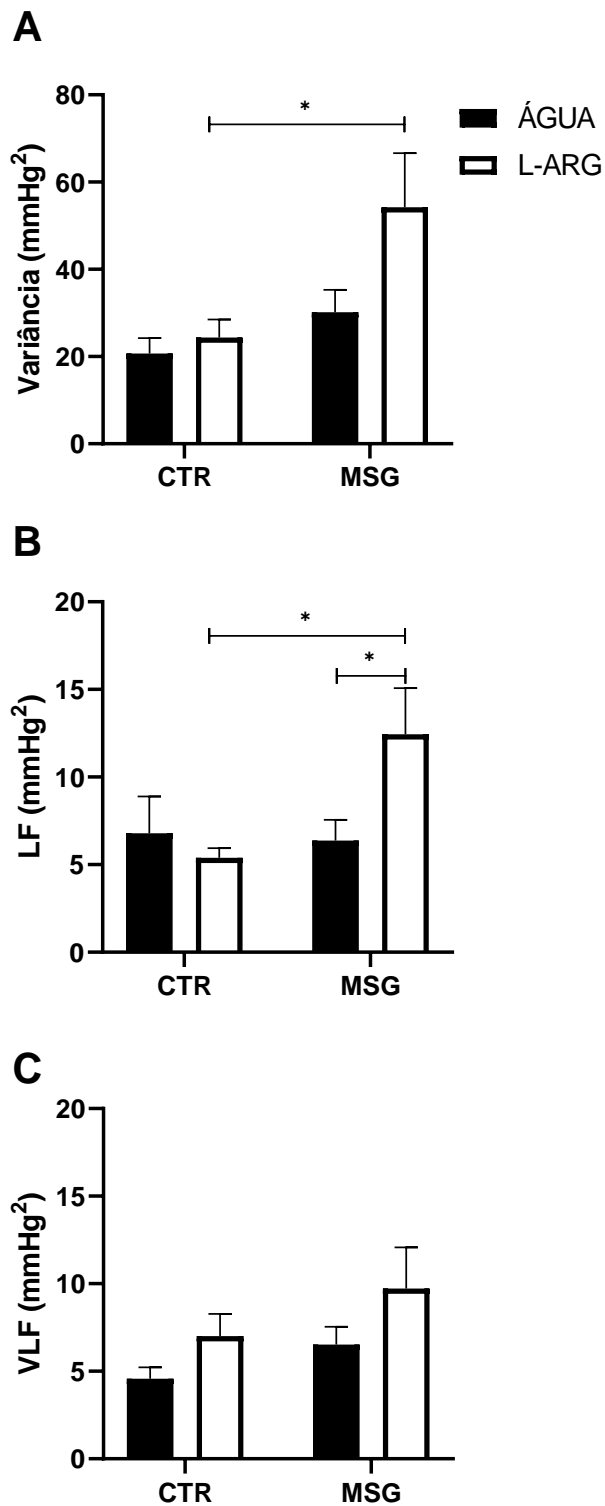


**Figura 3. Parâmetros cardiovasculares da suplementação de L-arginina.** Efeitos da suplementação oral de L-arginina sobre os parâmetros da (A) pressão arterial média (PAM) e (B) frequência cardíaca (FC) em ratos controle (CTR) e com obesidade (MSG) não anestesiados. Valores expressos como média  $\pm$  EPM, \* $p < 0,05$ , Anova Two Way,  $n = 8-11$  ratos por grupo. Fonte: Fernanda N. C. Lopes, 2021.

### **5.3 ANÁLISE ESPECTRAL DA VARIABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS) E INTERVALO DE PULSO (IP)**

#### **5.3.1 Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica - PAS**

Nossos resultados mostraram aumento da modulação autonômica da PAS nos parâmetros da variância entre os grupos CTR e MSG tratados com L-arg (CTR L-arg=24±4; MSG L-arg=54±12\*, figura 4A), do componente LF (CTR L-arg=5±0,6; MSG L-arg=12±3\*; figura 4B) e entre MSG água e MSG L-arg (MSG: água=6±1, L-arg 12±3\*, figura 4B). No componente VLF não houve diferenças estatísticas (CTR: água=5±0,7, L-arg=7±1; MSG: água 6±1, L-arg 10±2, figura 4C).

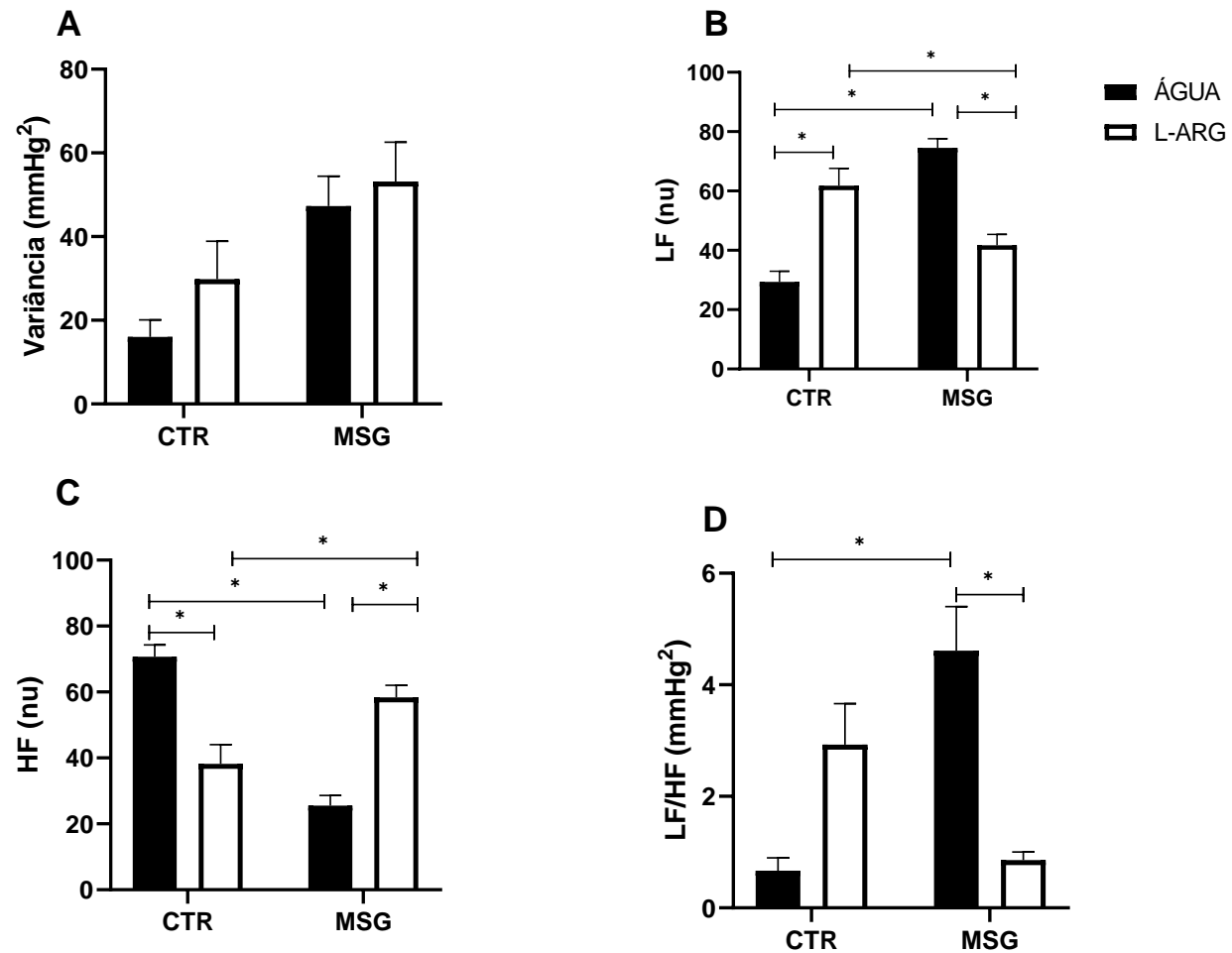


**Figura 4. Análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS).** (A) variância da PAS, (B) LF representa componente simpático autonômico, (C) VLF representa a influência do sistema humoral. Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ , Two Way seguido do pós teste de Sidak,  $n = 6-10$  ratos por grupo. Fonte: Fernanda N. C. Lopes, 2021.

### 5.3.2 Análise da variabilidade do intervalo de pulso - IP

A modulação autonômica no IP não mostrou diferença estatística na variância (CTR: água=16±4, L-arg=30±9; MSG: água=47±7, L-arg=53±9, figura 5A). Em relação ao componente LF nossos resultados mostraram que o grupo MSG água é maior que o CTR água (Água: CTR=29±4 vs MSG=74±3\*, figura 5B) e após suplementação com L-arg o grupo MSG mostrou – se menor em relação ao CTR L-arg (L-arg: CTR=62±6 vs MSG=42±4\*, figura 5B) e ao MSG água (MSG: água=74±3 vs L-arg=42±4\*, figura 5B). No componente HF o grupo MSG água apresentou-se menor em relação ao grupo CTR água (Água: CTR=71±4 vs MSG=25±3\*, figura 5C) e após a suplementação ocorreu uma redução no grupo CTR L-arg em relação ao CTR água (CTR: água=71±4 vs L-arg=38±6\*, figura 5C), aumento no grupo MSG L-arg em relação ao MSG água (MSG: água=25±3 vs L-arg=58±4\*, figura 5C) e quando comparado CTR x MSG após a L-arg, o grupo MSG mostrou-se maior (L-arg: CTR=38±6 vs MSG=58±4\*, figura 5C).

O balanço simpátovagal LF/HF mostrou que o grupo MSG água está maior comparado ao grupo CTR água (CTR água=0,5±0,1-1,2 vs MSG água=4±2-7\*, figura 5D) e mostrou redução após suplementação com L-arg no grupo MSG (MSG: água=4±2-7 vs L-arg=0,8±0,5-1,3\*, figura 5D).

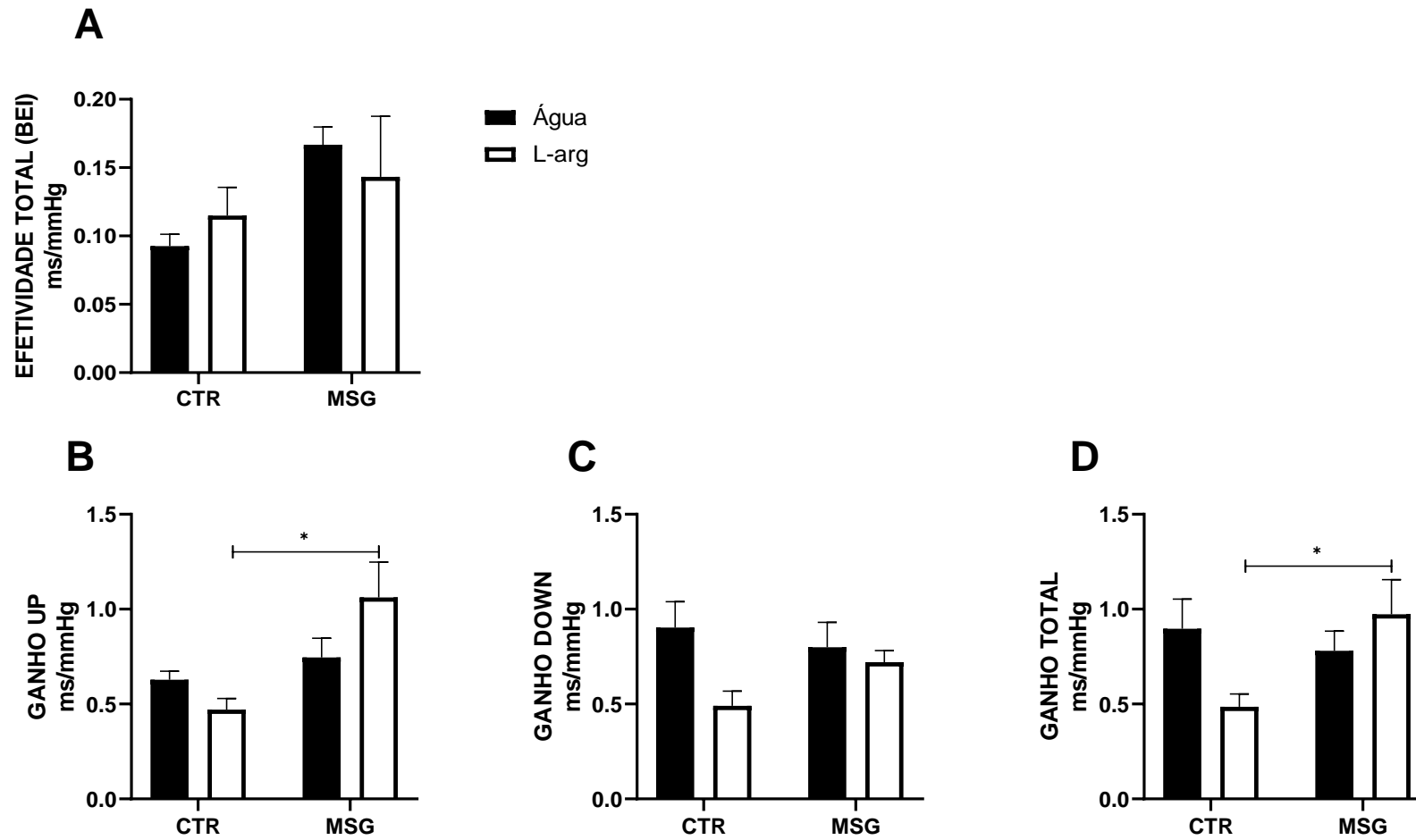


**Figura 5. Análise espectral da variabilidade do intervalo de pulso (IP).** (A) variância do intervalo de pulso, (B) LF (nu) representa componente simpático autonômico, (C) HF (nu) representa componente parassimpático autonômico, (D) LF/HF balanço simpatovagal. \* $p < 0,05$ , Anova Two Way seguido do teste de Sidak e os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM,  $n=6-10$  ratos por grupo. Fonte: Fernanda N. C. Lopes, 2021.

#### 5.4 ANÁLISE DO BARORREFLEXO ESPONTÂNEO

O índice de efetividade barorreflexa (Bei) não mostrou diferença estatística entre os grupos (figura 6A). Os dados descritivos estão na tabela 5.

Nas análises do ganho barorreflexo o grupo MSG L-arg apresentou-se maior em relação ao grupo CTR L-arg nas sequências de ganho up (CTR L-arg=0,5±0,06 vs MSG L-arg=1,0±0,2\*, figura 6B) e de ganho total (CTR L-arg=0,5±0,07 vs MSG L-arg=1±0,1\*, figura 6D), sem diferenças estatísticas no ganho down (CTR: água=0,9±0,1, L-arg=0,5±0,07; MSG: água=0,8±0,1, L-arg=0,7±0,07, figura 6C).



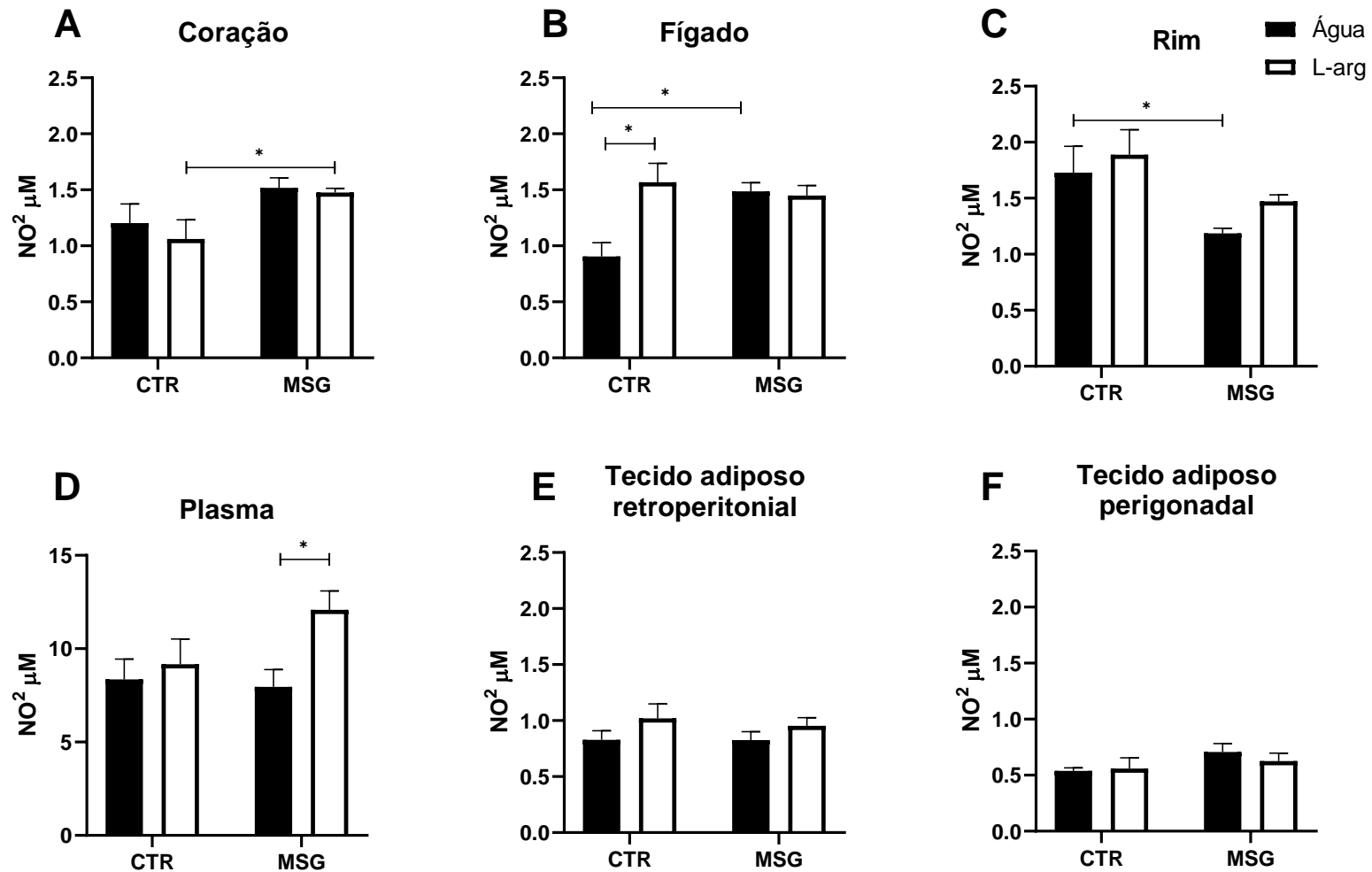
**Figura 6. Análise do barorreflexo espontâneo.** O índice de efetividade barorreflexa está expresso em (A) Bei total. A representação do ganho está expresso em (B) Ganho up, (C) Ganho down e (D) Ganho total. \* $p < 0,05$  Anova Two Way seguido do pós teste de Sidak e os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM,  $n=6-10$  ratos por grupo. Fonte: Fernanda N. C. Lopes, 2021.

## 5.5 DOSAGEM DE NITRITO NO CORAÇÃO, FÍGADO, RIM, PLASMA E TECIDO ADIPOSEO

A dosagem indireta de  $\text{NO}_2^-$  mostrou que no coração apenas o grupo MSG L-arg apresentou aumento em relação ao grupo CTR L-arg (CTR L-arg= $1,0\pm 0,2$  vs MSG L-arg= $1,5\pm 0,03^*$ , figura 7A).

A dosagem de nitrito no fígado mostrou que o grupo MSG água tem maiores concentrações em relação ao CTR água (CTR água= $0,9\pm 0,1$  vs MSG água= $1,4\pm 0,07^*$ , figura 7B) e a suplementação com L-arg promoveu aumento do grupo CTR L-arg comparado ao CTR água (CTR: água= $0,9\pm 0,1$  vs L-arg= $1,6\pm 0,2^*$ , figura 7B) porém sem diferenças estatísticas nos grupos MSG (MSG: água= $1,5\pm 0,07$  vs L-arg= $1,4\pm 0,1$ , figura 7B). No plasma houve aumento de nitrito no grupo MSG após suplementação com L-arg (MSG: água= $8\pm 0,9$ , L-arg= $12\pm 1^*$ , figura 7D), sem alterações nos grupos CTR (CTR: água= $8,4\pm 1$ , L-arg= $9,1\pm 1$ , figura 7D). A concentração de nitrito no rim mostrou-se diminuída em ratos MSG água quando comparado com CTR água (CTR: água= $1,5\pm 1,1-2,4$ , L-arg= $1,9\pm 1,2-2,4$ ; MSG: água= $1,1\pm 1,0-1,3^*$ , figura 7C) sem alterações após o tratamento (CTR L-arg= $1,9\pm 1,2-2,4$ ; MSG L-arg= $1,4\pm 1,3-1,6$ , figura 7C).

Não foi observado diferenças estatísticas na concentração de nitrito nos tecidos adiposo retroperitoneal (CTR: água= $0,8\pm 0,08$ , L-arg= $1\pm 0,1$ ; MSG: água= $0,8\pm 0,07$ , L-arg= $0,9\pm 0,07$ , figura 7E) e perigonadal (CTR: água= $0,5\pm 0,03$ , L-arg= $0,5\pm 0,09$ ; MSG: água= $0,7\pm 0,07$ , L-arg= $0,6\pm 0,07$ , figura 7F).



**Figura 7. Dosagem de nitrito. Efeitos da suplementação oral com L-arginina na produção de  $\text{NO}_2^-$  no (A) coração, (B) fígado, (C) rim, (D) plasma, (E) gordura retroperitoneal, (F) gordura perigonadal de ratos controles (CTR) e com obesidade (MSG) suplementados ou não com L-arginina. \* $p < 0,05$ , Anova Two Way seguido do pós teste de Sidak e os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM,  $n = 6-10$  ratos por grupo. Fonte: Fernanda N. C. Lopes, 2021.**

## 6. DISCUSSÃO

Os principais resultados obtidos através deste estudo foram: 1) ratos que receberam injeção de glutamato monossódico desenvolveram a obesidade na vida adulta representada pelo aumento do tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal e pelo aumento do índice de Lee. Após a suplementação com L-arg houve uma redução da quantidade de ambos tecidos adiposo nos ratos com obesidade; 2) os ratos MSG apresentaram maiores valores de pressão arterial e a suplementação com L-arg não alterou esses parâmetros. No entanto, a suplementação reduziu a pressão arterial de ratos CTR, sem provocar alterações na frequência cardíaca; 3) com relação a variabilidade da frequência cardíaca: ratos MSG apresentaram aumento da modulação simpática e a suplementação com L-arg promoveu redução desse componente. Nos animais controle a L-arg atuou de forma inversa promovendo aumento da modulação simpática. Com relação à modulação parassimpática os ratos MSG apresentaram menor atividade e após a suplementação com L-arg ocorreu aumento deste componente. Nos ratos CTR houve redução do componente HF após a suplementação com L-arg. A razão LF/HF nos ratos MSG mostrou-se aumentada e após a suplementação com L-arg houve redução deste parâmetro; 4) Na sensibilidade do barorreflexo espontâneo: a suplementação com L-arg promoveu aumento do gain up nos ratos MSG comparados ao CTR também suplementado; 5) Nas dosagens de nitrito no coração: a suplementação com L-arg promoveu aumento da concentração somente no grupo MSG em relação ao CTR L-arg; 6) No fígado: ratos MSG apresentaram aumento de nitrito e após a suplementação com L-arg houve aumento no grupo CTR em relação ao seu próprio controle; 7) No plasma: o grupo MSG após a suplementação com L-arg apresentou maior aumento nas concentrações de nitrito. Dessa forma, nosso trabalho mostrou que a suplementação com L-arginina foi

benéfica para os ratos MSG para redução de gordura e melhora dos aspectos autonômicos. No entanto, não trouxe benefícios para atenuar os parâmetros de pressão arterial.

Trabalhos na literatura mostram que ratos tratados com glutamato monossódico desenvolvem obesidade na vida adulta e apresentam acúmulo de tecido adiposo perigonadal e retroperitoneal, menor comprimento nasoanal e peso corporal, e aumento do índice de Lee (DA CUNHA et al., 2017; DA SILVA MATTOS et al., 2012; MATYSKOVÁ et al., 2008), o mesmo ocorrendo também em camundongos (LUCCHETTI et al., 2019; MIRANDA et al., 2013) Esses achados também foram observados no presente estudo.

O NO é amplamente conhecido pelos seus efeitos como um modulador endógeno do tônus vascular e na função endotelial e a L-arg é o único substrato para sua formação. O aumento na pressão arterial, aumenta o estresse de cisalhamento endotelial e promove aumento da liberação de NO nos vasos promovendo vasodilatação. Estudos mostram que diminuição de eNOS está ligado intimamente com o desenvolvimento de hipertensão, hipertensão induzida pela obesidade e em obesos normotensos (RAJAPAKSE; HEAD; KAYE, 2016) bem como é relatado aumento da iNOS no tecido adiposo branco contribuindo para a resistência à insulina, dislipidemias e aumento do risco cardiovascular (KAPUR et al., 2000). Além disso, existem estudos mostrando que o transportador da L-arg (CAT1) quando diminuído provoca redução na biodisponibilidade de NO e contribui para a hipertensão na obesidade e seu aumento promove redução da hipertensão (RAJAPAKSE et al., 2014).

O aminoácido L-arg tem sido utilizado como suplemento alimentar pelo fato de ser o precursor da síntese de NO nos sistemas orgânicos (MIRMIRAN et al., 2016;

SIASOS et al., 2007). O NO regula a atividade das células musculares lisas vasculares possibilitando maior vasodilatação na sua presença ou vasoconstrição quando presente em menor quantidade sendo um dos mecanismos que contribui para o desenvolvimento e manutenção do quadro de hipertensão arterial (GOKCE, 2004).

Déficits na produção ou biodisponibilidade de NO estão relacionados com doenças endócrino-metabólicas e cardiovasculares e a suplementação de L-arg tem se mostrado eficaz no controle da diabetes mellitus (LUCOTTI et al., 2006; PIATTI et al., 2001), doença arterial coronariana (LUCOTTI et al., 2009) e da hipertensão arterial (PALLOSHI et al., 2004) em humanos e em melhora do metabolismo de lipídio, absorção de glicose e hipertensão em animais (ARAUJO et al., 2017; DE CASTRO BARBOSA et al., 2013).

Os efeitos benéficos associados à suplementação com L-arg estão relacionados com a melhora da função endotelial, aumento da síntese de NO vascular, redução da atividade da endotelina I e angiotensina II, redução do estresse oxidativo e melhora na sensibilidade à insulina (GOKCE, 2004). Ainda há trabalhos que mostram o papel do NO como neuromodulador inibitório e excitatório (HORN et al., 1994), influenciando na atividade muscular (BALON; NADLER, 1994; SILVEIRA et al., 2003) e no metabolismo lipídico (FRÜHBECK; GÓMEZ-AMBROSI, 2001; RIBIERE et al., 1996).

Nosso trabalho não mostrou redução da massa corpórea nos ratos suplementados com L-arg, no entanto, mostrou uma redução no acúmulo de ambos os tecidos adiposo após a suplementação com L-arg nos ratos MSG. Este resultado pode ser devido ao aumento da lipólise e inibição da lipogênese pela modulação da expressão e função de enzimas-chaves envolvidas na resposta de antioxidantes e no metabolismo de lipídios nos animais que receberam a suplementação com L-arg

(JOBGEN et al., 2009b). Trabalhos da literatura corroboram com nossos achados mostrando que ratos Zucker (modelo experimental genético de obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2) após 4 semanas de suplementação com L-arg reduziram a adiposidade (MCKNIGHT et al., 2010; WU et al., 2007). Após 10 semanas de suplementação com L-arg ratos Zucker apresentaram redução de tecido adiposo epididimal (perigonadal) e retroperitoneal em relação ao CTR (FU, 2005). A suplementação com L-arg também promoveu redução do tecido adiposo branco e aumento do tecido marrom em ratos obesos por dieta hiperlipídica (JOBGEN et al., 2009a)

Em nosso estudo não foi observado redução nas tecido adiposo dos ratos CTR após a suplementação com L-arg. Dados de Chiyoda e colaboradores (CHIYODA et al., 2009) mostram que após a suplementação com L-arg 3 vezes na semana por 4 semanas não mostrou diferenças estatísticas no valor do peso corporal, e Rajapakse e colaboradores (2014) também não observaram alterações no peso corporal de camundongos obesos (RAJAPAKSE et al., 2014). Outros dados na literatura mostram que a suplementação com L-arg atua na inibição da somatostatina que é conhecida por inibir a secreção de GH (COLLIER; CASEY; KANALEY, 2005; KANALEY, 2008). No entanto, a suplementação com L-arg não alterou o comprimento nasoanal de nenhum dos grupos, resultados que são corroborados com os dados de Chiyoda e colaboradores (2009) que também não observaram alterações no comprimento nasoanal após suplementação com L-arg (CHIYODA et al., 2009). Dessa forma, a L-arg melhorando a disponibilidade de NO em ratos CTR não promoveu efeito de aumentar a taxa metabólica dos adipócitos de forma significativa pelo fato destes não possuírem grande quantidade de adipócitos em comparação ao MSG.

Nosso estudo mostrou que a suplementação com L-arg promoveu um menor valor da PAM basal em ratos CTR e não apresentou diferenças estatísticas para o grupo MSG. Ambos os grupos não apresentaram diferenças na FC após a suplementação com L-arg. Estes resultados corroboram com os dados da literatura pois evidencia o efeito vasodilatador do NO nos vasos levando a redução da PAM no grupo CTR. Podemos fazer um paralelo com estudo em humanos mostrando que a infusão de L-arginina promove efeito hipotensor em normotensos sem promover alterações na FC (MEHTA; STEWART; LEVY, 1996). Outro estudo conclui que em humanos normotensos a disponibilidade do substrato para produção de NO é uma etapa limitante para promover o relaxamento vascular dependente do endotélio, no entanto, em indivíduos hipertensos o aumento da disponibilidade de substrato não altera a vasodilatação sugerindo que na hipertensão a resposta vascular não está relacionada com a redução da disponibilidade de substrato para a produção de NO (PANZA et al., 1993).

Em um trabalho do nosso grupo foi mostrado que inibindo a via cNOS com L-NAME ocorre um aumento da PAM em ratos CTR porém sem alterações nos ratos MSG e sem diferenças estatísticas na FC de ambos os grupos. Além disso, esse estudo mostrou que a expressão de eNOS na aorta de ratos MSG estava diminuída bem como a produção do superóxido aumentada o que favorece a diminuição da disponibilidade de NO e aumento de ERO. Os autores concluíram que essas alterações sejam devido ao desacoplamento da eNOS (DA CUNHA et al., 2014). Outro trabalho mostrou que a quantidade de NO estava reduzida promovendo diminuição do relaxamento vascular e aumento na produção de ERO mas a expressão da eNOS estava aumentada e o problema estava na habilidade da enzima em produzir NO (LOBATO et al., 2011). Dessa forma, é possível que a não alteração na pressão

arterial após suplementação com L-arg nos ratos MSG hipertensos, possa ser devido a um problema com a enzima eNOS e não por deficiência de substrato.

Comparando esses resultados de Cunha e colaboradores (2014) com os nossos dados utilizando o mesmo modelo animal, reforça a ideia que em animais com obesidade a expressão ou produção da enzima eNOS pode estar diminuída e que essa redução da eNOS não pode ser revertida com a suplementação com L-arg, pois mesmo suplementando não houve queda da PAM no grupo MSG. Podemos também considerar que esses ratos possuem ERO aumentado já que em diversos trabalhos tem sido relatado essa alteração tanto no modelo de obesidade MSG (DA CUNHA et al., 2014, 2017; LUCCHETTI et al., 2019) como em outros modelos de obesidade (MACIEJCZYK et al., 2018) e hipertensão (OLIVEIRA-SALES et al., 2008).

O aumento da atividade simpática é um mecanismo bastante conhecido por fazer parte da fisiopatologia da hipertensão (SOUZA et al., 2008). O balanço simpátovagal é um importante índice para a análise da função autonômica e a VFC é uma forma quantitativa de avaliar a modulação do SNA em condições fisiológicas ou patológicas, funcionando como um preditor de saúde cardiovascular. Quanto maior for a variabilidade, melhor adaptação autonômica e quanto menor a variabilidade há maiores chances de desenvolvimento de doenças metabólicas e cardiovasculares (PAL et al., 2009; VANDERLEI et al., 2009).

Nossos resultados mostram que apesar de não ter alterações na FC, a VFC nos ratos CTR suplementados com L-arg parece ter um efeito compensatório pela queda da PAM pois aumentou o componente LF e reduziu o HF no IP. Nos ratos MSG a suplementação com L-arg se mostrou benéfica reduzindo o componente LF e aumentando o HF no intervalo de pulso. Nossos resultados reforçam dados prévios do nosso laboratório que mostram que ratos MSG apresentam aumento da modulação

simpática no IP e estas alterações podem estar envolvidas com a redução da expressão da eNOS, aumento da atividade da iNOS sistêmica e no coração e aumento do estresse oxidativo sistêmico (DA CUNHA et al., 2011, 2014, 2017). Além disso, trabalho de nosso laboratório (DA SILVA MATTOS et al., 2012) mostrou que ratos MSG apresentam aumento da atividade simpática renal. No entanto, maiores estudos devem ser realizados para avaliar se aumentar a dose de L-arg pode ter algum impacto também na PAM ou se ela pode ser usada como uma ferramenta de prevenção para as DCV quando os primeiros sinais aparecem nas alterações da VFC.

A análise do barroreflexo espontâneo mostrou aumento no ganho up, que está relacionado com a resposta bradicárdica ao aumento da PA, após a suplementação com L-arg do grupo MSG em relação ao CTR L-arg, mostrando que a L-arg difere na resposta entre CTR e MSG mostrando melhor resposta bradicárdica nos ratos com obesidade. Konrad e colaboradores (KONRAD et al., 2012) mostraram que ratos MSG apresentam alterações barorreflexas com diminuição do reflexo bradicárdico que está associado com os efeitos vagais sobre o coração e se a responsividade do nodo sinusal está diminuída para a modulação parassimpática, a VFC também está diminuída. Corroborando com esse artigo, nosso dado do ganho barorreflexo pode estar relacionado com a melhora da modulação simpática e parassimpática no IP dos ratos MSG L-arg.

Nas análises das dosagens de nitrito nos órgãos, o coração apresentou diferenças somente após a suplementação com L-arg entre CTR e MSG estando aumentada nos ratos MSG. Apesar de ter resultados mostrando aumento da iNOS no tecido cardíaco (DA CUNHA et al., 2017), nosso estudo não mostrou essa diferença e quando fornecemos mais substrato houve aumento de nitrito, porém não podemos sugerir que seja proveniente da iNOS pois não realizamos imuno-histoquímica no

tecido. No fígado foi observado aumento na concentração de nitrito nos ratos MSG água em comparação ao CTR água mostrando que possa ser devido ao desenvolvimento de esteatose hepática já observada no modelo MSG (COELHO et al., 2019; DENTIN et al., 2006; LUCCHETTI et al., 2019) sugerindo um possível aumento pela iNOS e a suplementação com L-arg aumentou a concentração somente no CTR em relação ao CTR água, mostrando que possivelmente o MSG L-arg por já produzir mais NO, adicionar mais substrato não aumentou o limiar de produção tendo efeito de aumento só no CTR L-arg. Foi observado também aumento da concentração de nitrito no plasma de ratos MSG L-arg em comparação ao MSG água. Estudos mostram que em humanos (MIRMIRAN et al., 2016; RAJAPAKSE; HEAD; KAYE, 2016) e em animais (RAJAPAKSE et al., 2014) com obesidade ou com hipertensão induzida pela obesidade a biodisponibilidade de NO e o transportador de L-arg estão diminuídos. Portanto, mesmo sem apresentar redução de nitrito antes da suplementação em relação ao CTR água, podemos sugerir que a L-arg foi eficaz em melhorar as concentrações de nitrito nos ratos MSG que impactou diretamente na redução de tecido adiposo e melhora na variabilidade cardíaca.

Dessa forma, concluímos que ratos suplementados com L-arg obtiveram redução dos tecidos adiposo e juntamente com maior disponibilidade de nitrito possibilitou melhora no perfil autonômico aumentando a resposta parassimpática e reduzindo a simpática.

**ESTUDO 2. AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDATIVO DA ÁREA ROSTROVENTROLATERAL DO BULBO (RVLM) EM RATOS CONTROLE E OBESOS E OS EFEITOS DO TRATAMENTO COM VITAMINA C.**

## **7. MATERIAIS E MÉTODOS**

Neste estudo foi seguido o mesmo protocolo do item 4.1 e 4.2 do estudo 1.

### **7.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS**

#### Avaliação funcional:

Os ratos para microinjeção central foram divididos em grupos de forma aleatória como CTR salina, CTR L-glu e CTR vit C; MSG salina, MSG L-glu e MSG vit C, totalizando 6 grupos.

#### Avaliação molecular:

Os grupos experimentais para a avaliação do perfil oxidativo foram separados em CTR e MSG, totalizando 2 grupos.

Para avaliar o efeito da vitamina C no perfil oxidativo da RVLM os grupos foram definidos como: CTR água, CTR vit C; MSG água, MSG vit C, totalizando 4 grupos. Os mesmos ratos foram utilizados para dosagem de NO nos órgãos: coração, rim, fígado, aorta e, também no plasma.

### **7.2 TRATAMENTO COM VITAMINA C**

Os ratos receberam um tratamento com vitamina C na concentração de 50 mg/kg (redoxon®) ou veículo (água de torneira) por gavagem durante 21 dias (a partir do 69º dia de vida) sendo administrado uma vez ao dia (ELDIN et al., 1992).

### **7.3 CIRURGIAS**

#### **7.3.1 Cateterização da artéria e veia femoral**

A cirurgia foi realizada aos 88 dias de vida dos ratos e a metodologia é a mesma descrita do estudo 1 (item 4.5) com a adição da cateterização da veia femoral, para caso o rato necessite de administração de anestésico durante a execução do protocolo experimental (em alguns animais o procedimento de microinjeção pode induzir o comportamento de “rolamento em barril”. Quando o animal desenvolve esse comportamento ele é anestesiado e eutanasiado, sendo retirado do grupo experimental).

### **7.3.2 Implante de cânulas-guia direcionadas à RVLM**

Em seguida aos implantes dos cateteres femorais, foi realizada a cirurgia de implante das cânulas-guia. Foi realizado o complemento de anestésico quando necessário via venosa. Os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica de acordo com a técnica utilizada anteriormente (MARTINS-PINGE; BARALDI-PASSY; LOPES, 1997). As cânulas-guia foram implantadas e fixadas com resina acrílica em direção à área RVLM, utilizando como referência a sutura lâmbda (coordenadas: AP= -3,0; L= 1,8 mm) (PAXINOS; WATSON, 2007). Após esta cirurgia, os animais receberam dose profilática única de poli antibiótico veterinário (30.000 UI/kg, v.im.) e de Paracetamol (100mg/kg, v.o) e voltaram ao biotério para recuperação da cirurgia por 2 dias para o registro cardiovascular na ausência de anestesia seguido do protocolo experimental.

### **7.4 REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA**

Após 48 horas de recuperação das cirurgias, os ratos foram registrados no período basal de acordo com o tópico 4.6 do estudo 1. Neste estudo foi acoplado à cânula da veia uma seringa contendo anestésico (cetamina e xylasina nas doses já relatadas no protocolo 4.4 do estudo 1) para, se no momento das microinjeções

ocorrer o comportamento de “rolamento em barril”, ser administrado no rato. Em seguida iniciaram-se os protocolos específicos de microinjeção central (Protocolo de estudo funcional).

## **7.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

Os protocolos experimentais foram realizados nos animais CTR e MSG.

### **7.5.1 Protocolo de estudo funcional**

Após o registro basal foi retirado os oclusores das cânulas guia, esperou-se a estabilidade do registro e foi inserido na RVLM a agulha gengival (30G, curta) conectada com uma cânula de polietileno (P10) acoplada a seringa Hamilton (10µl) contendo a droga a ser administrada. Esperou-se novamente a estabilização do registro e foi microinjetado a droga na área RVLM.

#### ➤ Salina estéril na área RVLM

Foi realizada a microinjeção de salina estéril (100nl) (MARTINS-PINGE; BARALDI-PASSY; LOPES, 1997) unilateralmente à RVLM em ratos CTR e MSG.

#### ➤ L-glutamato na área RVLM

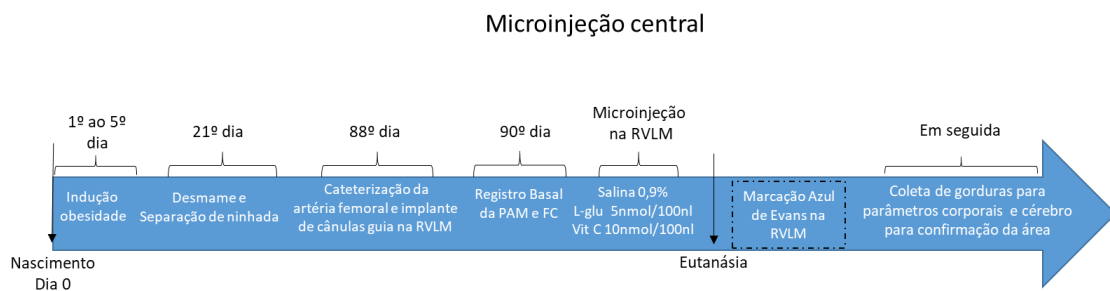
Foi realizada a microinjeção de L-glutamato (L-Glu) (5nmol/100nl) (MARTINS-PINGE; BARALDI-PASSY; LOPES, 1997) unilateralmente à RVLM em ratos CTR e MSG.

#### ➤ Vitamina C na área RVLM

Foi realizada a microinjeção de vitamina C (vit C) (10 nmol/100nl) (OLIVEIRA-SALES et al., 2008) unilateralmente à RVLM em ratos CTR e MSG.

Para este procedimento, foi avaliado o pico de resposta pressora e de frequência cardíaca de cada droga administrada. Após o término do protocolo, foi realizada a punção cardíaca para coleta de sangue. Os ratos foram eutanasiados com sobredose de anestésico e realizado a medida nasoanal, seguida da pesagem das tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal para fazer a caracterização da obesidade.

A figura 8 representa o delineamento experimental das microinjeções na RVLM.

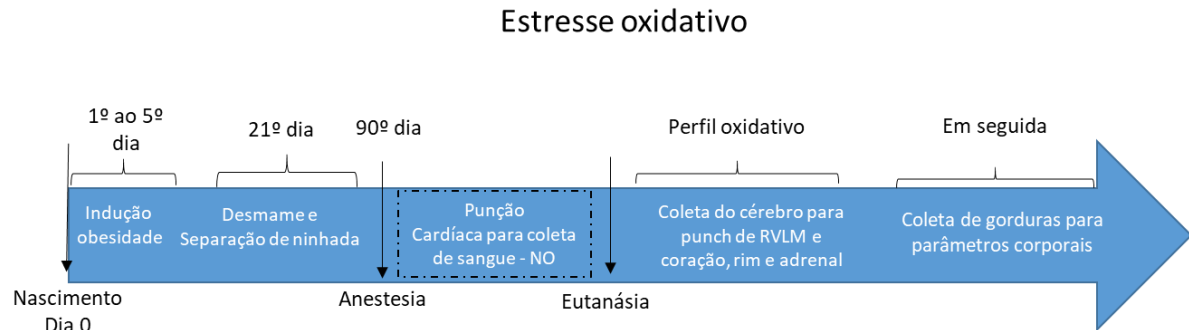


**Figura 8. Esquema delineamento experimental de microinjeção de drogas na RVLM em ratos CTR e MSG.** Ratos receberam injeções subcutâneas de glutamato monossódico para indução da obesidade ou veículo do 1º ao 5º dia pós natal. Aos 21 dias foi realizado o desmame e com 88 dias foi realizado a cateterização da artéria e veia femoral e o implante de cânulas guia direcionadas para a área rostroventrolateral do bulbo (RVLM). Aos 90 dias a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram registradas seguidos do protocolo de microinjeção de salina, L-glutamato ou vitamina C. Após isso foi realizado a eutanásia com sobredose de anestésico, marcação do sitio de microinjeção com corante azul de Evans e pesagem de gordura retroperitoneal e perigonadal para compor os parâmetros de obesidade. Fonte: Fernanda N. C. Lopes, 2021.

### 7.5.2 Protocolo de análise molecular

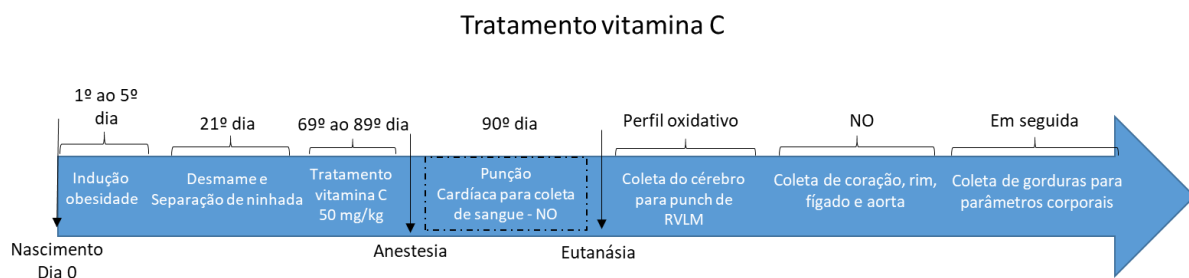
**Perfil oxidativo:** Aos 90 dias de vida os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e cloridrato de xylasina (6,7 mg/kg) para realizar punção cardíaca para obtenção do plasma. Em seguida foram eutanasiados com sobredose de anestésico (cetamina e xylasina) e coletado cérebro, coração, rim e adrenal para fazer o perfil oxidativo de ratos CTR e MSG. Foi realizada a coleta e pesagem do tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal para compor os parâmetros de

obesidade. A figura 9 apresenta o delineamento experimental de avaliação do perfil oxidativo.



**Figura 9. Esquema do protocolo de estresse oxidativo em ratos CTR e MSG.** Ratos receberam injeções subcutâneas de glutamato monossódico para indução da obesidade ou veículo do 1º ao 5º dia pós natal. Aos 21 dias foi realizado o desmame e aos 90 dias os ratos foram anestesiados para realizar a coleta de sangue por punção cardíaca. Em seguida foram eutanasiados com sobredose de anestésico e coletado cérebro, coração, rim e adrenal para realizar o perfil oxidativo e pesado tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal para compor os parâmetros de obesidade. Fonte: Fernanda N. C. Lopes, 2021.

**Tratamento com vitamina C:** Aos 69 dias de vida ratos CTR e MSG iniciaram o tratamento crônico com vitamina C ou veículo por 21 dias consecutivos e, aos 90 dias foram anestesiados e o sangue coletado por punção cardíaca. Os ratos foram eutanasiados e o cérebro coletado para perfil oxidativo; e coração, rim, fígado e aorta para dosagem de nitrito. A figura 10 apresenta o delineamento experimental.



**Figura 10. Esquema do protocolo de tratamento com vitamina C em ratos CTR e MSG.** Ratos receberam injeções subcutâneas de glutamato monossódico para indução da obesidade ou veículo do 1º ao 5º dia pós natal. Aos 21 dias foi realizado o desmame e a partir do 69º dia receberam tratamento ou não com vitamina C por gavagem durante 21 dias. Aos 90 dias os ratos foram

anestesiados para realizar a coleta de sangue por punção cardíaca. Em seguida foram eutanasiados com sobredose de anestésico e coletado cérebro para o perfil oxidativo e coração, rim, fígado e aorta para realizar dosagem de NO. Para compor os parâmetros de obesidade foram pesados as tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal. Fonte: Fernanda N. C. Lopes, 2021.

## **7.6 MARCAÇÃO E HISTOLOGIA DO CÉREBRO**

Após o protocolo de microinjeção ter acabado e os animais tendo sido submetidos à eutanásia com sobredose de anestésico, os sítios de microinjeção foram marcados com solução de Azul de Evans 2% com volume de 100 nanolitros (nl). Em seguida, os cérebros foram retirados e colocados em formalina 10% para posterior realização dos cortes histológicos. Foram realizados cortes de 40 µm em criostato de congelamento (Leica), posicionados e fixados em lâmina de vidro e corados pela técnica de vermelho neutro 1%. Os cortes foram analisados com microscópio ótico para confirmar a região de microinjeção. Para o estudo foram considerados somente os ratos que tiveram a região RVLM marcadas.

## **7.7 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO**

**Coleta de “punchs” da área RVLM.** Para avaliar os parâmetros antioxidante e pró-oxidante ratos CTR e MSG que não foram submetidos ao implante de cânulas guia na RVLM foram anestesiados e realizado a perfusão do cérebro com KCL 1,15% através da perfusão transcardíaca usando uma bomba peristáltica na velocidade de 10 mL/min com 200 ml de KCL gelado. Após o término, os cérebros foram retirados e armazenados no freezer -80 até completar o período da coleta. Após a coleta foi realizado punchs bilaterais da área RVLM que foram obtidos através de cortes seccionais do bulbo (obex rostral, 1000-1200 µm de espessura) de acordo com (RAQUEL et al., 2016) e armazenados novamente no freezer -80 para posterior análise dos ensaios oxidativos.

**Ensaio oxidativos avaliados.** As análises realizadas neste trabalho foram a determinação da capacidade antioxidante total através da habilidade da molécula antioxidante de reduzir o cátion ABTS, habilidade do tecido reduzir o íon ferro foi avaliada pelo ensaio FRAP. O ensaio NBT avaliou a produção do ânion superóxido e o ensaio T-BARS avaliou a peroxidação lipídica que foi determinada pelos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. A seguir está descrita de forma sintetizada a metodologia utilizada em cada um desses ensaios.

**Ensaio de FRAP.** Capacidade antioxidante de reduzir o íon ferro nas amostras. As amostras foram homogeneizadas em solução de KCl e centrifugadas (4°C por 10 minutos). A alíquota dos sobrenadantes foram reativados com reagente FRAP, composto por cloreto férrico (20mM) e 2,4,6 – tripiridil-s-diazina (TPTZ, 10mM) em tampão acetato (0,3 mM, pH 3,6). Depois de 15 minutos incubando foi lido em absorvância de 595nm. A habilidade de reduzir ânion ferro do tecido foi relacionada com a curva padrão Trolox (0,4 – 400 nmol) (FATTORI et al., 2017b). Os resultados foram expressos em Trolox (nmol) por miligrama de proteína.

**Ensaio de ABTS.** A propriedade de consumir o radical livre das amostras foi determinado pelo método ABTS (radical 2,2'azinobis- (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)). As amostras foram homogeneizadas em solução de KCl (1,15%) e centrifugadas (0,2g, 4°C por 10 minutos). O sobrenadante foi retirado e diluído na solução ABTS (7mM em persulfato de potássio) e a absorvância foi medida em (730nm) depois de 15 minutos de incubação de acordo com [7]. Os resultados foram expressos em Trolox (nmol) por miligrama de proteína.

**Ensaio de NBT.** Avaliação da capacidade de redução do ânio superóxido pelo reagent NBT (nitroblue tetrazolium dye). As amostras foram homogeneizadas em solução de KCL (1,15%). O sobrenadante foi retirado e incubado com 100 µl de NBT

em placas com 96 poços por 1h a 37°C. O sobrenadante foi retirado e reduzido a uma solução de formazan pela adição de 120 µl de 2 M KOH and 140 µl de DMSO. A redução do NBT foi lida pela absorbância de 600nm de acordo com (FATTORI et al., 2015). Os dados foram expressos em OD/mg de tecido.

**Ensaio de T-BARS.** A peroxidação lipídica nas amostras foi determinada pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS mensuradas pela quantidade de malondialdeído (MDA) presente nas amostras. Para esse ensaio foi adicionado ácido tricloroacético (10%) no homogenato para precipitar as proteínas seguido por centrifugação (1,000xg, 4°C, 3minutos). O sobrenadante livre de proteínas foi separado e adicionado ácido tiobarbitúrico (0,67%). A mistura foi mantida em banho maria (15 minutos, 100°C). Malondialdeído (MDA), produto intermediário da peroxidação lipídica, foi determinado pelas absorbâncias 535 e 572 nm pela leitora de microplacas como descrito previamente (FATTORI et al., 2017a).

## **7.8 DOSAGEM DE NITRITO (ÓXIDO NÍTRICO)**

A dosagem de NO pela concentração indireta de nitrito foi baseada no mesmo protocolo do estudo 1 (seção 4.8). Os órgãos analisados para este protocolo foram coração, rim, fígado, aorta e plasma.

## **7.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

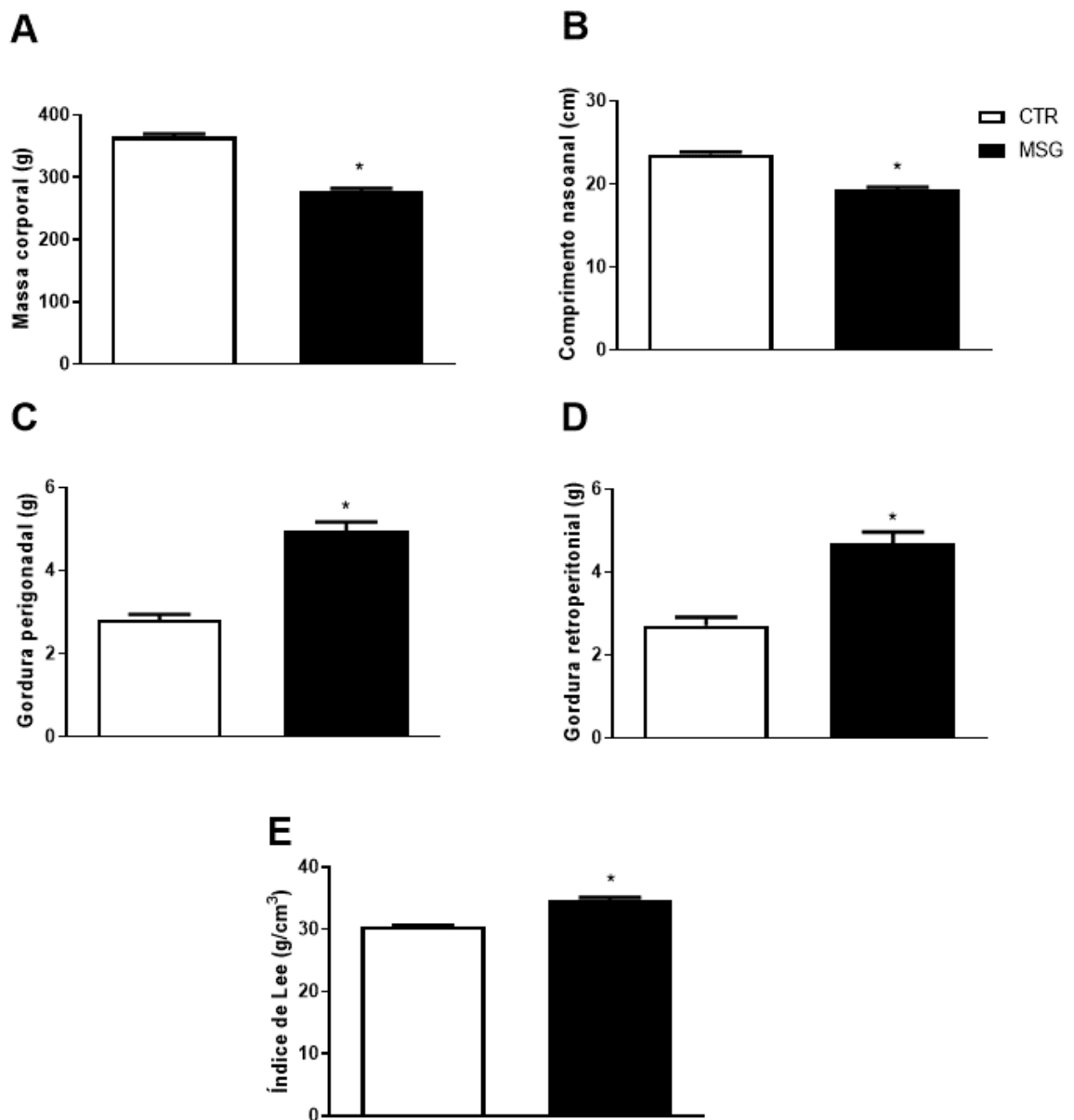
A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa estatístico Prisma® (GraphPad®, San Diego, CA). Foi realizada análise exploratória de cada variável avaliando a normalidade da distribuição com teste Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade através do teste de Bartlett. Para dados que apresentaram variância normal e homogeneidade nas variâncias foi utilizado análise paramétrica com ANOVA One-Way com pós teste de Tukey para comparação entre 4 grupos e

teste t-student para comparações entre dois grupos e os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para dados não paramétricos foi utilizado teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn e os dados foram expressos como mediana  $\pm$  25% e 75% interquartis. Em todas as análises o nível de significância considerado foi  $p < 0,05$ .

## 8. RESULTADOS

### 8.1 CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE INDUZIDA POR GLUTAMATO MONOSSÓDICO – MSG

O tratamento subcutâneo com glutamato monossódico realizado do 1º ao 5º dia de vida dos filhotes de ratos induziu o desenvolvimento da obesidade neuroendócrina na fase adulta (90 dias) observado no grupo MSG, o qual apresentou menor massa corporal (CTR=365±5 vs MSG=277±5\*, figura 11A), menor comprimento nasoanal (CTR=23±0,2 vs MSG=13±0,3\*) (Figura 11B), aumento do tecido adiposo retroperitoneal (CTR=3±0,2 vs MSG=5±0,3\*, figura 11C) e perigonadal (CTR=3±0,1 vs MSG=5±0,2\*, figura 11D) e aumento do índice de Lee (CTR=30±0,3 vs MSG=35±0,4\*, figura 11E) quando comparado ao grupo CTR. Todos os dados foram expressos como média ± EPM, \*p<0,05, CTR n=16, MSG n=15.

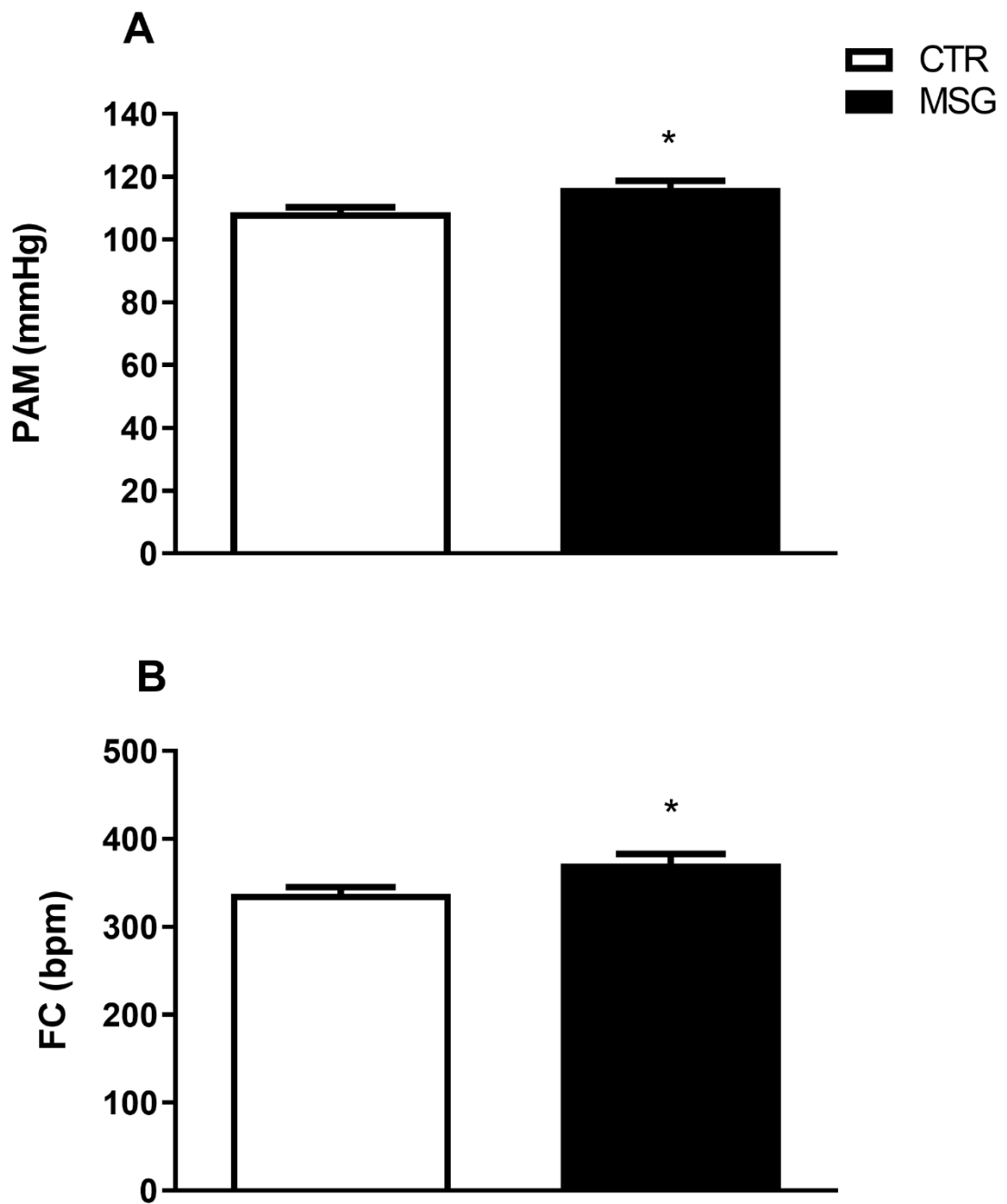


**Figura 11. Caracterização da obesidade.** Caracterização da obesidade aos 90 dias induzida pela administração subcutânea de glutamato monossódico ou veículo do 1<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> dia de vida em ratos Wistar. (A) Massa corporal; (B) Comprimento nasoanal; (C) Gordura perigonadal; (D) Gordura retroperitoneal; (E) Índice de Lee. Valores expressos como média ± EPM; Teste t-student, \*p<0,05. CTR n=16; MSG n=15. Fonte: Fernanda N. C. Lopes, 2021.

## 8.2 PARÂMETROS BASAIS DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA E FREQUÊNCIA CARDÍACA

Aos 90 dias de vida, os ratos foram submetidos ao protocolo experimental. Na avaliação dos parâmetros cardiovasculares as medidas da pressão arterial média e frequência cardíaca foram obtidas de forma direta através de um cateter inserido na artéria femoral. O período basal utilizado para análise foi entre 20-30 minutos de registro estável.

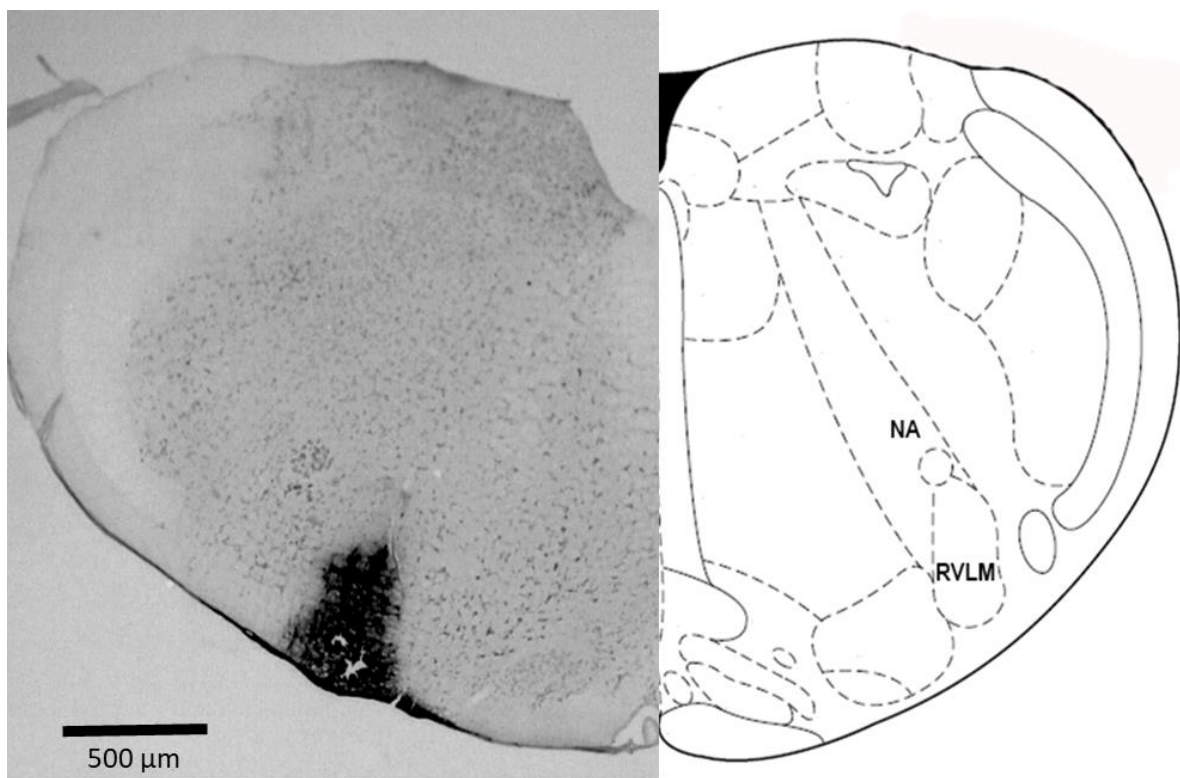
Animais MSG quando comparados ao CTR apresentaram aumento da PAM (CTR=108±2 vs MSG=116±2 mmHg\*, figura 12A) e aumento da FC (CTR=338±7 vs MSG=372±11 bpm\*, figura 12B). Dados expressos como média ± EPM, \* p< 0,05, CTR n=16, MSG n=15.



**Figura 12. Parâmetros cardiovasculares.** Valores basais da pressão arterial média (A) e frequência cardíaca (B) de ratos controle (CTR) e com obesidade (MSG). Valores expressos como média ± EPM; Teste t-student, \* $p < 0,05$ . CTR,  $n=16$ ; MSG,  $n=15$ . Fonte: Fernanda N. C. Lopes, 2021.

### 8.3 CONFIRMAÇÃO DA REGIÃO DE MICROINJEÇÃO NA ÁREA RVLM

Para nos certificar que as substâncias foram administradas na área RVLM foram realizados cortes histológicos de 40  $\mu\text{m}$  da região do bulbo para montagem de lâminas e coloração (vermelho neutro) para a confirmação da microinjeção na área RVLM como mostrado na figura 13, com a marcação unilateral do sítio de microinjeção. Os animais que não apresentaram este padrão de marcação foram desconsiderados deste estudo.



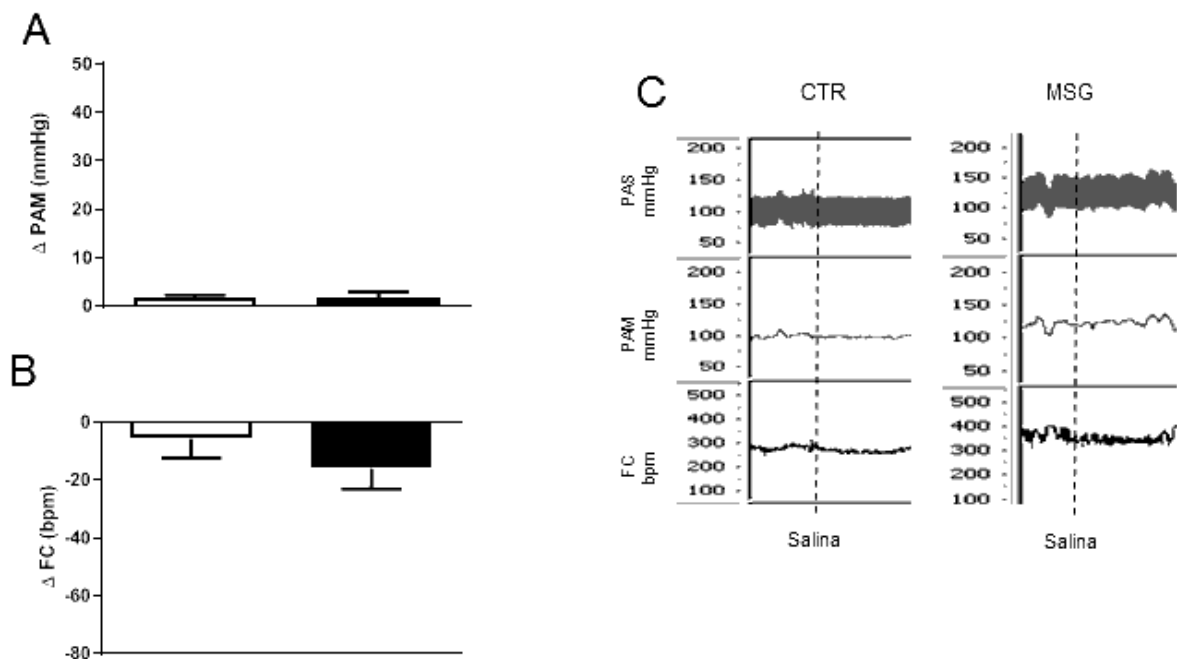
**Figura 13. Corte histológico e diagrama da região bulbar.** Corte realizado por micrótomo com cortes histológicos de 40 $\mu\text{m}$ . A foto foi obtida através de uma lupa com aumento de 1,5x (500 $\mu\text{m}$ ). A parte esquerda representa a marcação do sítio central de microinjeção na RVLM. Na parte direita representa a localização no atlas de Paxinos. NA: Núcleo Ambíguo; RVLM: área rostroventrolateral do bulbo. Fonte: Fernanda N. C. Lopes, 2021.

## 8.4 MICROINJEÇÃO UNILATERAL DE SALINA, L-GLUTAMATO E VITAMINA C NA ÁREA RVLM

Após o período basal de registro dos parâmetros cardiovasculares os animais foram submetidos à microinjeção unilateral diretamente na área RVLM das respectivas substâncias:

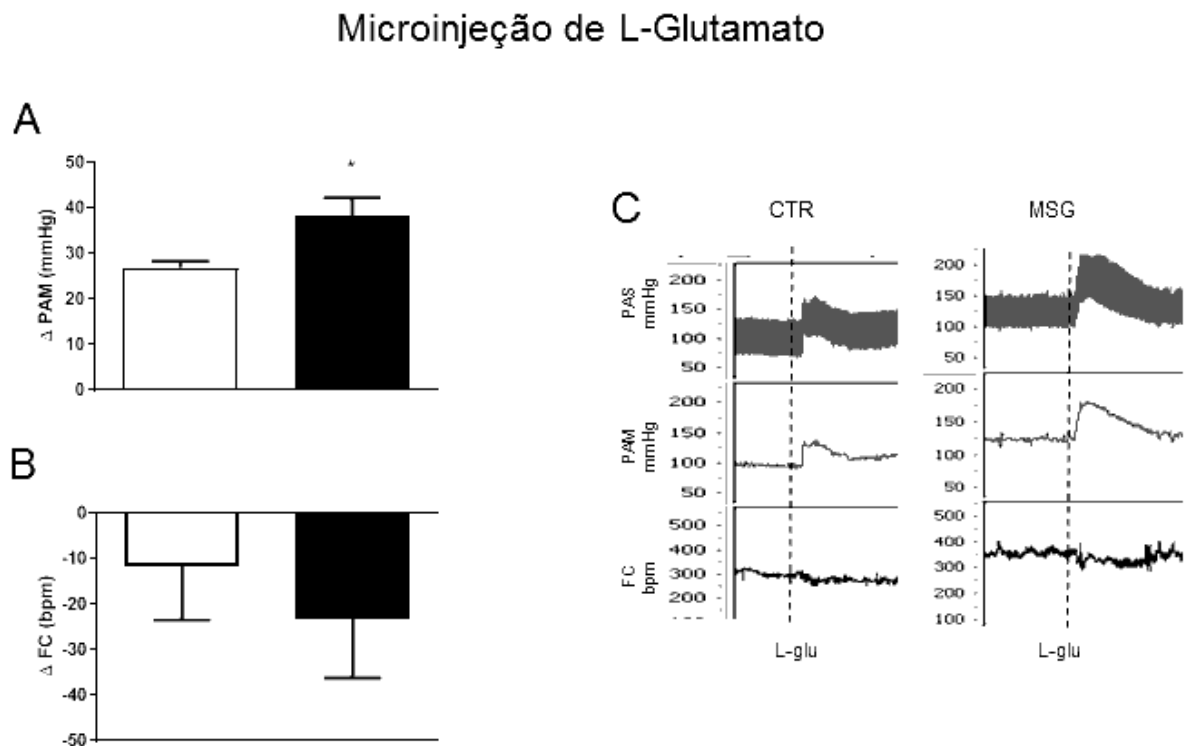
**Salina estéril.** Após a microinjeção do veículo (salina) não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos ( $2 \pm 0.5$  vs  $2 \pm 1$ , figura 14A) assim como na frequência cardíaca (CTR= $-6 \pm 7$  vs MSG= $-16 \pm 7$ , figura 14B). Teste t-Student. Valores expressos como média  $\pm$  EPM, \* $p < 0,05$ . CTR n=5, MSG n=5.

### Microinjeção de Salina



**Figura 14. Efeitos da microinjeção de salina na área RVLM.** Microinjeção unilateral de salina estéril (100nl) e seu efeito sobre a variação da (A) pressão arterial média (PAM), (B) frequência cardíaca (FC) e (C) traçado típico de ratos controle (CTR) e com obesidade (MSG) não anestesiados. Teste t-Student. Valores expressos como média  $\pm$  EPM, \* $p < 0,05$ . CTR n=5, MSG n=5. Fonte: Fernanda N. C. Lopes, 2021.

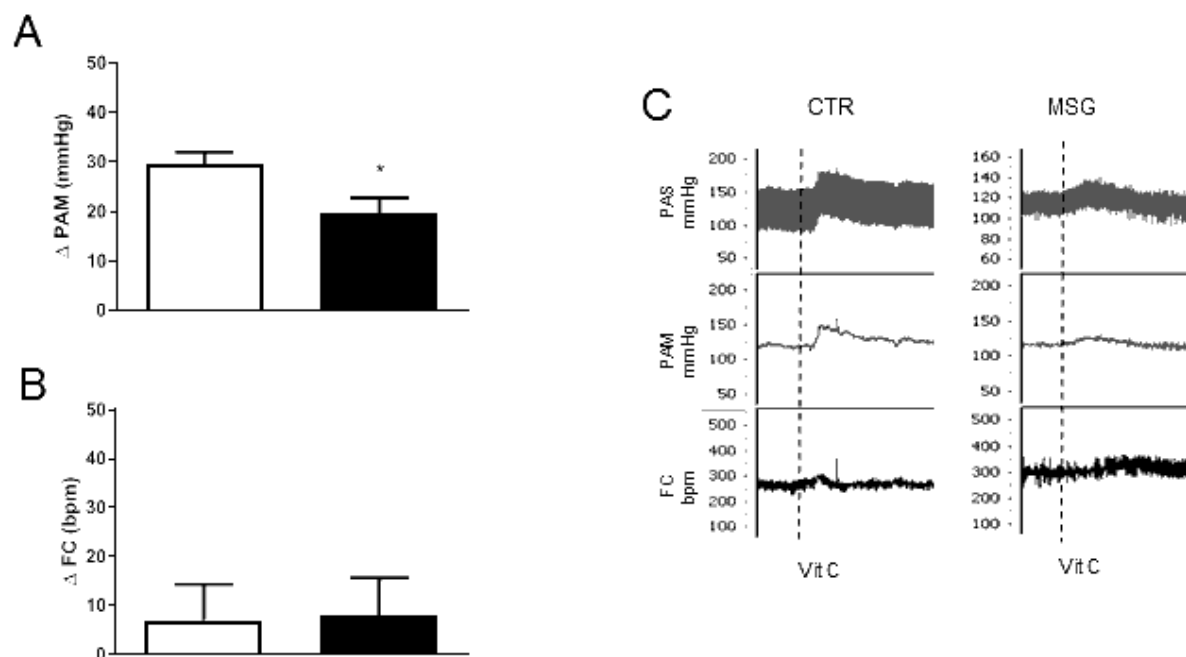
**L-glutamato.** Após a microinjeção de L-glutamato foi observado um aumento na variação da PAM de ambos os grupos, porém observamos um maior aumento no grupo MSG (CTR=27±1 vs MSG=38±4\*, figura 15A). Ao mesmo tempo foi observado queda na frequência cardíaca em ambos os grupos mas sem diferenças significantes entre eles (CTR=-11±12 vs MSG=-23±13, figura 15B). Teste t student. Valores expressos como média ± EPM,  $p < 0,05$ . CTR n=5, MSG n=5.



**Figura 15. Efeitos da microinjeção de L-glutamato na área RVLM.** Microinjeção unilateral de L-glutamato (5nmol/100nl) e seu efeito na variação da (A) pressão arterial média (PAM), (B) frequência cardíaca (FC) e (C) traçado típico de ratos controle (CTR) e com obesidade (MSG) não anestesiados. Teste t-Student. Valores expressos como média ± EPM,  $*p < 0,05$ . CTR n=5, MSG n=5. Fonte: Fernanda N. C. Lopes, 2021.

**Vitamina C.** Após microinjeção de vitamina C (figura 7A) houve aumento na variação da pressão arterial média de ambos os grupos, porém no grupo MSG houve uma menor variação em relação ao CTR (CTR=29±2 vs. MSG=20±3\*, figura 16A). Na frequência cardíaca não houve diferenças estatísticas (CTR=7±7 vs MSG=8±8, figura 16B). Teste t-Student Valores expressos como média ± EPM,  $p < 0,05$ . CTR n=6, MSG n=5.

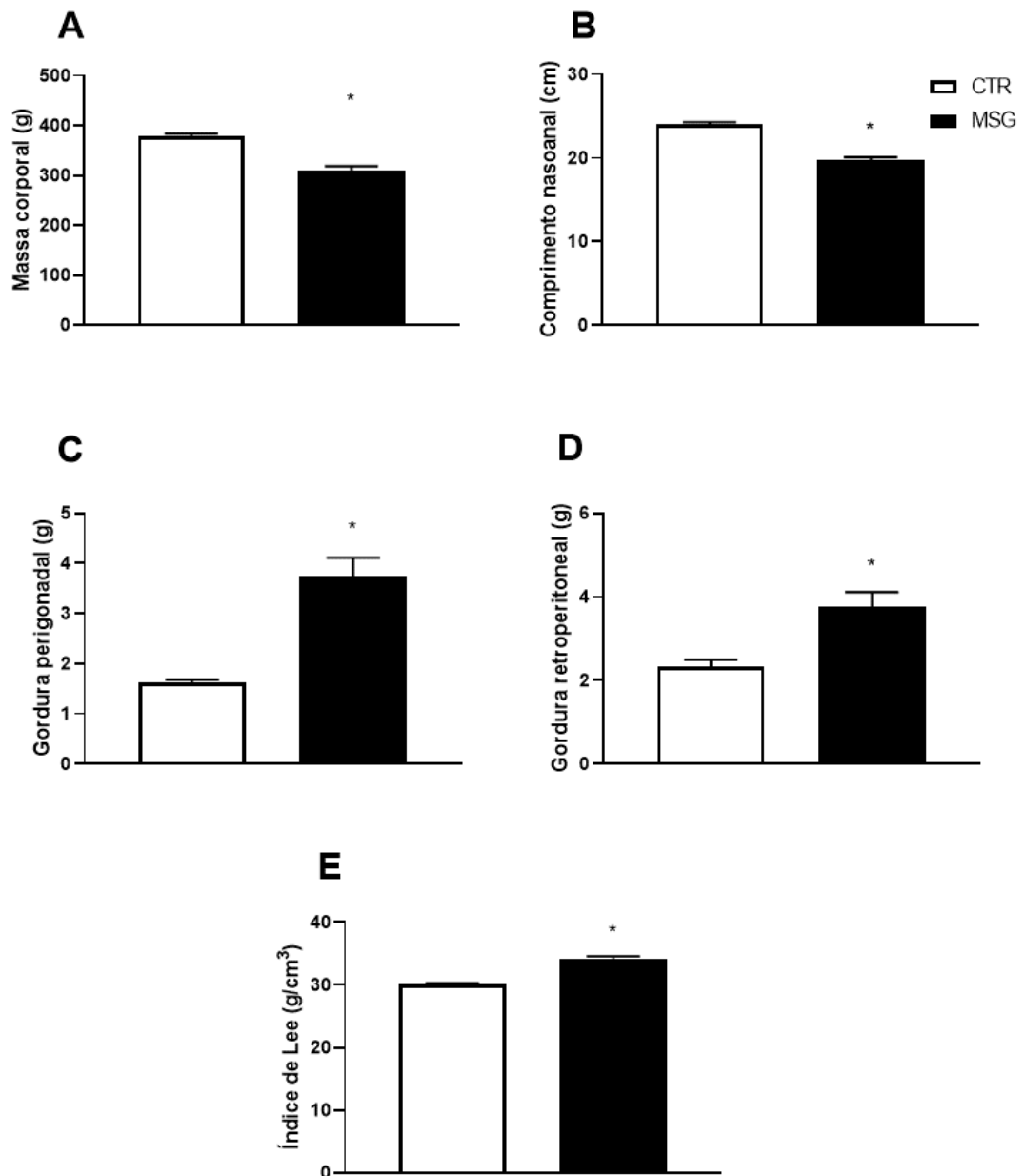
### Microinjeção de Vitamina C



**Figura 16. Efeitos da microinjeção de vitamina C na RVLM.** Microinjeção unilateral de vitamina C (10nmol/100nl) na área RVLM e seus efeitos sobre os parâmetros da (A) pressão arterial média (PAM), (B) frequência cardíaca (FC) e (C) traçado típico dos ratos controle (CTR) e com obesidade (MSG) não anestesiados. Teste t-Student. Valores expressos como média ± EPM,  $*p < 0,05$ . CTR n=6, MSG n=5. Fonte: Fernanda N. C. Lopes, 2021.

## 8.5 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

O tratamento subcutâneo com glutamato monossódico realizado do 1<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> dia de vida dos filhotes de ratos induziu o desenvolvimento da obesidade neuroendócrina na fase adulta (90 dias) observado no grupo MSG apresentando menor massa corporal (CTR=378±5 vs MSG=309±10\*, figura 17A) e comprimento nasoanal (CTR=24±0,2 vs MSG=20±0,4\*, figura 17B) quando comparado ao CTR. Ratos MSG também apresentaram aumento das tecido adiposo retroperitoneal (CTR=2±0,2 vs MSG=4±0,4\*, figura 17C) e perigonadal (CTR=2±0,1 vs MSG=4±0,4\*, figura 17D) e aumento do índice de Lee (CTR=30±0,2 vs MSG=34±0,3\*, figura 17E). \*p<0,05, teste t Student e os valores estão expressos como média ± EPM. CTR n=9, MSG n=10.

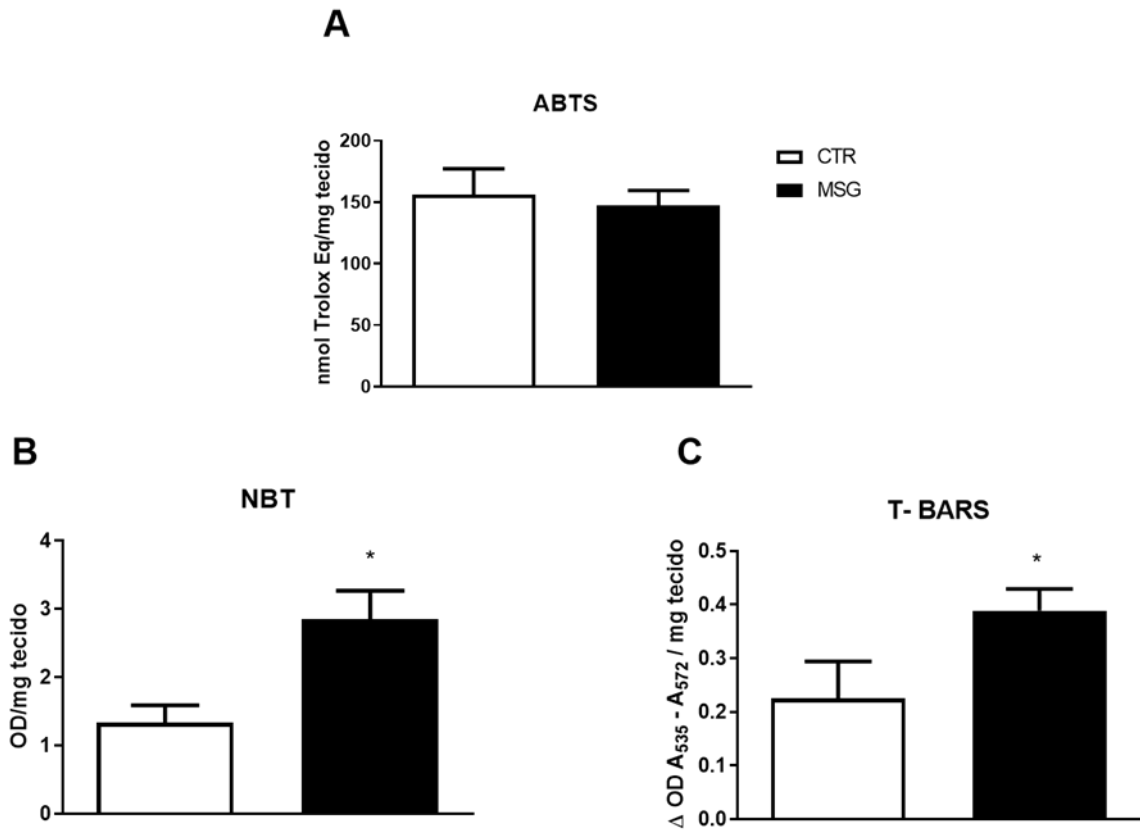


**Figura 17. Caracterização da obesidade induzida por glutamato monossódico – MSG.** Caracterização da obesidade aos 90 dias induzida pela administração subcutânea de glutamato monossódico ou veículo do 1º ao 5º dia de vida em ratos Wistar. Massa corporal (A); Comprimento nasoanal (B); Gordura perigonadal (C); Gordura retroperitoneal (D); Índice de Lee (E). \* $p < 0,05$ , Teste t-Student e os valores são expressos como média  $\pm$  EPM, CTR  $n=9$ , MSG  $n=10$ . Fonte: Fernanda N. C. Lopes, 2021.

A avaliação da capacidade oxidante e antioxidante foi realizada através dos ensaios de Abts que avalia a capacidade antioxidante total através da neutralização do radical cátion ABTS<sup>+</sup> e Frap que tem a capacidade de reduzir o íon ferro, Nbt que avalia a produção do ânion superóxido e T-bars que avalia a peroxidação lipídica pela concentração de tiobarbitúricos. Dessa forma, os dois primeiros testes representam a capacidade antioxidante e os dois últimos a capacidade pró-oxidante na área RVLM e nos órgãos coração, rim e adrenal.

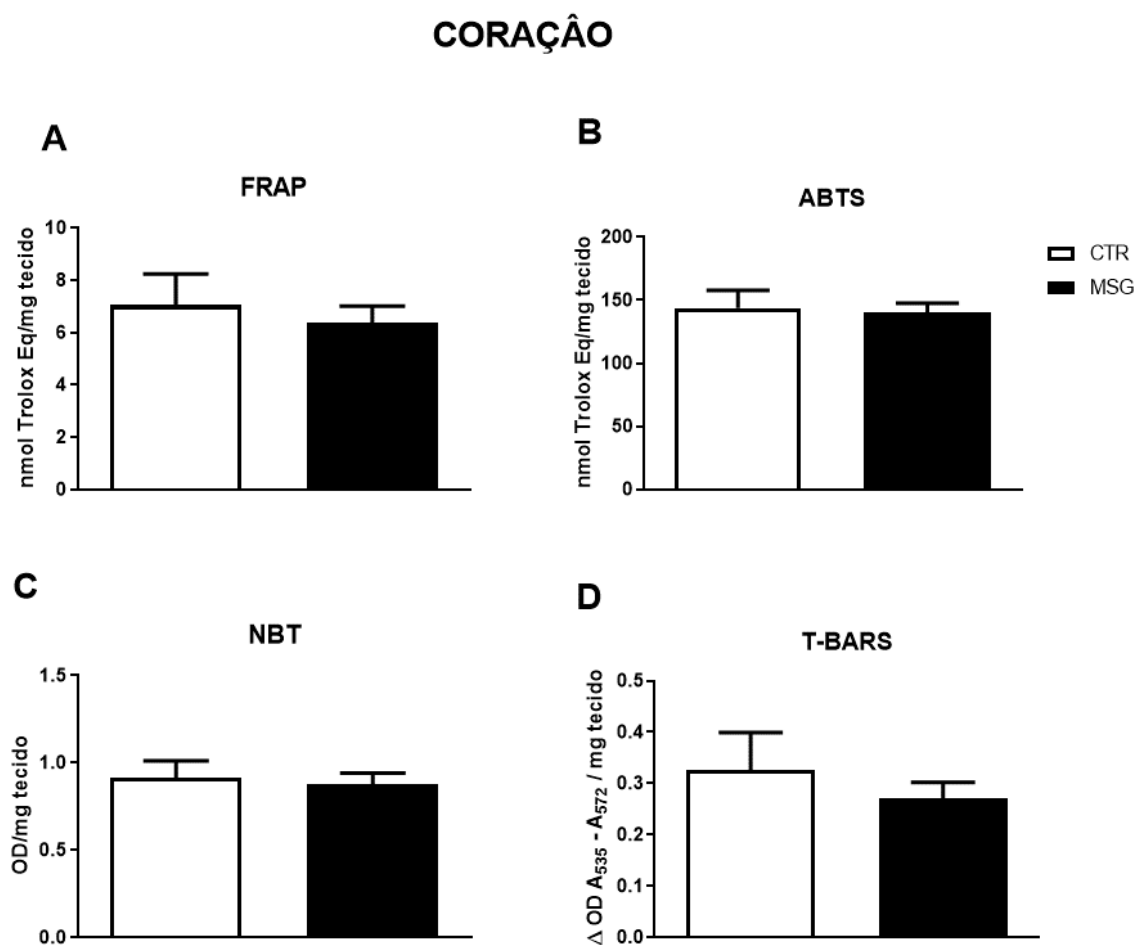
**RVLM.** Na avaliação do tecido cerebral da área RVLM o ensaio Abts não mostrou diferenças estatísticas (figura 11A) porém os ensaios pró-oxidantes: Nbt (CTR=1±0,2 vs MSG=3±0,4\*, figura 18B) e T-bars (CTR=0,2±0,07 vs MSG=0,4±0,04\*, figura 18C) no grupo MSG mostraram-se aumentados em comparação aos respectivos CTR. Teste t-Student. Valores expressos como média ± EPM, p<0,05, n=6-10 ratos por grupo.

# RVLM



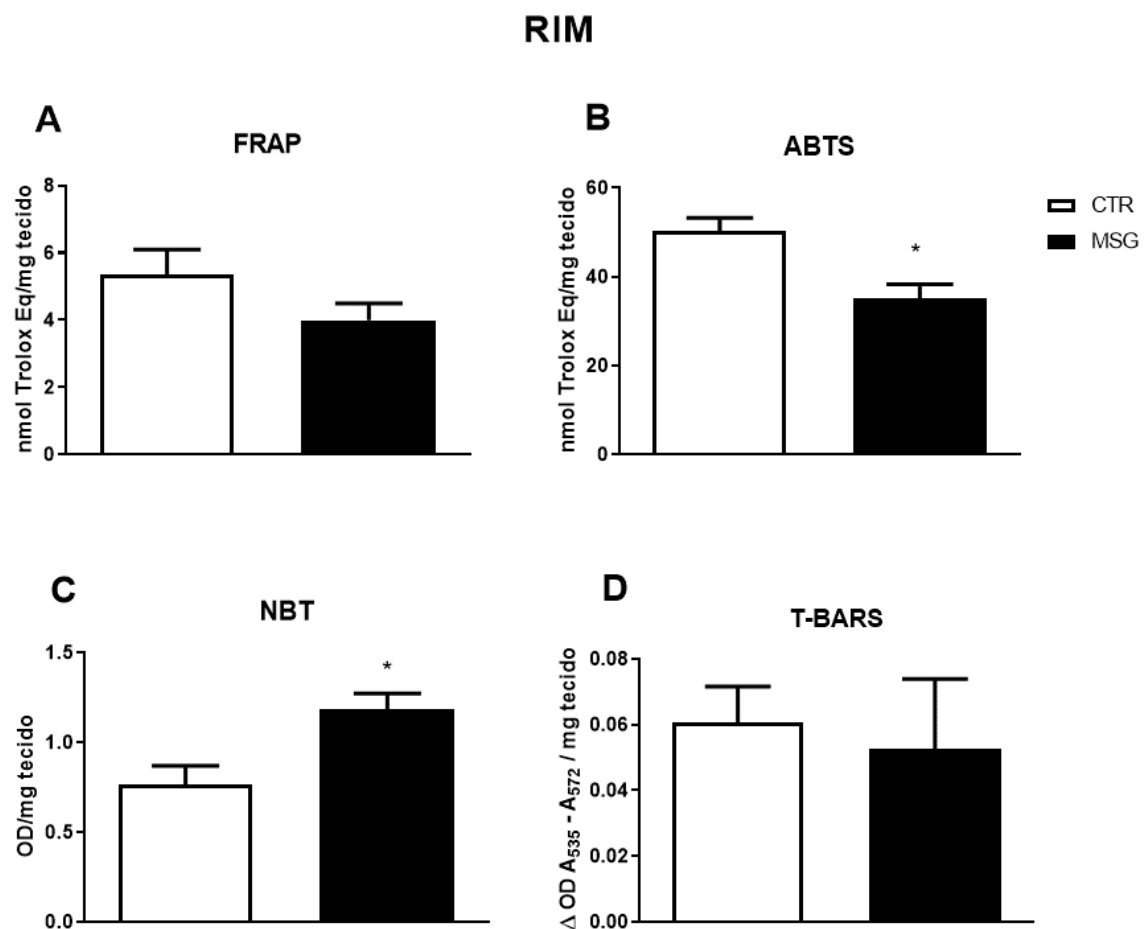
**Figura 18. Efeitos da obesidade no estresse oxidativo na área RVLM.** Parâmetro antioxidante expresso pela análise de (A) Abts e pró-oxidantes expressos pelos ensaios de (B) Nbt e (C) T-bars. Os ensaios foram realizados em ratos controle (CTR) e com obesidade (MSG). Teste t-Student. Valores expressos como média  $\pm$  EPM, \* $p < 0,05$ ,  $n = 6-10$  ratos por grupo. Fonte: Fernanda N. C. Lopes, 2021.

**Coração.** Para o tecido cardíaco foi avaliado os ensaios de Frap (CTR= $7 \pm 1$  vs MSG= $6 \pm 0,6$ , figura 19A), Abts (CTR= $144 \pm 14$  vs MSG= $140 \pm 8$ , figura 19B), Nbt (CTR= $0,9 \pm 0,1$  vs MSG= $0,9 \pm 0,06$ , figura 19C) e T-bars (CTR= $0,3 \pm 0,07$  vs MSG= $0,3 \pm 0,03$ , figura 19D). Nesse tecido não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos CTR e MSG. Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM, n=8-10 ratos por grupo.



**Figura 19. Efeitos da obesidade no estresse oxidativo no coração.** Parâmetros antioxidantes expressos pela análise de FRAP e ABTS e pró-oxidantes expressos pelos ensaios de NBT e T-BARS. Os ensaios foram realizados em ratos controle (CTR) e com obesidade (MSG). Teste t-Student. Valores expressos como média  $\pm$  EPM, n=8-10 ratos por grupo. Fonte: Fernanda N. C. Lopes, 2021.

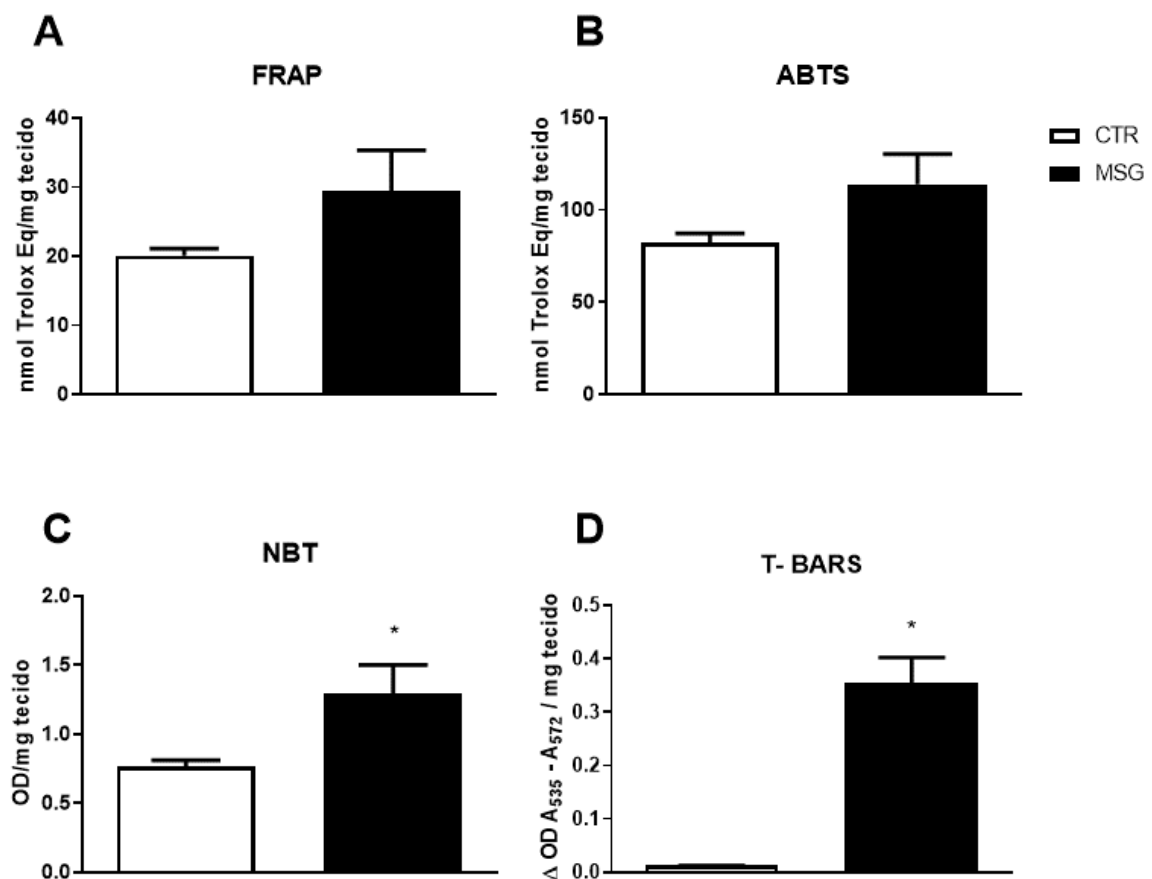
**Rim.** Neste tecido foi observado redução do Abts nos animais MSG (CTR=50±3 vs MSG=35±3\*, figura 20B) e aumento na produção do ânion superóxido – Nbt (CTR=0,8±0,1 vs MSG=1±0,09\*, figura 20C) em comparação ao grupo CTR. Não foram observadas diferenças estatísticas nos ensaios de FRAP (CTR=5±0,7 vs MSG=4±0,5, figura 20A) e T-bars (CTR=0,06±0,01 vs MSG=0,05±0,02, figura 20D). Os dados foram expressos como média ± EPM, \*p<0,05, n= 8-9 ratos por grupo.



**Figura 20. Efeitos da obesidade no estresse oxidativo no rim.** Parâmetros antioxidantes expressos pela análise de (A) FRAP e (B) ABTS e pró-oxidantes expressos pelos ensaios de (C) NBT e (D) T-BARS. Os ensaios foram realizados em ratos controle (CTR) e com obesidade (MSG). Teste t-Student. Valores expressos como média ± EPM, \*p<0,05. n= 9 ratos por grupo. Fonte: Fernanda N. C. Lopes, 2021.

**Glândula adrenal.** Neste tecido foi observado um aumento do NBT (CTR=0,7 ± 0,7-0,9 vs MSG=1±0,9-2\*, figura 21C) e do T-BARS (CTR=0,01±0,01-0,01 vs. MSG=0,4±0,3-0,5\*, figura 21D) no grupo MSG em relação aos seus CTR. Nos parâmetros de FRAP (CTR=19±18-27 vs MSG=24±17-44, figura 21A) e ABTS (CTR=78±720-97 vs MSG=103±86-135, figura 21B) não foi observado diferenças estatisticamente significantes em comparação ao grupo CTR. Os dados foram expressos como mediana ± 25% e 75% interquartis, \*p<0,05. n=6-10 ratos por grupo.

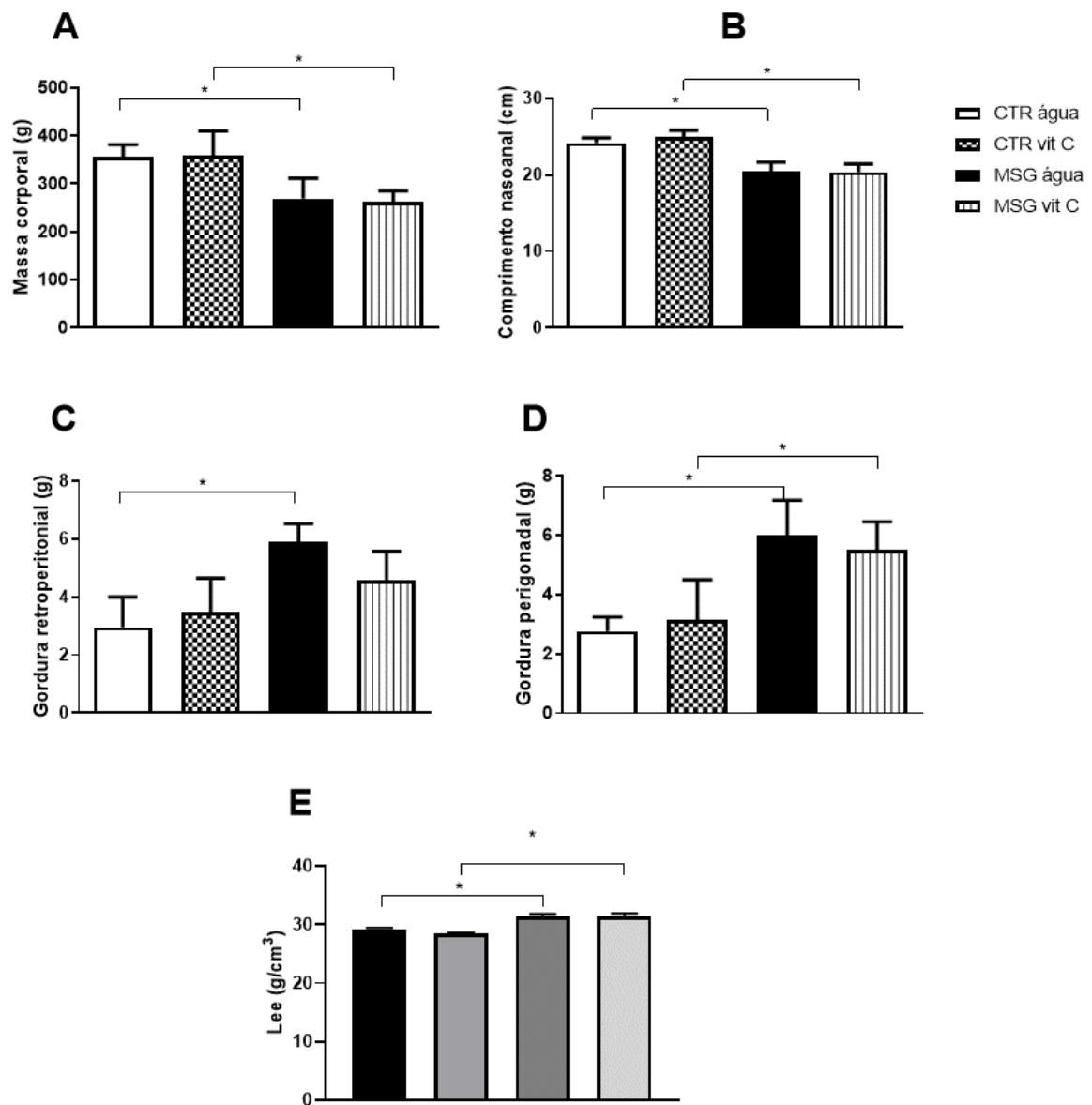
## ADRENAL



**Figura 21. Efeitos da obesidade no estresse oxidativo na glândula adrenal.** Parâmetros antioxidantes expressos pela análise de (A) Abts e (B) Frap e pró-oxidantes expressos pelos ensaios de (C) Nbt e (D) T-bars. Os ensaios foram realizados em ratos controle (CTR) e com obesidade (MSG). Teste Mann-Whitney. Valores expressos como mediana ± 25% e 75% interquartis, \*p<0,05. n=6-10 ratos por grupo. Fonte: Fernanda N. C. Lopes, 2021.

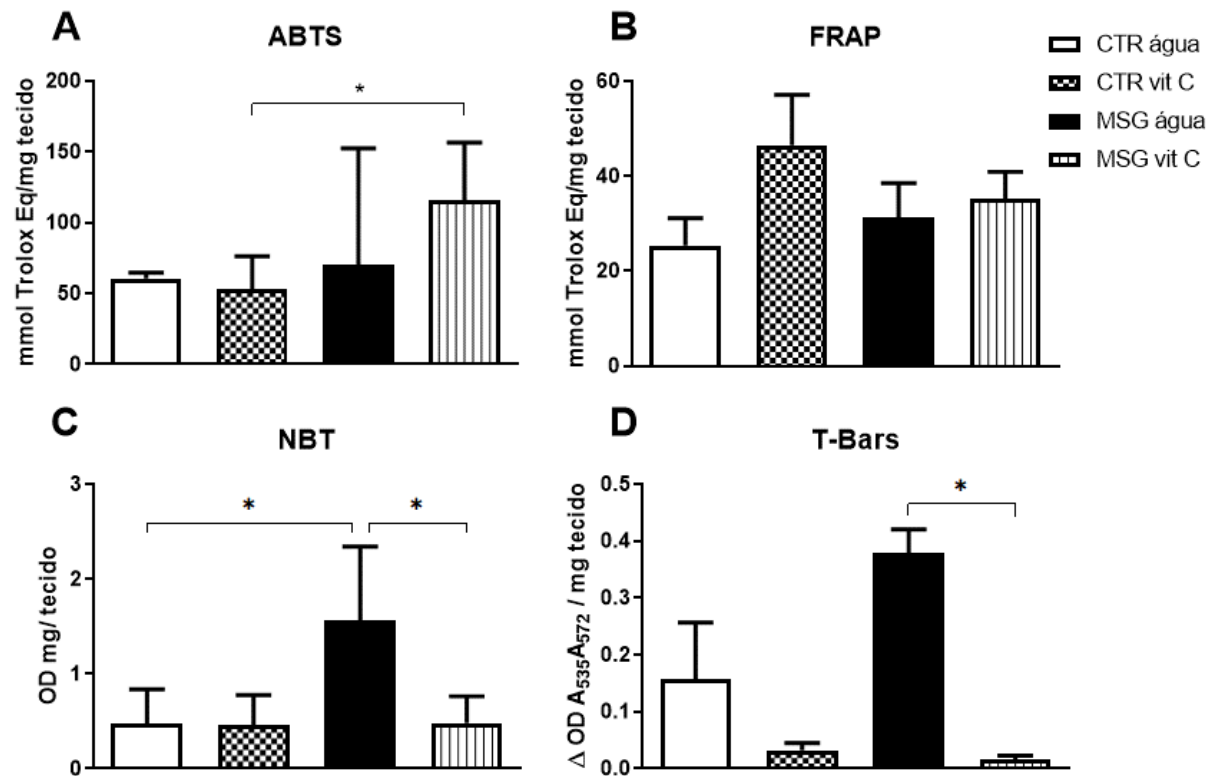
## 8.6 TRATAMENTO CRÔNICO COM VITAMINA C

O tratamento subcutâneo com glutamato monossódico realizado do 1º ao 5º dia de vida dos filhotes de ratos induziu o desenvolvimento da obesidade neuroendócrina na fase adulta (90 dias) observado no grupo MSG apresentando menor massa corporal (Ctr água=355±11 vs MSG água=269±19\*, figura 22A), e o tratamento crônico com vit C não modificou esses parâmetros (CTR Vit C=358±21 vs MSG Vit C=262±9\*, figura 22A) quando comparado aos respectivos grupos CTR. Os ratos MSG apresentaram menor comprimento nasoanal (CTR=24±0,3 vs MSG=20±0,5\*, figura 22B) e a vit C não alterou esses parâmetros (CTR Vit C=25±0,4 vs MSG Vit C=20±0,4\*, figura 22B) quando comparado ao CTR. Ratos MSG também apresentaram aumento das tecido adiposo retroperitoneal (CTR água=3±0,4 vs MSG água=6±0,3\*, figura 22C) no entanto após tratamento com vit C a diferença estatística desaparece quando comparado ao grupo CTR (CTR vit C=3±0,5 vs MSG vit C=4±0,4 figura 22C) e maior gordura perigonadal (CTR água=3±0,2 vs MSG água=6±0,5\*, figura 22D) e o tratamento não promoveu mudanças neste padrão (CTR vit C=3±0,6 vs MSG vit C=5±0,4\*, figura 22D) em relação ao CTR. Houve aumento do índice de Lee (CTR água=29±0,2 vs MSG água=31±0,4\*, figura 22E) e com o tratamento esse padrão se manteve (CTR vit C=28±0,4 vs MSG vit C=31±0,5\*, figura 22E) em relação aos CTR. \*p<0,05, Anova one way e pós teste de Tukey; Os valores são expressos como média ± EPM, n=5-7 ratos por grupo.



**Figura 22. Caracterização da obesidade induzida por glutamato monossódico – MSG.** Caracterização da obesidade aos 90 dias induzida pela administração subcutânea de glutamato monossódico ou veículo do 1º ao 5º dia de vida em ratos Wistar. (A) Massa corporal; (B) Comprimento nasoanal; (C) Gordura perigonadal; (D) Gordura retroperitoneal; (E) Índice de Lee. \*p<0,05, Anova one way e os valores são expressos como média ± EPM, n= 5-7 ratos por grupo. Fonte: Fernanda N. C. Lopes, 2021.

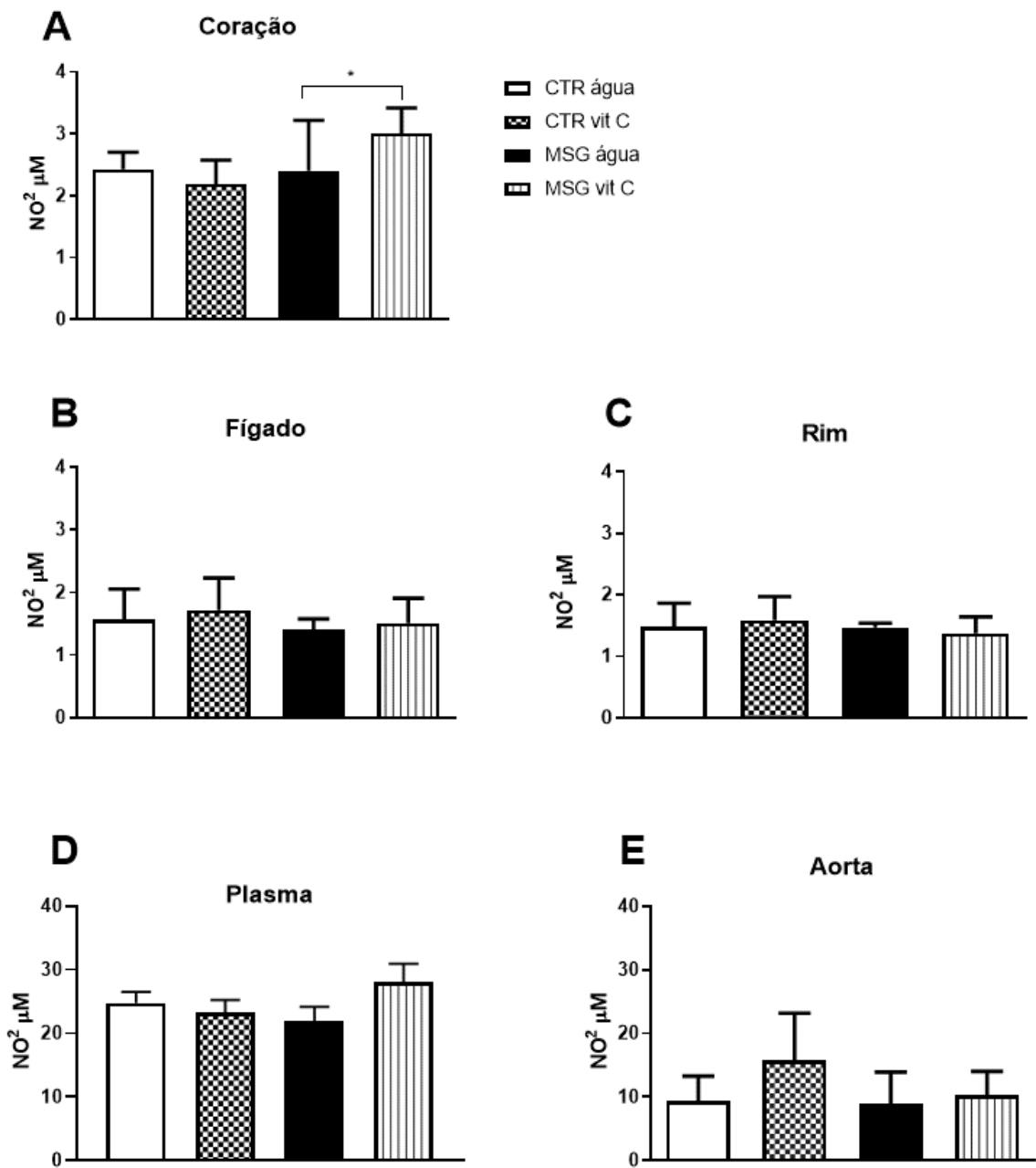
**RVLM.** Na avaliação do tecido cerebral da área RVLM após o tratamento crônico com vit C o grupo MSG apresentou maior aumento nas dosagens de Abts em relação ao CTR vit C (CTR vit C=53±40-76 vs MSG vit C=116±100-157\*, figura 23A). O ensaio de Frap não mostrou diferenças estatísticas entre os grupos (figura 23B). Na dosagem de Nbt o grupo MSG água apresentou maiores valores em relação ao CTR água (CTR água=0,4±0,2 vs MSG água=1,6±0,3\*, figura 23C) e após o tratamento o grupo MSG vit C apresentou menor aumento em relação ao MSG água (MSG água=1,6±0,3 vs MSG vit C=0,5±0,1\*, figura 23C). Na avaliação do T-bars, o tratamento promoveu redução das concentrações no grupo MSG em comparação ao MSG água (MSG água=0,23±0,07 vs MSG vit C=0,39±0,04\*, figura 23D). Os dados foram expressos como média ± EPM para Nbt e Frap e mediana ± 25% e 75% interquartis para Abts e T-bars. P<0,05, n=5-7 ratos por grupo.



**Figura 23. Efeito do tratamento crônico com vitamina C na área RVLM.** Parâmetros antioxidantes expressos pela análise de Abts (A) e Frap (B) e pró-oxidantes expressos pelos ensaios de Nbt (C) e T-bars (D). Os ensaios foram realizados em ratos controle (CTR) e com obesidade (MSG) tratados ou não com vitamina C. Anova One Way seguido pelo pós teste de Tukey (figura B e C) e Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn (figura A e D). Valores expressos como média  $\pm$  EPM para Nbt e Frap e mediana  $\pm$  25% e 75% interquartis para Abts e T-bars, n=5-7 ratos por grupo. Fonte: Fernanda N. C. Lopes, 2021.

## 8.7 DOSAGEM DE NO - QUANTIFICAÇÃO DE NITRITO

A quantificação de nitrito após tratamento crônico com vitamina C em órgãos de ratos CTR e MSG mostrou que no coração, após o tratamento com vitamina C o grupo MSG apresentou maior aumento de nitrito em relação ao MSG água (MSG água=22±2 vs MSG Vit C=28±3\*, figura 24A). Sem diferenças estatísticas para o fígado (figura 24B), rim (figura 17C), plasma (figura 24D) e aorta (figura 24E) \* Os dados numéricos estão apresentados no apêndice 1, tabela 8.



**Figura 24. Efeitos do tratamento crônico com vitamina C nas concentrações de nitrito em órgãos de ratos controle (CTR) e com obesidade (MSG).** (A) coração, (B) fígado, (C) rim, (D) plasma e (E) aorta. Anova One Way seguido pós teste de Tukey, \* $p < 0,05$ ,  $n = 5-7$  ratos por grupo. Fonte: Fernanda N. C. Lopes, 2021.

## 9. DISCUSSÃO

No presente estudo avaliamos os efeitos da obesidade MSG em ratos adultos sobre o perfil oxidativo em órgãos, assim como os efeitos funcionais no controle cardiovascular pelo neurotransmissor glutamato e pela vitamina C, um antioxidante. Os principais resultados obtidos através deste estudo foram: 1) Ratos que receberam glutamato monossódico na fase neonatal desenvolveram obesidade indicada pelo aumento do índice de Lee e das tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal e após tratamento com vit C o grupo MSG apresentou menos gordura retroperitoneal; 2) Ratos obesos apresentaram maior aumento na resposta pressórica ao L-glutamato na área RVLM em relação ao CTR; 3) Ratos obesos apresentaram menor resposta pressora à microinjeção da vitamina C na RVLM em relação ao CTR; 4) Na dosagem do balanço oxidativo nos órgãos, foi observado aumento do estresse oxidativo na área RVLM, no rim e na adrenal, sem alterações observadas no coração; 5) O tratamento com vit C na área RVLM promoveu redução dos marcadores pró-oxidantes do grupo MSG vit C em relação ao MSG água além de melhorar a resposta antioxidante em relação ao CTR vit C; 6) Na dosagem de NO o tratamento com vit C promoveu aumento da concentração de nitrito no coração de ratos MSG vit C em relação ao MSG água. Dessa forma, a hipertensão desenvolvida pelos ratos MSG pode ser devido, em parte, pela maior ativação dos neurônios glutamatérgicos da RVLM, e essa resposta pode ser decorrente do fato da área apresentar maior estresse oxidativo, sendo este atenuado pelo tratamento agudo (local) e crônico com vitamina C.

O modelo experimental de obesidade foi comprovado pelo cálculo do índice de Lee e pelo aumento das tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal. Está bem consolidado na literatura que o modelo de obesidade induzida por glutamato apresenta parâmetros metabólicos alterados, pois o glutamato é um aminoácido

neuroexcitatório quando administrado em altas doses (HIRATA et al., 1997; KIZER; NEMEROFF; YOUNGBLOOD, 1977) e no período neonatal ele atravessa a barreira hematoencefálica que ainda não está completamente formada, lesando regiões hipotalâmicas, principalmente o núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) (OLNEY, 1969) que possui importante papel no controle do metabolismo. Com a lesão no ARC, ocorre baixa liberação do hormônio do crescimento levando ao baixo desenvolvimento corporal, acúmulo de gordura abdominal pela queda na taxa metabólica, atrofia da glândula pituitária, gônadas e nervo óptico além de desequilíbrio na sinalização de insulina e leptina (DAWSON et al., 1997; DOLNIKOFF et al., 2001; MACHO et al., 2000; MALETÍNSKÁ et al., 2006; PERELLO et al., 2009). Embora de origem diferente, muitas dessas alterações têm sido encontradas na síndrome metabólica (FINGERET; MARQUES-VIDAL; VOLLENWEIDER, 2018; GRUNDY et al., 2004; LI; LI; LIU, 2013).

Os ratos MSG apresentaram aumento da PAM basal e FC em relação aos animais CTR, dados que corroboram com estudos anteriores utilizando esse mesmo modelo (VOLTERA et al., 2008); ou aumento da PAM porém sem alterações na FC em ratos (DA CUNHA et al., 2014, 2017; KONRAD et al., 2012) e camundongos (LUCCHETTI et al., 2019). Ainda é desconhecido a origem da hipertensão desenvolvida por este modelo de obesidade, porém estudos mostram que ratos MSG possuem aumento da atividade simpática renal (DA SILVA MATTOS et al., 2012) balanço autonômico, sensibilidade barorreflexa alterada (KARLEN-AMARANTE et al., 2012; KONRAD et al., 2012), e aumento do estresse oxidativo plasmático e vascular (CUNHA et al., 2010; DA CUNHA et al., 2014). No entanto, nenhum estudo até o momento, utilizando esse modelo de obesidade avaliou as alterações na área RVLM, que é o local de saída central das projeções para o sistema simpático.

Além da obesidade, o modelo utilizado neste estudo também apresenta resistência à insulina e dislipidemias (DE MELLO et al., 2001; HIRATA et al., 1997), caracterizando o estado de síndrome metabólica. Em adição, tem sido relatado aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), contribuindo para a manutenção do estado crônico de baixo grau de inflamação (XU et al., 2017). Um dos mecanismos que podem iniciar o processo inflamatório é a produção de ERO ou ERN ou mesmo radicais livres que são moléculas que possuem um elétron desemparelhado na sua composição se tornando instável e muito reativas (NONHEBEL; WALTON, 1974; SIES, 2015).

A RVLM é uma área bulbar responsável pela regulação da atividade nervosa simpática e da pressão arterial. O L-glutamato é um neurotransmissor, entre outros, responsável pela excitabilidade dos neurônios dessa área. Quando realizada injeções de L-glutamato na RVLM observa-se um aumento da descarga neuronal contribuindo para o aumento da atividade simpática e da PA (GUYENET, 2006). Em animais anestesiados ou acordados, a administração de glutamato na RVLM sempre eleva a pressão arterial (HUBER; SCHREIHOFER, 2016; MARTINS-PINGE; BARALDI-PASSY; LOPES, 1997; RAQUEL et al., 2016).

A literatura mostra que uma das possibilidades do aumento da pressão arterial em animais com obesidade é pelo aumento da atividade simpática dos neurônios da área RVLM. Stocker e colaboradores (2007) foi o primeiro estudo a mostrar esta relação em ratos obesos hipertensos (STOCKER; MEADOR; ADAMS, 2007) seguido por outros autores que também evidenciaram aumento da atividade neuronal na RVLM em outros modelos experimentais de obesidade (HUBER; SCHREIHOFER, 2011), hipertensão renovascular (2K-1C) (OLIVEIRA-SALES et al., 2008, 2009) e em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (NISHIHARA et al., 2012).

O trabalho da Huber e colaboradores (2016) mostrou um aumento da resposta glutamatérgica na RVLM de ratos Zucker (com obesidade e hipertensão moderada) levando ao aumento da PAM e da atividade nervosa renal sem diferenças na FC. Os autores sugerem que o aumento do simpático não é consequência somente de alterações barorreflexas mas inclui aumento da ativação da RVLM pelo glutamato (HUBER; SCHREIHOFER, 2016).

No presente estudo foi observado que o grupo MSG apresentou maior resposta pressórica ao L-glu em comparação ao grupo CTR e sem diferenças estatísticas na FC. A partir desses resultados podemos sugerir um aumento da atividade simpática dos ratos MSG envolvendo a atividade dos neurônios glutamatérgicos da RVLM. Esse resultado pode ser devido ao fato da área RVLM apresentar maior estresse oxidativo, como comprovado posteriormente pelos resultados da quantificação de NBT e TBARS na RVLM que se mostraram aumentados em relação ao grupo CTR e estão em concordância com outros estudos realizados mostrando que ratos com obesidade e/ou com síndrome metabólica possuem aumento de estresse oxidativo em áreas centrais responsáveis pelo controle cardiovascular (LU et al., 2018; WU et al., 2014).

Trabalhos mostraram que a presença de estresse oxidativo na RVLM aumentou a ativação simpática, através da observação da queda na atividade nervosa simpática e pressão arterial quando administrado SOD (superóxido dismutase) na RVLM em porcos (ZANZINGER; CZACHURSKI, 2000), tempol, em ratas com pré eclampsia (YAN et al., 2017) e em ratos hipertensos renovascular (2K-1C) (OLIVEIRA-SALES et al., 2009). Além disso, foi demonstrado que o estresse oxidativo aumenta a resposta glutamatérgica e reduz a resposta gabaérgica em ratos espontaneamente hipertensos (NISHIHARA et al., 2012).

O estresse oxidativo tem sido implicado como sendo um mediador da hipertensão, sendo que a maioria dos estudos em indivíduos que têm pressão arterial mais baixa também têm maiores níveis de antioxidantes endógenos, como vitaminas E e C (KUWABARA et al., 2014). O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de ERO e antioxidantes. As ERO são produzidas naturalmente pela produção de energia mitocondrial, mas também por enzimas como NADPH oxidase e xantina oxidase, bem como interações com outros oxidantes (CHAN; CHAN, 2019). Na RVLM de ratos hipertensos SHR (CHAN et al., 2009; KOGA et al., 2008) as expressões gênicas e proteicas das subunidades da NADPH oxidase são reguladas positivamente, juntamente com a atividade enzimática aumentada de NADPH oxidase na RVLM de animais SHR (HIROOKA et al., 2010; KISHI et al., 2010; PETERSON; SHARMA; DAVISSON, 2006). Gene *knock down* das subunidades gp91phox, p22phox e p47phox da NADPH oxidase na RVLM (CHAN et al., 2009, 2010; HIROOKA, 2008b; NOZOE et al., 2008) enfraquece o fluxo vasomotor simpático e promove normotensão em ratos SHR. Estes resultados indicam que a hiperexcitação simpática na hipertensão neurogênica é atribuível à produção aumentada de ERO geradas pela NADPH oxidase pela ativação da angiotensina II na RVLM (CHAN; CHAN, 2019; HUBER; SCHREIHOFER, 2016). Por sua vez, estudos tem demonstrado que o aumento de angiotensina II parece ser responsável por aumentar a atividade da NADPH oxidase (LU et al., 2018; RECKELHOFF; ROMERO; YANES CARDOZO, 2019). Recentes estudos apontam que em animais hipertensos a angiotensina II aumentada agindo em seus receptores AT1 aumenta o estresse oxidativo nos neurônios glutamatérgicos da RVLM (JIANG et al., 2019). Dessa forma, embora não tenhamos dosado os níveis de angiotensina em nossos ratos, é possível

que ela esteja aumentada assim como foi observado no PVN de ratos obesos por dieta alta em tecido adiposo (LU et al., 2018).

Considerando que os ratos MSG apresentaram maior responsividade ao L-glutamato na RVLM e que este efeito poderia ser resultado do aumento do estresse oxidativo, foi realizado a microinjeção de vitamina C na mesma região para avaliar sua atividade em ratos CTR e MSG. A microinjeção de vit C em ratos CTR promoveu aumento na PAM e aumento na FC. Nos animais MSG foi observado um menor aumento na PAM sem diferenças na FC quando comparado aos animais CTR. Não há nenhum estudo até o presente momento que tenha realizado microinjeções de vit C na RVLM em ratos obesos não anestesiados. No entanto, Oliveira-Sales e colaboradores (2008) realizaram um estudo que mostra um efeito hipotensor da vit C na RVLM de animais hipertensos renovasculares porém sem efeito em ratos CTR (OLIVEIRA-SALES et al., 2008). Lu e colaboradores (2018) também realizaram a microinjeção de scavenger de superóxido no PVN de ratos com obesidade e observaram maior queda na PAM em relação ao CTR (LU et al., 2018).

Embora ainda não seja conhecida a razão para essas diferenças na alteração da PAM após a microinjeção de Vit C na RVLM, nosso estudo apresenta aspectos que se distinguem em relação a estes trabalhos: nossos experimentos foram realizados em animais não anestesiados e a microinjeção de vit C na área RVLM foi unilateral, além do fato de nossos animais terem passado por protocolos cirúrgicos diferentes e serem obesos. Os estudos com microinjeções em animais não anestesiados tem mostrado muitas vezes dados contrários aos realizados em animais anestesiados e na sua grande maioria as razões para essas diferenças tem sido o uso da anestesia, que já tem mostrado interferir na sensibilidade dos neurônios do sistema nervoso

central (BACHELARD; GARDINER; BENNETT, 1990; CARDOSO et al., 2006; MARTINS-PINGE; BARALDI-PASSY; LOPES, 1997).

A vit C é um cofator essencial para a hidroxilação e atua como um scavenger de  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^-$  no organismo. O cérebro consome 20% de todo oxigênio corporal e tem alta taxa metabólica se caracterizando como um tecido altamente oxidável. Essa circunstância justifica a presença de antioxidante neste local para manter o equilíbrio redox. No entanto, essa distribuição de antioxidantes não é homogênea apresentando locais com maiores taxas de glutathione e outros com vit C (ascorbato). A habilidade em ser um antioxidante da vit C é doar elétrons do segundo e terceiro carbono da sua estrutura (PADAYATTY; LEVINE, 2016). Todavia, a vit C também pode se tornar um agente pró-oxidante na presença de metais livres. Estudo realizado por Kang e colaboradores (1998) mostrou que se administrado vit C antes da indução de estresse oxidativo nos pulmões de ratos ela promovia efeito protetivo ao tecido e quando administrado vit C depois de 1 hora após a indução houve aumento de etano exalado e das lesões pulmonares. Dessa forma, os autores concluem que houve interação da vit C com os metais livres causados pela lesão (KANG; JANG; PARK, 1998). Outro aspecto interessante observado foi que diferentes doses de vit C em condições de estresse oxidativo promove um papel antioxidante e quando administrado mesmo que baixas doses em um local em equilíbrio redox, ela atua como pró-oxidante (FIGUEROA-MÉNDEZ; RIVAS-ARANCIBIA, 2015).

Extrapolando para nossos experimentos, talvez a vit C no rato CTR tenha tido um aspecto mais pró-oxidante pois o local estaria em equilíbrio redox e no rato MSG que apresentou aumento nos fatores pró-oxidantes, evidenciado no perfil oxidativo aumentado de NBT e T-bars em relação ao CTR, a vit C teve mais um papel de scavenger de ERO do que pró-oxidante, promovendo menor efeito na PAM.

Consideradas as possíveis distinções, o padrão da resposta da vitamina C no nosso trabalho foi reduzir o aumento da PAM nos ratos MSG sugerindo uma possível redução dos componentes oxidativos que mantinham uma maior ativação da resposta excitatória na área RVLM como observado com a microinjeção de L-glu.

Em relação ao balanço oxidativo em outros tecidos periféricos relacionados ao sistema cardiovascular foi observado no rim a redução na capacidade antioxidante mostrada pelo ABTS além de aumento no NBT que é um marcador pró-oxidante. Esse aumento do estresse oxidativo pode ser pela influência do aumento do tecido adiposo que mantem o organismo em estado inflamatório e desequilíbrio redox aumentando produção de ROS como observado em ratos Zucker (RAZA; JOHN; HOWARTH, 2015; SHARMA, 2016) além disso, os adipócitos expressam angiotensinogênio gerando aumento da produção de ang II contribuindo para alterações renais (THATCHER et al., 2009). Obesidade e SM associada com DCV pode levar ao desenvolvimento de lesões renais com provável desenvolvimento de doença renal crônica a longo prazo (GUARNIERI et al., 2010). A adrenal também apresenta o perfil oxidativo em desequilíbrio com maior presença de fatores pró-oxidantes que pode estar relacionado ao fato da obesidade promover alteração no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, aumentar a liberação de catecolaminas pelo córtex da adrenal e elevar a circulação de aldosterona (KARGI; IACOBELLIS, 2014). Nos ratos MSG já existe a observação de que apresentam maior produção de corticosterona (STERMAN DOLNIKOFF et al., 1988) que contribuem para maior ativação do sistema simpático. No entanto, no coração não observamos alterações oxidativas. É possível que outros mecanismos contribuam para elevar a FC nesse modelo de obesidade.

O tratamento crônico com vit C durante 21 dias não promoveu mudanças na composição corporal dos ratos MSG exceto na gordura retroperitoneal fazendo com

que a diferença estatística desaparecesse entre MSG e CTR mas não ao ponto de tornar-se diferente do grupo MSG água. Como o antioxidante reduz o estresse oxidativo, é possível que a vit C possa ter reduzido ERO e com isso possibilitou maior formação de NO pela eNOS pois a ERO aumenta o desacoplamento dessa enzima impedindo a formação de NO e com o aumento da atividade da eNOS ela aumenta a atividade metabólica do tecido adiposo favorecendo sua redução (SANSBURY et al., 2012).

No perfil antioxidante na RVLM a vitamina C promoveu maiores concentrações no grupo MSG vit C em relação ao CTR vit C sugerindo uma maior efetividade nos animais obesos em relação à restauração das reservas antioxidantes, mesmo não apresentando diferenças significantes antes do tratamento.

O tratamento com vit C mostrou-se eficaz para reduzir os componentes pró-oxidativos na área RVLM de ratos MSG sugerindo um possível efeito central através da administração periférica. A vit C tem dificuldade em atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e estudo mostrou que somente 0,4% da infusão de vit C consegue atravessar a BHE após um tempo de 30 minutos (AGUS et al., 1997). No entanto, a forma oxidada que se apresenta como ácido dehidroascórbico consegue atravessar a BHE com maior facilidade através dos transportadores GLUT-1 e se fixa ao tecido cerebral na conformação de vit C (FIGUEROA-MÉNDEZ; RIVAS-ARANCIBIA, 2015). Devido ao tempo de tratamento do nosso trabalho ter sido por 21 dias, pode ter possibilitado essa passagem da vitamina C para o sistema nervoso central e alcançado a RVLM promovendo todos os efeitos observados.

Neste estudo também foi avaliado a concentração de nitrito nos órgãos e plasma dos animais tratados com vit C. O tratamento promoveu aumento da concentração de nitrito somente no coração de ratos MSG vit C em relação ao MSG água. Apesar dos

nossos dados não mostrar diferenças entre CTR água e MSG água e corroborar com dados em camundongos realizados pelo nosso grupo que também não mostrou diferenças estatísticas do nitrito no coração (LUCCHETTI et al., 2019), dados anteriores do nosso grupo mostraram que ratos com obesidade MSG apresentaram aumento da expressão da iNOS no tecido cardíaco (DA CUNHA et al., 2017). Artigos trazem que na obesidade MSG há um aumento da produção de ERO que favorece o desacoplamento das isoformas da NOS, principalmente a eNOS causando maior vasoconstrição endotelial contribuindo para a manutenção da hipertensão (HERNÁNDEZ BAUTISTA et al., 2019). Considerando que a vit C promove redução de ERO, nossos dados sugerem que a vit C foi eficaz em aumentar o nitrito no coração através da redução de ERO no local que por sua vez reduziu o desacoplamento das isoformas permitindo mais formação de óxido nítrico. No entanto, não podemos afirmar qual a origem do NO neste local pois através da dosagem de nitrito não é possível especificar de qual isoforma ele provem.

Os demais órgãos, incluindo o plasma, não apresentaram diferenças estatísticas antes do tratamento que corrobora com o estudo 1 desta tese e também compartilha de alguns resultados do trabalho de Lucchetti e colaboradores (2019) que mostrou em camundongos MSG que não houve diferenças estatísticas na dosagem de nitrito no plasma e coração (LUCCHETTI et al., 2019) em relação ao grupo CTR.

Dessa forma, concluímos que ratos MSG apresentam aumento no estresse oxidativo na área RVLM e em órgãos periféricos como rim e adrenal e podem contribuir para o aumento e manutenção da hipertensão. O tratamento antioxidante com vit C de forma aguda e crônica foi eficaz para reduzir a PAM e cronicamente administrada a vit C promoveu aumento da disponibilidade de nitrito no coração de ratos MSG, mostrando que o tratamento com vit C pode ser eficaz quando utilizada

em condições em desequilíbrio redox com preponderância dos componentes pró-oxidantes e que atua de forma indireta quando reduz ERO na biodisponibilidade da enzima NOS que também possui papel essencial na fisiopatologia da hipertensão.

## 10. CONCLUSÃO GERAL

Os achados deste trabalho permitem concluir que a suplementação com L-arginina aumentou a oferta de NO para o organismo dos animais promovendo queda da pressão arterial dos ratos CTR, e foi efetiva para reduzir o tecido adiposo em ratos com obesidade. Além disso, a suplementação com L-arg promoveu a melhora nos parâmetros autonômicos simpático (queda) e parassimpático (aumento) que podem, a longo prazo, ser os responsáveis pela reversão da hipertensão pela diminuição da atividade simpática.

Ratos MSG apresentam hipertensão e possivelmente devido ao aumento da atividade simpática na área RVLM como mostraram os resultados. Um dos mecanismos que parece estar envolvido é o aumento do estresse oxidativo na área RVLM e em órgãos periféricos como o rim e adrenal que influenciam no desenvolvimento da hipertensão. O tratamento crônico com a vitamina C foi eficaz para reduzir o estresse oxidativo na RVLM bem como atenuar a resposta pressórica à administração aguda diretamente na área RVLM.

No entanto, além da diminuição do NO e da presença de estresse oxidativo, outros mecanismos estão envolvidos na fisiopatologia da hipertensão em indivíduos obesos, e terapias que visem restaurar essas alterações devem ser investigadas.

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUS, D. B. et al. Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 11, p. 2842–2848, 1 dez. 1997.

AIRES, M. DE M. Fisiologia. **Fisiologia**, 2008.

AIZENMAN, E.; HARTNETT, K. A.; REYNOLDST, I. J. Oxygen free radicals regulate NMDA receptor function via a redox modulatory site. **Neuron**, v. 5, n. 6, p. 841–846, 1990.

AIZENMAN, E.; LIPTON, S. A.; LORING, R. H. Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. **Neuron**, v. 2, n. 3, p. 1257–1263, 1989.

ARAUJO, T. R. et al. Benefits of l-alanine or l-arginine supplementation against adiposity and glucose intolerance in monosodium glutamate-induced obesity. **European Journal of Nutrition**, v. 56, n. 6, p. 2069–2080, 1 set. 2017.

AVSHALUMOV, M. V.; RICE, M. E. NMDA Receptor Activation Mediates Hydrogen Peroxide-Induced Pathophysiology in Rat Hippocampal Slices. **Journal of Neurophysiology**, v. 87, n. 6, p. 2896–2903, 1 jun. 2002.

BACHELARD, H.; GARDINER, S. M.; BENNETT, T. Cardiovascular responses elicited by chemical stimulation of the rostral ventrolateral medulla in conscious, unrestrained rats. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 31, n. 3, p. 185–90, dez. 1990.

BALBO, S. L. et al. Vagotomy reduces obesity in MSG-treated rats. **Research communications in molecular pathology and pharmacology**, v. 108, n. 5–6, p. 291–296, 2000.

BALISTRERI, CR; CARUSO, C. C. G. **Sci-Hub | The Role of Adipose Tissue and Adipokines in Obesity-Related Inflammatory Diseases. Mediators of Inflammation, 2010, 1–19 | 10.1155/2010/802078**. Disponível em: <<https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1155/2010/802078>>. Acesso em: 2 jul. 2020.

BALON, T. W.; NADLER, J. L. Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. **Journal of Applied Physiology**, v. 77, n. 6, p. 2519–2521, 1994.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. **Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly**. [s.l: s.n.].

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **The Journal of endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 527–8, abr. 1968.

BROOKES, P. S. **Mitochondrial nitric oxide synthase** *Mitochondrion* Elsevier, , 1 mar. 2004.

CACANYIOVA, S. et al. Effect of chronic nNOS inhibition on blood pressure, vasoactivity, and arterial wall structure in Wistar rats. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 304–310, 1 jun. 2009.

CAMPESE, V. M. et al. Reactive oxygen species stimulate central and peripheral sympathetic nervous system activity. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, n. 2, p. H695–H703, ago. 2004.

CARDOSO, L. M. et al. **ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NO CONTROLE NEUROVEGETATIVO DA PRESSÃO ARTERIAL REACTIVE OXYGEN SPECIES IN THE AUTONOMIC CONTROL OF THE BLOOD PRESSURE.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.fmrp.usp.br/revista>>. Acesso em: 2 jul. 2020.

CHAN, J. Y. H.; CHAN, S. H. H. **Differential impacts of brain stem oxidative stress and nitrosative stress on sympathetic vasomotor tone** *Pharmacology and Therapeutics* Elsevier Inc., , 1 set. 2019.

CHAN, S. H. et al. Differential cardiovascular responses to blockade of nNOS or iNOS in rostral ventrolateral medulla of the rat. **British journal of pharmacology**, v. 133, n. 4, p. 606–14, jun. 2001a.

CHAN, S. H. H. et al. Differential cardiovascular responses to blockade of nNOS or iNOS in rostral ventrolateral medulla of the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 133, n. 4, p. 606–614, 2001b.

CHAN, S. H. H. et al. Transcriptional Upregulation of Mitochondrial Uncoupling Protein 2 Protects Against Oxidative Stress-Associated Neurogenic Hypertension. **Circulation Research**, v. 105, n. 9, p. 886–896, 23 out. 2009.

CHAN, S. H. H. et al. Oral Intake of Rosiglitazone Promotes a Central Antihypertensive Effect Via Upregulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  and Alleviation of Oxidative Stress in Rostral Ventrolateral Medulla of Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 55, n. 6, p. 1444–1453, jun. 2010.

CHAN, S. H. H.; WANG, L. L.; CHAN, J. Y. H. Differential engagements of glutamate and GABA receptors in cardiovascular actions of endogenous nNOS or iNOS at rostral ventrolateral medulla of rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 138, n. 4, p. 584–593, fev. 2003.

CHEN, F.; CHAM, J. L.; BADOER, E. High-fat feeding alters the cardiovascular role of the hypothalamic paraventricular nucleus. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 298, n. 3, p. R799-807, mar. 2010.

CHIYODA, A. et al. Efeito da suplementação oral de arginina sobre a secreção de GH e metabolismo de lipídios em ratos Wistar treinados. **Motricidade**, v. 5, n. 4, 1

dez. 2009.

COELHO, C. F. F. et al. Early onset and progression of non-alcoholic fatty liver disease in young monosodium l-glutamate-induced obese mice. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 10, n. 2, p. 188–195, 1 abr. 2019.

COLLIER, S. R.; CASEY, D. P.; KANALEY, J. A. Growth hormone responses to varying doses of oral arginine. **Growth Hormone and IGF Research**, v. 15, n. 2, p. 136–139, abr. 2005.

COLOMBARI, E. et al. **Role of the medulla oblongata in hypertension.** *Hypertension*, 2001.

COVARRUBIAS-PINTO, A. et al. Old Things New View: Ascorbic Acid Protects the Brain in Neurodegenerative Disorders. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 12, p. 28194–217, 27 nov. 2015.

CUNHA, N. V et al. Cox-2 inhibition attenuates cardiovascular and inflammatory aspects in monosodium glutamate-induced obese rats. **Life sciences**, v. 87, n. 11–12, p. 375–81, 11 set. 2010.

DA CUNHA, N. V. et al. COX-2 inhibition does not reverse the increased sympathetic modulation in MSG obese rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 165, n. 2, p. 201–204, dez. 2011.

DA CUNHA, N. V. et al. Decreased endothelial nitric oxide, systemic oxidative stress, and increased sympathetic modulation contribute to hypertension in obese rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 306, n. 10, p. H1472–H1480, 15 maio 2014.

DA CUNHA, N. V. et al. iNOS inhibition improves autonomic dysfunction and oxidative status in hypertensive obese rats. **Clinical and Experimental Hypertension**, 2017.

DA SILVA MATTOS, A. M. et al. Renal sympathetic nerve activity is increased in monosodium glutamate induced hyperadipose rats. **Neuroscience letters**, v. 522, n. 2, p. 118–22, 1 ago. 2012.

DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiological reviews**, v. 74, n. 2, p. 323–64, abr. 1994.

DAMPNEY, R. A. L. et al. **Cardiovascular effects of angiotensin II in the rostral ventrolateral medulla: The push-pull hypothesis** *Current Hypertension Reports* Springer, , 9 jun. 2007. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11906-007-0040-4>>. Acesso em: 31 jan. 2021

DAWSON, R. et al. Attenuation of leptin-mediated effects by monosodium glutamate-induced arcuate nucleus damage. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 273, n. 1, p. E202–E206, jul. 1997.

DE CASTRO BARBOSA, T. et al. L-Arginine enhances glucose and lipid metabolism in rat L6 myotubes via the NO/ c-GMP pathway. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 62, n. 1, p. 79–89, jan. 2013.

DE FREITAS MATHIAS, P. C. et al. Transplantation of pancreatic islets from hypothalamic obese rats corrects hyperglycemia of diabetic rats. **Transplantation proceedings**, v. 39, n. 1, p. 193–5, [s.d.].

DE MELLO, M. A. et al. Glucose tolerance and insulin action in monosodium glutamate (MSG) obese exercise-trained rats. **Physiological chemistry and physics and medical NMR**, v. 33, n. 1, p. 63–71, 2001.

DEJAM, A. et al. Nitrite infusion in humans and nonhuman primates: Endocrine effects, pharmacokinetics, and tolerance formation. **Circulation**, v. 116, n. 16, p. 1821–1831, out. 2007.

DENTIN, R. et al. Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. **Diabetes**, v. 55, n. 8, p. 2159–2170, ago. 2006.

DOBUTOVI, B. et al. **Nitric Oxide and its Role in Cardiovascular Diseases**The **Open Nitric Oxide Journal**. [s.l: s.n.].

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 and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 25, p. 426–433, 2001.

DURRER SCHUTZ, D. et al. European Practical and Patient-Centred Guidelines for Adult Obesity Management in Primary Care. **Obesity Facts**, v. 12, n. 1, p. 40–66, 1 mar. 2019.

DUTRA, S. G. V. et al. Cardiac Autonomic Modulation Is Determined by Gender and Is Independent of Aerobic Physical Capacity in Healthy Subjects. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, 3 out. 2013.

ELDIN, A. A. K. et al. Effect of vitamin C administration in modulating some biochemical changes in arthritic rats. **Pharmacological Research**, v. 26, n. 4, p. 357–366, 1 dez. 1992.

ELFERING, S. L.; SARKELA, T. M.; GIULIVI, C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 41, p. 38079–38086, 11 out. 2002.

EMANUELA, F. et al. Inflammation as a Link between Obesity and Metabolic Syndrome. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2012, 2012.

ESCH, T.; STEFANO, G. B. **WWW. MEDSCI MONIT.COM Proinflammation: A common denominator or initiator of different pathophysiological disease**

**processes.** [s.l: s.n.]. Disponível em:

<[http://www.medscimonit.com/pub/vol\\_8/no\\_5/2686.pdf](http://www.medscimonit.com/pub/vol_8/no_5/2686.pdf)>. Acesso em: 19 nov. 2020.

FATTORI, V. et al. Curcumin inhibits superoxide anion-induced pain-like behavior and leukocyte recruitment by increasing Nrf2 expression and reducing NF- $\kappa$ B activation. **Inflammation Research**, v. 64, n. 12, p. 993–1003, 11 dez. 2015.

FATTORI, V. et al. Differential regulation of oxidative stress and cytokine production by endothelin ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors in superoxide anion-induced inflammation and pain in mice. **Journal of Drug Targeting**, v. 25, n. 3, p. 264–274, 16 mar. 2017a.

FATTORI, V. et al. Vinpocetine reduces diclofenac-induced acute kidney injury through inhibition of oxidative stress, apoptosis, cytokine production, and NF- $\kappa$ B activation in mice. **Pharmacological Research**, v. 120, p. 10–22, jun. 2017b.

FERNANDES, G. S. A. et al. Glutamate-induced obesity leads to decreased sperm reserves and acceleration of transit time in the epididymis of adult male rats. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, p. 105, 5 dez. 2012.

FIGUEROA-MÉNDEZ, R.; RIVAS-ARANCIBIA, S. **Vitamin C in health and disease: Its role in the metabolism of cells and redox state in the brain** *Frontiers in Physiology* Frontiers Research Foundation, , 23 dez. 2015. Disponível em: <[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)>. Acesso em: 25 jan. 2021

FINGERET, M.; MARQUES-VIDAL, P.; VOLLENWEIDER, P. Incidence of type 2 diabetes, hypertension, and dyslipidemia in metabolically healthy obese and non-obese. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 28, n. 10, p. 1036–1044, 1 out. 2018.

FÖRSTERMANN, U. et al. Nitric oxide synthase isozymes characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension**, v. 23, n. 6, p. 1121–1131, 1994.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. **Nitric oxide synthases: Regulation and function** *European Heart Journal*, abr. 2012.

FRÜHBECK, G.; GÓMEZ-AMBROSI, J. Modulation of the leptin-induced white adipose tissue lipolysis by nitric oxide. **Cellular Signalling**, v. 13, n. 11, p. 827–833, 1 nov. 2001.

FU, W. J. ET AL. **Dietary L-arginine Supplementation Reduces Fat Mass in Zucker Diabetic Fatty Rats - PubMed**. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15795423/>>. Acesso em: 3 jul. 2020.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373–376, 1980.

FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **The Journal of clinical investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752–61, 5 dez. 2004.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199902113400607>, 21 out. 2008.

GAGO, B. et al. Red wine-dependent reduction of nitrite to nitric oxide in the stomach. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 9, p. 1233–1242, 1 nov. 2007.

GAO, L. et al. Sympathoexcitation by central ANG II: Roles for AT1 receptor upregulation and NAD(P)H oxidase in RVLM. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 288, n. 5 57-5, maio 2005.

GOKCE, N. **L-arginine and hypertension**. Journal of Nutrition. **Anais...American Institute of Nutrition**, 2004Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15465790/>>. Acesso em: 1 out. 2020

GRANATA, A. R.; KUMADA, M.; REIS, D. J. Sympathoinhibition by A1-noradrenergic neurons is mediated by neurons in the C1 area of the rostral medulla. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 14, n. 4, p. 387–95, dez. 1985.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. 1, p. 415–445, 23 abr. 2011.

GRUNDY, S. M. et al. Definition of Metabolic Syndrome. **Circulation**, v. 109, n. 3, p. 433–438, 27 jan. 2004.

GUARNIERI, G. et al. Metabolic Syndrome and Chronic Kidney Disease. **Journal of Renal Nutrition**, v. 20, n. 5, p. S19–S23, set. 2010.

GUERTZENSTEIN, P. G.; SILVER, A. Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. **The Journal of physiology**, v. 242, n. 2, p. 489–503, out. 1974.

GUIMARAES, P. S. et al. Increasing angiotensin-(1-7) levels in the brain attenuates metabolic syndrome-related risks in fructose-fed rats. **Hypertension**, v. 63, n. 5, p. 1078–1085, 2014.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 7, n. 5, p. 335–46, maio 2006.

GUYENET, P. G.; HASELTON, J. R.; SUN, M. K. Sympathoexcitatory neurons of the rostroventrolateral medulla and the origin of the sympathetic vasomotor tone. **Progress in brain research**, v. 81, p. 105–16, 1989.

HAYNES, W. G. et al. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 2, p. 270–278, 15 jul. 1997.

HERNÁNDEZ-BAUTISTA, R. et al. Biochemical Alterations during the Obese-Aging Process in Female and Male Monosodium Glutamate (MSG)-Treated Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 7, p. 11473–11494, 27 jun. 2014.

HERNÁNDEZ BAUTISTA, R. J. et al. Obesity: Pathophysiology, monosodium glutamate-induced model and anti-obesity medicinal plants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 503–516, mar. 2019.

HILZENDEGER, A. M. et al. A brain leptin-renin angiotensin system interaction in the regulation of sympathetic nerve activity. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 303, n. 2, p. H197–H206, 15 jul. 2012.

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 = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 30, n. 5, p. 671–4, maio 1997.

HIROOKA, Y. Role of reactive oxygen species in brainstem in neural mechanisms of hypertension. **Autonomic Neuroscience**, v. 142, n. 1–2, p. 20–24, nov. 2008a.

HIROOKA, Y. Role of reactive oxygen species in brainstem in neural mechanisms of hypertension. **Autonomic Neuroscience**, v. 142, n. 1–2, p. 20–24, 3 nov. 2008b.

HIROOKA, Y. et al. Oxidative stress and central cardiovascular regulation. - Pathogenesis of hypertension and therapeutic aspects -. **Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society**, v. 74, n. 5, p. 827–35, maio 2010.

HORN, T. et al. Nitric oxide actions in paraventricular nucleus: Cardiovascular and neurochemical implications. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 266, n. 1 35-1, 1994.

HOTAMISLIGIL, G. S. **Inflammation and metabolic disorders** *Nature*, 14 dez. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17167474/>>. Acesso em: 2 jul. 2020

HUANG, A. et al. Neuronal NOS-dependent dilation to flow in coronary arteries of male eNOS-KO mice. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 282, n. 2 51-2, 2002.

HUANG, C. C.; CHAN, S. H. H.; HSU, K. SEN. cGMP/protein kinase G-dependent potentiation of glutamatergic transmission induced by nitric oxide in immature rat rostral ventrolateral medulla neurons in vitro. **Molecular Pharmacology**, v. 64, n. 2, p. 521–532, 1 ago. 2003.

HUANG, C. C.; CHAN, S. H. H.; HSU, K. SEN. 3-Morpholinylsydnominine inhibits glutamatergic transmission in rat rostral ventrolateral medulla via peroxynitrite formation and adenosine release. **Molecular Pharmacology**, v. 66, n. 3, p. 492–501, 1 set. 2004.

HUBER, D. A.; SCHREIHOFER, A. M. Altered regulation of the rostral ventrolateral medulla in hypertensive obese Zucker rats. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 301, n. 1, p. H230-40, jul. 2011.

HUBER, D. A.; SCHREIHOFFER, A. M. Exaggerated sympathoexcitatory reflexes develop with changes in the rostral ventrolateral medulla in obese Zucker rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 311, n. 2, p. R243–R253, 1 ago. 2016.

IIDA, M. et al. Substitution at codon 269 (glutamine → proline) of the leptin receptor (OB-R) cDNA is the only mutation found in the Zucker fatty (fa/fa) rat. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 224, n. 2, p. 597–604, 16 jul. 1996.

JANSSON, E. Å. et al. A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 7, p. 411–417, 2008.

JIA, Y. X. et al. Altered L-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in the vascular adventitia of rats with sepsis. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, n. 12, p. 1202–1208, dez. 2006.

JIANG, L. et al. Upregulation of AT1 Receptor Mediates a Pressor Effect Through ROS-SAPK/JNK Signaling in Glutamatergic Neurons of Rostral Ventrolateral Medulla in Rats With Stress-Induced Hypertension. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 1860, 8 jan. 2019.

JOBGEN, W. et al. Dietary L-Arginine Supplementation Reduces White Fat Gain and Enhances Skeletal Muscle and Brown Fat Masses in Diet-Induced Obese Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 139, n. 2, p. 230–237, 1 fev. 2009a.

JOBGEN, W. et al. High fat feeding and dietary L-arginine supplementation differentially regulate gene expression in rat white adipose tissue. **Amino Acids**, v. 37, n. 1, p. 187–198, maio 2009b.

KANALEY, J. A. **Growth hormone, arginine and exercise** *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* Curr Opin Clin Nutr Metab Care, , jan. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18090659/>>. Acesso em: 2 out. 2020

KANG, S. A.; JANG, Y. J.; PARK, H. In vivo dual effects of vitamin C on paraquat-induced lung damage: Dependence on released metals from the damaged tissue. **Free Radical Research**, v. 28, n. 1, p. 93–107, 1998.

KAPUR, S. et al. **Nitric oxide: a new player in the modulation of energy metabolism** *International Journal of Obesity*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.nature.com/ijo](http://www.nature.com/ijo)>. Acesso em: 2 fev. 2021.

KARGI, A. Y.; IACOBELLIS, G. Adipose Tissue and Adrenal Glands: Novel Pathophysiological Mechanisms and Clinical Applications. 2014.

KARLEN-AMARANTE, M. et al. Altered baroreflex and autonomic modulation in monosodium glutamate-induced hyperadipose rats. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 61, n. 10, p. 1435–42, out. 2012.

KATAKAM, P. V. G. et al. Insulin-induced generation of reactive oxygen species and uncoupling of nitric oxide synthase underlie the cerebrovascular insulin resistance in obese rats. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 32, n. 5, p. 792–804, maio 2012.

KELLOGG, D. L.; ZHAO, J. L.; WU, Y. Neuronal nitric oxide synthase control mechanisms in the cutaneous vasculature of humans in vivo. **Journal of Physiology**, v. 586, n. 3, p. 847–857, 1 fev. 2008.

KISHI, T. et al. Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Circulation**, v. 109, n. 19, p. 2357–2362, 18 maio 2004.

KISHI, T. et al. Sympathoinhibition induced by centrally administered atorvastatin is associated with alteration of NAD(P)H and Mn superoxide dismutase activity in rostral ventrolateral medulla of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 55, n. 2, p. 184–90, fev. 2010.

KISHI, T.; HIROOKA, Y. Oxidative stress in the brain causes hypertension via sympathoexcitation. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 335, 2012.

KIZER, J. S.; NEMEROFF, C. B.; YOUNGBLOOD, W. W. Neurotoxic amino acids and structurally related analogs. **Pharmacological reviews**, v. 29, n. 4, p. 301–18, dez. 1977.

KOGA, Y. et al. High Salt Intake Enhances Blood Pressure Increase during Development of Hypertension via Oxidative Stress in Rostral Ventrolateral Medulla of Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension Research**, v. 31, n. 11, p. 2075–2083, nov. 2008.

KONNO, S. et al. Sympathoinhibitory effects of telmisartan through the reduction of oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla of obesity-induced hypertensive rats. **Journal of hypertension**, v. 30, n. 10, p. 1992–9, out. 2012.

KONRAD, S. et al. Monosodium glutamate neonatal treatment induces cardiovascular autonomic function changes in rodents. **Clinics**, v. 67, n. 10, p. 1209–1214, 1 out. 2012.

KURUKULASURIYA, L. R. et al. **Hypertension in Obesity** *Medical Clinics of North America* Med Clin North Am, , set. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21855699/>>. Acesso em: 5 jul. 2020

KUWABARA, A. et al. The association between vitamin E intake and hypertension: results from the re-analysis of the National Health and Nutrition Survey. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 60, n. 4, p. 239–45, 2014.

LAMBERT, G. W. et al. **Sympathetic nervous activation in obesity and the metabolic syndrome—Causes, consequences and therapeutic implications** *Pharmacology and Therapeutics*, maio 2010.

LI, H.; POULOS, T. L. Structure-function studies on nitric oxide synthases. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 1, p. 293–305, jan. 2005.

LI, M.; LI, Y.; LIU, J. Metabolic Syndrome with Hyperglycemia and the Risk of Ischemic Stroke. **Yonsei Medical Journal**, v. 54, n. 2, p. 283, 1 mar. 2013.

LOBATO, N. S. et al. Obesity induced by neonatal treatment with monosodium glutamate impairs microvascular reactivity in adult rats: Role of NO and prostanoids. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 21, n. 10, p. 808–816, out. 2011.

LOHMEIER, T. E.; ILIESCU, R. The sympathetic nervous system in obesity hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 15, n. 4, p. 409–416, ago. 2013.

LOURDES PIRES BIANCHI, M.; MARIA GREGGI ANTUNES, L. **RADICAIS LIVRES E OS PRINCIPAIS ANTIOXIDANTES DA DIETA RADICAIS LIVRES E OS PRINCIPAIS ANTIOXIDANTES DA DIETA FREE RADICALS AND THE MAIN DIETARY ANTIOXIDANTS** Rev. Nutr. [s.l: s.n.].

LU, Q. B. et al. Superoxide anions and NO in the paraventricular nucleus modulate the cardiac sympathetic afferent reflex in obese rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, 1 jan. 2018.

LUCCHETTI, B. F. C. et al. Metabolic syndrome agravates cardiovascular, oxidative and inflammatory dysfunction during the acute phase of Trypanosoma cruzi infection in mice. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

LUCOTTI, P. et al. Beneficial effects of a long-term oral L-arginine treatment added to a hypocaloric diet and exercise training program in obese, insulin-resistant type 2 diabetic patients. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 291, n. 5, 2006.

LUCOTTI, P. et al. Oral L-arginine supplementation improves endothelial function and ameliorates insulin sensitivity and inflammation in cardiopathic nondiabetic patients after an aortocoronary bypass. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 58, n. 9, p. 1270–1276, set. 2009.

MACHO, L. et al. Late effects of postnatal administration of monosodium glutamate on insulin action in adult rats. **Physiological Research**, v. 49, n. SUPPL. 1, 2000.

MACIEJCZYK, M. et al. Redox balance, antioxidant defense, and oxidative damage in the hypothalamus and cerebral cortex of rats with high fat diet-induced insulin resistance. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 2018.

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. **Nitric oxide and macrophage function** *Annual Review of Immunology* Annu Rev Immunol, , 1997. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9143691/>>. Acesso em: 19 nov. 2020

MALETÍNSKÁ, L. et al. Effect of cholecystinin on feeding is attenuated in monosodium glutamate obese mice. **Regulatory Peptides**, v. 136, n. 1–3, p. 58–63, set. 2006.

MARTINS-PINGE, M. C. et al. Differential influence of iNOS and nNOS inhibitors on rostral ventrolateral medullary mediated cardiovascular control in conscious rats. **Autonomic neuroscience : basic & clinical**, v. 131, n. 1–2, p. 65–9, 30 jan. 2007.

MARTINS-PINGE, M. C.; BARALDI-PASSY, I.; LOPES, O. U. Excitatory effects of nitric oxide within the rostral ventrolateral medulla of freely moving rats. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 30, n. 3 Pt 2, p. 704–7, set. 1997.

MATYSKOVÁ, R. et al. Comparison of the obesity phenotypes related to monosodium glutamate effect on arcuate nucleus and/or the high fat diet feeding in C57BL/6 and NMRI mice. **Physiological research**, v. 57, n. 5, p. 727–34, 2008.

MCKNIGHT, J. R. et al. **Beneficial effects of L-arginine on reducing obesity: Potential mechanisms and important implications for human health** *Amino Acids* Springer-Verlag Wien, , 2010.

MEHTA, S.; STEWART, D. J.; LEVY, R. D. The Hypertensive Effect of L-Arginine is Associated with Increased Expired Nitric Oxide in Humans. **Chest**, v. 109, n. 6, p. 1550–1555, 1996.

MINSON, J. B. et al. Separate areas of rat medulla oblongata with populations of serotonin- and adrenaline-containing neurons alter blood pressure after L-glutamate stimulation. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 19, n. 1, p. 39–50, abr. 1987.

MIRANDA, R. A. et al. Swim training of monosodium l-glutamate-obese mice improves the impaired insulin receptor tyrosine phosphorylation in pancreatic islets. **Endocrine**, v. 43, n. 3, p. 571–578, jun. 2013.

MIRMIRAN, P. et al. The association of dietary L-arginine intake and serum nitric oxide metabolites in adults: A population-based study. **Nutrients**, v. 8, n. 5, 20 maio 2016.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **The New England journal of medicine**, v. 329, n. 27, p. 2002–12, 30 dez. 1993.

MORRIS, M. J. CARDIOVASCULAR AND METABOLIC EFFECTS OF OBESITY. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 35, n. 4, p. 416–419, 1 abr. 2008.

MORRISON, S. F. Glutamate transmission in the rostral ventrolateral medullary sympathetic premotor pathway. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 23, n. 4–5, p. 761–772, out. 2003.

MORRISON, S. F.; MILNER, T. A.; REIS, D. J. Reticulospinal vasomotor neurons of the rat rostral ventrolateral medulla: relationship to sympathetic nerve activity and the C1 adrenergic cell group. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 8, n. 4, p. 1286–301, abr. 1988.

MUELLER, P. J. Exercise training attenuates increases in lumbar sympathetic nerve activity produced by stimulation of the rostral ventrolateral medulla. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 102, n. 2, p. 803–13, fev. 2007.

NAGATA, M. et al. Type 2 Diabetes Mellitus in Obese Mouse Model Induced by Monosodium Glutamate. **Experimental Animals**, v. 55, n. 2, p. 109–115, 2006.

NAVARRO-GONZÁLVIZ, J. A.; GARCÍA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clinical chemistry**, v. 44, n. 3, p. 679–81, mar. 1998.

NISHIHARA, M. et al. Oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla modulates excitatory and inhibitory inputs in spontaneously hypertensive rats. **Journal of hypertension**, v. 30, n. 1, p. 97–106, jan. 2012.

NONHEBEL, D. C.; WALTON, J. C. (JOHN C. **Free-radical chemistry; structure and mechanism**. [s.l.] University Press, 1974.

NOZOE, M. et al. Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate sympathoexcitation induced by angiotensin II in the rostral ventrolateral medulla. **Journal of hypertension**, v. 26, n. 11, p. 2176–84, nov. 2008.

OLIVEIRA-SALES, E. B. et al. Oxidative Stress Contributes to Renovascular Hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 21, n. 1, p. 98–104, 1 jan. 2008.

OLIVEIRA-SALES, E. B. et al. Oxidative Stress in the Sympathetic Premotor Neurons Contributes to Sympathetic Activation in Renovascular Hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 22, n. 5, p. 484–492, 1 maio 2009.

OLNEY, J. W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science (New York, N.Y.)**, v. 164, n. 3880, p. 719–21, 9 maio 1969.

PADAYATTY, S. J.; LEVINE, M. Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. **Oral diseases**, v. 22, n. 6, p. 463–93, set. 2016.

PAL, G. K. et al. Spectral analysis of heart rate variability (HRV) may predict the future development of essential hypertension. **Medical Hypotheses**, v. 72, n. 2, p. 183–185, fev. 2009.

PALLOSHI, A. et al. Effect of oral L-arginine on blood pressure and symptoms and endothelial function in patients with systemic hypertension, positive exercise tests, and normal coronary arteries. **American Journal of Cardiology**, v. 93, n. 7, p. 933–935, 1 abr. 2004.

PANIS, C. et al. Trypanosoma cruzi: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. **Experimental parasitology**, v. 127, n. 1, p. 58–65, jan. 2011.

PANZA, J. A. et al. Effect of increased availability of endothelium-derived nitric oxide precursor on endothelium-dependent vascular relaxation in normal subjects and in patients with essential hypertension. **Circulation**, v. 87, n. 5, p. 1475–1481, 1993.

PATEL, K. P.; LI, Y. F.; HIROOKA, Y. Role of nitric oxide in central sympathetic outflow. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 226, n. 9, p. 814–24, out. 2001.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. [s.l.] Elsevier, 2007.

PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D. E. et al. Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. **Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 3, p. 1035–1041, 1 mar. 1990.

PELLIGRINO, D. A.; KOENIG, H. M.; ALBRECHT, R. F. Nitric oxide synthesis and regional cerebral blood flow responses to hypercapnia and hypoxia in the rat. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 80–87, 1993.

PEPYS, M. B.; HIRSCHFIELD, G. M. C-reactive protein: a critical update. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 12, p. 1805–1812, 15 jun. 2003.

PERELLO, M. et al. Prolonged but Not Short Negative Energy Condition Restored Corticoadrenal Leptin Sensitivity in the Hypothalamic Obese Rat. **Neuroendocrinology**, v. 89, n. 3, p. 276–287, 2009.

PERELLÓ, M. et al. Adrenal enucleation in MSG-damaged hyperleptinemic male rats transiently restores adrenal sensitivity to leptin. **Neuroendocrinology**, v. 78, n. 3, p. 176–84, set. 2003.

PERFIELD, J. W. et al. Altered hepatic lipid metabolism contributes to nonalcoholic fatty liver disease in leptin-deficient Ob/Ob Mice. **Journal of Obesity**, v. 2013, 2013.

PERREAULT, M.; MARETTE, A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. **Nature Medicine**, v. 7, n. 10, p. 1138–1143, 2001.

PETERSON, J. R.; SHARMA, R. V.; DAVISSON, R. L. Reactive oxygen species in the neuropathogenesis of hypertension. **Current hypertension reports**, v. 8, n. 3, p. 232–41, jun. 2006.

PIATTI, P. et al. Long-Term Oral L-Arginine Administration Improves Peripheral and Hepatic Insulin Sensitivity in Type 2 Diabetic Patients. **Diabetes Care**, v. 24, n. 5, p. 875–880, 2001.

PURKAYASTHA, S.; CAI, D. **Neuroinflammatory basis of metabolic syndromeMolecular Metabolism**Elsevier GmbH, , 2013. Disponível em: </pmc/articles/PMC3854982/?report=abstract>. Acesso em: 29 jun. 2020

RAHMOUNI, K. et al. **Obesity-associated hypertension: New insights into**

**mechanismsHypertension**Lippincott Williams & Wilkins, , 1 jan. 2005. Disponível em: <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.HYP.0000151325.83008.b4>>. Acesso em: 31 jan. 2021

RAJAPAKSE, N. W. et al. Augmented endothelial-specific L-arginine transport prevents obesity-induced hypertension. **Acta Physiologica**, v. 212, n. 1, p. 39–48, set. 2014.

RAJAPAKSE, N. W.; HEAD, G. A.; KAYE, D. M. **Say NO to obesity-related hypertension: Role of the L-arginine-nitric oxide pathwayHypertension**Lippincott Williams and Wilkins, , 1 maio 2016.

RANA, J. S. et al. Cardiovascular metabolic syndrome ? an interplay of, obesity, inflammation, diabetes and coronary heart disease. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 9, n. 3, p. 218–232, maio 2007.

RAQUEL, H. DE A. et al. Swimming Training Modulates Nitric Oxide-Glutamate Interaction in the Rostral Ventrolateral Medulla in Normotensive Conscious Rats. **Frontiers in Physiology**, v. 7, p. 221, 13 jun. 2016.

RAZA, H.; JOHN, A.; HOWARTH, F. C. Increased Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Zucker Diabetic Rat Liver and Brain. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 1241–1251, 2015.

RECKELHOFF, J. F.; ROMERO, D. G.; YANES CARDOZO, L. L. Sex, Oxidative Stress, and Hypertension: Insights From Animal Models. **Physiology**, v. 34, n. 3, p. 178–188, 1 maio 2019.

RIBIERE, C. et al. White Adipose Tissue Nitric Oxide Synthase: A Potential Source for NO Production. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 222, n. 3, p. 706–712, 24 maio 1996.

RINALDI, W. et al. Efeito da redução de ninhada sobre as respostas autonômicas e metabólicas de ratos Wistar. **Revista de Nutricao**, v. 25, n. 3, p. 321–330, maio 2012.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ ET AL, 2013. **Obesity and Inflammation: Epidemiology, Risk Factors, and Markers of Inflammation - PubMed**. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23690772/>>. Acesso em: 28 jun. 2020.

ROSS, C. A. et al. Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate, and plasma catecholamines and vasopressin. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 474–94, fev. 1984.

SANSBURY, B. E. et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase prevents diet-induced obesity and regulates adipocyte phenotype. **Circulation Research**, v. 111, n. 9, p. 1176–1189, 12 out. 2012.

SEARS, C. E.; ASHLEY, E. A.; CASADEI, B. Nitric oxide control of cardiac function:

is neuronal nitric oxide synthase a key component? **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 359, n. 1446, p. 1021–1044, 29 jun. 2004.

SEDDON, M. et al. Effects of neuronal nitric oxide synthase on human coronary artery diameter and blood flow in vivo. **Circulation**, v. 119, n. 20, p. 2656–2662, 26 maio 2009.

SEDDON, M. D. et al. Neuronal nitric oxide synthase regulates basal microvascular tone in humans in vivo. **Circulation**, v. 117, n. 15, p. 1991–1996, abr. 2008.

SEIDELL, J. C.; HALBERSTADT, J. The Global Burden of Obesity and the Challenges of Prevention. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 66, n. Suppl. 2, p. 7–12, 9 jun. 2015.

SERAVALLE, G.; GRASSI, G. **Obesity and hypertension Pharmacological Research** Academic Press, , 1 ago. 2017.

SHARMA, K. Obesity and Diabetic Kidney Disease: Role of Oxidant Stress and Redox Balance. 2016.

SHINDE, U. A.; MEHTA, A. A.; GOYAL, R. K. **Nitric oxide: A molecule of the millennium** **Indian Journal of Experimental Biology**. [s.l: s.n.].

SHINOHARA, K. et al. Reduction of nitric oxide-mediated  $\gamma$ -amino butyric acid release in rostral ventrolateral medulla is involved in superoxide-induced sympathoexcitation of hypertensive rats. **Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society**, v. 76, n. 12, p. 2814–21, 2012.

SHIVA, S. et al. Ceruloplasmin is a NO oxidase and nitrite synthase that determines endocrine NO homeostasis. **Nature Chemical Biology**, v. 2, n. 9, p. 486–493, 2006.

SIASOS, G. et al. **L-Arginine, the substrate for NO synthesis: An alternative treatment for premature atherosclerosis?** **International Journal of Cardiology** **Int J Cardiol**, , 4 abr. 2007. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16860889/>>. Acesso em: 1 out. 2020

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180–183, 1 abr. 2015.

SILVEIRA, L. R. et al. Formation of hydrogen peroxide and nitric oxide in rat skeletal muscle cells during contractions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 5, p. 455–464, 1 set. 2003.

SIWY, J. et al. Evaluation of the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Rat as a Model for Human Disease Based on Urinary Peptidomic Profiles. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e51334, 7 dez. 2012.

SM, M. et al. Maternal Arginine Supplementation Enhances Thermogenesis in the Newborn Lamb. **Journal of animal science**, v. 98, n. 5, 2020.

SOUTHAN, G. J.; SZABÓ, C.; THIEMERMANN, C. Isothioureas: potent inhibitors of nitric oxide synthases with variable isoform selectivity. **British journal of**

**pharmacology**, v. 114, n. 2, p. 510–6, jan. 1995.

SOUZA, H. C. D. et al. Heart rate and arterial pressure variability in the experimental renovascular hypertension model in rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 139, n. 1–2, p. 38–45, 30 maio 2008.

STERMAN DOLNIKOFF, M. et al. Neonatal treatment with monosodium glutamate increases plasma corticosterone in the rat. **Neuroendocrinology**, v. 48, n. 6, p. 645–649, 1988.

STIENSTRA, R. et al. **The inflammasome puts obesity in the danger zone** *Cell Metabolism* Cell Press, , 4 jan. 2012.

STOCKER, S. D.; MEADOR, R.; ADAMS, J. M. Neurons of the rostral ventrolateral medulla contribute to obesity-induced hypertension in rats. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 49, n. 3, p. 640–6, mar. 2007.

SUN, D. et al. Enhanced release of prostaglandins contributes to flow-induced arteriolar dilation in eNOS knockout mice. **Circulation Research**, v. 85, n. 3, p. 288–293, 6 ago. 1999.

TEJERO, J.; SHIVA, S.; GLADWIN, M. T. **Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation** *Physiological Reviews* American Physiological Society, , 1 jan. 2019. Disponível em: [</pmc/articles/PMC6442925/?report=abstract>](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35442925/). Acesso em: 14 dez. 2020

TEZINI, G. C. S. V.; DIAS, D. P. M.; SOUZA, H. C. D. Aerobic physical training has little effect on cardiovascular autonomic control in aging rats subjected to early menopause. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 2, p. 147–153, fev. 2013.

THATCHER, S. et al. **The adipose renin-angiotensin system: Role in cardiovascular disease** *Molecular and Cellular Endocrinology*, 29 abr. 2009.

TROTTI, D.; DANBOLT, N. C.; VOLTERRA, A. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: A molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 8, p. 328–334, 1 ago. 1998.

VALGAS DA SILVA, C. P. et al. Improvement of the physical performance is associated with activation of NO/PGC-1 $\alpha$ /mtTFA signaling pathway and increased protein expressions of electron transport chain in gastrocnemius muscle from rats supplemented with l-arginine. **Life Sciences**, v. 125, p. 63–70, 15 mar. 2015.

VANDERLEI, L. C. M. et al. Basic notions of heart rate variability and its clinical applicability. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 24, n. 2, p. 205–217, 2009.

VANIN, A. F. et al. Nitric oxide synthase reduces nitrite to NO under anoxia. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 1, p. 96–103, 8 jan. 2007.

VARNER, K. J. et al. Differential regulation of sympathetic nerve activity by lateral

and medial subregions of the rostral ventral medulla. **Progress in brain research**, v. 81, p. 99–103, 1989.

VOLTERA, A. F. et al. [Effects of neuroendocrine obesity induction on systemic hemodynamics and left ventricular function of normotensive rats]. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 52, n. 1, p. 47–54, fev. 2008.

WANG, Y.; GOLLEDGE, J. Neuronal Nitric Oxide Synthase and Sympathetic Nerve Activity in Neurovascular and Metabolic Systems. **Current Neurovascular Research**, v. 10, n. 1, p. 81–89, 14 jan. 2013.

WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1111–1119, 2 maio 2005.

WU, G. et al. Dietary supplementation with watermelon pomace juice enhances arginine availability and ameliorates the metabolic syndrome in Zucker diabetic fatty rats. **Journal of Nutrition**, v. 137, n. 12, p. 2680–2685, 2007.

WU, K. L. H. et al. Role of nitric oxide synthase uncoupling at rostral ventrolateral medulla in redox-sensitive hypertension associated with metabolic syndrome. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 64, n. 4, p. 815–24, out. 2014.

XU, E. et al. Temporal and tissue-specific requirements for T-lymphocyte IL-6 signalling in obesity-associated inflammation and insulin resistance. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 14803, 3 ago. 2017.

YAN, J.-Q. et al. Oxidative Stress in the Rostral Ventrolateral Medulla Contributes To Cardiovascular Regulation in Preeclampsia. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 772, 4 out. 2017.

YANG, J. et al. Arginase regulates red blood cell nitric oxide synthase and export of cardioprotective nitric oxide bioactivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 37, p. 15049–15054, 10 set. 2013.

YANG, Z.; COOTE, J. H. Influence of the hypothalamic paraventricular nucleus on cardiovascular neurones in the rostral ventrolateral medulla of the rat. **Journal of Physiology**, v. 513, n. 2, p. 521–530, 1 dez. 1998.

ZANZINGER, J.; CZACHURSKI, J. Chronic oxidative stress in the RVLM modulates sympathetic control of circulation in pigs. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 439, n. 4, p. 489–494, 27 fev. 2000.

ZHU, D. N. et al. Central amino acids mediate cardiovascular response to angiotensin II in the rat. **Brain Research Bulletin**, v. 45, n. 2, p. 189–197, 1 jan. 1998.

ZOCCARATO, F.; VALENTE, M.; ALEXANDRE, A. Hydrogen Peroxide Induces a Long-Lasting Inhibition of the Ca<sup>2+</sup>-Dependent Glutamate Release in Cerebrocortical Synaptosomes Without Interfering with Cytosolic Ca<sup>2+</sup>. **Journal of Neurochemistry**, v. 64, n. 6, p. 2552–2558, 23 nov. 2002.



## 2. PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA E FREQUÊNCIA CARDÍACA.

	Pressão arterial média				Frequência cardíaca			
	Ctr água	Ctr L-arg	MSG água	MSG L-arg	Ctr água	Ctr L-arg	MSG água	MSG L-arg
	106,8	88,9	115,5	112,9	308,0	409,4	424,1	515,9
	105,6	89,8	112,6	112,5	362,4	459,5	378,9	457,8
	107,7	102,7	120,0	113,5	376,5	452,4	417,7	381,8
	110,5	74,1	116,1	123,8	381,4	428,6	401,0	421,6
	97,7	102,2	131,5	115,7	425,3	367,4	456,0	444,3
	96,1	74,8	116,9	115,5	395,4	414,5	458,0	395,0
	98,5	98,3	108,1	103,7	263,8	431,2	359,1	440,8
	112,7	91,6	114,3	107,3	373,3	342,4	327,7	371,5
		105,8	115,3	115,7		407,0	345,3	389,1
		107,8	122,9	125,8		394,3	328,1	413,5
		106,7				471,1		
<b>MÉDIA</b>	104,5	94,8	117,3	114,7	360,7	416,2	389,6	423,1
<b>ERRO PADRÃO</b>	2,2	3,6	2,0	2,1	18,1	11,7	15,6	13,7

### 3. VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA – PAS.

	PAS Variância				PAS - LF				PAS - VLF			
	Ctr água	Ctr L-arg	MSG água	MSG L-arg	Ctr água	Ctr L-arg	MSG água	MSG L-arg	Ctr água	Ctr L-arg	MSG água	MSG L-arg
	16,4	35,6	31,8	37,0	0,5	5,1	8,6	10,2	3,5	15,2	10,5	9,9
	10,9	36,8	12,6	35,0	3,8	3,4	3,4	8,4	3,0	7,5	5,5	4,7
	26,3	11,5	47,2	98,9	13,0	3,6	13,5	19,0	3,8	2,1	12,8	16,7
	32,5	17,0	26,1	34,6	13,0	6,4	7,6	10,9	6,3	5,2	6,7	7,4
	25,3	20,8	55,4	87,3	6,0	8,2	9,9	21,5	6,9	5,1	8,8	16,4
	12,8	17,0	42,4	32,5	4,5	4,5	8,0	4,7	4,0	9,0	4,5	3,2
		46,6	12,0			6,9	4,0			9,0	6,1	
		21,1	43,7			6,4	2,6			6,1	3,5	
		13,1	14,3			4,0	4,0			3,9	4,2	
			16,2				2,1				2,6	
MÉDIA	20,7	24,4	30,2	54,2	6,8	5,4	6,4	12,5	4,6	7,0	6,5	9,7
ERRO PADRÃO	3,5	4,1	5,1	12,4	2,1	0,6	1,2	2,6	0,7	1,3	1,0	2,3

#### 4. VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA – IP.

IP - Variância					IP - LF				
	Ctr água	Ctr L-arg	MSG água	MSG L-arg		Ctr água	Ctr L-arg	MSG água	MSG L-arg
	1,9	9,1	60,7	20,7		13,0	40,0	85,0	30,0
	30,7	66,6	40,4	42,5		40,0	55,0	81,0	52,0
	11,0	1,4	57,1	89,2		30,0	33,0	86,0	42,0
	22,2	9,3	28,7	53,5		33,0	63,0	75,0	34,0
	17,8	10,1	79,6	48,3		29,0	62,0	65,0	40,0
	12,7	32,5	44,5	64,9		31,0	61,0	74,0	52,0
		80,0	19,7				82,0	60,0	
		26,8	84,1				77,0	61,0	
		32,6	21,0				83,0	74,0	
			36,9					84,0	
MÉDIA	16,0	29,8	47,3	53,2		29,3	61,8	74,5	41,7
ERRO PADRÃO	4,1	9,1	7,2	9,4		3,6	5,8	3,1	3,7
IP - HF					IP - LF/HF				
	Ctr água	Ctr L-arg	MSG água	MSG L-arg		Ctr água	Ctr L-arg	MSG água	MSG L-arg
	87,0	60,0	15,0	70,0		0,2	0,7	7,4	0,5
	60,0	45,0	19,0	48,0		1,1	1,7	5,4	1,3
	70,0	67,0	14,0	58,0		0,1	0,5	8,8	0,8
	67,0	37,0	25,0	66,0		0,6	2,0	3,8	0,5
	71,0	38,0	35,0	60,0		0,5	2,1	2,2	0,8
	69,0	39,0	26,0	48,0		1,5	2,0	3,4	1,3
		18,0	40,0				5,7	2,4	
		23,0	39,0				5,3	1,8	
		17,0	26,0				6,3	3,5	
			16,0					7,5	
MÉDIA	70,7	38,2	25,5	58,3		0,7	2,9	4,6	0,9
ERRO PADRÃO	3,6	5,8	3,1	3,7		0,2	0,7	0,8	0,1

## 5. BARORREFLEXO ESPONTÂNEO.

5. BARORREFLEXO ESPONTÂNEO.													
	Bei total												
	Ctr água	Ctr L-arg	MSG água	MSG L-arg									
	0,08	0,03	0,20	0,04									
	0,08	0,14	0,14	0,17									
	0,08	0,02	0,21	0,31									
	0,10	0,20	0,22	0,08									
	0,13	0,13	0,09	0,05									
	0,08	0,09	0,18	0,22									
		0,09	0,19										
		0,15	0,14										
		0,18	0,17										
			0,13										
MÉDIA	0,09	0,11	0,17	0,14									
RO PADR	0,01	0,02	0,01	0,04									
	Ganho up				Ganho down				Ganho total				
	Ctr água	Ctr L-arg	MSG água	MSG L-arg	Ctr água	Ctr L-arg	MSG água	MSG L-arg	Ctr água	Ctr L-arg	MSG água	MSG L-arg	
	0,64	0,25	0,85	0,72	1,29	0,34	0,83	0,54	1,07	0,29	0,84	0,64	
	0,70	0,52	1,41	0,77	1,29	0,44	0,99	0,54	1,52	0,48	1,24	0,67	
	0,62	0,19	0,86	1,42	0,75	0,15	0,62	0,86	0,69	0,17	0,75	1,10	
	0,70	0,43	0,67	1,04	0,68	0,43	0,60	0,86	0,69	0,43	0,63	0,97	
	0,41	0,49	0,30	0,64	0,47	0,33	0,28	0,70	0,43	0,43	0,29	0,67	
	0,69	0,44	0,35	1,79	0,93	0,54	0,37		0,99	0,48	0,36	1,80	
		0,53	0,54			0,54	0,66			0,54	0,59		
		0,68	0,94			0,73	0,79			0,71	0,87		
		0,71	0,87			0,93	1,12			0,85	1,00		
			0,67				1,73				1,25		
MÉDIA	0,63	0,47	0,75	1,06	0,90	0,49	0,80	0,72	0,90	0,49	0,78	0,97	
RO PADR	0,05	0,06	0,10	0,19	0,14	0,08	0,13	0,06	0,16	0,07	0,10	0,18	



## APÊNDICE B – LISTA DE DADOS ESTUDO 2.

### 7. CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE.

Massa corporal		Comprimento nasoanal		Gordura retroperitoneal		Gordura perigonadal		Índice de Lee		
CTR	MSG	CTR	MSG	CTR	MSG	CTR	MSG	CTR	MSG	
365	260	22,0	18,5	4,2	4,1	3,3	4,6	32,5	34,5	
360	255	24,0	18,5	2,4	3,8	2,6	4,9	29,6	34,3	
360	310	23,5	19,0	2,3	4,8	2,1	5,1	30,3	35,6	
370	280	24,0	21,0	3,2	5,4	3,7	6,0	29,9	31,2	
375	276	24,5	20,0	3,7	5,3	3,1	4,7	29,4	32,6	
365	245	23,5	21,5	1,2	3,7	2,1	4,3	30,4	34,8	
353	300	25,0	20,0	2,3	3,9	2,8	4,9	31,4	34,9	
346	265	23,5	19,0	2,5	3,0	2,9	3,5	30,5	35,7	
358	287	22,5	20,5	2,5	5,0	2,7	4,5	30,2	35,2	
366	254	23,0	18,0	2,1	3,4	3,0	3,9	29,8	35,2	
355	290	23,5	18,5	2,3	3,7	2,1	6,2	30,1	35,8	
399	269	24,0	18,0	3,0	6,2	2,1	5,0	30,7	35,9	
365	280	23,5	21,0	4,1	5,9	2,8	4,9	30,4	31,2	
404	300	25,5	18,0	2,3	5,5	3,1	6,7	29,0	37,2	
320	289	23,5	18,5	2,5	6,5	3,9	5,0	29,1	35,7	
378		22,0		2,9		2,9		32,9		
MEDIA	364,9	277,3	23,6	19,3	2,7	4,7	2,8	5,0	30,4	34,6
ERRO PADRÃO	4,9	4,9	0,2	0,3	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3	0,4

### 8. PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA E FREQUÊNCIA CARDÍACA BASAL.

	PAM			FC	
	CTR	MSG		CTR	MSG
	104,641	129,264		324,166	476,916
	99,5307	110,358		255,88	393,099
	93,0248	101,254		358,457	300,537
	107,827	138,508		344,846	327,889
	111,168	110,82		400,119	357,074
	114,289	114,471		329,128	375,874
	108,353	111,066		354,062	336,467
	109,967	117,915		345,685	337,316
	115,852	111,317		356,31	353,394
	99,7353	111,087		349,337	386,292
	109,223	118,258		341,014	394,453
	113,865	110,412		346,273	435,426
	107,472	117,529		322,061	371,256
	114,18	119,562		302,93	347,721
	117,024	123,921		339,76	381,808
	112,56			334,6	
MÉDIA	108,7	116,4		337,8	371,7
ERRO PADRÃO	1,659	2,337		7,554	11,33

### 9. DELTA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA E FREQUÊNCIA CARDÍACA APÓS MICROINJEÇÃO DE SALINA, L-GLUTAMATO E VITAMINA C.

Delta Pressão arterial média							Delta Frequência cardíaca							
CTR			MSG				CTR			MSG				
Salina	Glu	Vit C	Salina	Glu	Vit C	Salina	Glu	Vit C	Salina	Glu	Vit C	Salina	Glu	Vit C
1,8	25,1	29,6	0,6	40,3	13,6	-18,0	-34,1	-22,3	-25,2	-35,9	7,5			
2,5	31,7	37,4	5,6	43,2	23,3	9,3	-28,8	4,2	-29,1	21,0	-15,3			
-0,4	28,2	36,1	2,3	49,1	28,4	-5,2	31,4	33,5	10,1	-48,5	0,6			
2,3	23,4	23,5	2,1	30,0	21,0	9,2	-23,2	7,8	-24,2	-43,0	29,7			
2,4	25,7	27,7	-2,3	28,7	12,5	-23,2	-3,0	13,7	-10,5	-10,0	17,6			
		23,0						5,0						
MÉDIA	1,7	26,8	29,5	1,7	38,3	19,7	-5,6	-11,5	7,0	-15,8	-23,3	8,0		
ERRO PADRÃO	0,5	1,4	2,5	1,3	3,9	3,0	6,7	12,0	7,3	7,2	12,9	7,6		

## 10. CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE PARA O GRUPO DE ESTRESSE OXIDATIVO

Massa corporal		Comprimento nasoanal		Gordura retroperitoneal		Gordura perigonadal		Índice de Lee						
	CTR	MSG		CTR	MSG		CTR	MSG		CTR	MSG			
	357,0	284,0		23,0	19,0		1,6	2,9		1,3	2,9		30,8	34,6
	400,0	275,0		25,0	18,5		2,7	2,5		1,8	2,5		29,5	35,2
	389,0	295,0		25,0	19,0		2,9	2,9		1,9	2,9		29,2	35,0
	395,0	322,0		24,5	19,0		2,9	4,5		1,8	4,5		29,9	36,1
	353,0	351,0		23,5	21,5		1,8	4,5		1,4	4,5		30,1	32,8
	377,0	312,0		24,0	20,0		1,9	4,0		1,6	4,0		30,1	33,9
	365,0	309,0		23,5	19,5		2,2	3,9		1,4	3,9		30,4	34,7
	384,0	256,0		24,0	18,5		2,4	2,1		1,7	2,1		30,3	34,3
	386,0	355,0		24,0	21,5		2,7	5,6		1,8	5,6		30,3	32,9
		329,0			21,0			4,8			4,8			32,9
MÉDIA	378,4	308,8		24,1	19,8		2,3	3,8		1,6	3,8		30,1	34,2
ERRO PADRÃO	5,6	10,1		0,2	0,4		0,2	0,4		0,1	0,4		0,2	0,3

### 11. DOSAGEM DE ESTRESSE OXIDATIVO.

	RVLM						T-BARS	
	ABTS			NBT				
	CTR	MSG		CTR	MSG		CTR	MSG
	181,65	133,12		0,81	1,54		0,08	0,33
	239,00	153,12		0,41	2,56		0,03	0,25
	158,58	202,61		1,23	4,79		0,25	0,53
	113,23	119,98		1,84	4,49		0,22	0,53
	92,31	130,30		1,67	3,98		0,28	0,46
	151,37	146,27		2,02	2,81		0,50	0,45
					1,65			0,18
					1,89			0,34
					1,90			0,41
MEDIA	156,00	147,60		1,33	2,85		0,23	0,39
ERRO PADRÃO	21,18	12,01		0,26	0,42		0,07	0,04

CORAÇÃO											
	FRAP			ABTS			NBT			T-BARS	
	CTR	MSG		CTR	MSG		CTR	MSG		CTR	MSG
	6,98	5,06		111,58	121,68		0,65	0,74		0,13	0,20
	2,33	5,63		160,09	131,08		0,95	0,80		0,18	0,44
	8,05	7,44		192,49	136,69		1,25	0,85		0,83	0,34
	10,17	2,98		103,63	155,76		0,67	1,28		0,42	0,38
	7,18	7,72		207,80	170,29		1,41	1,04		0,20	0,16
	5,69	4,24		142,62	104,13		0,91	0,64		0,45	0,23
	13,18	9,58		120,63	183,54		0,71	1,10		0,21	0,24
	9,08	7,23		111,31	134,79		0,76	0,75		0,22	0,25
	7,83	8,20			143,41			0,89		0,29	0,19
		5,63			118,39			0,65			
MÉDIA	7,83	6,37		143,80	140,00		0,91	0,87		0,33	0,27
ERRO PADRÃO	1,00	0,63		14,00	7,66		0,10	0,07		0,07	0,03

	RIM										
	FRAP			ABTS			NBT			T-BARS	
	CTR	MSG		CTR	MSG		CTR	MSG		CTR	MSG
	1,06	2,57		53,36	48,76		0,56	1,02		0,04	0,16
	4,28	6,51		52,19	53,23		1,50	1,14		0,12	0,03
	8,30	5,09		65,82	31,29		0,67	1,17		0,05	0,05
	5,64	5,06		47,94	38,89		0,99	1,03		0,04	0,10
	6,25	4,12		47,28	32,78		0,73	1,13		0,07	-0,08
	4,43	2,98		43,83	30,07		0,56	1,06		0,08	0,04
	6,67	2,97		52,84	27,86		0,76	1,79		0,09	0,07
	3,79	1,86		34,43	24,96		0,61	1,13		0,05	0,04
	7,74	4,79		55,37	27,36		0,50			0,01	0,06
MÉDIA	5,35	4,00		50,34	35,02		0,77	1,19		0,06	0,05
ERRO PADRÃO	0,74	0,50		2,87	3,31		0,10	0,09		0,01	0,02

ADRENAL											
	FRAP		ABTS			NBT			T-BARS		
	CTR	MSG	CTR	MSG		CTR	MSG		CTR	MSG	
	20,28	8,31	74,87	190,39		0,73	2,25		0,01	0,43	
	16,10	8,61	56,49	90,22		0,57	1,86		0,02	0,48	
	21,97	48,71	101,64	115,80		0,91	0,88		0,01	0,52	
	20,51	68,60	101,76	116,78		0,95	1,18		0,01	0,27	
	18,37	42,64	76,95	83,93		0,70	1,14		0,01	0,11	
	18,86	20,00	87,08	86,71		0,82	0,84		0,01	0,33	
	18,42	29,36	78,34			0,71	0,91		0,01	0,31	
	26,92	23,07	93,19			0,89				0,39	
	19,54	20,65	69,73			0,65					
		24,35									
MÉDIA/MEDIANA	20,11	29,43	78,34	103		0,7261	1,143		0,01264	0,3645	
ERRO PADRÃO	1,01	5,96	5,03	16,39		0,04	0,21		0,00	0,05	



### 13. DOSAGEM ESTRESSE OXIDATIVO NA RVLM – TRATAMENTO COM VITAMINA C POR 21 DIAS.

	RVLM					ABTS			
	FRAP								
	CTR água	CTR vit C	MSG água	MSG vit C		CTR água	CTR vit C	MSG água	MSG vit C
	20,08	31,33	21,87	35,47		50,15	49,14	59,48	113,50
	18,03	58,85	57,51	40,00		63,95	57,19	166,78	137,12
	44,76	72,93	14,93	38,03		60,50	41,14	55,52	115,99
	12,69	23,31	32,93	34,72		57,15	92,29	70,46	156,64
	14,64	17,17	29,39	21,09		65,48	71,00	138,15	100,34
	41,91	75,90		62,32			35,49		209,14
				14,45					76,06
<b>MÉDIA/MEDIANA</b>	25,35	46,58	31,33	35,16		60,5	53,16	70,46	116
<b>ERRO PADRÃO</b>	5,80	10,56	7,25	5,77		2,73	8,59	22,79	16,39
	NBT					T-BARS			
	CTR água	CTR vit C	MSG água	MSG vit C		CTR água	CTR vit C	MSG água	MSG vit C
	0,16	0,63	2,49	0,31		0,14	0,03	0,40	0,03
	0,08	0,16	1,08	0,16		0,26	0,02	0,33	0,01
	1,07	1,00	2,27	0,24		0,16	0,04	0,38	0,02
	0,44	0,21	0,70	0,63		0,13	0,04	0,44	0,02
	0,66	0,44	1,29	0,79		0,25	0,02	0,36	0,02
	0,46	0,33		0,77			0,05		0,02
									0,01
<b>MÉDIA/ MEDIANA</b>	0,48	0,46	1,56	0,48		0,16	0,03	0,38	0,02
<b>ERRO PADRÃO</b>	0,15	0,13	0,35	0,11		0,03	0,01	0,02	0,002

#### 14. DOSAGEM DE NITRITO (ÓXIDO NÍTRICO) - TRATAMENTO COM VITAMINA C POR 21 DIAS.

	Coração				Fígado				Rim			
	CTR água	CTR vit C	MSG água	MSG vit C	CTR água	CTR vit C	MSG água	MSG vit C	CTR água	CTR vit C	MSG água	MSG vit C
	2,28	2,00	2,52	3,20	2,14	1,25	1,23	1,14	1,45	1,68	1,38	1,27
	2,41	2,20	1,99	3,57	1,23	1,03	1,60	1,98	1,91	1,21	1,46	1,06
	1,98	2,78	2,21	3,47	1,19	1,57	1,23	1,12	1,36	1,28	1,46	1,43
	2,73	1,91	3,99	2,63	2,00	2,16	1,50	1,95	0,81	1,96	1,58	1,43
	2,66	1,76	1,85	2,54	1,00	2,15	1,48	1,04	1,67	2,10	1,48	1,91
	2,53	2,50	1,88	2,92	1,85	2,17		1,63	1,70	1,33		1,20
				2,74				1,70				1,34
<b>MÉDIA</b>	2,43	2,19	2,41	3,01	1,57	1,72	1,41	1,51	1,48	1,59	1,47	1,38
<b>ERRO PADRÃO</b>	0,11	0,16	0,33	0,15	0,20	0,21	0,08	0,15	0,16	0,15	0,03	0,10
	Plasma				Aorta							
	CTR água	CTR vit C	MSG água	MSG vit C	CTR água	CTR vit C	MSG água	MSG vit C				
	19,87	25,51	26,15	38,46	15,91	18,78	9,33	5,52				
	29,23	18,21	13,21	24,87	7,07	16,26	16,98	12,95				
	27,69	29,49	21,67	21,54	12,48	17,37	7,61	15,14				
	21,67	22,75	25,35	29,35	7,77	26,85	3,17	6,76				
	25,34	20,28	22,85	25,90	6,66	5,50	7,18	11,99				
					6,10	9,43		12,53				
								6,51				
<b>MÉDIA</b>	24,76	23,25	21,85	28,02	9,33	15,70	8,85	10,20				
<b>ERRO PADRÃO</b>	1,77	1,98	2,31	2,89	1,62	3,06	2,27	1,45				

## ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA.



### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 233/2016

Londrina, 26 de Outubro de 2016.

Prezada Pesquisadora,


Certificamos que o projeto intitulado "Participação das isoformas da óxido nítrico sintase e correlações com estresse oxidativo e inflamação em áreas centrais de controle cardiovascular na obesidade: efeitos da terapia antioxidante", protocolo CEUA nº 19678.2016.07, sob a responsabilidade de **Marli Cardoso Martins Pinge**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **11/10/2016**.

O objetivo do projeto é estudar de que maneira a NO-sintase, a produção de estresse oxidativo, e citocinas inflamatórias se relacionam com a função cardiovascular na RVLM e no PVN no modelo de obesidade MSG; e se o tratamento com antioxidante seria benéfico ou não para essas áreas. Para isso será realizada a indução da obesidade nos cinco primeiros dias de vida dos animais e aos 90 dias será realizada cirurgia sob anestesia de Cetamina (100 mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (20 mg/kg), para canulação da artéria e veia femoral. Em seguida será realizada cirurgia estereotáxica sob a mesma anestesia\* para implante de cânulas no RVLM ou PVN para microinfusão de salina ou ácido ascórbico. Ao final da cirurgia será administrada uma dose única (40.000 UI) de pentabiótico veterinário com estreptomicina e penicilina. Após dois dias de recuperação será realizado registro da PA e FC de forma direta dos animais no estado acordado. Eutanásia com sobredose de anestésico, GI 3.

Vigência do Projeto	15/03/2016 a 28/02/2020
Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	240
Idade	90 dias
Sexo	Machos
Origem	Projeto 10368/PROPPG
Amostras a serem coletadas	Cérebro, coração, fígado, rim, sangue e vaso sanguíneo

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

  
Prof. Dra. Glaucia Scantamburlo Alves Fernandes  
Coordenadora da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

**Prof. Dra. Marli Cardoso Martins Pinge**

Coordenadora do Projeto

Departamento de Ciências Fisiológicas / Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Chefe do Departamento de Ciências Fisiológicas e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas