



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NATALIA VERONEZ DA CUNHA

**EFEITOS DO BLOQUEIO SELETIVO DO ÓXIDO NÍTRICO E
TERAPIA ANTIOXIDANTE EM PARÂMETROS
CARDIOVASCULARES, AUTONÔMICOS E
INFLAMATÓRIOS DE RATOS COM OBESIDADE INDUZIDA
PELO GLUTAMATO MONOSSÓDICO**

NATALIA VERONEZ DA CUNHA

**EFEITOS DO BLOQUEIO SELETIVO DO ÓXIDO NÍTRICO E
TERAPIA ANTIOXIDANTE EM PARÂMETROS
CARDIOVASCULARES, AUTONÔMICOS E
INFLAMATÓRIOS DE RATOS COM OBESIDADE INDUZIDA
PELO GLUTAMATO MONOSSÓDICO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de doutor.

Orientador: Profa Dra Marli Cardoso Martins Pinge.

Co-orientador: Profa Dra Lusiane Maria Bendhack.

Londrina
2013

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C972e Cunha, Natalia Veronez da.
Efeitos do bloqueio seletivo do óxido nítrico e terapia antioxidante em parâmetros cardiovasculares, autonômicos e inflamatórios de ratos com obesidade induzida pelo glutamato monossódico / Natalia Veronez da Cunha. – Londrina, 2013.
114 f. : il.
Orientador: Marli Cardoso Martins Pinge.
Co-orientador: Lusiane Maria Bendhack.
Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2013.
Inclui bibliografia.
1. Obesidade – Teses. 2. Glutamato monossódico – Teses. 3. Pressão arterial – Teses. 4. Sistema cardiovascular – Teses. 5. Rato como animal de laboratório – Teses. I. Pinge, Marli Cardoso Martins. II. Bendhack, Lusiane Maria. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. IV. Sociedade Brasileira de Fisiologia. V. Título.

CDU 612:616.4

NATALIA VERONEZ DA CUNHA

**EFEITOS DO BLOQUEIO SELETIVO DO ÓXIDO NÍTRICO E TERAPIA
ANTIOXIDANTE EM PARÂMETROS CARDIOVASCULARES,
AUTONÔMICOS E INFLAMATÓRIOS DE RATOS COM OBESIDADE
INDUZIDA PELO GLUTAMATO MONOSSÓDICO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Ciências Fisiológicas pelo
Programa Multicêntrico em Ciências
Fisiológicas da Universidade Estadual de
Londrina, para obtenção do título de doutor.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marli Cardoso Martins Pinge
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Rubens Fazan Júnior
USP – Ribeirão Preto – SP

Profa. Dra. Carolina Panis
UNIOESTE – Francisco Beltrão – PR

Prof. Dr. Sérgio Luiz Domingues Cravo
UNIFESP – São Paulo – SP

Profa. Dra. Graziela Scianti Ceravolo
UEL – Londrina – PR

Londrina, 19 de agosto de 2013.

*Á minha família, alicerce fundamental de amor
imensurável, sempre presente nessa
caminhada.*

AGRADECIMENTOS

“A Deus, acima de tudo e de todos, fonte infinita de sabedoria”.

Aos meus pais, Celso e Marizete, meus exemplos de vida, pela dedicação e incentivo à minha formação pessoal e profissional. “Se eu pudesse vos fazer eterno... eterno eu vos faria.”

Ao meu esposo, Raphael, que com muito apoio e compreensão, nunca mediu esforços e sempre me encorajou, todo meu amor e respeito.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Marli Cardoso Martins Pinge, pela figura humana e maravilhosa que é. Obrigada pela orientação, crença, incentivo e, acima de tudo, por sua amizade, me mostrando que vale a pena fazer sempre o melhor.

Aos meus irmãos, Victor e Bruno, cunhadas, Gi e Aline, que sempre compreenderam minha ausência.

Aos meus mimandos sobrinhos, João e Mari, que com a simplicidade de criança, tornaram diferentes momentos de preocupação em boas risadas.

A todos professores que contribuíram não só com esse trabalho, mas com toda minha formação profissional, pelo convívio e pelos preciosos exemplos que resultaram em valiosos ensinamentos através de suas posturas profissionais, amigas e respeitadas que assumem. Em especial ao Prof. Dr. Phileno Pinge Filho, sempre presente.

À minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Lusiane Bendhack e equipe do seu laboratório, que não mediram esforços para ajudar na realização deste trabalho.

A todos meus amigos presentes e que já não mais estão no laboratório, pelo trabalho em equipe. Especialmente ao companheiro das “antigas” Ozahyr, sempre aguentando e participando das minhas correrias, e a querida Fer, meu braço direito, e esquerdo também. Obrigada por tudo!

Aos amigos do programa multicêntrico de pós-graduação em Ciências Fisiológicas, pelas ricas, muitas vezes sofridas, mas sempre inesquecíveis experiências compartilhadas.

Às amigas-irmãs, Dani, Milene e Vivian, pela verdadeira amizade em todos os momentos.

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

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

Aos órgãos de fomento à pesquisa e a este Programa de Pós-Graduação por creditar a realização deste estudo.

*Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,
Mas não esqueço de que minha vida
É a maior empresa do mundo...
E que posso evitar que ela vá à falência.
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver
Apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e
Se tornar um autor da própria história...
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar
Um oásis no recôndito da sua alma...
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.
É saber falar de si mesmo.
É ter coragem para ouvir um “Não”!!!
É ter segurança para receber uma crítica,
Mesmo que injusta...

Pedras no caminho?
Guardo todas, um dia vou construir um castelo...*

Fernando Pessoa

CUNHA, Natalia Veronez da. **Efeitos do bloqueio seletivo do óxido nítrico e terapia antioxidante em parâmetros cardiovasculares, autonômicos e inflamatórios de ratos com obesidade induzida pelo glutamato monossódico.** 2013. 114f. Tese (Doutorado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar nos animais controle (CTR) e com obesidade induzida por glutamato monossódico (MSG) o efeito da inibição da produção enzimática do óxido nítrico (NO) e terapia antioxidante com vitamina C sobre parâmetros cardiovasculares, autonômicos e perfil de estresse oxidativo; além de verificar a produção de NO e espécies reativas de oxigênio (EROs) em células endoteliais aórticas isoladas. A obesidade foi induzida pela administração intradérmica de 4 mg/g de peso corporal de MSG ou salina equimolar nos 5 primeiros dias de vida de ratos Wistar. A pressão arterial média, frequência cardíaca e análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) foram avaliadas após o tratamento com L-NAME (20 mg/kg) ou aminoguanidina (50mg/kg) ou salina 0,9%, via intra peritoneal por 30 dias, ou tratamento com vitamina C (50mg/kg) ou veículo (água destilada) por gavagem durante 21 dias. Adicionalmente, o perfil de estresse oxidativo foi avaliado através do TRAP e a lipoperoxidação plasmática. Também foram avaliados os níveis de prostaglandinas. Células endoteliais isoladas da aorta de ratos MSG e CTR foram avaliadas por citometria de fluxo pela intensidade de fluorescência (IF) emitida pela sonda sensível ao NO (DAF-2DA) e sensível a EROs (DHE), em condição basal e sob estímulo com acetilcolina (ACh). Ratos MSG apresentaram hipertensão arterial em comparação com os animais CTR, que foi atenuada com o tratamento antioxidante. Pela VFC, nenhuma diferença foi encontrada na análise da pressão arterial sistólica entre ratos CTR e MSG. Já na análise do intervalo de pulso, a obesidade induzida por MSG promoveu aumento do componente LF e diminuição no componente HF nas unidades normalizadas e aumento na razão LF/HF, que foram retificados pelos tratamentos com antioxidante e aminoguanidina. Animais MSG apresentaram altos níveis plasmáticos de lipoperoxidação revertidos pelos diferentes tratamentos e aumento dos níveis plasmáticos de prostaglandinas, atenuados por L-NAME e aminoguanidina tanto no grupo CTR quanto MSG. Não houve diferença no TRAP entre animais MSG e CTR, mesmo após tratamento antioxidante. Em células endoteliais da aorta de ratos CTR a IF basal para o DAF foi maior do que em MSG. Em ambos os grupos, a ACh aumentou a IF para o DAF em relação ao basal, no entanto esses valores foram menores em animais MSG. Contrariamente, a IF basal para o DHE foi maior nos animais MSG. Entretanto, a ACh aumentou a IF para DHE nos animais CTR e reduziu em animais MSG. Nossos resultados sugerem que a diminuição da produção de NO através da NO sintase endotelial em ratos MSG pode contribuir para o aumento da pressão arterial devido à menor biodisponibilidade de NO e aumentou da produção de EROs nas células endoteliais, ambos conduzindo a um aumento da atividade simpática. Além disso, a inflamação e o estresse oxidativo sistêmicos presente nesse modelo também podem contribuir para esse aumento da atividade simpática. A terapia antioxidante com vitamina C pode melhorar vários

aspectos da disfunção cardiovascular, no entanto, estudos futuros ainda devem ser projetados para melhor definir o agente e dose antioxidante a ser avaliada em humanos obesos.

Palavras-chave: Síndrome metabólica. Hipertensão. Baroreflexo. Espécies reativas de oxigênio. Prostaglandinas.

CUNHA, Natalia Veronez da. **Effects of selective blockade of nitric oxide and antioxidant therapy in cardiovascular, autonomic and inflammatory parameters in rats with obesity induced by monosodium glutamate.** 2013. 114p. Thesis (Doctoral Multicenter in Physiological Sciences) – State University of Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate in the control (CTR) and obese animals induced by monosodium glutamate (MSG) the effect of inhibiting the enzymatic production of nitric oxide (NO) and antioxidant therapy with vitamin C on cardiovascular, autonomic and stress profile on oxidative parameters, besides verifying the production of NO and reactive oxygen species (ROS) in endothelial cells isolated from aortic. Obesity was induced by administration of 4 mg/g body weight of MSG or equimolar salt in the first 5 days of life in Wistar rats. Mean arterial pressure, heart rate and spectral analysis of heart rate variability (HRV) were evaluated after treatment with L-NAME (20 mg/kg) or aminoguanidine (50mg/kg) or 0.9% saline intra peritoneal for 30 days, or treatment with vitamin C (50mg/kg) or vehicle (distilled water) by gavage for 21 days. Additionally, the profile of oxidative stress was evaluated by TRAP and plasma lipid peroxidation. We also evaluated the levels of prostaglandins. Endothelial cells isolated from rat aorta of MSG and CTR were evaluated by flow cytometry for fluorescence intensity (FI) emitted by NO-sensitive dye (DAF-2DA) and sensitive to ROS (DHE) in basal conditions and under stimulation with acetylcholine (ACh). MSG rats had arterial hypertension compared with CTR animals, which was attenuated after antioxidant treatment. No difference was found in the analysis of systolic blood pressure between CTR and MSG rats. In the analysis of pulse interval, obesity induced by MSG promoted an increased in LF band and decreased in HF band in normalized units and increase in the ratio LF / HF, which were rectified by treatment with aminoguanidine and antioxidant. MSG animals had higher plasma levels of lipid peroxidation reversed by the different treatments and increased plasma levels of prostaglandins attenuated by L-NAME and aminoguanidine in both CTR as MSG group. No difference was observed in TRAP between CTR and MSG animals, even after antioxidant treatment. In aortic endothelial cells the basal IF to DAF was higher in CTR rat than in MSG. In both groups, ACh increased IF for DAF compared to baseline, but these values were lower in MSG animals. In contrast, the basal IF for DHE was higher in MSG animals. However, ACh increased IF for DHE in CTR animals and reduced in MSG animals. Our results suggest that the reduced production of NO by endothelial NO synthase in MSG rats may contribute to the elevated blood pressure due to low bioavailability and increased production of ROS in endothelial cells, both leading to increased sympathetic activity. In addition, systemic inflammation and oxidative stress in this model may also contribute to this increase in sympathetic activity. The antioxidant therapy with vitamin C can enhance various aspects of cardiovascular dysfunction, however, further studies must still be designed to better define the dose and antioxidant agent to be assessed in obese humans.

Keywords: Metabolic syndrome. Hypertension. Baroreflex. Reactive oxygen species. Prostaglandins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Efeitos da obesidade MSG sobre a pressão arterial média (A) e frequência cardíaca (B) em ratos acordados tratados ou não com L-NAME.....43
- Figura 2** – Parâmetros espectrais da pressão arterial sistólica de ratos controles e obesos MSG tratados previamente com solução salina ou L-NAME. A = gráfico de barras representando a variância total da PAS, B = banda de baixa frequência (LF) e C = banda de alta frequência (HF).....45
- Figura 3** – Parâmetros espectrais do intervalo de pulso de ratos controles e obesos MSG tratados previamente com solução salina ou L-NAME. A = gráfico de barras representando a variância total do IP, B = banda de baixa frequência (LF) em unidade absoluta, C = banda de baixa frequência (LF) em unidade normalizada, D = banda alta frequência (HF) em unidade absoluta, E = banda alta frequência (HF) em unidade normalizada e F = razão LF/HF46
- Figura 4** – Níveis plasmáticos de prostaglandinas em animais controles e obesos MSG tratados com solução salina ou L-NAME.....48
- Figura 5** – Curvas representativas da lipoperoxidação plasmática de ratos controles e obesos MSG tratados previamente com solução salina ou L-NAME49
- Figura 6** – Capacidade antioxidante total plasmática de ratos controles e obesos MSG tratados previamente com solução salina ou L-NAME.....50
- Figura 7** – Imunohistoquímica para a iNOS no tecido cardíaco (A) e o *score* para marcação da imunohistoquímica para iNOS (B) de ratos controles e obesos MSG tratados previamente com solução salina ou L-NAME51
- Figura 8** – Intensidade de fluorescência emitida pela sonda sensível ao NO (DAF-2DA) em condições basal e estimulada com acetilcolina em ratos controle e obesos MSG52

Figura 9 – Intensidade de fluorescência emitida pela sonda sensível à EROs (DHE) em condições basal e estimulada com acetilcolina em ratos controle e obesos MSG	53
Figura 10 – Efeitos da obesidade MSG sobre a pressão arterial média (A) e frequência cardíaca (B) em ratos acordados controles e obesos MSG tratados ou não com aminoguanidina	55
Figura 11 – Parâmetros espectrais da pressão arterial sistólica de ratos controles e obesos MSG tratados previamente com solução salina ou aminoguanidina. A = gráfico de barras representando a variância total da PAS, B = banda de baixa frequência (LF) e C = banda de alta frequência (HF)	56
Figura 12 – Parâmetros espectrais do intervalo de pulso de ratos controles e obesos MSG tratados previamente com solução salina ou aminoguanidina. A = gráfico de barras representando a variância total do IP, B = banda de baixa frequência (LF) em unidade absoluta, C = banda de baixa frequência (LF) em unidade normalizada, D = banda alta frequência (HF) em unidade absoluta, E = banda alta frequência (HF) em unidade normalizada e F = razão LF/HF	57
Figura 13 – Níveis plasmáticos de prostaglandinas em animais controles e obesos MSG tratados com solução salina ou aminoguanidina	59
Figura 14 – Curvas representativas da lipoperoxidação plasmática de ratos controles e obesos MSG tratados previamente com solução salina ou aminoguanidina	60
Figura 15 – Capacidade antioxidante total plasmática de ratos controles e obesos MSG tratados previamente com solução salina ou aminoguanidina	61
Figura 16 – Imunohistoquímica para a iNOS no tecido cardíaco (A) e o <i>score</i> para marcação da imunohistoquímica para iNOS (B) de ratos controles e obesos MSG tratados previamente com solução salina ou aminoguanidina	62
Figura 17 – Efeitos da obesidade MSG sobre a pressão arterial média (A) e frequência cardíaca (B) em ratos acordados tratados ou não com vitamina C	64

Figura 18 – Parâmetros espectrais da pressão arterial sistólica de ratos controles e obesos MSG tratados previamente com água destilada ou vitamina C. A = gráfico de barras representando a variância total da PAS, B = banda de baixa frequência (LF) e C = banda de alta frequência (HF).....	66
Figura 19 – Parâmetros espectrais do intervalo de pulso de ratos controles e obesos MSG tratados previamente com água destilada ou vitamina C. A = gráfico de barras representando a variância total do IP, B = banda de baixa frequência (LF) em unidade absoluta, C = banda de baixa frequência (LF) em unidade normalizada, D = banda alta frequência (HF) em unidade absoluta, E = banda alta frequência (HF) em unidade normalizada e F = razão LF/HF.....	67
Figura 20 – Curvas representativas da lipoperoxidação plasmática de ratos controles e obesos MSG tratados previamente com água destilada ou vitamina C.....	69
Figura 21 – Capacidade antioxidante total plasmática de ratos controles e obesos MSG tratados previamente com água destilada ou vitamina C.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos da administração de MSG neonatal em ratos adultos pré-tratados com salina ou L-NAME.....	42
Tabela 2 – Sensibilidade barorreflexa de animais controles e obesos MSG tratados ou não com L-NAME	47
Tabela 3 – Efeitos da administração de MSG neonatal em ratos adultos pré-tratados com salina ou aminoguanidina	54
Tabela 4 – Sensibilidade barorreflexa de animais controles e obesos MSG tratados ou não com aminoguanidina	58
Tabela 5 – Efeitos da administração de MSG neonatal em ratos adultos pré-tratados com água destilada ou antioxidante	63
Tabela 6 – Sensibilidade barorreflexa de animais controles e obesos MSG tratados ou não com vitamina C.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AGL	Ácidos graxos livres
AMINO	Aminoguanidina
ARC	Núcleo arqueado do hipotálamo
CNA	Comprimento naso-anal
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
COX-2	Ciclooxigenase 2
CTR	Controle
CVLM	Área caudoventrolateral
DCV	Doenças cardiovasculares
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FC	Frequência cardíaca
FCDEs	Fatores contráteis derivados do endotélio
FMN	Flavina mononucleótido
FRDEs	Fatores relaxantes derivados do endotélio
FTT	Transformada Rápida de Fourier
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GH	Hormônio do crescimento
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HF	<i>High Frequency</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IF	Intensidade de fluorescência
IL - 1	Interleucina 1
IL1-β	Interleucina 1- beta
IL – 6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
IML	Coluna intermediolateral da medula espinhal
INF-γ	Interferon gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
i.p.	Intra peritoneal
IP	Intervalo de pulso

LF	<i>Low Frequency</i>
LPL	Lipase lipoproteica
MSG	Glutamato monossódico
mtNOS	Óxido nítrico sintase mitocondrial
NA	Núcleo ambíguo
NDV	Núcleo motor dorsal do vago
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NTS	Núcleo do trato solitário
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH	Radical hidroxil
ONOO ⁻	Peroxinitrito
OZR	Ratos Zucker obesos
PA	Pressão arterial
PAS	Pressão arterial sistólica
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
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
TNF-α	Fator de necrose tumoral
VFC	Variabilidade da frequência cardíaca
VIT C	Vitamina C
VLF	<i>Very Low Frequency</i>
VMH	Hipotálamo ventromedial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	OBESIDADE	19
1.2	OBESIDADE INDUZIDA POR GLUTAMATO MONOSSÓDICO (MSG).....	20
1.3	CONTROLE NEURAL DA PRESSÃO ARTERIAL	22
1.4	SÍNDROME METABÓLICA E FUNÇÃO AUTONÔMICA.....	25
1.5	ÓXIDO NÍTRICO E FUNÇÃO CARDIOVASCULAR	26
1.6	INFLAMAÇÃO E ESTRESSO OXIDATIVO NA OBESIDADE	29
2	JUSTIFICATIVA	33
3	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVO GERAL.....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	ANIMAIS	35
4.2	INDUÇÃO DA OBESIDADE	35
4.3	TRATAMENTOS	35
4.3.1	Bloqueio Farmacológico da Produção de Óxido Nítrico	35
4.3.2	Tratamento com Vitamina C.....	36
4.4	ANÁLISE DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES.....	36
4.4.1	Cateterização da Artéria e Veia Femorais.....	36
4.4.2	Registro Cardiovascular	37
4.4.3	Análise da Variabilidade Circulatória	37
4.4.4	Análise da Sensibilidade Baroreflexa	38
4.5	IMUNOHISTOQUÍMICA DO TECIDO CARDÍACO.....	38
4.6	DETERMINAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) E ÂNION SUPERÓXIDO (O ₂ ⁻) EM CÉLULAS ENDOTELIAIS ISOLADAS DE AORTA.....	39
4.7	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	40
4.7.1	Dosagem de Prostaglandina E ₂ (PGE ₂)	40
4.7.2	Avaliação de Estresse Oxidativo no Plasma	40

4.7.2.1	Avaliação da lipoperoxidação plasmática por reação de quimiluminescência	40
4.7.2.2	Determinação da capacidade antioxidante total (TRAP) no plasma	
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5	RESULTADOS	42
5.1	PARTE 1 – ENVOLVIMENTO DA VIA CONSTITUTIVA DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES, AUTONÔMICOS E INFLAMATÓRIOS DE RATOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR GLUTAMATO MONOSSÓDICO	43
5.1.1	Caracterização da Obesidade MSG	42
5.1.2	Parâmetros Cardiovasculares	43
5.1.2.1	Pressão arterial e frequência cardíaca	43
5.1.2.2	Análise espectral do intervalo de pulso e pressão arterial sistólica	44
5.1.2.3	Análise da sensibilidade barorreflexa	47
5.1.3	Análises Bioquímicas	47
5.1.3.1	Níveis de prostaglandinas plasmáticas (PGE ₂)	47
5.1.3.2	Avaliação de estresse oxidativo no plasma	48
5.1.3.2.1	<i>Avaliação da lipoperoxidação plasmática por reação de quimiluminescência</i>	48
5.1.3.2.2	<i>Determinação da capacidade antioxidante total (TRAP) no plasma</i>	49
5.1.4	Marcação Imunohistoquímica de iNOS no Tecido Cardíaco	50
5.1.5	Produção de Óxido Nítrico e Ânion Superóxido em Células Endoteliais Isoladas de Aorta	51
5.2	ENVOLVIMENTO DA VIA INDUZIDA DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES, AUTONÔMICOS E INFLAMATÓRIOS DE RATOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR GLUTAMATO MONOSSÓDICO	53
5.2.1	Caracterização da Obesidade MSG	53
5.2.2	Parâmetros Cardiovasculares	54
5.2.2.1	Pressão arterial e frequência cardíaca	54
5.2.2.2	Análise espectral do intervalo de pulso e pressão arterial sistólica	55
5.2.2.3	Análise da sensibilidade barorreflexa	58
5.2.3	Análises Bioquímicas	58
5.2.3.1	Níveis de prostaglandinas plasmáticas (PGE ₂)	58

5.2.3.2	Avaliação de estresse oxidativo e capacidade antioxidante no plasma.....	59
5.2.3.2.1	<i>Avaliação da lipoperoxidação plasmática por reação de quimiluminescência</i>	59
5.2.3.2.2	<i>Determinação da capacidade antioxidante total (TRAP) no plasma</i>	60
5.2.4	Marcação Imunohistoquímica de iNOS no Tecido Cardíaco	61
5.3	EFEITO DO TRATAMENTO ANTIOXIDANTE SOBRE OS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES, AUTONÔMICOS E INFLAMATÓRIOS DE RATOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR GLUTAMATO MONOSSÓDICO.....	63
5.3.1	Caracterização da Obesidade MSG	63
5.3.2	Parâmetros Cardiovasculares	64
5.3.2.1	Pressão arterial e frequência cardíaca.....	64
5.3.2.2	Análise espectral do intervalo de pulso e pressão arterial sistólica.....	65
5.3.2.3	Análise da sensibilidade barorreflexa.....	68
5.3.3	Análises Bioquímicas	68
5.3.3.1	Avaliação de estresse oxidativo no plasma.....	68
5.3.3.1.1	<i>Avaliação da lipoperoxidação plasmática por reação de quimiluminescência</i>	68
5.3.3.1.2	<i>Determinação da capacidade antioxidante total (TRAP) no plasma</i>	69
6	DISCUSSÃO	71
7	CONCLUSÃO	82
	REFERÊNCIAS	83
	ANEXO	97
	ANEXO A – Estudo Complementar	98

1 INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE

A obesidade é uma doença cada vez mais comum, cuja prevalência já atinge proporções epidêmicas tanto em nações do primeiro mundo quanto em países em desenvolvimento. Constitui um importante problema de saúde, estando associada à comorbidades como o diabetes mellitus tipo 2, a hipercolesterolemia, a hipertensão arterial entre outras doenças cardiovasculares, a apnéia do sono, problemas psicossociais, doenças ortopédicas e diversos tipos de câncer (WHO, 2012).

A Organização Mundial de saúde (OMS) indica a antropometria como um método útil na identificação de pessoas obesas. É um método barato, não invasivo, universalmente aplicável e com boa aceitação pela população. O índice de massa corporal (IMC) é um método antropométrico calculado pela fórmula: peso (em quilograma - kg) dividido pelo quadrado da altura (em metros - m). A OMS estima que em 2015 o mundo tenha 2,3 bilhões de pessoas com excesso de peso (IMC \geq 25 kg/m²) e 700 milhões de obesos (IMC \geq 30 kg/m²).

No Brasil, a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009 mostra um aumento contínuo de excesso de peso e obesidade na população com mais de 20 anos de idade ao longo de 35 anos. O excesso de peso quase triplicou entre homens, de 18,5% em 1974-75 para 50,1% em 2008-09. Nas mulheres, o aumento foi menor: de 28,7% para 48%. Já a obesidade cresceu mais de quatro vezes entre os homens, de 2,8% para 12,4% (1/4 dos casos de excesso) e mais de duas vezes entre as mulheres, de 8% para 16,9% (1/3 dos casos de excesso). Esta não é uma doença restrita aos adultos, já que o excesso de peso foi observado em 33,5% das crianças entre cinco a nove anos, sendo que 16,6% dos meninos também eram obesos; entre as meninas, a obesidade apareceu em 11,8%.

A obesidade caracteriza-se pelo excesso de gordura corpórea, que pode ser desencadeada por erros no metabolismo e na utilização dos nutrientes ou por balanço energético positivo, que ocorre quando o valor calórico ingerido é superior ao gasto, promovendo aumento dos estoques de energia e peso corporal (WHO, 2012). Seu desenvolvimento possui múltiplas causas e é o resultado de complexas interações entre fatores genéticos, psicológicos, socioeconômicos,

culturais e ambientais. Dieta com alta densidade calórica e sedentarismo estão entre suas principais causas. A obesidade leva à incapacidade funcional, redução da qualidade de vida, redução da expectativa de vida e aumento da mortalidade (HILL, 2006).

A obesidade é importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV), podendo ocorrer de forma independente ou concomitante com outros fatores de risco. No Brasil, as DCV são causas de aproximadamente 30% de todas as mortes. Destas, aproximadamente 50% ocorrem em adultos com idades entre 30-69 anos (ABALLAY et al., 2013).

A síndrome metabólica (SM) também está relacionada à obesidade. É uma entidade clínica que representa um grupo de fatores de risco cardiometabólicos caracterizada pela obesidade abdominal, resistência à insulina, hipertensão, hipertrigliceridemia, estado pró-inflamatório sistêmico e redução do nível de colesterol HDL. A presença de SM está associada a um risco aumentado de eventos cardiovasculares e mortalidade (LAMBERT et al., 2010).

Diferentes modelos experimentais são propostos com o intuito de elucidar a fisiopatologia da SM. Dentre eles podemos citar os modelos animais de mutação gênica, tais como camundongos ob/ob - que não produzem o hormônio leptina, desenvolvendo obesidade por hiperfagia e resistência à insulina (PERFIELD II et al., 2013); camundongos db/db e ratos Zucker obesos (OZR) (IIDA et al. 1996), que possuem mutação gênica do receptor da leptina, causando obesidade, hiperfagia e hipertensão (SIWY et al., 2013), bem como em roedores que receberam suplementação alimentar rica em lipídeos e/ou carboidratos cronicamente (DEMIGNÉ et al., 2006; RUTLEDGE; ADELI 2007), ou foram submetidos à administração subcutânea de glutamato monossódico (KIZER et al., 1978; HIRATA et al., 1997).

1.2 OBESIDADE INDUZIDA POR GLUTAMATO MONOSSÓDICO (MSG)

A literatura tem descrito um modelo de obesidade em animais de experimentação que mimetiza, pelo menos em parte, a condição clínica de síndrome metabólica rotulada como obesidade neuroendócrina, o modelo MSG (BALBO et al., 2000; DOLNIKOFF et al., 2001; FERNANDES et al., 2012; KIZER et al., 1978; LORDEN; CAUDLE, 1986; MACHO et al., 2000; MARTINS et al., 2004; OLNEY,

1969; PERELLÓ et al., 2003). Este modelo de obesidade é obtido pela administração subcutânea de MSG em ratos recém-nascidos, cuja barreira hematoencefálica não está totalmente desenvolvida (KIZER et al., 1978).

O MSG é um aminoácido neuroexcitatório lesivo ao sistema nervoso central (SNC) quando administrado em alta dose. Provoca edema intracelular e necrose neuronal que causa a destruição de corpos celulares de neurônios localizados no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC), eminência média e outras áreas cerebrais (KIZER et al., 1978; OLNEY, 1969). O ARC é o principal alvo dos efeitos deletérios do MSG injetado, acometendo 80 a 90% de seus neurônios (OLNEY, 1969).

O ARC é conhecido como local de secreção de neurotransmissores, peptídeos e de hormônios liberadores hipofisiotróficos como GH-RH, hormônio liberador do hormônio luteinizante, neuropeptídeo Y, corticotropina, somatostatina, substância P, prolactina, β -endorfina, dopamina, galamina, neurotensina, polipeptídeo pancreático e pró-encefalina, e a lesão desta região na fase neonatal implica em importantes efeitos na função neuroendócrina (NEMEROFF et al., 1977).

A destruição neuronal desta região altera o funcionamento normal do eixo hipotálamo-hipófise, uma área intimamente envolvida na regulação de diferentes funções, como balanço energético, crescimento e função gonadal (KIZER et al., 1978; OLNEY, 1969).

As extensivas lesões causadas pelo MSG resultam em uma síndrome com alterações neuroendócrinas e metabólicas caracterizada por redução do crescimento corporal, obesidade, produção diminuída de esperma, puberdade tardia, hipoatividade, hipofagia, altos níveis séricos de corticosteroides, excessiva adiposidade, intolerância à glicose e um aumento acentuado de triglicérides (BALBO et al., 2000; DOLNIKOFF et al., 2001; FERNANDES et al., 2012; LORDEN; CAUDLE, 1986; MACHO et al., 2000; MARTINS et al., 2004; OLNEY, 1969; PERELLÓ et al., 2003), muito parecida com as alterações típicas de indivíduos com síndrome metabólica.

Os animais submetidos à injeção de MSG na fase neonatal apresentam diminuição no comprimento e de vários órgãos devido ao hipossomatotropismo, com redução dos níveis circulantes do GH (hormônio do crescimento), tanto sua secreção basal como pulsátil, em virtude da destruição permanente dos neurônios do ARC, local de produção do GH-RH. Como o GH é

hormônio calorífero, que normalmente produz lipólise e anabolismo, além de ser diabetogênico, com a sua deficiência na fase adulta, acarretaria na falha da mobilização das gorduras, com aumento da glicólise e glicogenólise, hipoglicemia de jejum, adiposidade e intolerância ao frio, contribuindo para o aumento do tecido adiposo destes animais. Além disso, a participação da hiperatividade vagal é provavelmente muito relevante na adiposidade destes animais (SOUZA et al., 2001).

Na fase adulta, os ratos injetados com solução de MSG na fase neonatal, apresentam aumento da lipogênese no fígado, retroperitônio e testículos. Nas ratas, a lipogênese ocorre apenas nos ovários e retroperitônio. O acúmulo de gordura dá-se em razão do aumento da lipogênese "de novo" (síntese de ácidos graxos) e reduzida mobilização de gorduras. Existe uma atividade aumentada da enzima lipase lipoproteica (LPL) no retroperitônio e gônadas, sendo que apenas nos ratos observa-se aumento da atividade da LPL no fígado. No tecido adiposo de retroperitônio e gônadas, observa-se hipertrofia celular, caracterizando adiposidade do tipo hipertrófico (NASCIMENTO CURTI et al., 1991).

Nos ratos injetados com MSG, observa-se hiperinsulinemia, devido ao aumento da secreção de células beta das ilhotas pancreáticas, que está associada à lipogênese e atividade da LPL (CHIKAMORI et al., 1977). Também se observam elevados níveis de leptina circulantes. É possível que haja uma alteração da regulação do nível de adiposidade mediada pela leptina, através da destruição dos receptores de leptina ao nível de ARC, atenuando o *feedback* gerado pela leptina circulante, explicando o mecanismo de ação do MSG (DAWSON et al., 1997).

Alterações cardiovasculares, tais como alterações no padrão da hemodinâmica sistêmica com aumento da frequência cardíaca e da resistência periférica e diminuição do volume sistólico de ejeção foram relatadas em animais adultos que receberam MSG no período neonatal (VOLTERA et al., 2008).

1.3 CONTROLE NEURAL DA PRESSÃO ARTERIAL

O sistema nervoso autônomo (SNA), através das divisões simpático (SNS) e parassimpático (SNP), desempenha um importante papel na manutenção da homeostase do organismo, orientando diferentes processos fisiológicos tais como a função cardiovascular e o metabolismo energético. É o principal mediador neural de respostas fisiológicas à estímulos internos e externos (TEFF, 2008).

Os centros responsáveis pela manutenção e controle da função cardiovascular atuam basicamente através de mecanismos tônicos e reflexos, tais como o baroreflexo, o quimiorreflexo e o reflexo cardiopulmonar. Os barorreceptores arteriais são sensíveis às deformações da parede vascular e controlam a pressão arterial (PA) instantânea ou de curto prazo. As aferências provenientes desses mecanorreceptores arteriais projetam-se ao núcleo do trato solitário (NTS) a primeira estação sináptica do SNC. Neurônios de segunda ordem do NTS projetam-se e excitam o núcleo ambíguo (NA) e núcleo motor dorsal do vago (NDV), onde se localizam os neurônios pós-ganglionares parassimpáticos, os quais medeiam o tônus parassimpático para o coração. Outros neurônios do NTS projetam-se e excitam neurônios GABAérgicos da área caudoventrolateral (CVLM) que se projetam e inibem neurônios pré-motores simpáticos localizados na área rostroventrolateral do bulbo (RVLM), determinando o tônus simpático. Juntas, essas áreas contribuem para a manutenção da PA e frequência cardíaca (FC) seja em repouso ou durante a ativação de reflexos cardiovasculares (DAMPNEY, 1994).

Desta forma, elevações instantâneas da PA são prontamente corrigidas pelo aumento do tônus vagal e redução do tônus simpático, que determinam aumento da capacitância venosa, redução da frequência e contratilidade cardíaca e queda da resistência periférica total. Respostas estas que se somam para reduzir a PA, trazendo-a de volta a níveis controles. Quedas instantâneas da PA determinam respostas opostas (redução do tônus vagal e aumento do tônus simpático), novamente trazendo a pressão a seus valores basais (DAMPNEY, 1994).

A sensibilidade barorreflexa (SBR) representa um índice de atividade da função do baroreflexo arterial. A redução da SBR tem sido associada com regulação deficiente da PA e aumento do risco de mortalidade relacionada à DCV. Diferentes modelos de hipertensão apresentam diminuição na SBR (WANG et al., 2005). Já um aumento da SBR tem sido atribuído a condições de modulação benéfica da função cardiovascular como é o caso do exercício físico (DE ANGELIS et al., 2004).

A SBR comumente é avaliada pela relação entre mudanças reflexas na FC devido a mudanças na pressão arterial sistólica (PAS), causada pela injeção intravenosa de agentes vasoativos (FARAH et al., 1999). Outra forma de avaliar SBR de forma espontânea é através de uma estimativa da SBR através da quantificação

das alterações no ciclo cardíaco acompanhadas por mudança espontânea da PAS (DI RIENZO et al., 1985).

Ao longo das últimas décadas, diferentes técnicas têm sido usadas para avaliar a atividade do SNA sobre a função cardiovascular. Estes incluem: mensuração das concentrações plasmáticas de catecolaminas, excreção urinária de catecolaminas ou de seus metabólitos, bloqueio ou estimulação farmacológica de receptores adrenérgicos ou nicotínicos (ganglionares), microneurografia, registro da atividade simpática de nervos, e alguns métodos indiretos, tais como análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e variabilidade da PA e determinação da SBR (TENTOLOURIS et al., 2008).

A análise espectral para o estudo da VFC e variabilidade da PA é uma ferramenta não invasiva usada como marcador quantitativo da atividade autonômica. Ela é um instrumento que decompõe os sinais cardiovasculares em frequência de componentes e quantifica a potência de cada um desses componentes. Delimitam-se normalmente três faixas de frequências distintas, chamadas de componentes espectrais. São elas: alta frequência (*High Frequency* - HF: 0,75 a 3,00 Hz), baixa frequência (*Low Frequency* - LF: 0,20 a 0,75 Hz) e muito baixa frequência (*Very Low Frequency* - VLF: < 0,20 Hz).

Várias correlações fisiológicas são estudadas a partir da análise dos componentes espectrais. O componente HF corresponde à modulação respiratória e é um indicador da atuação do nervo vago sobre o coração, ao passo que, VLF é reflexo do trabalho exercido pelo SNS e pelo SNP e é influenciado parcialmente por outras atividades neuro-humorais. O componente LF é decorrente da ação conjunta dos componentes vagal e simpático sobre o coração, com predominância do simpático (MALLIANI et al., 1991; MONTANO et al., 1994; TASK FORCE, 1996).

A redução da VFC está associada a um pior prognóstico para uma ampla gama de condições clínicas, tais como doenças do sistema cardiovascular (TASK FORCE, 1996). A hiperatividade do SNS exerce efeitos desfavoráveis sobre o sistema cardiovascular, induzindo hipertrofia cardíaca, remodelamento arterial e disfunção endotelial (RAVUSSIN; TATARANNI, 1996; TENTOLOURIS et al., 2006) entre outros.

1.4 SÍNDROME METABÓLICA E FUNÇÃO AUTONÔMICA

Embora as alterações na função do SNA não estejam incluídas nos critérios necessários para o diagnóstico da SM, é bem sabido que a ativação do SNS está implicada na patogênese de componentes específicos dessa síndrome, aumentando o risco cardiovascular.

Há três condições típicas da SM que podem causar uma exacerbação do tônus simpático: a hiperinsulinemia, a hiperleptinemia, e a hiperlipidemia. A hiperinsulinemia, independentemente de alterações na glicemia, leva a um aumento substancial da concentração de noradrenalina circulante acompanhada por um aumento na pressão sanguínea. Além disso, altos níveis de insulina aumentam a reabsorção de sódio, favorecendo a expansão do volume de líquido extracelular, o que pode predispor à hipertensão. A leptina, além do seu efeito sobre o apetite e metabolismo, age no hipotálamo aumentando a pressão sanguínea através da ativação do SNS. Finalmente, altos níveis circulantes de ácidos graxos livres (AGL) podem participar da ativação do SNS (LAMBERT et al., 2010; MENDIZÁBAL et al., 2013).

O aumento da atividade simpática é uma característica comum à obesidade em humanos e em modelos animais, podendo levar ao aumento da PA via aumento na vasoconstrição periférica, aumento da reabsorção tubular renal de sódio e aumento do débito cardíaco por aumento da força e frequência do coração (DA SILVA et al., 2009; DIBONA, 2013; HALL, 1997; SHIBAO et al., 2007).

A literatura tem explorado os possíveis mecanismos envolvidos no aumento da atividade simpática na obesidade, que podem estar relacionados com outras alterações sistêmicas e, em conjunto, resultarem na hipertensão. Dentre essas alterações, podem-se destacar a hiperinsulinemia, a hiperleptinemia, o aumento da ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e o aumento dos AGL. Além disso, a obesidade também pode causar marcadas modificações estruturais nos rins, inflamação sistêmica e estresse oxidativo que contribuem para a hipertensão. No entanto, o decurso de tempo da ativação simpática e os mecanismos específicos que são responsáveis por esta forma de hipertensão não são completamente compreendidos (DORRESTEIJN et al., 2012; KURUKULASURIYA et al., 2011; LOHMEIER; ILIESCU, 2013; RAHMOUNI et al., 2005; RE, 2009).

Distúrbios no controle autonômico da variabilidade da FC e PA têm sido evidenciados na obesidade (QUILLOT et al., 2001; TONHAJZEROVA et al., 2008) e, provavelmente, a disfunção barorreflexa contribui para essas alterações (GRASSI et al., 2000; SKRAPARI et al., 2007).

Trabalhos realizados em nosso laboratório mostraram que ratos obesos MSG apresentaram hipertensão na idade adulta, seguido por um aumento na componente simpática da modulação autonômica evidenciada pela análise espectral da VFC e uma atividade nervosa simpática renal aumentada em relação aos controles (DA CUNHA et al., 2011; DA SILVA MATTOS et al., 2012), além de SBR alterada (KARLEN-AMARANTE et al., 2012).

O modelo de ratos obesos MSG possui níveis aumentados de cortisol decorrentes da lesão hipotalâmica (MATYSKOVA et al., 2008), assim como de leptina, decorrente do acúmulo de gordura visceral e da insulina, conseqüente à resistência à insulina (MACHO et al., 2000), tornando-o um modelo propício ao estudo da SM. Esses efeitos podem determinar aumento da atividade simpática, com maior liberação de catecolaminas na terminação nervosa, facilitado pelo efluxo simpático central (MARTINS et al., 2004; MORRISON et al., 2008).

1.5 ÓXIDO NÍTRICO E FUNÇÃO CARDIOVASCULAR

O óxido nítrico (NO) é um potente modulador cardíaco e vascular (DANSON; PATERSON, 2005). É um gás lipossolúvel com meia-vida extremamente curta (4-10 segundos) produzido por praticamente todas as células humanas. É sintetizado enzimaticamente a partir do aminoácido L-arginina, por um grupo de hemoproteínas, as óxido nítrico sintases (NOS), e requer a presença de cofatores como nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleótido (FMN) e (-6R) 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH₄).

Atualmente, três isoformas da NOS foram identificadas: a NOS neuronal (nNOS ou NOS I) constitutivamente expressa em neurônios centrais e periféricos, células epiteliais do estômago, útero, pulmão e músculo esquelético; a NOS induzível (iNOS ou NOS II), cujas fontes podem ser células endoteliais, células epiteliais, macrófagos, neutrófilos, células do músculo liso vascular e fibroblastos e a NOS endotelial (eNOS ou NOS III), encontrada em células endoteliais, músculo liso

vascular e músculo cardíaco (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; MONCADA; HIGGS, 1993). Alguns trabalhos descrevem ainda uma quarta forma de NOS localizada nas mitocôndrias de diferentes órgãos (NOS mitocondrial - mtNOS) (GIULIVI et al., 1998; ENKHBAATAR, 2004).

Enquanto a eNOS e a nNOS são enzimas constitutivas (cNOS), expressas em condições fisiológicas, sintetizam uma pequena quantidade de NO de forma cálcio-dependente, a ação da iNOS requer a presença de um indutor, como por exemplo, um microorganismo invasor, endotoxina ou citocina e age de forma independente do cálcio. No entanto, já foi demonstrado que a nNOS e eNOS também estão sujeitas à regulação de sua expressão, e que a iNOS pode também ser expressa constitutivamente mesmo sob condições fisiológicas (SHIMOKAWA; TSUTSUI, 2010). As citocinas mais importantes envolvidas na estimulação da iNOS são o TNF- α , interleucina 1-beta (IL1- β) e interferon gama (INF- γ) (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; JIA et al., 2006).

Após a indução, a iNOS produz grandes quantidades de NO, substancialmente maiores que as produzidas pela eNOS ou nNOS, e sua atividade continua até que o substrato seja exaurido. Dentro de condições de substrato reduzido (como a L-arginina), o NO produzido pelas NOS pode também levar a produção de ânion superóxido (O₂⁻), mostrando a estreita interação entre o NO e as espécies reativas de oxigênio (EROs) (ESCH, 2002).

O NO apresenta diferentes papéis nas funções fisiológicas: às vezes benéfico, outras vezes prejudicial ao organismo. Está envolvido na manutenção do tônus vascular, como neurotransmissor no SNC e periférico, na plasticidade sináptica no SNC, além de efeitos vasoprotetores e anti-ateroscleróticos. Também constitui um importante mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas, capaz de destruir patógenos e células tumorais. No entanto o NO é potencialmente tóxico. A toxicidade se faz presente particularmente em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante (DUSSE et al., 2003; FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; MONCADA; HIGGS, 2006).

O NO também participa dos processos inflamatórios de duas formas diferentes: o NO produzido pela via induzível, como o que ocorre em macrófagos, tem ações pró-inflamatórias, o qual é estimulado pelo TNF- α , interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6), enquanto que o NO produzido pela via endotelial e neuronal

parece possuir ações antiinflamatórias (DAS, 2001). Modelos experimentais de obesidade apresentam expressão aumentada da iNOS em diferentes tecidos (HÁ; CHAE, 2010; PERREAULT; MARRETE, 2001; SUN et al., 2012) e expressão diminuída da eNOS, no tecido adiposo marrom e branco e no músculo sóleo (VALERIO et al., 2006).

A literatura propõe que a iNOS trabalhe como um modulador na regulação do metabolismo energético: o aumento da expressão de iNOS no tecido adiposo pode aumentar a taxa basal de lipólise e inibir a ação da insulina, levando a um aumento dos níveis circulantes de AGL. Assim, é possível que a produção exagerada de NO pela iNOS possa contribuir para o desenvolvimento de resistência à insulina, hipertrigliceridemia e complicações cardiovasculares associadas à obesidade (KAPUR et al., 2000). No entanto, Noronha et al. (2005) demonstraram que a iNOS tem efeitos divergentes sobre a função vascular e metabólica na obesidade. Camundongos obesos *knockout* para iNOS estão protegidos contra a resistência à insulina, mas apresentam hipertensão e aumento da produção vascular de EROs.

A literatura evidencia que existe uma interação entre o NO e o SNA na regulação cardiovascular tanto em níveis periféricos como centrais. No SNC, o NO possui importante papel no controle da pressão sanguínea via SNS, pois inibe sua atividade e diminui seu tônus sobre os vasos. Além disso, o NO é um modulador pré-sináptico da neurotransmissão vagal, agindo na compensação da hipertensão arterial e ativação simpática cardíaca causada pela inibição da síntese de NO. Está se tornando cada vez mais evidente que a especificidade da ação do NO no SNC e no miocárdio pode depender das isoformas envolvidas na sua formação e sua regulação, além da sua localização espacial (DANSON; PATERSON, 2005; SARTORI et al., 2005; SEARS et al., 2004; SHAPOVAL, 2004).

A literatura mostra que alterações nessa interação entre o NO e o SNA podem participar da patogênese de vários estados de doença. Redução basal na síntese ou ação do NO promove vasoconstrição sustentada por dois mecanismos distintos: perda do tônus vasodilatador nas células musculares lisas vasculares e pela facilitação neural do efluxo simpático. Em contraste, a superprodução de NO leva a vasodilatação, hipotensão, derrame vascular e perturbações do metabolismo celular (MONCADA; HIGGSET, 2006). Shimokawa e Tsutsui (2010) mostram que as NOS participam na patogênese de doenças cardiovasculares. Em geral, a eNOS e

nNOS exercem funções cardiovasculares protetoras, enquanto iNOS parece exercer efeitos duais no sistema cardiovascular.

A nNOS parece desempenhar um papel simpatoinibitório sob condições normais através de efeitos centrais e periféricos. A literatura sugere que o NO derivado nNOS pode aumentar a atividade simpatoinibitória do GABA e inibir a atividade simpatoexcitatória da angiotensina II e do glutamato. Através destes efeitos, a nNOS pode ter um efeito inibitório sobre SNS (SEARS et al., 2004; WANG; GOLLEDGE, 2013).

1.6 INFLAMAÇÃO E ESTRESSO OXIDATIVO NA OBESIDADE

A associação da obesidade com um estado de inflamação crônica pode ser constatada pela observação de infiltrados de macrófagos no tecido muscular e adiposo (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005), produção anormal de mediadores pró-inflamatórios como o TNF- α , IL-6 (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2013; GERMAN et al., 2010) e ativação da iNOS (PERREAULT; MARRETE, 2001).

A inflamação sistêmica e o estresse oxidativo estão associados ao aumento da massa de tecido adiposo visceral resultante da obesidade (BALISTRERI et al., 2010; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2013; SMITH; MINSON, 2012). A presença de grandes adipócitos está associada a anormalidades estruturais funcionais do tecido adiposo. Estes incluem: 1) o aumento da produção de moléculas bioativas, como a leptina, resistina, angiotensina, citocinas pró-inflamatórias e EROs, 2) uma capacidade insuficiente para acomodar o excesso de aumentos relacionados com consumo de energia em lipídios, levando ao armazenamento de gordura ectópica em tecidos tais como o músculo esquelético e fígado, o que, por sua vez, aumenta a resistência à insulina e hiperinsulinemia, 3) a infiltração de macrófagos aumentada no tecido adiposo aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias e EROs. Estas "disfunções" do tecido adiposo podem, por sua vez, induzir a ativação do SNS e SRAA, e aumentar o a inflamação e o estresse oxidativo sistêmico, todos os quais são fortemente inter-relacionados através de um ciclo vicioso promovendo o desenvolvimento da hipertensão associada à obesidade (DORRESTEIJN et al., 2012; KURUKULASURIYA et al., 2011; MATHIEU et al., 2009; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2013; SMITH; MINSON, 2012).

A adiponectina é uma proteína também secretada pela gordura branca que aumenta a sensibilidade à insulina e estimula a oxidação dos ácidos graxos musculares. É uma estimulante da eNOS, desempenhando papéis importantes no controle do tônus vascular, inflamação e a proliferação de células do músculo liso, sendo protetor contra hipertensão e doenças cardiovasculares. Todavia, na obesidade, os níveis sanguíneos de adiponectina estão reduzidos, podendo haver reversão de seu papel benéfico com queda na produção de fatores vasodilatadores afetando a tensão e função vascular (MORRIS, 2008; GUZIK et al., 2007).

As EROs são derivados do metabolismo do oxigênio altamente reativos. Estas pequenas moléculas desempenham papéis importantes em processos fisiológicos, tais como a expressão gênica e transdução de sinal (BRIEGER et al., 2012). Em condições saudáveis, as EROs são mantidas em um nível ótimo devido ao equilíbrio entre a sua produção e eliminação por antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, a glutathione peroxidase, a catalase peroxidase) e não enzimáticos (vitaminas C e E) (HUTCHESON; ROCIC, 2012).

A vitamina C (ácido ascórbico) é um micronutriente hidrossolúvel necessário para várias funções biológicas. É um cofator para várias enzimas, participa na hidroxilação pós-translacional do colágeno, na biossíntese da carnitina e na conversão do neurotransmissor dopamina em noradrenalina. Além disso, a vitamina C é um importante regulador da absorção de ferro. Ela reduz íons férricos (Fe^{3+}) a ferrosos (Fe^{2+}), permitindo a captação de ferro pelo intestino delgado. A vitamina C é um agente redutor potente e eliminador de radicais livres no sistemas biológicos. Reage rapidamente com O_2^- e até mais rápido com o radical hidroxila (OH^-) originando semihidroascorbato. Neutraliza ainda o oxigênio singlete, reduz radicais tiil e combina rapidamente com o ácido hipocloroso, um poderoso oxidante gerado no local de processos inflamatórios (DUARTE; LUNEC, 2005).

O estresse oxidativo pode ocorrer como resultado de um aumento na geração de EROs, na diminuição do sistema antioxidante ou ambos, podendo provocar a injúria celular e tecidual e estimular a resposta inflamatória, por ativar padrões de sinalização celular (como c-Jun N-quinase terminal e o inibidor do fator de transcrição NF-Kappa B) que promovem a inflamação (HOTAMISLIGIL, 2006).

A literatura indica um aumento do estresse oxidativo na hipertensão essencial, bem como em pacientes hipertensos obesos, no entanto pouco se sabe

sobre o envolvimento do estresse oxidativo na hipertensão induzida pela obesidade (DOBRIAN et al., 2001).

Existem vários mecanismos pelos quais a obesidade gera estresse oxidativo. Dentre eles podemos citar: 1) a geração de EROs pela oxidação de metabólitos energéticos como glicose e ácidos graxos que ocorre nas mitocôndrias e por outros processos metabólicos, 2) o excesso de consumo de oxigênio, consequente do aumento da carga mecânica e metabolismo cardíaco, gera radicais livres na cadeia respiratória mitocondrial, que se encontra acoplado com a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias e 3) as citocinas produzidas pelos adipócitos são potentes estimuladoras para a produção de EROs por macrófagos e monócitos (DE MARCHI et al., 2013; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011). Além disso, a literatura sugere que a obesidade por si só pode induzir a produção de EROs sistêmica, já que o tecido adiposo apresenta um aumento na expressão de NADPH-oxidase e diminuição da expressão das enzimas antioxidantes (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011; FUJITA et al., 2006; FURUKAWA et al., 2004).

Outra fonte de EROs é o desacoplamento da eNOS, um processo no qual a eNOS gera O_2^- quando a concentração ou de L-arginina, o substrato da NOS, ou BH4, um cofactor da enzima, está depletado. A eNOS como produtora de O_2^- tem um papel crucial na hipertensão (FÖRSTERMANN; MÜNDEL, 2006).

O O_2^- reage rapidamente com o NO vascular para formar peroxinitrito ($ONOO^-$), um oxidante potente e altamente reativo, reduzindo a biodisponibilidade do NO. Assim, a geração de EROs é capaz de reduzir a vasodilatação dependente do endotélio e levar a hipertensão e disfunção endotelial, enquanto o $ONOO^-$ formado pode induzir dano celular incluindo agregação plaquetária, coagulação intravascular disseminada, peroxidação lipídica e dano mitocondrial (BURNEY et al., 1999; PARRAT, 1998).

A disfunção endotelial, atributo marcante da hipertensão, é definida como o desequilíbrio entre a produção e biodisponibilidade de fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDEs), particularmente o NO, e fatores contráteis derivados do endotélio (FCDEs), associados com o estresse oxidativo (SILVA et al., 2012). É uma condição também presente na obesidade, e pode ser crucial para o aumento do risco cardiovascular (BARTON et al., 2012; ZANGH, 2008).

Cunha et al. (2010) mostrou que o modelo MSG apresenta aumento de prostaglandinas e lipoperoxidação, comprovando que a obesidade é geradora de inflamação e estresse oxidativo. Além disso, nesse mesmo trabalho foi demonstrado que a inibição das prostaglandinas diminui o estresse oxidativo, a esteatose hepática e a hipertensão. No entanto, não se sabe se a vasculatura é o gerador do estado oxidativo nesse modelo.

2 JUSTIFICATIVA

A obesidade é uma condição precursora de várias fisiopatologias, dentre elas a hipertensão. Apesar do conhecimento da ativação do SNS na hipertensão arterial induzida pela obesidade, os mecanismos centrais e periféricos responsáveis pela elevação da PA são pouco compreendidos.

Considerando a associação da obesidade com um estado de inflamação e estresse oxidativo sistêmico que podem levar a uma hiperatividade simpática, bem como o envolvimento do óxido nítrico nessas condições, esse estudo pretende esclarecer os efeitos do bloqueio seletivo da síntese de óxido nítrico e terapia antioxidante sobre os parâmetros cardiovasculares, autonômicos e de estresse oxidativo em um modelo de síndrome metabólica induzida por glutamato monossódico (MSG), além da investigação inicial dos efeitos centrais do óxido nítrico sobre a ativação simpática mediada pelo L-glutamato microinjetado na RVLM de ratos obesos MSG. Conhecendo também a interferência da anestesia sobre a função cardiovascular, este estudo se propõe a avaliar os parâmetros propostos em animais não anestesiados.

Trabalhos anteriores do laboratório mostraram que ratos obesos MSG apresentam hipertensão arterial moderada na idade adulta, acompanhado de aumento de prostaglandinas, aumento da atividade simpática para o território renal, aumento da modulação simpática para o coração, disfunção barorreflexa e estresse oxidativo sistêmico. Assim entendemos que esse modelo experimental permitirá a pretendida investigação.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo principal investigar os efeitos do bloqueio farmacológico da produção de óxido nítrico e do tratamento antioxidante com vitamina C, sobre parâmetros inflamatórios, cardiovasculares e autonômicos de ratos obesos MSG não anestesiados.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar os parâmetros de obesidade em todos os grupos experimentais;
2. Analisar o efeito do tratamento com inibidores do NO ou vitamina C sobre parâmetros cardiovasculares basais;
3. Realizar a análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial sistólica nos ratos obesos tratados e comparar com os animais controle;
4. Realizar a imunohistoquímica do tecido cardíaco para iNOS;
5. Determinar a produção de NO e O₂⁻ em células endoteliais isoladas de aorta de ratos controles e obesos MSG;
6. Quantificar os níveis plasmáticos de prostaglandinas dos animais experimentais;
7. Avaliar o estresse oxidativo no plasma dos animais que receberam ou não tratamento com os inibidores da NOS ou vitamina C.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Departamento de Ciências Fisiológicas (CIF) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade (CEEA, processo nº 33645/2010-29).

4.1 ANIMAIS

Para esta pesquisa foram utilizados ratos Wistar (n=65), provenientes do biotério central da Universidade Estadual de Londrina, os quais foram submetidos a cruzamentos realizados no biotério setorial do departamento de Ciências Fisiológicas. Os filhotes aos 21 dias de vida foram desmamados e mantidos em gaiolas coletivas (máximo de cinco animais) à temperatura constante de 21 ± 2 °C, com ciclo claro/escuro de 12 horas. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*.

4.2 INDUÇÃO DA OBESIDADE

Ratos Wistar receberam durante os cinco (5) primeiros dias de vida, injeções intradérmicas de glutamato monossódico (4mg/g) (Sigma Co., MO, USA) e os animais controle receberam salina equimolar (MATHIAS et al., 2007). A obesidade foi caracterizada pelo cálculo do Índice de Lee para cada animal aos 90 dias de vida usando a fórmula: $\sqrt[3]{\text{peso corporal}/\text{comprimento naso-anal}} \times 1000$, e também através do peso das gorduras retroperitoneal e perigonadal, onde o peso corporal e o comprimento são dados em gramas (g) e centímetros (cm), respectivamente (BERNARDIS; PATTERSON, 1968).

4.3 TRATAMENTOS

4.3.1 Bloqueio Farmacológico da Produção de Óxido Nítrico

Ratos Wistar que receberam glutamato monossódico ou salina equimolar no período neonatal foram divididos em três (3) grupos aleatoriamente e tratados pela via intraperitoneal (i.p.) com L-NAME (inibidor da cNOS, 20 mg/kg) ou

aminoguanidina (inibidor da iNOS, 50 mg/kg) (MEHANNA et al., 2007), ou salina 0,9% (controle). Os diferentes tratamentos tiveram início aos 60 dias de vida e foram administrados diariamente até que os animais completassem 90 dias de idade.

4.3.2 Tratamento com Vitamina C

Ratos Wistar que receberam glutamato monossódico ou salina equimolar no período neonatal foram também divididos em outros dois (2) grupos aleatórios e tratados com vitamina C (Bayer, Rio de Janeiro, Brasil) (50mg/kg) ou veículo (água destilada) administrados oralmente por gavagem durante 21 dias a partir do 69º dia de vida (ELDIN et al., 1992).

4.4 ANÁLISE DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES

4.4.1 Cateterização da Artéria e Veia Femorais

Os animais controles e MSG foram submetidos à cirurgia sob anestesia de Tribromoetanol (250 mg/kg, i.p.) para implantação de cateteres na artéria e veia femorais com o objetivo de monitorização da pressão arterial e administração de drogas se necessário, respectivamente.

Os cateteres eram constituídos por segmentos de polietileno PE-10 (4-5cm) soldados a segmentos de polietileno PE-50 (12-13cm), previamente preenchidos com solução salina 0,9% e anticoagulante (15 U/mL de heparina em solução salina) e obstruídos com um ocluser.

Após a implantação dos cateteres, os mesmos foram exteriorizados na região dorsal do animal através de um trocarer por via subcutânea e fixados à pele por sutura cirúrgica. Após a cirurgia os animais voltaram ao biotério setorial e foram mantidos em caixas individuais durante todo o período pós-operatório.

4.4.2 Registro Cardiovascular

O registro direto da PA e FC foi realizado 24 horas após o procedimento cirúrgico de implantação dos cateteres, permitindo a recuperação dos animais dos efeitos anestésicos.

A cânula arterial do animal foi acoplada a um transdutor de pressão (MLT0380, ADInstruments) conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (Powerlab, 4/20T, ADInstruments), obtendo-se assim a pressão pulsátil, pressão arterial média (PAM) e FC. Durante o período de registro os animais foram mantidos dentro de caixas individuais em ambiente silencioso.

Após o tratamento com salina, ou com inibidores da NOS ou com vitamina C, os animais cateterizados foram submetidos ao registro basal da PA e FC por uma hora. O registro cardiovascular foi gravado no computador e este foi utilizado posteriormente para a realização da análise espectral da variabilidade da pressão arterial e frequência cardíaca.

4.4.3 Análise da Variabilidade Circulatória

A análise da variabilidade do intervalo de pulso (IP) e pressão arterial sistólica (PAS) no domínio da frequência foi realizada utilizando-se o programa computacional CardioSeries v2.4 (<http://www.danielpenteado.com>) (TEZINI et al., 2013). Uma vez que o programa computacional não realiza aquisição de dados, registros de PA, com no mínimo 10 minutos de duração, foram processados pelo programa computacional LabChart 7.0 (ADInstruments, Bella Vista, Austrália), o qual é capaz de detectar pontos de inflexão nos pulsos de pressão e gerar séries, batimento-a-batimento, com valores de IP e PAS para cada ciclo cardíaco.

As séries temporais, batimento-a-batimento, com valores de IP e PAS foram reamostradas em 10 Hz (1 valor a cada 100 ms) por interpolação cúbica do tipo *spline*, para regularização do intervalo de tempo entre os batimentos. As séries com valores interpolados de IP e PAS foram divididas em segmentos com 512 valores cada, com sobreposição de 50% (Protocolo de Welch). A estacionariedade dos valores de IP e PAS de cada segmento foi examinada visualmente e os segmentos com artefatos ou transientes foram excluídos.

Após a inspeção visual dos segmentos com valores interpolados de IP e PAS, os segmentos considerados adequados foram integrados em bandas de baixa frequência (LF: 0,20 - 0,75 Hz) e alta frequência (HF: 0,75 - 3,00 Hz), e os resultados foram expressos em unidades absolutas (ms^2 ou 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 da banda de muito baixa frequência (VLF: < 0,20 Hz). Para avaliar o balanço simpátovagal cardíaco, calculou-se a razão entre a potência das banda de LF e HF (LF/HF) do espectro do IP.

4.4.4 Análise da Sensibilidade Barorreflexa

A sensibilidade barorreflexa (SBR) foi avaliada no domínio do tempo por meio do Método da Sequência. Utilizando-se o programa computacional CardioSeries v2.4 (<http://www.danielpenteado.com>), séries temporais batimento-a-batimento com valores de IP e PAS foram utilizadas para análise da SBR. As séries temporais foram analisadas em busca de sequências de quatro ou mais batimentos nos quais aumentos progressivos da PAS foram acompanhados por aumentos progressivos do IP, ou reduções progressivas da PAS foram acompanhadas por reduções progressivas do IP. Para detecção das alterações da PAS e do IP foram utilizados os limiares de 0 mmHg e 0 ms, respectivamente. Após detecção de uma rampa de PAS (sequência de quatro ou mais batimentos nos quais aumentos ou reduções progressivas da PAS foram acompanhados, ou não, de aumentos ou reduções do IP), o programa computacional buscava por alterações no IP sem qualquer intervalo, ou seja, *delay* de zero batimentos. Uma sequência barorreflexa só foi utilizada quando o coeficiente de correlação (r) entre os valores de PAS e IP foi maior ou igual a 0,8. A SBR foi determinada a partir da média da inclinação da reta da regressão linear entre os valores de PAS e IP de cada sequência barorreflexa encontrada.

4.5 IMUNOHISTOQUÍMICA DO TECIDO CARDÍACO

O coração dos animais controles e MSG submetidos aos tratamentos foi retirado após eutanásia dos animais com superdose de anestésico e fixado em formalina tamponada 10% para posterior inclusão em blocos de parafina. Em seguida foram realizados cortes do tecido cardíaco de 5 μ m de espessura por microtomia mecânica em lâminas silanizadas. As reações de imunohistoquímica foram realizadas nos cortes utilizando-se o complexo avidina-biotina-peroxidase

(ABC) (kit Dako LSAB®, Alemanha) para marcação de iNOS (BD Biosciences, diluição de 1:300).

As incubações foram realizadas numa câmara úmida. Os cortes foram tratados durante 40 minutos à temperatura ambiente com 2% de BSA e incubadas durante a noite a 4° C com o anticorpo primário (anticorpo policlonal de coelho anti-VEGF diluído 1:50, Sigma). A atividade da peroxidase foi visualizada por tratamento com H₂O₂ e 3 3'- diaminobenzidina (DAB) durante 5 minutos. Os cortes foram então fracamente contrastado com hematoxilina de Harry (Merck). Para cada caso foram realizados controles negativos em cortes seriados. Nos cortes controle, a incubação com os anticorpos primários foram omitidos. A intensidade e localização das imunorreatividades contra os anticorpos primários utilizados foram examinados usando um fotomicroscópio (Leica DM 2500), e os *scores* foram quantificados como descrito por Choudhury et al. (2010).

4.6 DETERMINAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) E ÂNION SUPERÓXIDO (O₂⁻) EM CÉLULAS ENDOTELIAIS ISOLADAS DE AORTA

Aortas foram isoladas de ratos controles e MSG, dissecadas e abertas longitudinalmente. As células endoteliais foram isoladas mecanicamente por suave fricção com uma haste de plástico em placas contendo solução de Hanks. A suspensão celular foi centrifugada a 1000 rpm durante 5 minutos, e o pelete de células foi suspenso em 2,0 ml de solução de Hanks com a seguinte composição (em mM): NaCl 145,0, KCl 5,0, 10,0 dextrose, 10,0 HEPES, pH 7,4. As células endoteliais isoladas da aorta dos animais controles e MSG foram primeiramente aliquoteadas em três grupos: branco, basal e estimulada pela acetilcolina (ACh). A análise citofluorográfica foi realizada usando um Becton-Dickinson FACScanto (San Jose, CA, EUA). O₂⁻ e NO intracelulares foram monitorados separadamente mensurando mudanças na intensidade de fluorescência (IF) emitidos pelas sondas dihidroetidina (DHE) e diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA), respectivamente (KOJIMA et al., 1998; DE IULIIS et al., 2006).

Inicialmente, um primeiro grupo de células endoteliais foi analisado no citômetro de fluxo sem sonda (branco) como controle para assegurar que não havia interferência de fluorescência emitida por algum fluoróforo endógeno. Depois disso, o segundo grupo de células foi incubado apenas com DHE (2,5 mM) ou DAF-

2DA (10 uM) durante 20 minutos (basal). O terceiro grupo de células foi estimulada com ACh (1 uM) durante 10 minutos, respeitando o tempo de incubação (20 minutos) para ambas as sondas. A aquisição foi fixada em 5.000 células e os resultados foram expressos como média \pm EPM de IF.

4.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Alíquotas do plasma foram obtidas pela centrifugação do sangue heparinizado coletado através da cânula arterial dos animais 30 minutos após o término do registro cardiovascular.

4.7.1 Dosagem de Prostaglandina E₂ (PGE₂)

Os níveis de PGE₂ foram quantificados através do método ELISA por competição, utilizando um kit comercial (Cayman Chemical Company) segundo instruções do fabricante. Os dados obtidos foram expressos em pg/mL (PINGE-FILHO et al., 1999).

4.7.2 Avaliação de Estresse Oxidativo no Plasma

4.7.2.1 Avaliação da lipoperoxidação plasmática por reação de quimiluminescência

A lesão lipoperoxidativa induzida por t-butil hidroperóxido foi avaliada por ensaio de quimiluminescência de acordo com Panis et al. (2012). O t-butil hidroperóxido provoca a iniciação da reação com peróxidos pré-existentes, que ao reagirem em cadeia doando elétrons para outro radical peroxil, emitem luz que é lida por quimiluminescência. A lipoperoxidação no plasma foi avaliada pela adição de 125 mL de amostra em 865 uL de tampão de 10 mM de fosfato pH 7,4 (NaCl 0,9%), com adição de 10 mL de solução de t-butil 3 mM. O espectro de quimiluminescência foi monitorado durante 60 minutos pelo luminômetro Glomax (Promega, EUA). O luminômetro foi conectado a um microcomputador através do programa Spreadsheet Interface v1. 0, que realizou o registro da quimiluminescência emitida. Os resultados foram expressos em unidades de luz relativas (URL) e a totalidade da curva obtida foi usada como indicador da lipoperoxidação.

4.7.2.2 Determinação da capacidade antioxidante total (TRAP) no plasma

A técnica mede os níveis de antioxidantes totais, principalmente antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis de baixa massa molecular. O TRAP foi determinado de acordo com Panis et al. (2012), que emprega o 2,2-azo-bis (2-amidinopropano diidroclorido - ABAP) como um gerador de radicais e o luminol para amplificar a detecção de fótons e a emissão de luz por quimiluminescência. As amostras de plasma foram diluídas a 1:10 em tampão de glicina 0,1 M, pH 8,6 a 37°C. A solução ABAP foi obtida dissolvendo 54,24 mg em 1ml de água destilada ultra-pura. Análogo hidrossolúvel da vitamina E (Trolox) foi utilizado como referência antioxidante (2,5 mg em 5 mL de tampão de glicina 0,1 M, pH 8,6, a 37°C) e solução de luminol como amplificador da reação (3,98 mg, em 250 uL de KOH 1 M adicionado a 10 mL de tampão de glicina e diluídos 1:10 em tempo de reação). As curvas de quimiluminescência foram obtidos num luminômetro Glomax (TD 20/20 Turner Designers, EUA) e os resultados expressos como nM de Trolox.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa estatístico "INSTAT" (GraphPad, San Diego, CA). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As comparações entre os grupos controles e experimentais foram analisadas pelo teste Anova One Way, seguido de Newman Keuls post hoc, considerando as diferenças significantes para um valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 PARTE 1 – ENVOLVIMENTO DA VIA CONSTITUTIVA DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES, AUTONÔMICOS E INFLAMATÓRIOS DE RATOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR GLUTAMATO MONOSSÓDICO

5.1.1 Caracterização da Obesidade MSG

O tratamento com MSG durante os cinco primeiros dias de vida em filhotes de ratos Wistar induziu a obesidade em ratos adultos, como indicado por um aumento do índice de Lee e aumento das gorduras retroperitoneal e perigonadal nos animais MSG quando comparados aos animais controle (Tabela 1). Além disso, ratos MSG mostraram um menor peso corporal e CNA que os ratos controle. Estas observações constituem a caracterização da obesidade em ratos MSG. O pré-tratamento farmacológico com inibidor não seletivo da cNOS, L-NAME, modificou alguns desses parâmetros: reduziu o peso corporal e a gordura retroperitoneal apenas nos animais MSG (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeitos da administração de MSG neonatal em ratos adultos pré-tratados com salina ou L-NAME.

	CTR SALINA (n=7)	MSG SALINA (n=8)	CTR L-NAME (n=5)	MSG L-NAME (n=6)
Peso (g)	374 ± 16.17	316 ± 6.94*	384 ± 16.69	281 ± 15.95*#
Comprimento naso-anal (cm)	23 ± 0.39	21 ± 0.32*	24 ± 0.25	20 ± 0.48*
Índice de Lee	0.31 ± 0.004	0.33 ± 0.005*	0.30 ± 0.001	0.32 ± 0.003*
Gordura Perigonadal (g)	3.24 ± 0.42	6.36 ± 0.81*	2.92 ± 0.50	4.38 ± 0.57*
Gordura Retroperitoneal (g)	3.60 ± 0.46	7.08 ± 0.51*	3.06 ± 0.69	5.09 ± 0.51*#

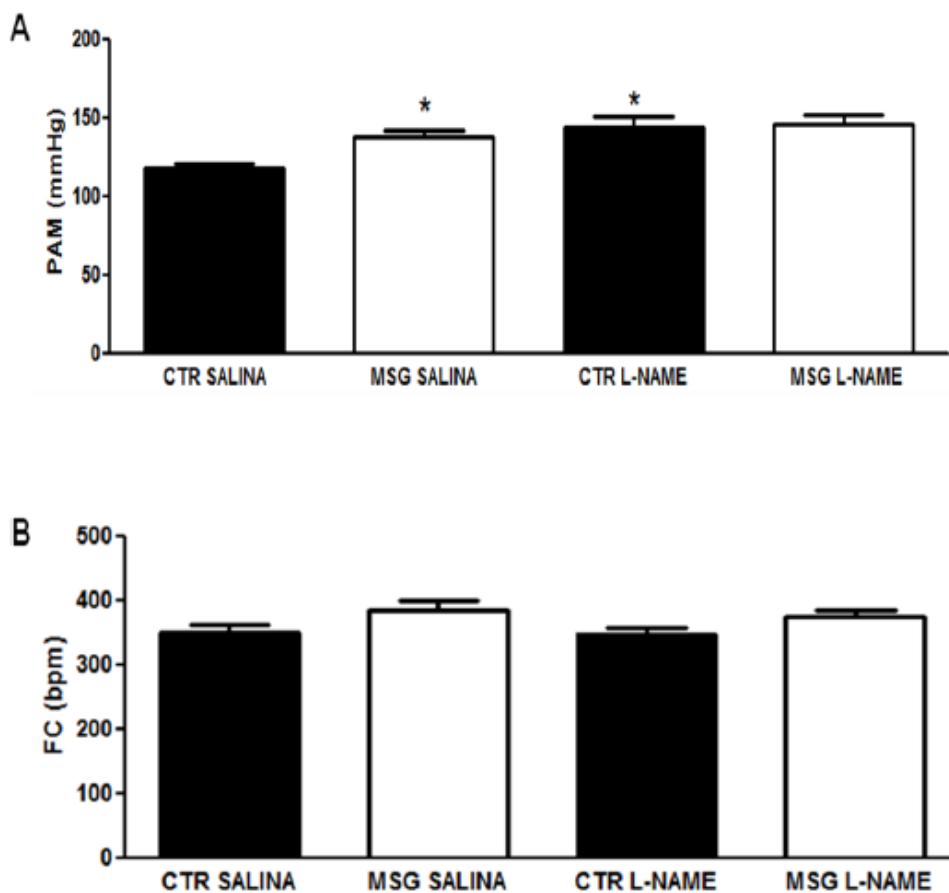
5.1.2 Parâmetros Cardiovasculares

5.1.2.1 Pressão arterial e frequência cardíaca

Os valores de referência para a PAM e FC para cada grupo foram obtidos como o valor médio do período de registro basal de pelo menos 30 minutos para cada animal. Os dados confirmam que animais MSG são hipertensos comparados com animais controles ($CTR_{salina} = 118 \pm 2$ mmHg, $n = 7$; $MSG_{salina} = 138 \pm 4$ mmHg, $n = 8$, $p < 0,05$), sem mudança na FC ($CTR_{salina} = 350 \pm 12$ bpm; $MSG_{salina} = 384 \pm 15$ bpm).

Como mostrado na figura 1, o pré-tratamento com L-NAME aumentou a PAM somente nos animais controles ($CTR_{L-NAME} = 144 \pm 7$ mmHg, $n = 5$, $MSG_{L-NAME} = 145 \pm 6$ mmHg, $n = 6$, $p < 0,001$).

Figura 1 – Efeitos da obesidade MSG sobre a pressão arterial média (PAM) (A) e frequência cardíaca (FC) (B) em ratos acordados tratados ou não com L-NAME. CTR (controle); MSG (obesos MSG). * $p < 0,05$ vs. CTR salina.



5.1.2.2 Análise espectral do intervalo de pulso e pressão arterial sistólica

A figura 2A mostra que nenhuma diferença estatística foi encontrada na análise PAS entre ratos controles e obesos. Nas figuras 3C, 3E e 3F, observam-se que, na análise do IP, animais MSG apresentaram um aumento da unidade LF normalizada ($CTR_{salina} = 24 \pm 4$ un, $n = 7$; $MSG_{salina} = 40 \pm 4$ un, $n = 8$, $p < 0,05$) e uma diminuição da unidade HF normalizada ($CTR_{salina} = 76 \pm 4$ un; $MSG_{salina} = 61 \pm 4$ un, $p < 0,05$), além de um aumento na razão LF/HF ($CTR_{salina} = 0,35 \pm 0,08$; $MSG_{salina} = 0,81 \pm 0,16$, $p < 0,05$). Esses dados confirmam que animais obesos MSG apresentam um aumento na modulação cardíaca simpática e diminuição parassimpática (DA CUNHA et al., 2011).

O pré-tratamento com L-NAME não modificou nenhum dos parâmetros analisados na variabilidade do IP e PAS no domínio da frequência.

Figura 2 – Parâmetros espectrais da pressão arterial sistólica (PAS) de ratos controle (CTR) e obesos MSG (MSG) tratados previamente com solução salina ou L-NAME. A = gráfico de barras representando a variância total da PAS, B = banda de baixa frequência (LF) e C = banda de alta frequência (HF).

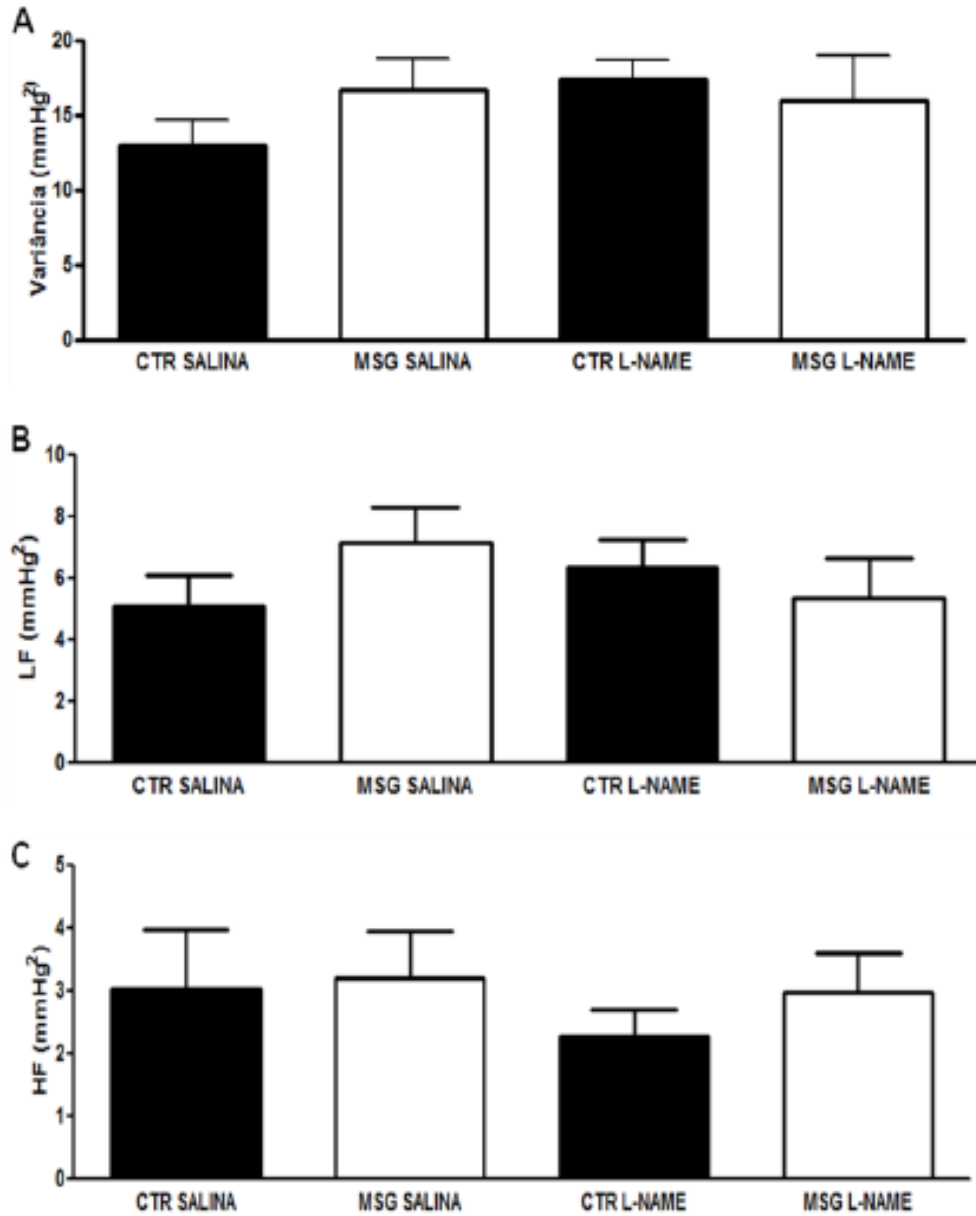
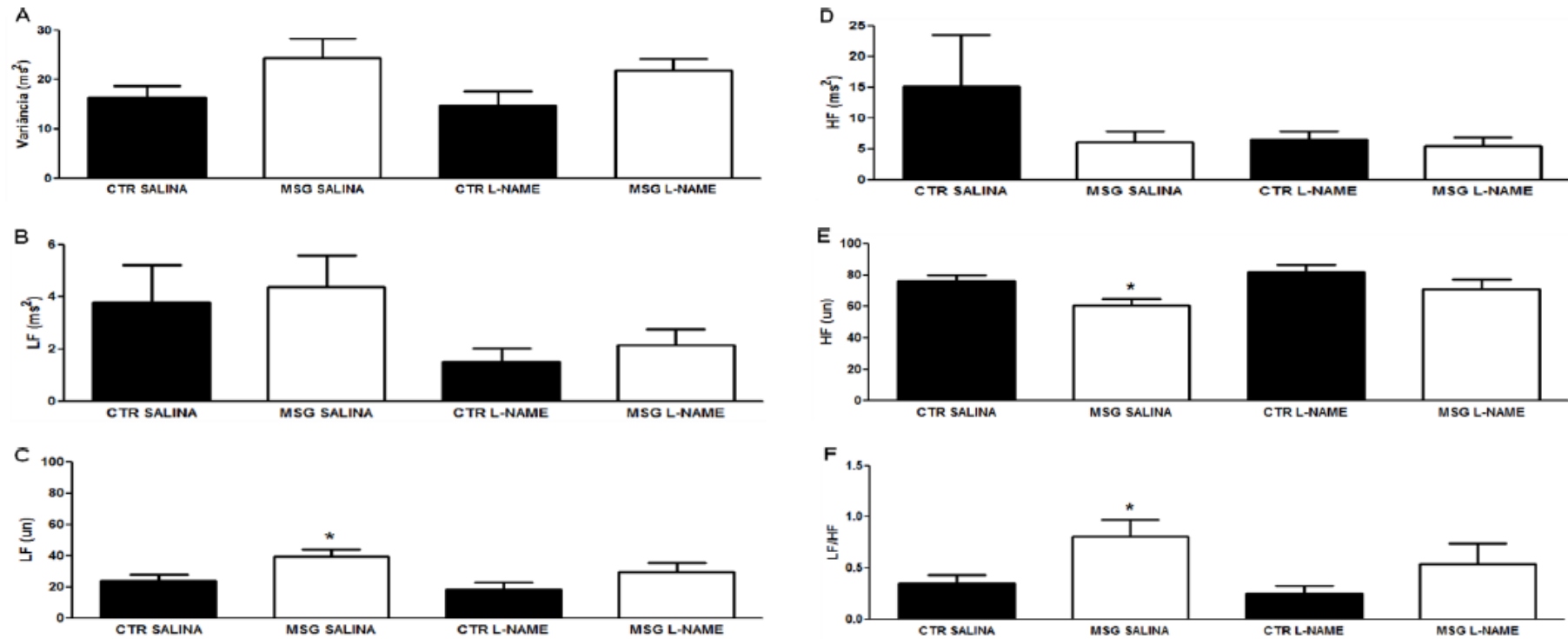


Figura 3 – Parâmetros espectrais do intervalo de pulso (IP) de ratos controles (CTR) e obesos MSG (MSG) tratados previamente com solução salina ou L-NAME. A = gráfico de barras representando a variância total do IP, B = banda de baixa frequência (LF) em unidade absoluta, C = banda de baixa frequência (LF) em unidade normalizada, D = banda alta frequência (HF) em unidade absoluta, E = banda alta frequência (HF) em unidade normalizada e F = razão LF/HF. * $p < 0,05$ vs. CTR salina.



5.1.2.3 Análise da sensibilidade barorreflexa

A Tabela 2 lista a sensibilidade barorreflexa espontânea de animais controles e obesos MSG tratados ou não com L-NAME. Os resultados mostram que não houve nenhuma diferença estatística entre os grupos.

Tabela 2 – Sensibilidade barorreflexa de animais controles e obesos MSG tratados ou não com L-NAME.

	CTR SALINA (n=7)	MSG SALINA (n=8)	CTR L-NAME (n=5)	MSG L-NAME (n=6)
Ganho (ms/mmHg)	1.32 ± 0.2	1.06 ± 0.1	1.1 ± 0.2	0.85 ± 0.1

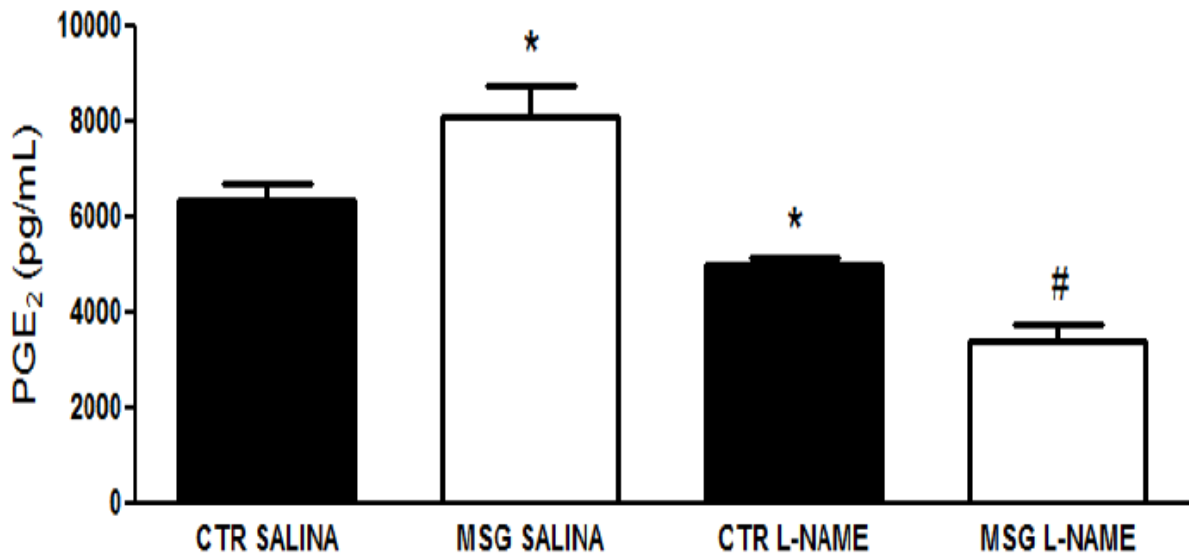
CTR (controle); MSG (obesos MSG). Valores expressos como média ± EPM.

5.1.3 Análises Bioquímicas

5.1.3.1 Níveis de prostaglandinas plasmáticas (PGE₂)

Os níveis plasmáticos de prostaglandinas foram avaliados nos animais controles e obesos MSG pré-tratados com solução salina ou L-NAME. Ratos obesos MSG (8123 ± 646 pg/mL, n = 6) apresentaram um aumento nos níveis plasmáticos de PGE₂ comparado com ratos controles (6367 ± 327 pg/mL, n = 7, p<0,05) (Figura 4). O pré-tratamento com o inibidor não seletivo da cNOS, L-NAME, atenuou os níveis de PGE₂ nos dois grupos, porém a diminuição nos animais MSG foi maior (CTR_{L-NAME} = 4984 ± 194 pg/mL, n = 5; MSG_{L-NAME} = 3410 ± 328 pg/mL, n = 6, p<0,05).

Figura 4 – Níveis plasmáticos de prostaglandinas (PGE₂) em animais controles (CTR) e obesos MSG (MSG) tratados com solução salina ou L-NAME. * $p < 0,05$ vs. CTR salina; # $p < 0,05$ vs. MSG salina.

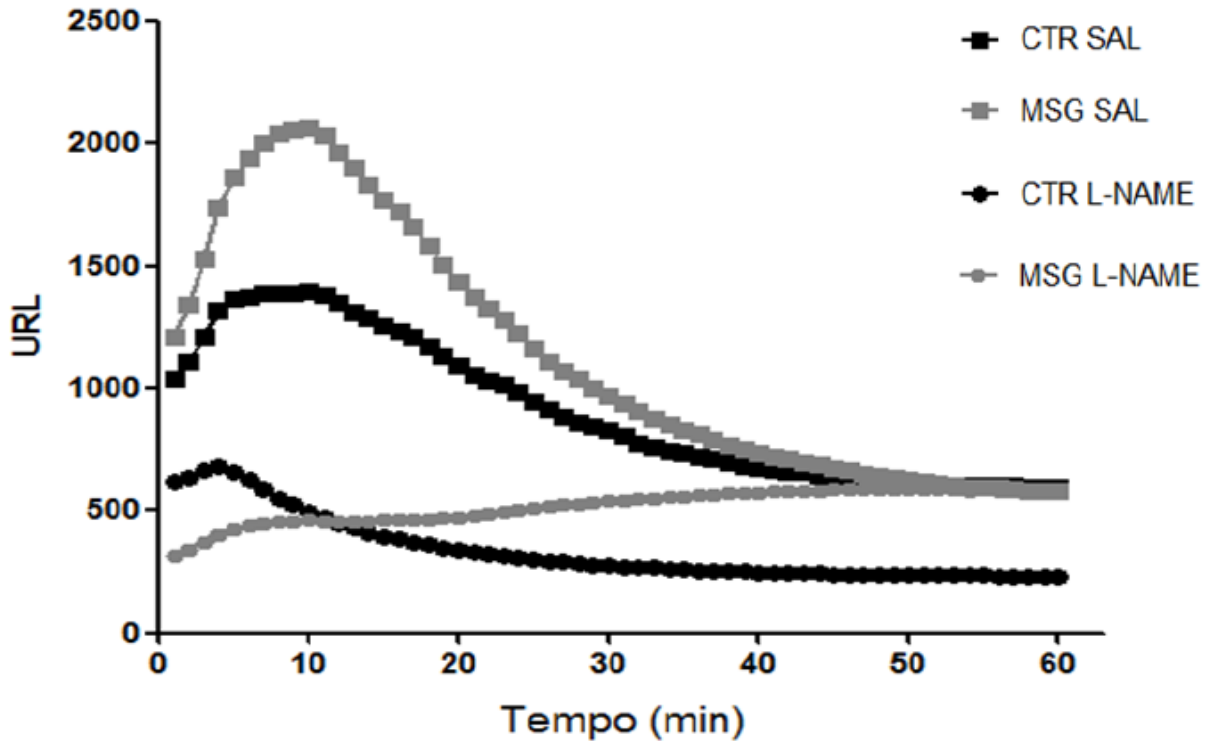


5.1.3.2 Avaliação de estresse oxidativo no plasma

5.1.3.2.1 Avaliação da lipoperoxidação plasmática por reação de quimiluminescência

A análise dos níveis plasmáticos de lipoperoxidação mostrou que ratos com obesidade induzida por MSG apresentaram maiores níveis de peroxidação lipídica em comparação com ratos controles, e que o pré-tratamento com L-NAME atenuou este parâmetro em ambos os grupos (Figura 5).

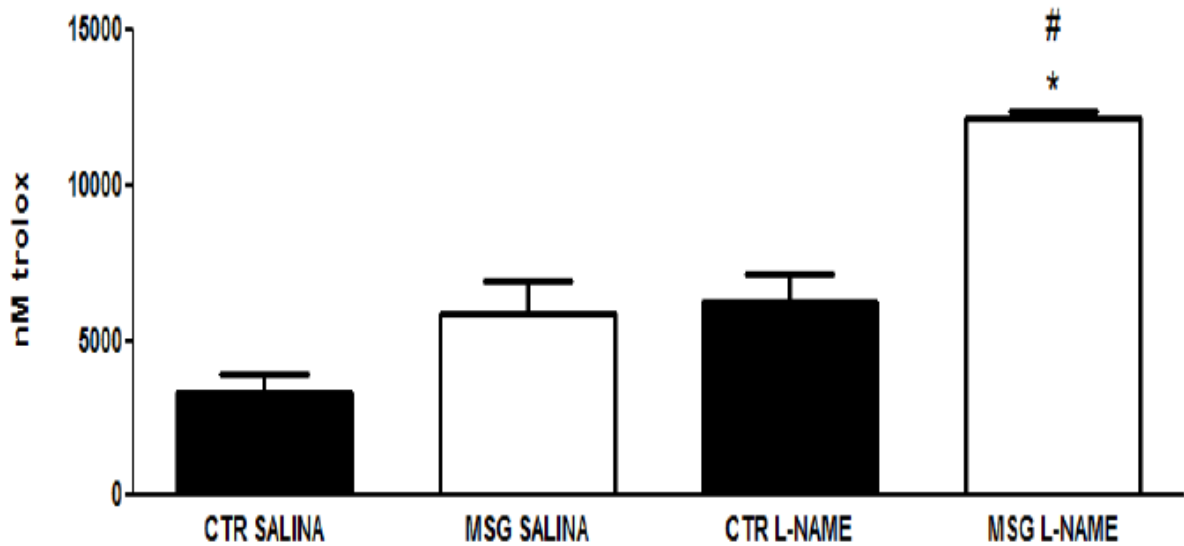
Figura 5 – Curvas representativas da lipoperoxidação plasmática de ratos controles (CTR) e obesos (MSG) tratados previamente com solução salina (SAL) ou L-NAME.



5.1.3.2.2 Determinação da capacidade antioxidante total (TRAP) no plasma

A Figura 6 mostra que não houve diferença estatística entre animais controle e obesos MSG na capacidade antioxidante total do plasma (CTR salina = 3282 ± 621 nM Trolox, $n = 5$; MSG salina = 5845 ± 1030 nM Trolox, $n = 5$). Foi observado um aumento significativo desse parâmetro apenas nos animais obesos MSG após o pré-tratamento com L-NAME (MSG L-NAME = 12196 ± 197 nM Trolox, $n = 5$; $p < 0,001$).

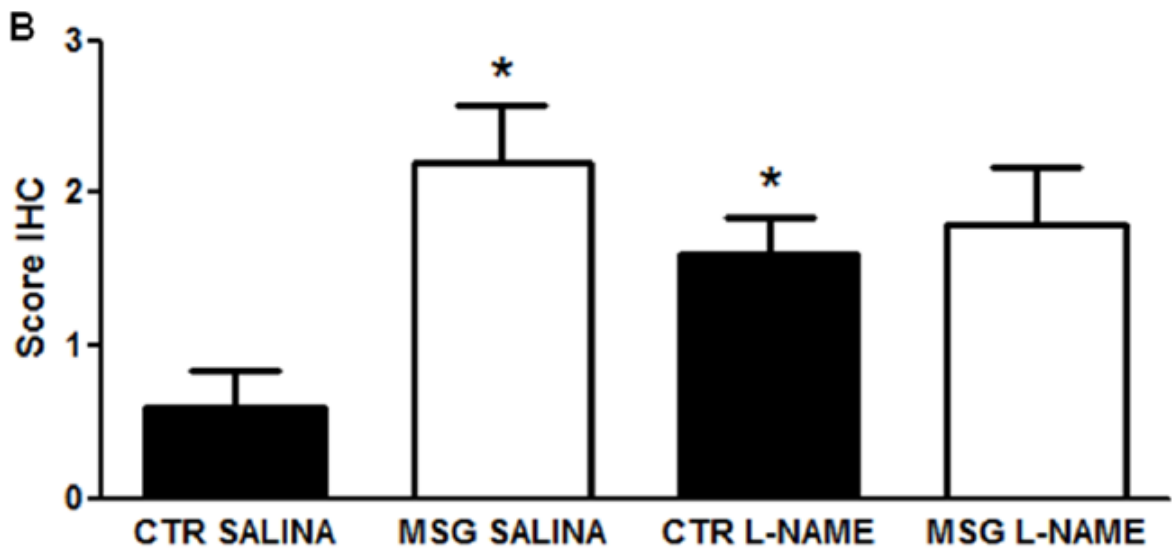
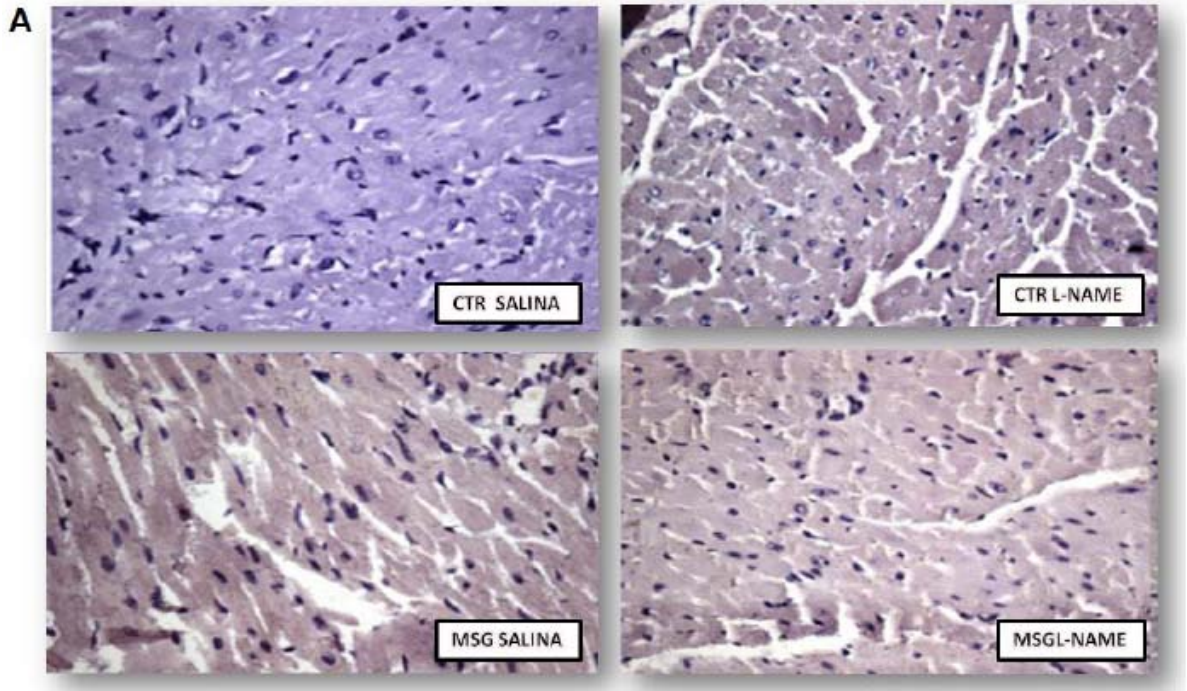
Figura 6 – Capacidade antioxidante total plasmática (TRAP) de ratos controle (CTR) e obesos MSG (MSG)) tratados previamente com solução salina ou L-NAME. * $p < 0,05$ vs. CTR salina; # $p < 0,05$ vs. MSG salina.



5.1.4 Marcação Imunohistoquímica de iNOS no Tecido Cardíaco

A marcação imunohistoquímica de iNOS no tecido cardíaco mostrou um padrão semelhante ao observado no plasma para lipoperoxidação, na qual os ratos com obesidade induzida por MSG apresentou maior *score* para marcação de iNOS. O tratamento com L-NAME aumentou a marcação apenas nos animais controles, sem nenhuma alteração nos animais obesos MSG (Figura 7).

Figura 7 – Imunohistoquímica para a iNOS no tecido cardíaco (A) e o score para marcação da imunohistoquímica (IHC) para iNOS (B) de ratos controle (CTR) e obesos MSG (MSG) tratados previamente com solução salina ou L-NAME. * $p < 0,05$ vs. CTR salina.

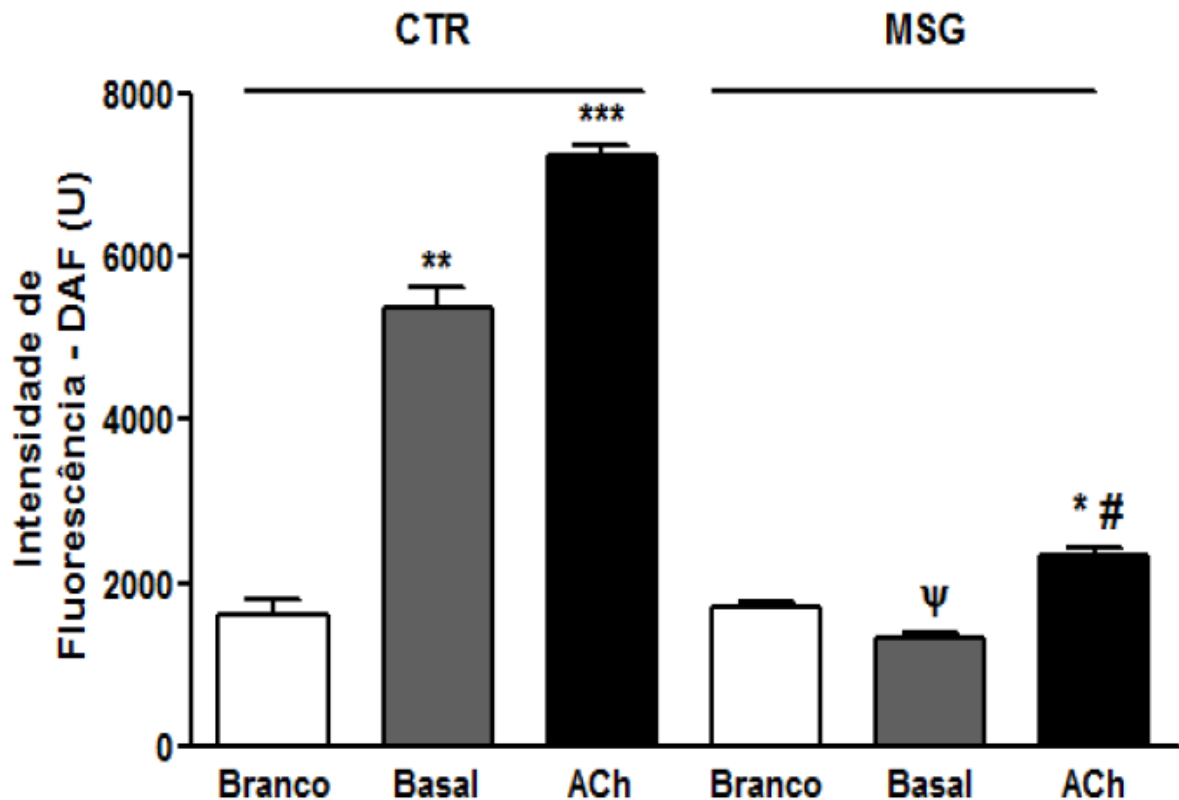


5.1.5 Produção de Óxido Nítrico e Ânion Superóxido em Células Endoteliais Isoladas de Aorta

A produção basal de NO em células endoteliais da aorta de ratos controle ($5362,0 \pm 256,5$ IF, $n = 5$) foi maior do que em ratos MSG (1324 ± 46 IF, $n = 4$, $p < 0,001$) (Figura 8). Nas células endoteliais, no estado basal, houve um aumento

da produção de NO pelo estímulo ACh tanto em ratos controle como MSG (CTR = 7260 ± 98 IF; MSG: 2331 ± 98 IF, $p < 0,001$). No entanto, a produção de NO após o estímulo com a ACh manteve-se maior nos animais controles em comparação com os obesos MSG.

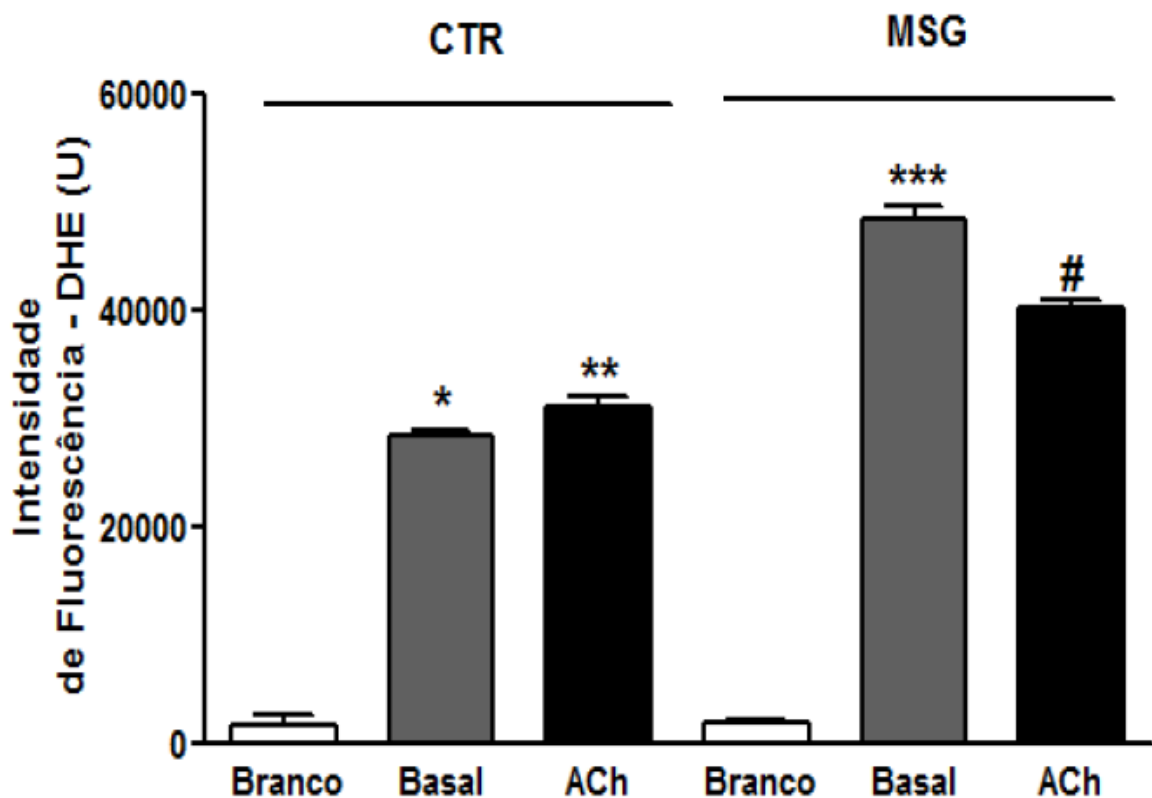
Figura 8 – Intensidade de fluorescência (IF) emitida pela sonda sensível ao NO (DAF-2DA) em condições basal e estimulada com acetilcolina (ACh) em ratos controle (CTR) e obesos MSG (MSG). (*) diferença entre ACh e Basal para MSG – $p < 0,01$; (**) diferença entre Basal e Branco para CTR – $p < 0,001$; (***) diferença entre ACh e Basal para CTR – $p < 0,001$; (#) diferença entre ACh de MSG e CTR - $p < 0,001$; (ψ) diferença entre Basal de MSG e CTR - $p < 0,001$.



A produção basal de O_2^- foi maior nas células endoteliais da aorta de ratos MSG (48544 ± 1225 , $n = 4$, $p < 0,001$) comparada com ratos controle CTR (28357 ± 461 , $n = 5$) (Figura 9). Contudo, a produção de O_2^- foi aumentada após estímulo com ACh nos animais controles, enquanto que em ratos obesos MSG, essa produção foi reduzida quando comparada com o respectivo valor basal. Embora o estímulo com ACh tenha reduzido a produção de O_2^- pelas células endoteliais da aorta dos animais MSG, estes níveis permaneceram maiores nesses animais

($40225,2 \pm 634,0$, $p < 0,001$) em comparação com os animais controles (31090 ± 1030).

Figura 9 – Intensidade de fluorescência (IF) emitida pela sonda sensível à EROs (DHE) em condições basal e estimulada com acetilcolina (ACh) em ratos controle (CTR) e obesos MSG (MSG). (*) diferença entre Basal e Branco para CTR - $p < 0,001$; (**) diferença entre ACh e Basal para CTR - $p < 0,05$; (***) diferença entre Basal de MSG e CTR - $p < 0,001$; (#) diferença entre ACh de MSG e CTR, ACh e Basal para MSG - $p < 0,001$.



5.2 PARTE 2 – ENVOLVIMENTO DA VIA INDUZIDA DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES, AUTONÔMICOS E INFLAMATÓRIOS DE RATOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR GLUTAMATO MONOSSÓDICO

5.2.1 Caracterização da Obesidade MSG

Nenhuma das características que assinalam a obesidade em ratos MSG já mostradas na Tabela 1 foi alterada pelo pré-tratamento com aminoguanidina (Tabela 3), a não ser o fato de que nos animais obesos tratados o peso corporal não é mais diferente quando comparado ao seu controle.

Tabela 3 – Efeitos da administração de MSG neonatal em ratos adultos pré-tratados com salina ou aminoguanidina.

	CTR SALINA (n=7)	MSG SALINA (n=8)	CTR AMINO (n=9)	MSG AMINO (n=7)
Peso (g)	374 ± 16.17	316 ± 6.94*	359 ± 12.11	344 ± 8.96
Comprimento naso-anal (cm)	23 ± 0.39	21 ± 0.32*	23 ± 0.30	21 ± 0.32*
Índice de Lee	0.31 ± 0.004	0.33 ± 0.005*	0.31 ± 0.002	0.33 ± 0.004*
Gordura Perigonadal (g)	3.24 ± 0.42	6.36 ± 0.81*	2.11 ± 0.18	6.94 ± 0.79*
Gordura Retroperitoneal (g)	3.60 ± 0.46	7.08 ± 0.51*	2.07 ± 0.20	6.63 ± 0.58*

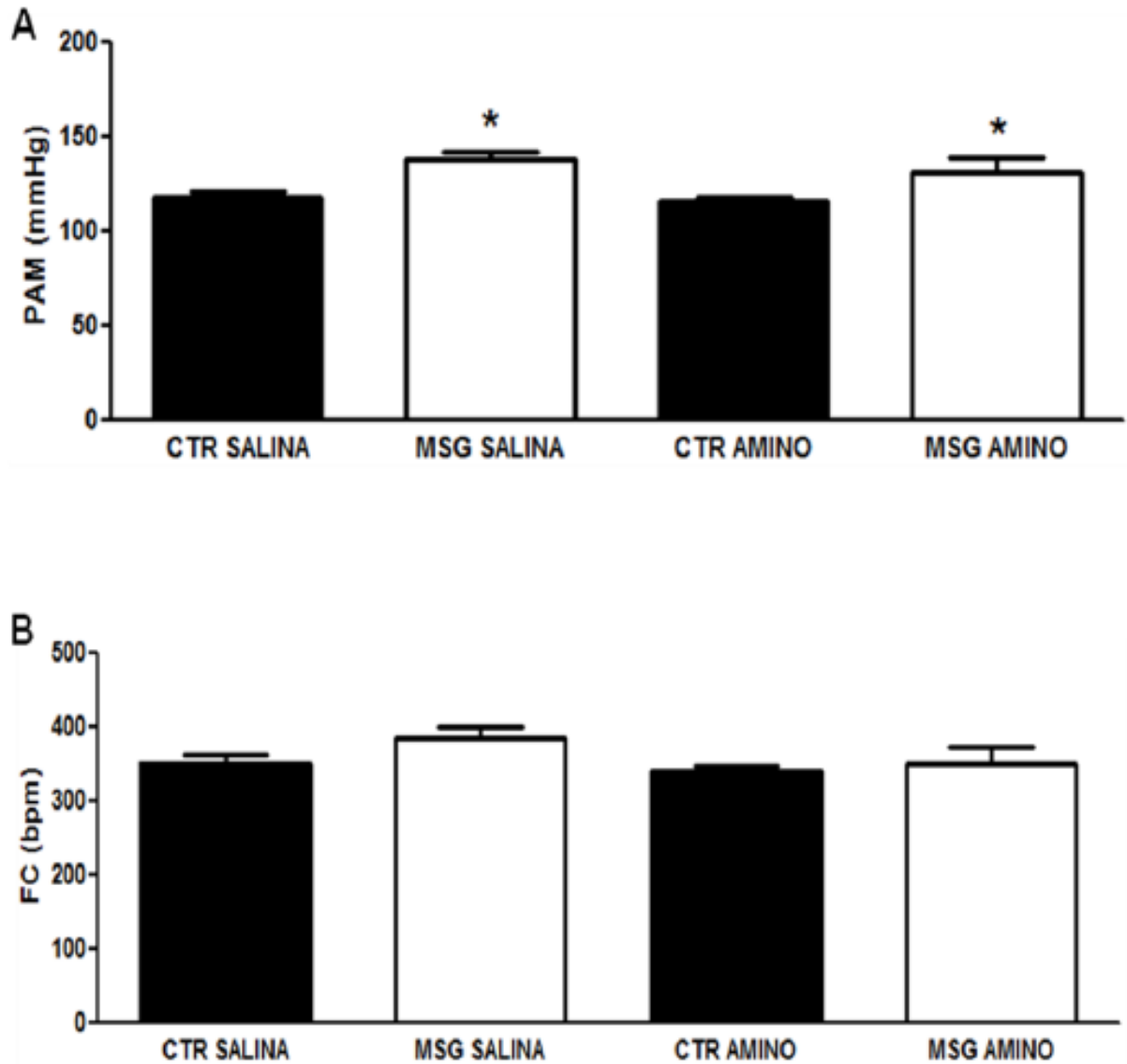
CTR (controle); MSG (obesos MSG). Valores expressos como média ± EPM; * $p < 0,05$ vs. CTR salina.

5.2.2 Parâmetros Cardiovasculares

5.2.2.1 Pressão arterial e frequência cardíaca

Valores basais de PA e FC observada nos animais obesos MSG mostrada na Figura 1 não foram alterados com o pré-tratamento com aminoguanidina (CTR_{amino} = 116 ± 2 mmHg, n = 9; MSG_{amino} = 131 ± 7 mmHg, n = 7) (Figura 10).

Figura 10 – Efeitos da obesidade MSG sobre a pressão arterial média (PAM) (A) e frequência cardíaca (FC) (B) em ratos acordados tratados ou não com aminoguanidina (AMINO). CTR (controle); MSG (obesos MSG). * $p < 0,05$ vs. CTR salina.



5.2.2.2 Análise espectral do intervalo de pulso e pressão arterial sistólica

O *drive* cardíaco simpático aumentado e parassimpático diminuído observado nos animais obesos MSG pela análise do IP (Figura 3) foram modificados pelo pré-tratamento com aminoguanidina. O tratamento resultou numa diminuição da unidade LF normalizada (MSG_{amino} = 19 ± 6 un, $n = 7$, $p < 0,05$), aumento da unidade HF normalizada (MSG_{amino} = 81 ± 6 un, $p < 0,05$) e diminuição da razão LF/HF (MSG

amino = $0,31 \pm 0,14$, $p < 0,05$) (Figuras 12C, 12E e 12F). Nenhuma diferença estatística foi encontrada na PAS após o tratamento (Figura 11).

Figura 11 – Parâmetros espectrais da pressão arterial sistólica (PAS) de ratos controles (CTR) e obesos MSG (MSG) tratados previamente com solução salina ou aminoguanidina (AMINO). A = gráfico de barras representando a variância total da PAS, B = banda de baixa frequência (LF) e C = banda de alta frequência (HF).

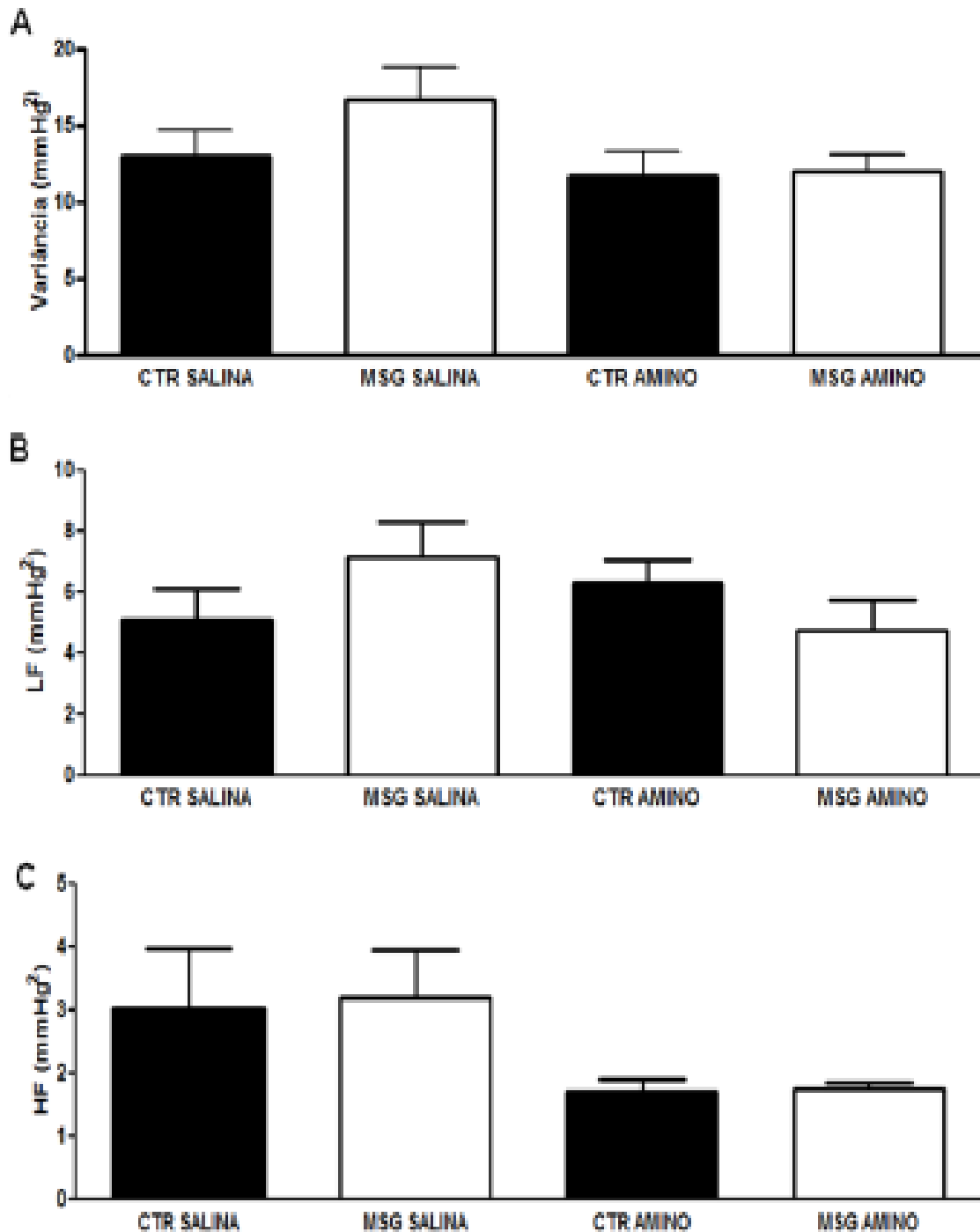
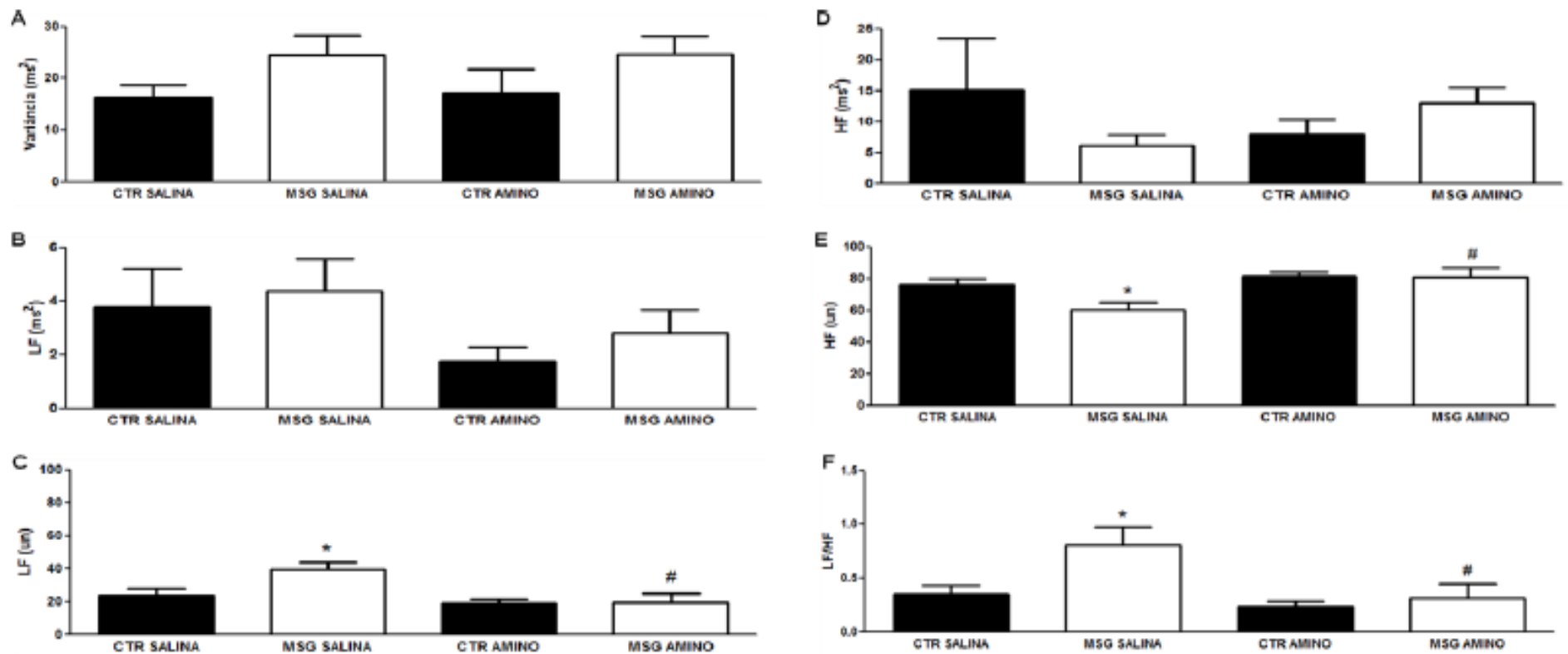


Figura 12 – Parâmetros espectrais do intervalo de pulso (IP) de ratos controles (CTR) e obesos MSG (MSG) tratados previamente com solução salina ou aminoguanidina (AMINO). A = gráfico de barras representando a variância total do IP, B = banda de baixa frequência (LF) em unidade absoluta, C = banda de baixa frequência (LF) em unidade normalizada, D = banda alta frequência (HF) em unidade absoluta, E = banda alta frequência (HF) em unidade normalizada e F = razão LF/HF. * $p < 0,05$ vs. CTR salina; # $p < 0,05$ vs. MSG salina.



5.2.2.3 Análise da sensibilidade barorreflexa

A Tabela 4 mostra que a sensibilidade barorreflexa espontânea de animais controle e obesos MSG também não foi modificada pelo pré-tratamento com inibidor da iNOS.

Tabela 4 – Sensibilidade barorreflexa de animais controles e obesos MSG tratados ou não com aminoguanidina.

	CTR SALINA (n=7)	MSG SALINA (n=8)	CTR AMINO (n=9)	MSG AMINO (n=7)
Ganho (ms/mmHg)	1.32 ± 0.2	1.06 ± 0.1	1.45 ± 0.3	1.74 ± 0.2

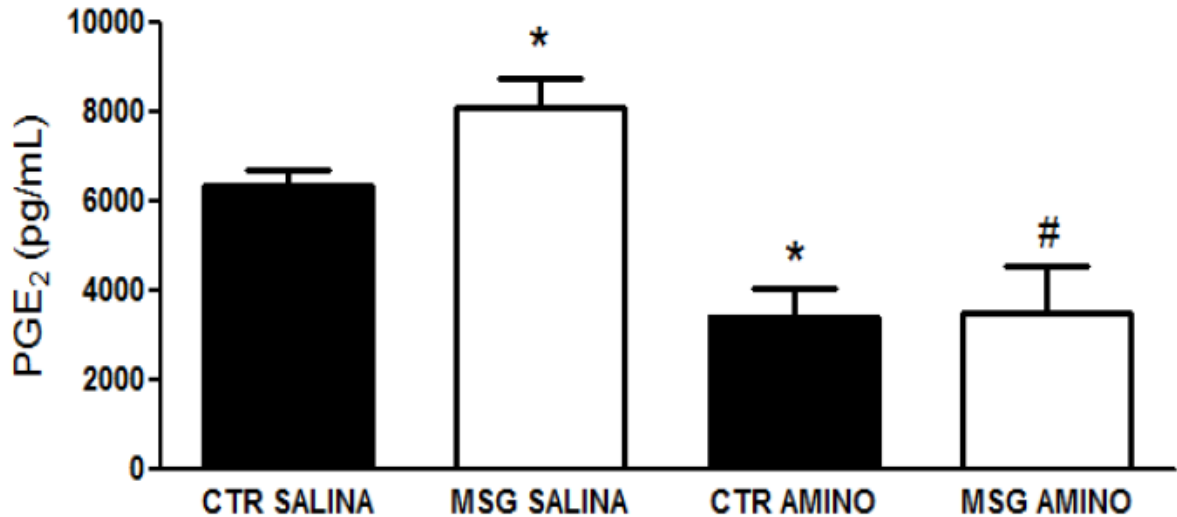
CTR (controle); MSG (obesos MSG). Valores expressos como média ± EPM.

5.2.3 Análises Bioquímicas

5.2.3.1 Níveis de prostaglandinas plasmáticas (PGE₂)

A Figura 13 mostra que o pré-tratamento com aminoguanidina, assim como L-NAME, atenuou os níveis de PGE₂ nos dois grupos, porém a diminuição nos animais MSG foi maior (CTR_{AMINO} = 3428 ± 628 pg/mL, n = 8; MSG_{amino} = 3506 ± 1046 pg/mL, n = 7, p<0,05).

Figura 13 – Níveis plasmáticos de prostaglandinas (PGE₂) em animais controles (CTR) e obesos MSG (MSG) tratados com solução salina ou aminoguanidina (AMINO). * $p < 0,05$ vs. CTR salina; # $p < 0,05$ vs. MSG salina.

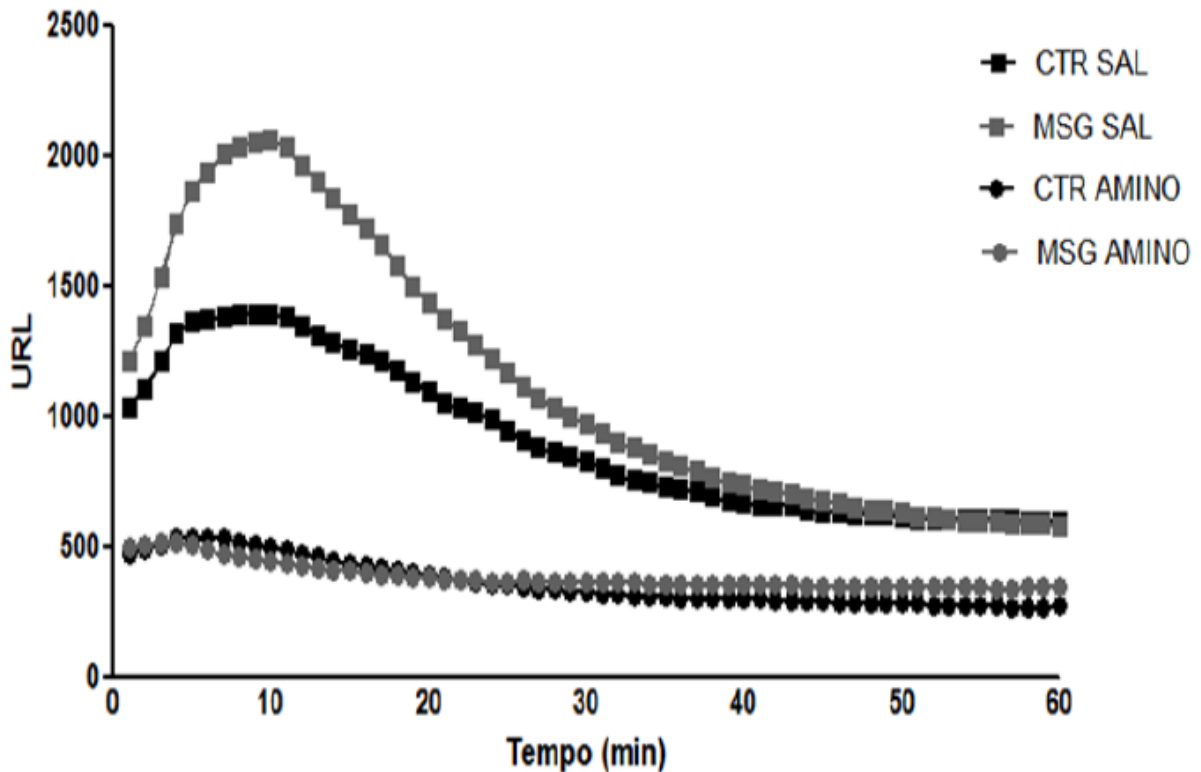


5.2.3.2 Avaliação de estresse oxidativo e capacidade antioxidante no plasma

5.2.3.2.1 Avaliação da lipoperoxidação plasmática por reação de quimiluminescência

A análise dos níveis plasmáticos de lipoperoxidação mostrou que ratos com obesidade induzida por MSG apresentaram maiores níveis de peroxidação lipídica em comparação com ratos controles, e que o pré-tratamento com aminoguanidina também atenuou este parâmetro em ambos os grupos (Figura 14).

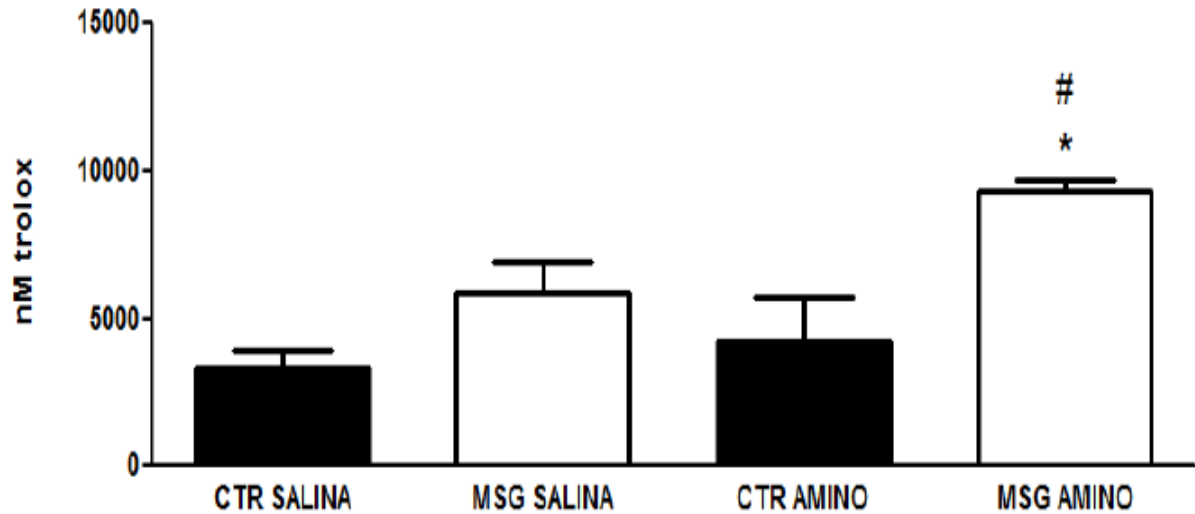
Figura 14 – Curvas representativas da lipoperoxidação plasmática de ratos controles (CTR) e obesos MSG (MSG) tratados previamente com solução salina (SAL) ou aminoguanidina (AMINO).



5.2.3.2.2 Determinação da capacidade antioxidante total (TRAP) no plasma

A Figura 15 mostra que, assim como o pré-tratamento com L-NAME (Figura 6), o pré-tratamento com aminoguanidina aumentou significativamente o TRAP apenas nos animais obesos MSG ($MSG_{AMINO} = 9343 \pm 378$ nM Trolox, $n = 5$; $p < 0,001$).

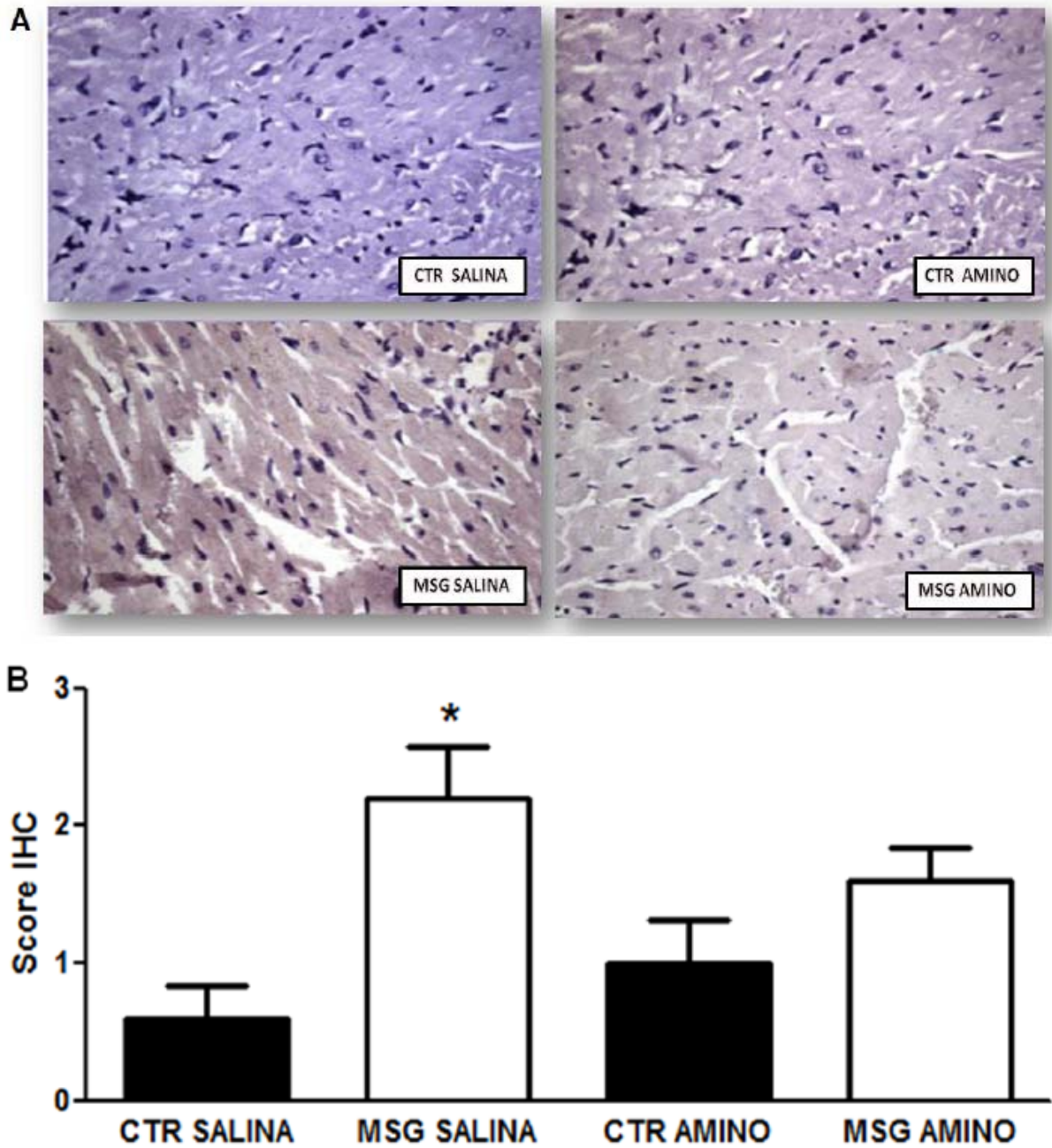
Figura 15 – Capacidade antioxidante total plasmática (TRAP) de ratos controles (CTR) e obesos MSG (MSG) tratados previamente com solução salina ou aminoguanidina (AMINO). * $p < 0,05$ vs. grupo controle salina; # $p < 0,05$ vs. MSG salina.



5.2.4 Marcação Imunohistoquímica de iNOS no Tecido Cardíaco

A figura 16 mostra que após o pré-tratamento com aminoguanidina, a diferença encontrada entre a marcação imunohistoquímica de iNOS no tecido cardíaco de animais controles e obesos MSG não aparecem mais.

Figura 16 – Imunohistoquímica para a iNOS no tecido cardíaco (A) e o score para marcação da imunohistoquímica (IHC) para iNOS (B) de ratos controles (CTR) e obesos MSG (MSG) tratados previamente com solução salina ou aminoguanidina (AMINO). * $p < 0,05$ vs. CTR salina.



5.3 PARTE 3 – EFEITO DO TRATAMENTO ANTIOXIDANTE SOBRE OS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES, AUTONÔMICOS E INFLAMATÓRIOS DE RATOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR GLUTAMATO MONOSSÓDICO

5.3.1 Caracterização da Obesidade MSG

Os filhotes de ratos Wistar que receberam o tratamento com MSG durante os cinco primeiros dias desenvolveram a obesidade quando adultos, como indicado por um aumento do índice de Lee, aumento das gorduras retroperitoneal e perigonadal e menor CNA quando comparados aos animais controle. O pré-tratamento com vitamina C não modificou nenhum desses parâmetros. (Tabela 5).

Tabela 5 – Efeitos da administração de MSG neonatal em ratos adultos pré-tratados com água destilada ou antioxidante.

	CTR ÁGUA (n=5)	MSG ÁGUA (n=5)	CTR VIT C (n=5)	MSG VIT C (n=8)
Peso (g)	354 ± 13.54	312 ± 13.06*	330 ± 4.05	310 ± 6.88*
Comprimento naso-anal (cm)	24 ± 0.34	22 ± 0.19*	24 ± 0.10	22 ± 0.30*
Índice de Lee	0.29 ± 0.005	0.31 ± 0.004*	0.29 ± 0.001	0.31 ± 0.004*
Gordura Perigonadal (g)	3.23 ± 0.36	4.79 ± 0.19*	2.58 ± 0.22	5.59 ± 0.40*
Gordura Retroperitoneal (g)	3.96 ± 0.82	6.74 ± 0.83*	2.95 ± 0.58	6.15 ± 0.41*

CTR (controle); MSG (obesos MSG). Valores expressos como média ± EPM; * $p < 0,05$ vs. CTR salina;

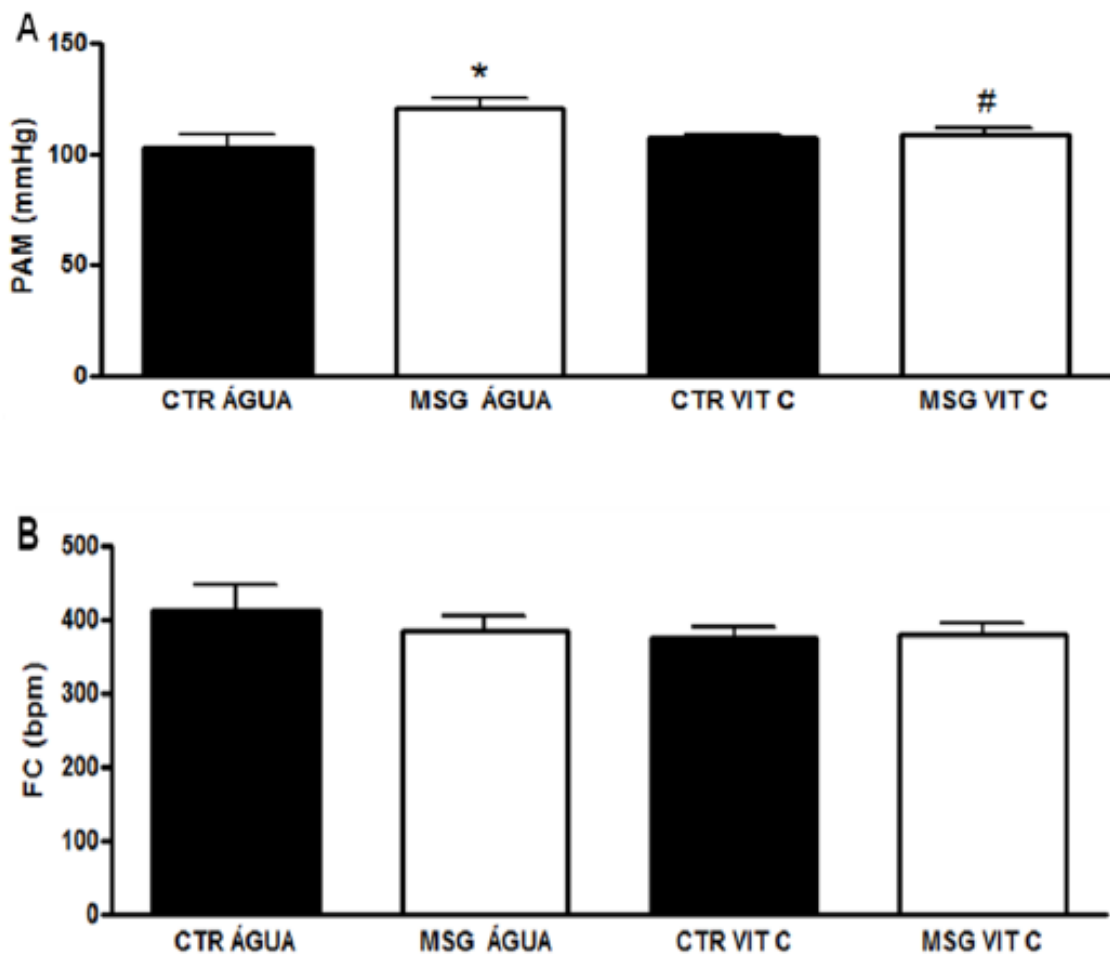
5.3.2 Parâmetros Cardiovasculares

5.3.2.1 Pressão arterial e frequência cardíaca

Os resultados de PAM e FC obtidos como média do registro basal confirmam que animais MSG são hipertensos comparados com animais controle (CTR $\text{águ}\text{a}$ = 103 ± 6 mmHg, n = 5; MSG $\text{águ}\text{a}$ = 121 ± 4 mmHg, n = 5, $p < 0,05$), sem mudança na FC (CTR $\text{águ}\text{a}$ = 412 ± 35 bpm; MSG $\text{águ}\text{a}$ = 385 ± 20 bpm).

O pré-tratamento com vitamina C atenuou a PAM apenas no grupo MSG (CTR vit C = 107 ± 2 mmHg, n = 5; MSG vit C = 109 ± 3 mmHg, n = 8; $p < 0,05$), sem alteração na FC (CTR vit C = 375 ± 17 bpm; MSG vit C : 381 ± 14 mmHg) (Figura 17).

Figura 17 – Efeitos da obesidade MSG sobre a pressão arterial média (PAM) (A) e frequência cardíaca (FC) (B) em ratos acordados tratados ou não com vitamina C (vit C). CTR (controle); MSG (obesos MSG). * $p < 0,05$ vs. CTR $\text{águ}\text{a}$; # $p < 0,05$ vs. MSG $\text{águ}\text{a}$.



5.3.2.2 Análise espectral do intervalo de pulso e pressão arterial sistólica

A figura 18A confirma que não houve nenhuma diferença estatística na análise da PAS entre ratos controles e obesos e as figuras 19C, 19E e 19F confirmam que, na análise do IP, animais MSG apresentaram um aumento da unidade LF normalizada ($CTR_{\text{água}} = 24 \pm 4 \text{ un}$, $n = 5$; $MSG_{\text{água}} = 49 \pm 6 \text{ un}$, $n = 5$, $p < 0,05$) e uma diminuição na unidade HF normalizada ($CTR_{\text{água}} = 76 \pm 4 \text{ un}$; $MSG_{\text{água}} = 51 \pm 6 \text{ un}$, $p < 0,05$), além de um aumento na razão LF/HF ($CTR_{\text{água}} = 0,34 \pm 0,06$; $MSG_{\text{água}} = 1 \pm 0,26$, $p < 0,05$).

O pré-tratamento com vitamina C, apenas nos animais MSG, resultou na diminuição da unidade LF normalizada ($MSG_{\text{vit C}} = 26 \pm 4 \text{ un}$, $n = 8$, $p < 0,05$) aumento da unidade HF normalizada ($MSG_{\text{vit C}} = 74 \pm 4 \text{ un}$, $p < 0,05$) e diminuição da razão LF/HF ($MSG_{\text{vit C}} = 0,4 \pm 0,08$, $p < 0,05$) na análise do IP (Figuras 19C, 19E e 19F).

Figura 18 – Parâmetros espectrais da pressão arterial sistólica (PAS) de ratos controles (CTR) e obesos MSG (MSG) tratados previamente com água destilada ou vitamina C (vit C). A = gráfico de barras representando a variância total da PAS, B = banda de baixa frequência (LF) e C = banda de alta frequência (HF).

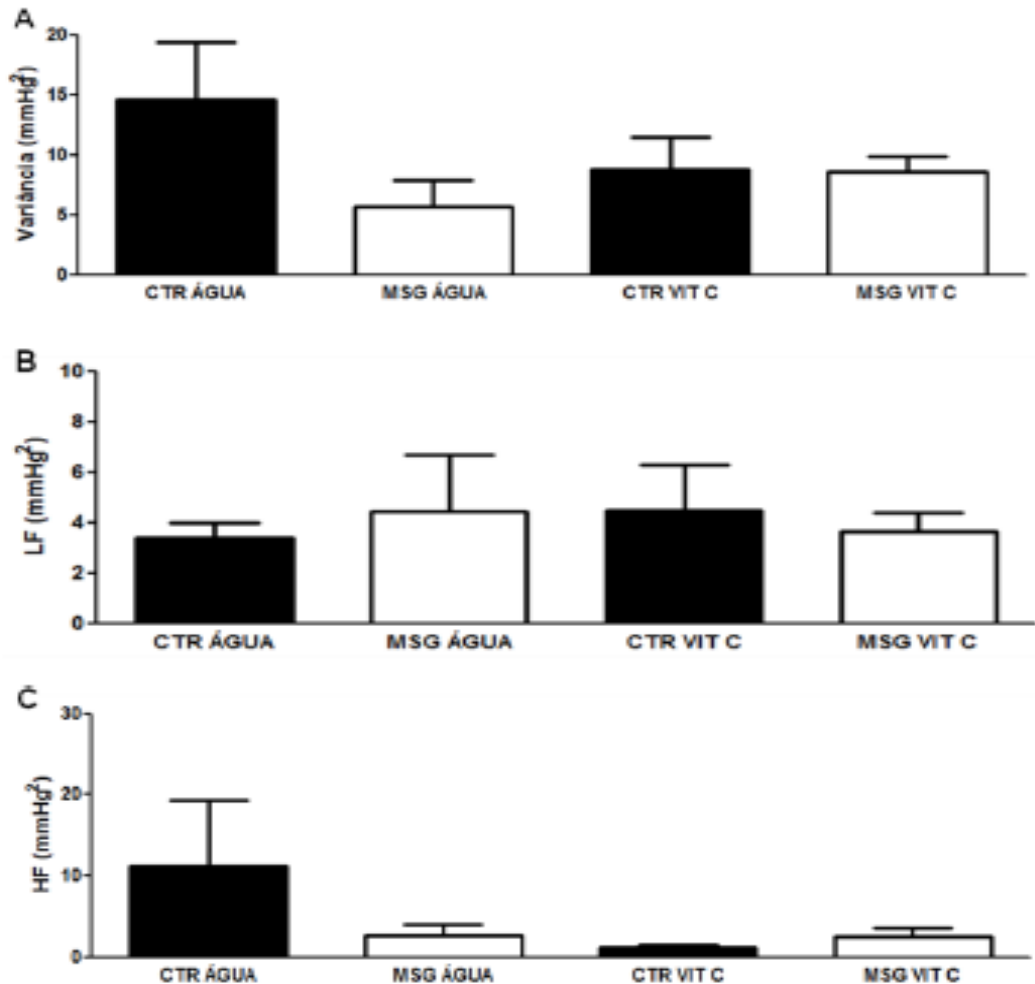
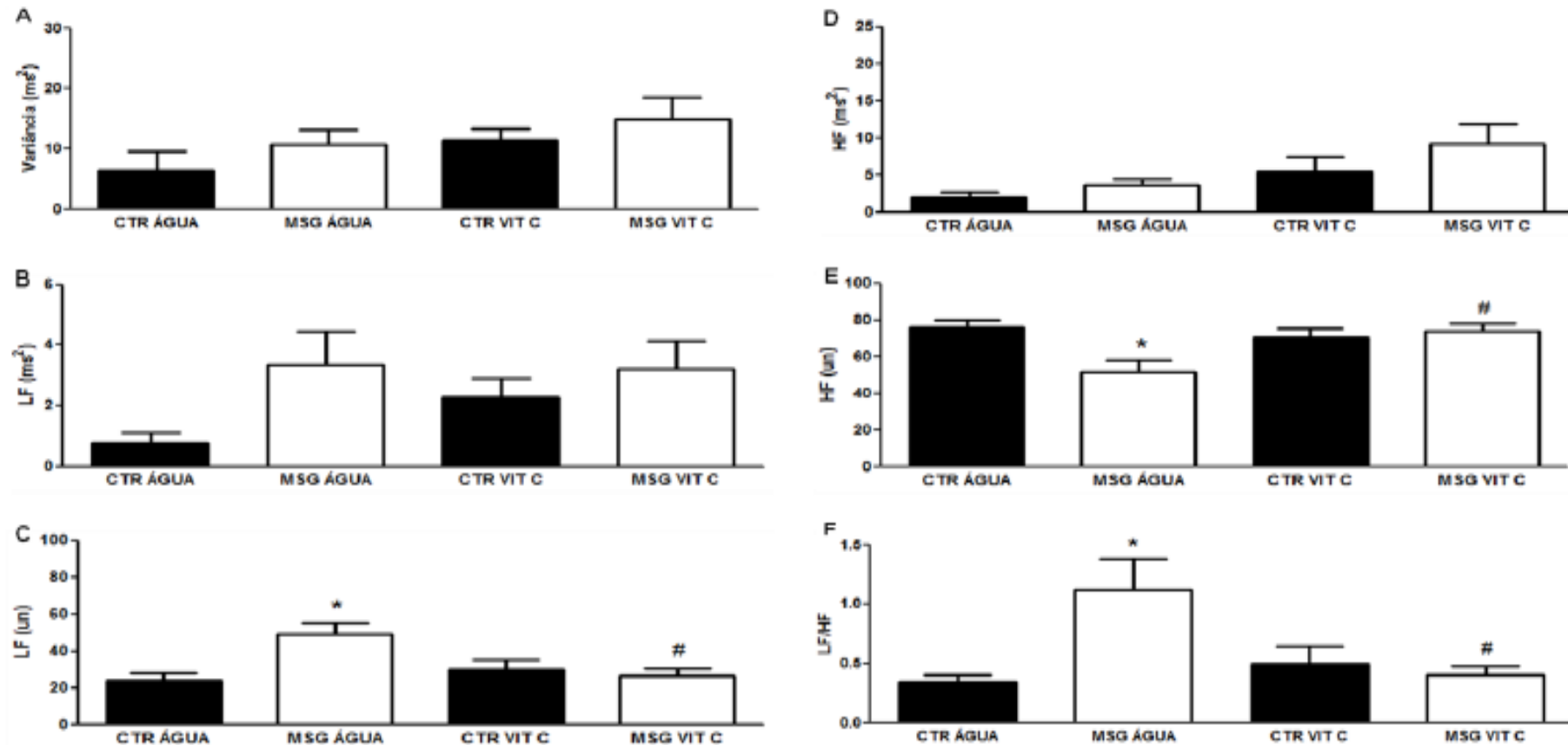


Figura 19 – Parâmetros espectrais do intervalo de pulso (IP) de ratos controles (CTR) e obesos MSG (MSG) tratados previamente com água destilada ou vitamina C (vit C). A = gráfico de barras representando a variância total do IP, B = banda de baixa frequência (LF) em unidade absoluta, C = banda de baixa frequência (LF) em unidade normalizada, D = banda alta frequência (HF) em unidade absoluta, E = banda alta frequência (HF) em unidade normalizada e F = razão LF/HF. * $p < 0,05$ vs. CTR água; # $p < 0,05$ vs. MSG água.



5.3.2.3 Análise da sensibilidade barorreflexa

Os resultados mostram que não houve nenhuma diferença estatística entre os grupos na análise da SBR espontânea, mesmo após o pré-tratamento com antioxidante (Tabela 6).

Tabela 6 – Sensibilidade barorreflexa de animais controles e obesos MSG tratados ou não com vitamina C.

	CTR ÁGUA (n=5)	MSG ÁGUA (n=5)	CTR VIT C (n=5)	MSG VIT C (n=8)
Ganho (ms/mmHg)	0.65 ± 0.3	1.07 ± 0.3	1.56 ± 0.5	1.26 ± 0.2

CTR (controle); MSG (obesos MSG). Valores expressos como média ± EPM.

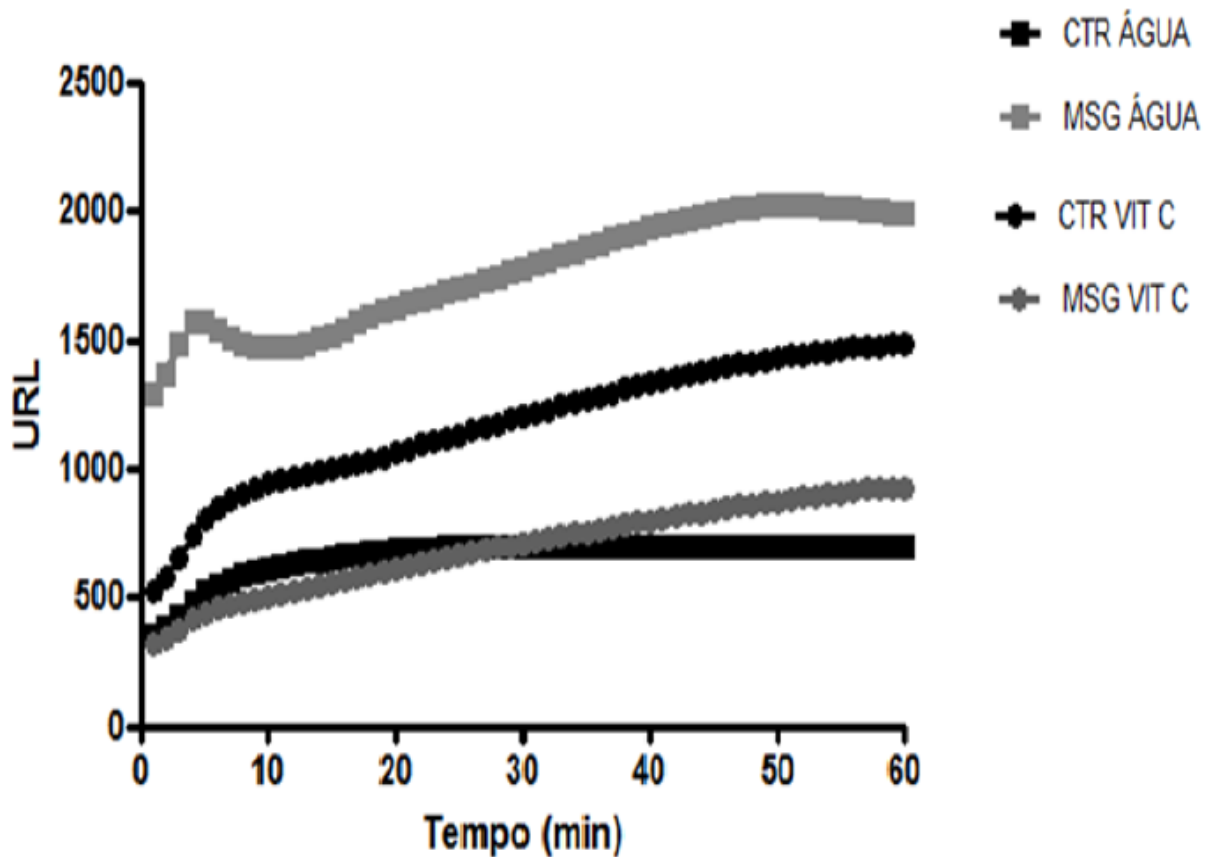
5.3.3 Análises Bioquímicas

5.3.3.1 Avaliação de estresse oxidativo no plasma

5.3.3.1.1 Avaliação da lipoperoxidação plasmática por reação de quimiluminescência

O pré-tratamento com vitamina C atenuou os níveis plasmáticos de lipoperoxidação mais elevados de animais obesos MSG. No entanto, o tratamento induziu a um aumento dos níveis plasmáticos de lipoperoxidação nos animais controles (Figura 20).

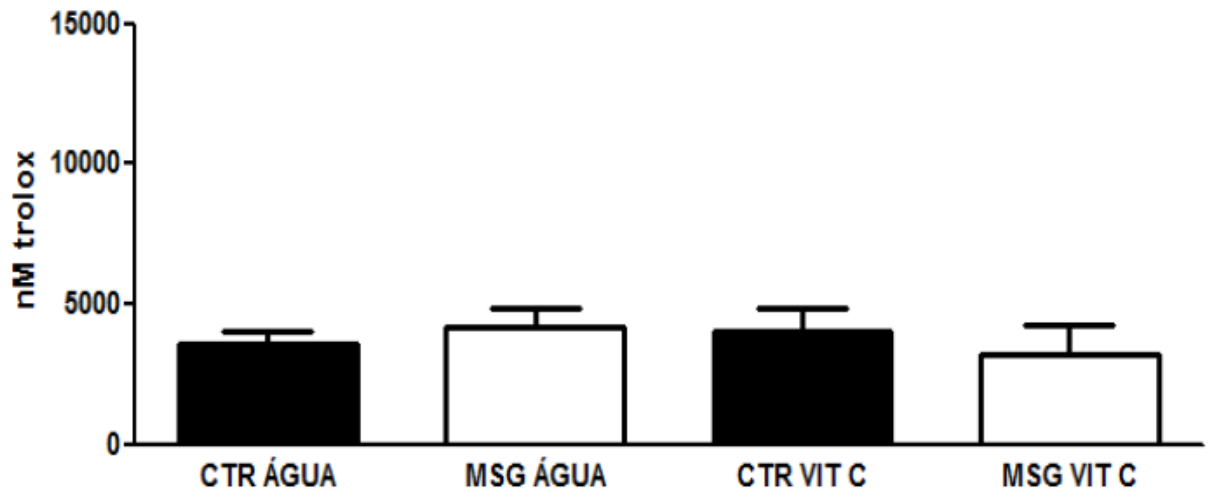
Figura 20 – Curvas representativas da lipoperoxidação plasmática de ratos controles (CTR) e obesos (MSG) tratados previamente com água destilada ou vitamina C (vit C).



5.3.3.1.2 Determinação da capacidade antioxidante total (TRAP) no plasma

Não houve diferença estatística entre a capacidade antioxidante total plasmática de animais controles e obesos MSG (CTR_{água} = 3587 ± 456 nM Trolox, n = 4; MSG_{água} = 4198 ± 652 nM Trolox, n = 5), mesmo após o tratamento antioxidante (CTR_{vit C} = 3989 ± 890 nM Trolox, n = 4; MSG_{vit C} = 3211 ± 1022 nM Trolox, n = 5) (Figura 21).

Figura 21 – Capacidade antioxidante total plasmática (TRAP) de ratos controles (CTR) e obesos (MSG) tratados previamente com água destilada ou vitamina C (vit C).



6 DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou que a administração de MSG em ratos Wistar no período neonatal ocasiona, além da indução da obesidade neuroendócrina, um nível moderado de hipertensão na idade adulta, que provavelmente seja em parte resultado de uma menor produção de NO via eNOS, uma vez que há menor biodisponibilidade de NO em células endoteliais e elevada produção de EROs nos animais MSG, e deficiências no controle autonômico da circulação, onde o NO e o estresse oxidativo estejam envolvidos. Neste estudo também avaliamos o papel da iNOS sobre parâmetros cardiovasculares e autonômicos e nossos dados sugerem que a produção de NO por essa via esteja aumentada no coração de animais obesos MSG e isso contribua para as alterações autonômicas cardíacas observadas. Além disso, os estudos utilizando tratamento com vitamina C fortaleceram a hipótese de que o estresse oxidativo pode estar envolvido nas alterações cardiovasculares e autonômicas nesse tipo de obesidade e que terapias antioxidantes podem ser avaliadas para possíveis tratamentos em humanos.

É bem descrito na literatura que o tratamento neonatal com MSG é capaz de induzir a obesidade em ratos, caracterizada por aumento do índice de Lee e das gorduras viscerais e menor peso corporal e comprimento naso-anal (DE CARVALHO PAPA et al., 2002; ROMAGNANO et al., 1982; ŽELEZNÁ et al., 2008). Os resultados de caracterização desse trabalho e de outros estudos de nosso laboratório (CUNHA et al., 2010, 2011; DA SILVA MATTOS et al., 2011; KARLEN-AMARANTE et al., 2012), assim como de outros grupos que utilizaram o modelo MSG (MIRANDA et al., 2013; SVIDNICKI et al., 2013), confirmaram que os ratos que receberam MSG nos cinco primeiros dias de vida se tornaram obesos, devido ao acúmulo de gorduras na região abdominal. Esse menor peso dos ratos obesos MSG provavelmente se deve ao menor tamanho desses animais, já que o tratamento com MSG diminui a produção do hormônio do crescimento, resultando em uma redução do comprimento do corpo e atrofia da hipófise, das gônadas e os nervos ópticos (ROMAGNANO et al., 1982; ŽELEZNÁ et al., 2008). O aumento da gordura corporal, sem qualquer alteração do peso corporal nos animais obesos MSG pode ser explicada por uma menor taxa metabólica e não por uma elevada ingestão de alimentos (MALETÍNSKÁ et al., 2008; MORRIS et al., 1998; ŽELEZNÁ et al., 2008).

O NO pode influenciar a composição corporal através do seu papel modulador na regulação do balanço energético sobre a atividade de neurônios hipotalâmicos (CANABAL et al., 2007; GASKIN et al., 2003; MORLEY; FLOOD, 1991, 1992; MORLEY et al., 1999). Animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentam menor expressão da nNOS no hipotálamo ventromedial (VMH), no entanto, são mais sensíveis ao efeito da inibição da NOS sobre o ganho de peso e ingestão alimentar, sugerindo um papel do NO na hiperfagia e obesidade induzida pela dieta palatável (SADLER; WILDING, 2004).

Nossos resultados evidenciaram que o pré-tratamento com aminoguanidina, inibidor da iNOS, ou com antioxidante, a vitamina C, não modificou nenhum dos parâmetros de caracterização da obesidade MSG. No entanto, o pré-tratamento com L-NAME, inibidor da cNOS, reduziu o peso corporal e a gordura retroperitoneal apenas nos animais MSG. Assim, nossos resultados também evidenciam um envolvimento do NO produzido pela via constitutiva nas vias metabólicas relacionadas com o depósito de gordura em ratos MSG. Dados da literatura já evidenciaram que em camundongos geneticamente obesos perdem peso após tratamento com L-NAME e sugerem o envolvimento do NO no controle da ingestão alimentar assim como no ganho de peso (MORLEY; FLOOD, 1992, 1994). No entanto, dados recentes da literatura apontam para um possível envolvimento do NO da via endotelial sobre a perda de peso, onde a super expressão da eNOS previne a obesidade induzida por dieta e regula o fenótipo do adipócito (SESSA, 2012). Não sabemos ao certo de que forma o bloqueio sistêmico da síntese de NO por L-NAME leva á perda de gordura em animais MSG, mas há indícios que atuando no SNC, o NO atua controlando o metabolismo e, por sua vez, os depósitos de gordura (MORLEY; FARR, 2008). No entanto, não se sabe se um aumento do NO em alguma área do cérebro que controle o metabolismo possa ser responsável pelo aumento dos depósitos de gordura observados nos animais MSG.

A obesidade é uma epidemia mundial, e está fortemente associada com a hipertensão e doenças cardiovasculares. Várias alterações centrais e periféricas podem estar envolvidas nos mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelo desenvolvimento ou a manutenção da PA elevada na obesidade, e dentre elas podemos destacar o aumento da atividade simpática (HILL, 2006). A ativação simpática está implicada na patogênese da hipertensão essencial através de modificações da frequência cardíaca e débito cardíaco, aumento da resistência

vascular periférica e retenção renal de sódio (GRASSI, 2006; TENTOLOURIS, et al., 2006) entre outros possíveis mecanismos. Considerando que o SNS é um importante mecanismo de controle da função cardiovascular e do metabolismo, e que a literatura evidencia a presença de alterações autonômicas em indivíduos obesos (LAMBERT et al., 2010); é extremamente relevante estudar o envolvimento do simpático nas alterações cardiovasculares em modelos de obesidade.

A análise da variabilidade do IP e PAS no domínio da frequência é uma ferramenta amplamente utilizada para avaliar a modulação autonômica cardiovascular, especialmente em condições fisiopatológicas (MALLIANI et al., 1991). Ela é considerada um indicador sensível da modulação simpática e permite estabelecer a avaliação, o diagnóstico e o prognóstico de doenças que ocorrem devido a disfunções autonômicas, como no caso da obesidade (PAL et al., 2009).

Nossos resultados que avaliaram a VFC no IP confirmam um aumento do componente simpático nos animais obesos MSG já evidenciado anteriormente (CUNHA et al., 2010). Um estudo realizado por Scomparin et al. (2009) mostrou que camundongos obesos MSG apresentam um aumento na atividade do nervo vago e uma diminuição na atividade do nervo simpático retroperitoneal. Já o trabalho de Morrison et al. (2008) verificou que o balanço autonômico nos animais obesos MSG pode variar entre os tecidos. Eles mostraram que animais MSG diabéticos entre 65 e 70 semanas de idade tinham redução significativa nas concentrações de noradrenalina no coração, artéria da cauda e íleo, enquanto que as concentrações na glândula adrenal e corpos cavernosos estavam significativamente aumentadas. Assim, parece que as alterações autonômicas observadas no modelo MSG diferem em relação ao sistema fisiológico, e que provavelmente ambos os componentes do sistema nervoso autônomo estejam alterados.

O reflexo barorreceptor é um sistema eficiente para controle cardiovascular, que atua “amortecendo” as oscilações da PA (DAMPNEY, 1994). Nossos resultados na análise da SBR espontânea mostram que não houve nenhuma diferença estatística entre os grupos controle e obesos, tratados ou não. No entanto, recentes trabalhos que avaliaram a SBR no modelo MSG pela relação entre mudanças reflexas na FC á mudanças na PAS, causada pela injeção intravenosa de drogas vasoativas (fenilefrina e nitroprussiato de sódio), mostraram tanto um aumento da bradicardia reflexa ao aumento da PA pela fenilefrina

indicando uma maior atividade barorreflexa com aumento do componente parassimpático (KARLEN-AMARANTE et al., 2012), como uma redução do reflexo bradicárdico indicando uma diminuição vagal (KONRAD et al., 2012). Porém ambos evidenciaram ausência de diferença entre as respostas taquicardias após nitroprussiato.

A análise da SBR do nosso trabalho foi avaliada através detecção de sequências espontâneas acopladas de alterações de PA e FC nos registros contínuos de PA. A literatura mostra que em indivíduos saudáveis, essas sequências ocorrem com uma frequência relativamente alta, cerca de 80 sequências/hora. Interessantemente, através dessas análises foi observado que entre as séries acopladas existem várias alterações de PA que não são acompanhadas por alterações de FC, sugerindo que mesmo em indivíduos saudáveis o barorreflexo pode não ser invariavelmente efetivo (DI RIENZO et al., 2001). Talvez por isso não observamos alterações nos nossos animais obesos MSG.

Estudos do nosso laboratório demonstraram que ratos com obesidade induzida por MSG apresentam um nível moderado de hipertensão na idade adulta acompanhado de alteração na modulação simpática cardíaca, aumento da atividade nervosa simpática renal, além de aumento de prostaglandinas plasmáticas e de estresse oxidativo (CUNHA et al., 2010, 2011; DA SILVA et al., 2012), e após tratamento crônico com um inibidor da ciclooxigenase-2 (COX-2), celecoxibe, a hipertensão foi atenuada (CUNHA et al., 2010). Esses dados sugerem que a inflamação e o estresse oxidativo estão presentes nessa condição fisiopatológica.

O NO é um radical produzido a partir de L-arginina, numa reação mediada pela enzima NO sintase, que desempenha um papel importante na função cardiovascular e também em processos inflamatórios (DUSSE et al., 2003). Há evidências que suportam a hipótese de que o NO desempenha um papel importante no SNS, modulando a função circulatória, por meio de um efeito simpatoinibitório (SAKUMA et al., 1992). Assim, sua inibição pode resultar em aumento da atividade simpática com elevação dos níveis de pressão arterial (TOGASHI et al., 1992). Da mesma forma, também é conhecido que os níveis de NO são diminuídos em humanos hipertensos, proporcionando apoio à noção de que os níveis de NO desempenham um papel importante na patogênese da hipertensão essencial (MOSS et al., 2004).

Neste trabalho, animais controles tratados com L-NAME apresentaram aumento dos níveis basais de PAM, sem nenhuma alteração significativa da modulação autonômica. Embora esse achado pareça paradoxal considerando os inúmeros trabalhos que sugerem um papel inibitório para o NO sobre a atividade simpática, tanto em estudos centrais (KAGIYAMA et al., 1997; SHAPOVAL et al., 1991), como periféricos (SAKUMA et al., 1992; SOUZA et al., 2009), nossos dados são concordantes com dados da literatura que mostraram que o bloqueio experimental da cNOS com L-NAME em animais acordados leva à hipertensão arterial sem aumento na atividade simpática (DOS SANTOS et al., 2010).

Contrariamente aos animais controles, os ratos obesos MSG não mostraram nenhuma alteração nos valores de PAM após o tratamento com L-NAME, ou seja, a hipertensão observada nos animais MSG não aumentou pelo bloqueio crônico da síntese de NO e depois deste tratamento as diferenças encontradas na análise da VFC entre animais controles e obesos MSG não aparecem mais, dando suporte a hipótese de que o NO da via constitutiva participe das alterações autonômicas observadas nos animais MSG, tanto para o componente simpático como para o parassimpático.

Dessa forma, visto que o NO endotelial é um importante modulador do tônus vascular, a ausência de efeito do tratamento com inibidor da cNOS na PA observada nos ratos obesos MSG sugere uma diminuição importante na produção de NO endotelial responsável pelo relaxamento vascular nestes animais. Nossos resultados da determinação de NO e O_2^- em células endoteliais isoladas de aorta fortalecem essa hipótese, mostrando que animais obesos MSG apresentam redução na produção basal de NO e aumento de O_2^- . Juntos, esses resultados fornecem evidências de que ratos obesos MSG apresentam alteração na produção de NO, que pode ser responsável em grande parte pelas alterações cardiovasculares encontradas nesses animais, além de corroborar com dados da literatura (TOKAREV; JEZOVÁ, 2000).

Igualmente, a ausência de efeito do L-NAME em produzir um aumento ainda maior na PAM dos ratos obesos MSG pode ser explicado pela diminuição do peso corporal e gordura desses animais após o tratamento. Dada a associação entre a gordura visceral abdominal e a presença de hipertensão, a literatura evidencia que uma redução nos depósitos de gordura estaria associada

com uma correspondente redução da PA. Uma redução na atividade do SNS seria um dos possíveis mecanismos que ligam a redução da gordura visceral abdominal com reduções na PA (DAVY; HALL, 2004; DORRESTEIJN et al., 2012).

Os valores de PAM e FC tanto de animais controles como animais obesos MSG não tiveram nenhuma alteração após pré-tratamento com aminoguanidina. No entanto, esse tratamento promoveu uma atenuação do componente simpático e aumento do componente parassimpático na análise do IP na VFC, resultando numa diminuição na razão LF/HF. Esses resultados sugerem que o NO produzido pela iNOS esteja envolvido nas alterações autonômicas encontradas nos ratos obesos MSG.

Modelos experimentais de obesidade apresentam expressão aumentada da iNOS em diferentes tecidos (HÁ; CHAE, 2010; PERREAULT; MARRETE, 2001; SUN et al., 2012). O aumento na expressão de iNOS na obesidade pode ser ocasionada devido à produção excessiva de indutores como glicose (SHARMA et al., 1995), citocinas pró-inflamatórias (WILLIAMS et al., 1994), ácidos graxos livres (SHIMABUKURO et al., 1997) e de EROs (BOJUNGA et al., 2004).

Nossos dados mostraram um aumento na expressão da iNOS no tecido cardíaco de ratos obesos MSG, corroborando com a participação do NO produzido pela via induzida na obesidade induzida por MSG. O pré-tratamento com aminoguanidina não foi capaz de reduzir significativamente a marcação para iNOS no coração nem dos animais controles, nem dos obesos MSG. Talvez a dose utilizada e/ou o tempo de tratamento não tenham sido suficientes. No entanto, o pré-tratamento com L-NAME aumentou a marcação para iNOS apenas nos animais controles, sem nenhuma alteração nos animais obesos MSG. Isso pode ser visto como uma compensação da via induzida para gerar NO, já que a via constitutiva estava sendo bloqueada com o tratamento.

Está bem estabelecido que a obesidade esteja associada com uma resposta inflamatória crônica caracterizada pela produção anormal de citocinas e ativação de vias de sinalização inflamatórias, com aumento da expressão de iNOS em diferentes tecidos (HÁ; CHAE, 2010; PERREAULT; MARRETE, 2001; SUN et al., 2012). Os nossos dados mostraram um aumento na expressão da iNOS no tecido cardíaco de ratos obesos MSG, corroborando com a participação do NO produzido pela via induzida na obesidade induzida por MSG. Além disso, após o tratamento

com aminoguanidina a expressão da iNOS não se mostrou ser diferente entre controle e obeso. Esses dados são concordantes com os dados observados pela análise espectral, o que nos permite sugerir que as disfunções autonômicas cardíacas encontradas nos animais MSG se devem em grande parte pelo aumento do NO produzido pela via induzida no coração.

Outra possibilidade a cerca dos efeitos do aumento da iNOS sobre o sistema cardiovascular seria através de um efeito central. O trabalho de Kimura et al. (2005) sugeriu a que expressão em excesso da iNOS na RVLM causa resposta hipertensiva via ativação do sistema nervoso simpático, provavelmente atribuída ao aumento no estresse oxidativo. Sendo assim, podemos especular que o pré-tratamento periférico com aminoguanidina atuando de forma central, levaria à atenuação do componente simpático nos animais obesos MSG. Trabalhos da literatura já evidenciaram respostas centrais com tratamento periférico com aminoguanidina (LIN et al., 1999; NINKOVIĆ et al., 2009; ZHANG et al., 1996). No entanto outros mecanismos, como o estresse oxidativo, mantiveram os níveis pressóricos elevados.

O envolvimento de componentes da inflamação na hipertensão observada no modelo MSG já foi avaliado em nosso laboratório (CUNHA et al., 2010). Nesse estudo foi mostrado que o tratamento crônico com celecoxibe, um inibidor da COX-2, atenuou a hipertensão e o estresse oxidativo nos animais obesos MSG.

Dados da literatura têm evidenciado que o NO participa da inflamação. NO e prostaglandinas compartilham vias semelhantes e as duas moléculas podem ser produzidas simultaneamente nos mesmos tecidos na inflamação (KIM, 2011). Embora os pré-tratamentos com L-NAME e aminoguanidina não tenham alterado os níveis pressóricos dos animais obesos MSG, atenuaram a inflamação. O presente trabalho mostrou que os níveis plasmáticos de PGE₂ foram atenuados pelos tratamentos nos animais controle e obesos, no entanto o grau de atenuação foi maior no grupo dos obesos.

Em outro estudo conduzido em nosso laboratório, observamos também que o aumento na modulação simpática cardíaca presente nos animais obesos MSG não foi revertida pelo celecoxibe (DA CUNHA et al., 2011), sugerindo que outros mecanismos além da inflamação estejam envolvidos no aumento da modulação simpática observada nesse modelo.

A inflamação sistêmica e o estresse oxidativo estão associados ao aumento da massa de tecido adiposo visceral resultante da obesidade. (BALISTRERI et al., 2010; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2013; SMITH; MINSON, 2012). A literatura aponta um aumento do estresse oxidativo na hipertensão essencial, bem como em pacientes hipertensos obesos. O estresse oxidativo pode contribuir para a geração e manutenção de hipertensão principalmente através da inativação do NO (DOBRIAN et al., 2001; VAZIRI et al., 2000). O NO produzido pela eNOS pode ser rapidamente inativado pela reação com O_2^- para formar $OONO^-$ (PACHER et al., 2007). O O_2^- pode ser formado por NADPH oxidase ou eNOS desacoplada (GRIENDLING et al., 2000; COSENTINO et al., 1998).

Os nossos dados mostraram que a produção de NO em células endoteliais isoladas de aorta foi reduzida e a produção basal de O_2^- foi aumentada em ratos obesos MSG. A diminuição da produção de NO em células endoteliais podem contribuir para uma vasodilatação reduzida nos ratos MSG, enquanto a geração de EROs pode reduzir a vasodilatação endotélio-dependente, ao alterar a biodisponibilidade do NO, levando a hipertensão. Como anteriormente demonstrado por Förstermann e Münzel (2006), o desacoplamento da eNOS é uma das fontes mais importantes de EROs. É um processo no qual a eNOS gera O_2^- , quando a concentração de L-arginina, o substrato da NOS, ou BH4, um cofactor da enzima, é esgotada. Assim, os nossos dados quando integrados com os resultados anteriores apóiam a hipótese de a participação da produção de NO e de EROs nas células endoteliais isoladas da aorta de ratos MSG poderia ser devido ao desacoplamento da eNOS. De um modo semelhante, outros estudos têm mostrado o aumento da produção de EROs em vasos de resistência de ratos obesos MSG (LOBATO et al., 2011, 2012).

No presente estudo confirmou-se dados anteriores (CUNHA et al., 2010), mostrando que o estresse oxidativo está presente sistemicamente em animais obesos MSG. O estado de baixo grau de inflamação presente na obesidade pode induzir a produção de radicais livres e conduzir para o aumento da peroxidação lipídica (DAVÍ et al., 2002). Os níveis plasmáticos de lipoperoxidação foram significativamente maiores nos ratos MSG e os tratamentos com L-NAME e aminoguanidina atenuaram a lipoperoxidação em ambos os grupos, porém grau de

atenuação foi mais elevado no grupo dos obesos. Esses resultados evidenciam a participação do NO gerado tanto pela cNOS como pela iNOS no estresse oxidativo presente nesses animais.

Em relação à capacidade antioxidante total no plasma (TRAP) não houve diferença entre os grupos controle e obeso MSG no presente trabalho. No entanto, após os pré-tratamentos com L-NAME e aminoguanidina, houve um aumento significativo desses valores apenas nos animais obesos MSG, reforçando a participação do NO nesse modelo.

O estudo de Skalicky et al. (2008) também não demonstrou alteração na capacidade antioxidante total entre obesos com síndrome metabólica e controle, mesmo na presença do estresse oxidativo. O fato de não existir diferença entre o TRAP de animais controle e obesos MSG apenas nos diz que a capacidade total não foi alterada. Entretanto, pode ser que haja variação de antioxidantes específicos, os quais não foram avaliados neste trabalho.

O pré-tratamento com vitamina C também atenuou a lipoperoxidação plasmática nos animais obesos MSG, no entanto aumentou a lipoperoxidação dos animais controle. Nenhuma diferença foi observada na capacidade antioxidante total entre os grupos controle e obesos MSG, tratados ou não com vitamina C. Em certas condições, a vitamina C pode agir como um pró-oxidante, contribuindo para danos oxidativos através da produção de OH^- . Ela age reduzindo Fe^{3+} para Fe^{2+} (e Cu^{2+} para Cu^{1+}), e na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) estimula a formação de OH^- por meio da Reação de Fenton. O efeito geral dependerá da concentração de ascorbato presente uma vez que também neutraliza OH^- (DUARTE; LUNEC, 2005; VANNUCCHI et al., 1998). Sendo assim, é provável que a dose utilizada nesse trabalho tenha sido benéfica para os animais obesos MSG e prejudicial para os animais controles, agindo com um pró-oxidante.

A elevada produção de EROs e a diminuição da capacidade antioxidante desempenha um importante papel na patogênese da disfunção endotelial e da inflamação em doenças cardiovasculares. Além de participar de anormalidades da função renal, que em conjunto, podem levar ao desenvolvimento da hipertensão (ELMARAKBY; IMIG, 2010; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011). A literatura tem evidenciado o envolvimento do estresse oxidativo em diferentes

modelos experimentais de hipertensão e que os animais com esses tipos de hipertensão respondem favoravelmente à terapia antioxidante (VAZIRI et al., 2000).

Nossos resultados mostraram que o nível moderado de hipertensão observado nos animais obesos MSG foi atenuado após o tratamento antioxidante com vitamina C. Também foi observado pela análise da VFC no IP, que o tratamento com vitamina C nos animais MSG resultou numa diminuição do componente simpático, aumento do componente parassimpático, além de uma diminuição no equilíbrio simpatovagal. A redução simultânea da atividade nervosa simpática e da PAM observadas neste estudo sugere que o estresse oxidativo esteja envolvido na fisiopatologia da hipertensão derivada da obesidade MSG, atuando tanto a nível central como periférico.

A nível periférico, como mecanismo de ação vascular, é sugerido que a vitamina C tem o potencial de eliminar os O_2^- , impedindo a formação de ONOO-, aumentando a biodisponibilidade do NO e diminuindo o efeito pressórico (OLIVEIRA-SALES et al., 2008). Já a nível central, citamos mais uma vez o trabalho de Kimura et al. (2005) que alude que o estresse oxidativo na RVLM media a hipertensão através da ativação do SNS. Deste modo, sugerimos que o pré-tratamento com vitamina C pode ter promovido um efeito central, atenuando o componente simpático nos animais obesos MSG.

Uma das dificuldades na utilização periférica da vitamina C como um antioxidante atuando no SNC está relacionada com a dificuldade em atravessar a barreira hematoencefálica. Postula-se que a barreira hematoencefálica tem um meio para transportar vitamina C lentamente, com base na observação de que uma pequena quantidade de absorção foi observada no cérebro 30 minutos após a infusão de vitamina C. Em contraste, a forma oxidada, o ácido desidroascórbico, entra facilmente no cérebro por meio de GLUT-1 e é retida pelo tecido cerebral na forma de vitamina C (AGUS et al., 1997). No presente estudo podemos sugerir que o tratamento por um período maior (21 dias) permitiu o acesso mesmo que lento até o SNC. Para justificar o possível transporte por meio de GLUT-1, seria necessário avaliar sua expressão na RVLM de animais obesos MSG.

Os mecanismos através dos quais o aumento de EROs no SNC resulta em aumento da atividade simpática e aumento da pressão sanguínea não estão muito bem esclarecidos ainda. A literatura aponta que estas respostas podem ser mediadas por uma interação entre O_2^- e NO. O_2^- reage rapidamente com NO,

aumentando a formação de ONOO^- e diminuindo a biodisponibilidade de NO. (KISHI; HIROOKA, 2012; WEI et al., 2009).

Considerando a ação do NO na RVLM, a diminuição na sua biodisponibilidade por uma interação com EROs poderia contribuir para o aumento da atividade simpática e hipertensão (OLIVEIRA-SALES et al., 2008). Por outro lado, o NO produzido pela iNOS aumentaria a produção de EROs, o que influenciaria a atividade neuronal na RVLM, ocasionando aumento da atividade simpática e hipertensão (KIMURA et al., 2005). Além disso, foi relatado que o ONOO^- na RVLM teria um efeito excitotóxico (ZANZINGER; CZACHURSKI, 2000). No entanto, seria necessário avaliar os efeitos do NO derivado das vias constitutiva e induzida na RVLM em animais obesos MSG, para esclarecer essa hipótese.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados nos permitem concluir que a diminuição da produção de NO através da NO sintase endotelial em ratos obesos MSG pode contribuir para o aumento da pressão arterial destes animais devido à menor biodisponibilidade de NO e aumento da produção de EROs nas células endoteliais, ambos conduzindo a um aumento da atividade simpática. A via induzida de produção de NO parece estar aumentada e tem uma participação importante na atividade autonômica cardíaca. Além disso, a inflamação e o estresse oxidativo sistêmicos presente nesse modelo também contribuem para esse aumento da atividade simpática. O tratamento antioxidante pode ser uma terapia recomendada para combater os danos ao sistema cardiovascular em indivíduos obesos.

REFERÊNCIAS

- ABALLAY, L. R.; EYNARD, A. R.; DIAZ, M. D. P.; NAVARRO, A.; MUNOZ, S. E. Overweight and obesity: their relationship to metabolic syndrome, cardiovascular disease, and cancer in South America. **Nutrition Reviews**, v. 71, p. 168-179, 2013.
- AGUS, D. B.; GAMBHIR, S. S.; PARDRIDGE, W. M.; SPIELHOLZ, C.; BASELGA, J.; VERA, J. C.; GOLDE, D. W. Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, p. 2842-2848, 1997.
- BALBO, S. L.; MATHIAS, P. C.; BONFLEUR, M. L.; ALVES, H. F.; SIROTI, F. J.; MONTEIRO, O. G.; RIBEIRO, F. B.; SOUZA, A. C. Vagotomy reduces obesity in MSG-treated rats. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, v. 108, p. 291-296, 2000.
- BALISTRERI, C. R.; CARUSO, C.; CANDORE, G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. **Mediators of Inflammation**, p. 1-11, 2010.
- BARTON, M.; BARETELLA, O.; MEYER, M. R. Obesity and risk of vascular disease: importance of endothelium-dependent vasoconstriction. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, p. 591-602, 2012.
- BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between "Lee index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, v. 40, p. 527-528, 1968.
- BOJUNGA, J.; DRESAR-MAYERT, B.; USADEL, K. H.; KUSTERER, K.; ZEUZEM, S. Antioxidative treatment reverses imbalances of nitric oxide synthase isoform expression and attenuates tissue-cGMP activation in diabetic rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, p. 771-780, 2004.
- BRIEGER, K.; SCHIAVONE, S.; MILLER JR, F. J.; KRAUSE, K. H. Reactive oxygen species: from health to disease. **Swiss Medical Weekly**, v. 142, p. 1-14, 2012.
- BURNEY, S.; CAUFIELD, J. L.; NILES, J. C.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrate. **Mutation Research**, v. 424, p. 37-49, 1999.
- CANABAL, D. D.; SONG, Z.; POTIAN, J. G.; BEUVE, A.; MCARDLE, J. J.; ROUTH, V. H. Glucose, insulin, and leptin signaling pathways modulate nitric oxide synthesis in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, p. R1418-R1428, 2007.
- CHIKAMORI, K.; MASUDA, K.; ISUMI, H.; ISAKA, K.; TEZUKA, U. Effect of vagotomy on hyperinsulinemia in obese rats with hypothalamic lesions. **Endocrinologia Japonica**, v. 24, p. 251-258, 1977.

CHOUDHURY, K. R.; YAGLE, K. J.; SWANSON, P. E.; KROHN, K. A.; RAJENDRAN, J. G. A robust automated measure of average antibody staining in immunohistochemistry images. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 58, p. 95-107, 2010.

COSENTINO, F.; PATTON, S.; D'USCIO, L. V.; WERNER, E. R.; WERNER-FELMAYER, G.; MOREAU, P.; MALINSKI, T.; LÜSCHER, T. F. Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 101, p. 1530-1537, 1998.

CUNHA, N. V.; DE ABREU, S. B.; PANIS, C.; GRASSIOLLI, S.; GUARNIER, F. A.; CECCHINI, R.; MAZZUCO, T. L.; PINGE-FILHO, P.; MARTINS-PINGE, M. C. Cox-2 inhibition attenuates cardiovascular and inflammatory aspects in monosodium glutamate-induced obese rats. **Life Science**, v. 87, p. 375-381, 2010.

DA CUNHA, N. V.; PINGE-FILHO, P.; BARBOSA NETO, O.; GRASSIOLLI, S.; MARTINS-PINGE, M. C. COX-2 inhibition does not reverse the increased sympathetic modulation in MSG obese rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 165, p. 201-204, 2011.

DA SILVA MATTOS, A. M.; XAVIER, C. H.; KARLEN-AMARANTE, M.; DA CUNHA, N. V.; FONTES, M. A.; MARTINS-PINGE, M. C. Renal sympathetic nerve activity is increased in monosodium glutamate induced hyperadipose rats. **Neuroscience Letter**, v. 522, p. 118-122, 2012.

DA SILVA, A. A.; DO CARMO, J. M.; DUBINION, J.; HALL, J. E. The role of the sympathetic nervous system in obesity-related hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 11, p. 206-211, 2009.

DAMPNEY, R. A. L. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiological Reviews**, v. 74, p. 323-364, 1994.

DANSON, E. J.; PATERSON, D. J. Cardiac neurobiology of nitric oxide synthases. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 1047, p. 183-196, 2005.

DAS, U. N. Is Obesity an Inflammatory Condition? **Nutrition**, v. 17, p. 953-966, 2001.

DAVÌ, G.; GUAGNANO, M. T.; CIABATTONI, G.; BASILI, S.; FALCO, A.; MARINOPICCOLI, M.; NUTINI, M.; SENSI, S.; PATRONO, C. Platelet activation in obese women: role of inflammation and oxidant stress. **JAMA**, v. 288, p. 2008-2014, 2002.

DAVY, K. P.; HALL, J. E. Obesity and hypertension: two epidemics or one? **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 286, p. R803-R813, 2004.

DAVY, K. P.; ORR, J. S. Sympathetic nervous system behavior in human obesity. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 33, p. 116-124, 2009.

DAWSON, R.; PELLEYMOUNTER, M. A.; MILLARD, W. J.; LIU, S.; EPPLER, B. Attenuation of leptin-mediated effects by monosodium glutamate-induced arcuate nucleus damage. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 273, p. 202-2066, 1997.

DE ANGELIS, K.; WICHI, R. B.; JESUS, W. R.; MOREIRA, E. D.; MORRIS, M.; KRIEGER, E. M. Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, p. 2174-78, 2004.

DE CARVALHO PAPA, P.; VARGAS, A. M.; DA SILVA, J. L.; NUNES, M. T.; MACHADO, U. F. GLUT4 protein is differently modulated during development of obesity in monosodium glutamate-treated mice. **Life Sciences**, v. 71, p. 1917-28, 2002.

DE IULIIS, G. N.; WINGATE, J. K.; KOPPERS, A. J.; MCLAUGHLIN, E. A.; AITKEN, R. J. Definitive Evidence for the Nonmitochondrial. Production of Superoxide Anion by Human Spermatozoa. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, p. 1968-1975, 2006.

DE MARCHI, E.; BALDASSARI, F.; BONONI, A.; WIECKOWSKI, M. R.; PINTON, P. Oxidative stress in cardiovascular diseases and obesity: role of p66Shc and protein kinase C. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1-11, 2013.

DEMIGNÉ, C.; BLOCH-FAURE, M.; PICARD, N.; SABBOH, H.; BESSON, C.; RÉMÉSY, C.; GEOFFROY, V.; GASTON, A. T.; NICOLETTI, A.; HAGÈGE, A. Mice chronically fed a westernized experimental diet as a model of obesity, metabolic syndrome and osteoporosis. **European journal of nutrition**, v. 45, p. 298-306, 2006.

DI RIENZO, M.; BERTINIERI, G.; MANCIA, G.; PEDOTTI, A. A new method for evaluating the baroreflex role by a joint pattern analysis of pulse interval and systolic blood pressure series. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v. 23, p. 313-314, 1985.

DI RIENZO, M.; PARATI, G.; CASTIGLIONI, P.; TORDI, R.; MANCIA, G.; PEDOTTI, A. Baroreflex effectiveness index: an additional measure of baroreflex control of heart rate in daily life. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 280, p. R744-R751, 2001.

DIBONA, G. F. Sympathetic Nervous System and Hypertension. **Hypertension**, v. 61, p. 556-560, 2013.

DOBRIAN, A. D.; DAVIES, M. J.; SCHRIVER, S. D.; LAUTERIO, T. J.; PREWITT, R. L. Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension. **Hypertension**, v. 37, p. 554-60, 2001.

DOLNIKOFF, M.; MARTIN-HIDALGO, A.; MACHADO, U. F.; LIMA F. B.; HERRERA E. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. **International Journal of Obesity**, v. 25, p. 426-33. 2001.

- DORRESTEIJN, J. A.; VISSEREN, F. L.; SPIERING, W. Etiology and Pathophysiology. Mechanisms linking obesity to hypertension. **Obesity Reviews**, v. 13, p. 17-26, 2012.
- DOS SANTOS, F. M.; MARTINS DIAS, D. P.; DA SILVA, C. A.; FAZAN, R. JR.; SALGADO, H. C. Sympathetic activity is not increased in L-NAME hypertensive rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 298, p. R89-R95, 2010.
- DUARTE, T. L.; LUNEC, J. Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. **Free Radical Research**, v. 39, p. 671-686, 2005.
- DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 343-350, 2003.
- ELDIN, A. A.; HAMDY, M. A.; SHAHEEN, A. A.; MOTAWI, T. K.; ABD EL GAWAD, H. M. Effect of vitamin C administration in modulating some biochemical changes in arthritic rats. **Pharmacological Research**, v. 26, p. 357-366, 1992.
- ELMARAKBY, A. A.; IMIG, J. D. Obesity is the major contributor to vascular dysfunction and inflammation in high-fat diethypertensive rats. **Clinical Science**, v. 118, p. 291-301, 2010.
- ENKHBAATAR, P.; TRABER, D. Role of neuronal nitric oxide synthase in cardiopulmonary lesions of sepsis. In: VINCENT, J. L. (Ed.). **Yearbook of intensive care and emergency medicine**. Berlin, Germany: Springer, 2004: 85-92.
- ESCH, T.; STEFANO, G. B.; FRICCHIONE, G. L.; BENSON, H. Stress-related diseases: a potential role for nitric oxide. **Medical Science Monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 8, p. RA103-RA118, 2002.
- FARAH, V. M. A.; MOREIRA, E. D.; PIRES, M. D.; IRIGOYEN, M. C. C.; KRIEGER, E. M. Comparison of three methods for the determination of baroreflex sensitivity in conscious rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 361-369, 1999.
- FERNANDES, G. S. A.; ARENA, A. C.; CAMPOS, K. E.; VOLPATO, G. T.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; DAMASCENO, D. C.; KEMPINAS, W. G. 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. 1-6, 2012.
- FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A.; MADRIGAL-SANTILLÁN, E.; BAUTISTA, M.; ESQUIVEL-SOTO, J.; MORALES-GONZÁLEZ, A.; ESQUIVEL-CHIRINO, C.; DURANTE-MONTIEL, I.; SÁNCHEZ-RIVERA, G.; VALADEZ-VEJA, C.; MORALES-GONZÁLEZ, J. A. Inflammation, oxidative stress, and obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 3117-3132, 2011.

FÖRSTERMANN, U.; MÜNDEL, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. **Circulation**, v. 113, p. 1708-1714, 2006.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, p. 829-837, 2012.

FUJITA, K.; NISHIZAWA, H.; FUNAHASHI, T.; SHIMOMURA, I.; SHIMABUKURO, M. Systemic oxidative stress is associated with visceral fat accumulation and the metabolic syndrome. **Circulation Journal**, v. 70, p. 1437-1442, 2006.

FURUKAWA, S.; FUJITA, T.; SHIMABUKURO, M.; IWAKI, M.; YAMADA, Y.; NAKAJIMA, Y.; NAKAYAMA, O.; MAKISHIMA, M.; MATSUDA, M.; SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, p. 1752-1761, 2004.

GASKIN, F. S.; FARR, S. A.; BANKS, W. A.; KUMAR, V. B.; MORLEY, J. E. Ghrelin-induced feeding is dependent on nitric oxide. **Peptides**, v. 24, p. 913-918, 2003.

GERMAN, A. J.; RYAN, V. H.; GERMAN, A. C.; STUART WOOD, I.; TRAYHURN, P. Obesity, its associated disorders and the role of inflammatory adipokines in companion animals. **The Veterinary Journal**, v. 185, p. 4-9, 2010.

GIULIVI, C.; PODEROSO, J. J.; BOVERIS, A. Production of nitric oxide by mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 11038-11043, 1998.

GRASSI, G. Sympathetic overdrive and cardiovascular risk in the metabolic syndrome hypertension. **Hypertension**, v. 29, p. 839-846, 2006.

GRASSI, G.; SERAVALLE, G.; DELL'ORO, R.; TURRI, C.; BOLLA, G. B.; MANCIA, G. Adrenergic and reflex abnormalities in obesity-related hypertension. **Hypertension**, v. 36, p. 538-442, 2000.

GRIENGLING, K. K.; SORESCU, D.; LASSÈGUE, B.; USHIO-FUKAI, M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 20, p. 2175-2183, 2000.

GUZIK, T. J.; MARVAR, P. J.; CZESNIKIEWICZ-GUZIK, M.; KORBUT, R. Perivascular adipose tissue as a messenger of the brain-vessel axis: role in vascular inflammation and dysfunction. **Journal Of Physiology And Pharmacology**, v. 58, p. 591-610, 2007.

HA, S. K.; CHAE, C. Inducible nitric oxide distribution in the fatty liver of a mouse with high fat diet-induced obesity. **Experimental Animals**, v. 59, p. 595-604, 2010.

HALL, J. E. Mechanisms of abnormal renal sodium handling in obesity hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 10, p. 49S-55S, 1997.

HILL, J. O. Understanding and Addressing the Epidemic of Obesity: An Energy Balance Perspective. **Endocrine Reviews**, v. 27, p. 750-761, 2006.

HIRATA, A. E.; ANDRADE, I. S.; VASKEVICIUS, P.; DOLNIKOFF, M. S. Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 671-6744. 1997.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 14, p. 860-867, 2006.

HUTCHESON, R.; ROCIC, P. The metabolic syndrome, oxidative stress, environment, and cardiovascular disease: the great exploration. **Experimental Diabetes Research**, p. 1-13, 2012.

IIDA, M.; MURAKAMI, T.; ISHIDA, K.; MIZUNO, A.; KUWAJIMA, M.; SHIMA, K. 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 Biophysical Research Communications**, v. 224, p. 597-604, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002–2003**. Antropometria e Estado Nutricional de Crianças, Adolescentes e Adultos no Brasil. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2003medidas/pof2003medidas.pdf>>. Acesso em: 04 jun. 2013.

JIA, Y. X.; PAN, C. S.; YANG, J. H.; LIU, X. H.; YUAN, W. J.; ZHAO, J.; TANG, C. S.; QI, Y. F. 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, p. 1202-1208, 2006.

KAGIYAMA, S.; TSUCHIHASHI, T.; ABE, I.; FUJISHIMA, M. Cardiovascular effects of nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla of rats. **Brain Research**, v. 757, p. 155-158, 1997.

KAPUR, S.; PICARD, F.; PERREAULT, M.; DESHAIES, Y.; MARETTE, A. Nitric oxide: a new player in the modulation of energy metabolism. **International Journal of Obesity**, v. 24, p. S36-S40, 2000.

KARLEN-AMARANTE, M.; DA CUNHA, N. V.; DE ANDRADE, O.; DE SOUZA, H. C.; MARTINS-PINGE, M. C. Altered baroreflex and autonomic modulation in monosodium glutamate-induced hyperadipose rats. **Metabolism**, v. 61, p. 1435-1442, 2012.

KIM, S. F. The role of nitric oxide in prostaglandin biology; update. **Nitric Oxide**, v. 25, p. 255-264, 2011.

KIMURA, Y.; HIROOKA, Y.; SAGARA, Y.; ITO, K.; KISHI, T.; SHIMOKAWA, H.; TAKESHITA, A.; SUNAGAWA, K. Overexpression of inducible nitric oxide synthase in rostral ventrolateral medulla causes hypertension and sympathoexcitation via an increase in oxidative stress. **Circulation Research**, v. 96, p. 252-260, 2005.

KISHI, T.; HIROOKA, Y. Oxidative stress in the brain causes hypertension via sympathoexcitation. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 1-8, 2012.

- KIZER, J. S.; NEMEROFF, C. B.; YOUNGBLOOD, W. W. Neurotoxic amino acids and structurally related analogs. **Pharmacological Reviews**, v. 29, p. 301-18. 1978.
- KOJIMA, H.; NAKATSUBO, N.; KIKUCHI, K.; URANO, Y.; HIGUCHI, T.; TANAKA, J.; KUDO, Y.; NAGANO, T. Direct evidence of NO production in rat hippocampus and cortex using a new fluorescent indicator: DAF-2 DA. **Neuroreport**, v. 9, p. 3345-3348, 1998.
- KONRAD, S. P.; FARAH, V.; RODRIGUES, B.; WICHI, R. B.; MACHADO, U. F.; LOPES, H. F.; D'AGORD SCHAAN, B.; DE ANGELIS, K.; IRIGOYEN, M. C. Monosodium glutamate neonatal treatment induces cardiovascular autonomic function changes in rodents. **Clinics (São Paulo)**, v. 67, p. 1209-1214, 2012.
- KURUKULASURIYA, L. R.; STAS, S.; LASTRA, G.; MANRIQUE, C.; SOWERS, J. R. Hypertension in obesity. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 95, p. 903-917, 2011.
- LAMBERT, G. W.; STRAZNICKY, N. E.; LAMBERT, E. A.; DIXON, J. B.; SCHLAICH, M. P. Sympathetic nervous activation in obesity and the metabolic syndrome - Causes, consequences and therapeutic implications. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 126, p. 159-172, 2010.
- LIN, H. C.; WAN, F. J.; KANG, B. H.; WU, C. C.; TSENG, C. J. Systemic administration of lipopolysaccharide induces release of nitric oxide and glutamate and c-fos expression in the nucleus tractus solitarii of rats. **Hypertension**, v. 33, p. 1218-1224, 1999.
- LOBATO, N. S.; FILGUEIRA, F. P.; AKAMINE, E. H.; DAVEL, A. P.; ROSSONI, L. V.; TOSTES, R. C.; CARVALHO, M. H.; FORTES, Z. B. Obesity induced by neonatal treatment with monosodium glutamate impairs microvascular reactivity in adult rats: role of NO and prostanoids. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 21, p. 808-816, 2011.
- LOBATO, N. S.; FILGUEIRA, F. P.; HAGIHARA, G. N.; AKAMINE, E. H.; PARIZ, J. R.; TOSTES, R. C.; CARVALHO, M. H.; FORTES, Z. B. Improvement of metabolic parameters and vascular function by metformin in obese non-diabetic rats. **Life Sciences**, v. 90, p. 228-235, 2012.
- LOHMEIER, T. E.; ILIESCU, R. The Sympathetic Nervous System in Obesity Hypertension. **Current Hypertension Reports**, p. 1-8, 2013.
- LORDEN, J. F.; CAUDLE, A. Behavioral and endocrinological effects of single injections of monosodium glutamate in the mouse. **Neurobehavioral Toxicology Teratology**, v. 8, p. 509-519, 1986.
- MACHO, L.; FICKOVA, M.; JEZOVA, R.; ZORAD, S. Late effects of postnatal administration of monosodium glutamate on insulin action in adult rats. **Physiology Research**, v. 49, p. S79-85, 2000.
- MALETÍNSKÁ, L.; TOMA, R. S.; PIRNIK, Z.; KISS, A.; SLANINOVÁ, J.; HALUZÍK, M.; ŽELEZNÁ, B. Effect of cholecystikinin on feeding is attenuated in monosodium glutamate obese mice. **Regulatory Peptides**. v. 136, p. 58-63. 2006.

- MALLIANI, A.; PAGANI, M.; LOMBARDI, F.; CERUTTI, S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. **Circulation**, v. 84, p. 1482-1494, 1991.
- MARTINS, A. C.; SOUZA, K. L.; SHIO, M. T.; MATHIAS, P. C.; LELKES, P. I.; GARCIA, R. M. Adrenal medullary function and expression of catecholamine-synthesizing enzymes in mice with hypothalamic obesity. **Life Science**, v. 74, p. 3211-3222, 2004.
- MATHIAS, P. C.; GRASSIOLLI, S.; ROCHA, D. N.; SCOMPARIN, D. X.; GRAVENA, C. Transplantation of pancreatic islets from hypothalamic obese rats corrects hyperglycemia of diabetic rats. **Transplantation Proceedings**, v. 39, p. 193-195, 2007.
- MATHIEU, P.; POIRIER, P.; PIBAROT, P.; LEMIEUX, I.; DESPRÉS, J. P. Visceral Obesity: the link among inflammation, hypertension, and cardiovascular disease. **Hypertension**, v. 53, p. 577-584, 2009.
- MATYSKOVA, R.; MALETINSKÁ, L.; MAIXNEROVÁ, J.; PIRNÍK, K. A.; ZELEZNÁ, B. 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, p. 727-734, 2008.
- MEHANNA, A.; VITORINO, D. C.; PANIS, C.; BLANCO, E. E. A.; PINGE FILHO, P.; MARTINS-PINGE, M. C. Cardiovascular and pulmonary effects of NOS inhibition in endotoxemic conscious rats subjected to swimming training. **Life Sciences**, v. 81, p. 1301-1308, 2007.
- MENDIZÁBAL, Y.; LLORENS, S.; NAVA, E. Hypertension in metabolic syndrome: vascular pathophysiology. **International Journal of Hypertension**, p. 1-15, 2013.
- MIRANDA, R. A.; BRANCO, R. C.; GRAVENA, C.; BARELLA, L. F.; DA SILVA FRANCO, C. C.; ANDREAZZI, A. E.; DE OLIVEIRA, J. C.; PICINATO, M. C.; DE FREITAS MATHIAS, P. C. Swim training of monosodium L-glutamate-obese mice improves the impaired insulin receptor tyrosine phosphorylation in pancreatic islets. **Endocrine**, v. 43, p. 571-578, 2013.
- MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. S193-S201, 2006.
- MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 2002-2012, 1993.
- MONTANO, N.; RUSCONE, T. G.; PORTA, A.; LOMBARDI, F.; PAGANI, M.; MALLIANI, A. Power spectral analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt. **Circulation**, v. 90, p. 1826-1831, 1994.
- MORLEY, J. E.; ALSHAHERA, M. M.; FARRA, S. A.; FLOOD, J. F.; KUMAR, V. B. Leptin and neuropeptide Y (NPY) modulate nitric oxide synthase: further evidence for a role of nitric oxide in feeding. **Peptides**, v. 20, p. 595-600, 1999.

MORLEY, J. E.; FARR, S. A. Cachexia and neuropeptide Y. **Nutrition**, v. 24, p. 815-819, 2008.

MORLEY, J. E.; FLOOD, J. F. Competitive antagonism of nitric oxide synthetase causes weight loss in mice. **Life Sciences**, v. 51, p. 1285-1289, 1992.

_____. Effect of competitive antagonism of NO synthetase on weight and food intake in obese and diabetic mice. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. R164-R168, 1994.

_____. Evidence that nitric oxide modulates food intake in mice. **Life Sciences**, v. 49, p. 707-711, 1991.

MORRIS, M. J. Cardiovascular and metabolic effects of obesity. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 35, p. 416-419, 2008.

MORRIS, M. J.; TORTELLI, C. F.; FILIPPIS, A.; PROIETTO, J. Reduced BAT function as a mechanism for obesity in the hypophagic, neuropeptide Y deficient monosodium glutamate-treated rat. **Regulatory Peptides**, v. 75-76, p. 441-447, 1998.

MORRISON, J. F. B.; SHEHAB, S.; SHEEN, R.; DHANASEKARAN, S.; SHAFFIULLAH, M.; MENSAH-BROWN, E. Sensory and autonomic nerve changes in the monosodium glutamate-treated rat: a model of type II diabetes. **Experimental Physiology**, v. 93, p. 213-222, 2008.

MOSS, M. B.; BRUNINI, T. M.; SOARES DE MOURA, R.; NOVAES MALAGRIS, L. E.; ROBERTS, N. B.; ELLORY, J. C.; MANN, G. E.; MENDES RIBEIRO, A. C. Diminished L-arginine bioavailability in hypertension. **Clinical Science**, v. 107, p. 391-397, 2004.

NASCIMENTO CURI, C. M. O.; MARMO, M. R.; EGAMI, M.; RIBEIRO, E. B.; ANDRADE, I. S.; DOLNIKOFF, M. S. Effect of monosodium glutamate treatment during neonatal development on lipogenesis rate and lipoprotein lipase activity in adult rats. **Biochemistry International**, v. 24, p. 927-935, 1991.

NEMEROFF, C. B.; GRANT, L. D.; BISSETTE, G.; ERVIN, G. N.; HARRELL, L. E.; PRANGE JR, A. J. Growth, endocrinological and behavioral deficits after monosodium L-glutamate in the neonatal rat: possible involvement of arcuate dopamine neuron damage. **Psychoneuroendocrinology**, v. 2, p. 179-196, 1977.

NINKOVIĆ, M. B.; MALICEVIĆ, Z. M.; JELENKOVIĆ, A.; DUKIĆ, M. M.; JOVANOVIĆ, M. D.; STEVANOVIĆ, I. D. Nitric oxide synthase inhibitors partially inhibit oxidative stress development in the rat brain during sepsis provoked by cecal ligation and puncture. **General Physiology and Biophysics**, v. 28, p. 243-250, 2009.

NORONHA, B. T.; LI, J. M.; WHEATCROFT, S. B.; SHAH, A. M.; KEARNEY, M. T. Inducible nitric oxide synthase has divergent effects on vascular and metabolic function in obesity. **Diabetes**, v. 54, p. 1082-1089, 2005.

OLIVEIRA-SALES, E. B.; DUGAICH, A. P.; CARILLO, B. A.; ABREU, N. P.; BOIM, M. A.; MARTINS, P. J.; D'ALMEIDA, V.; DOLNIKOFF, M. S.; BERGAMASCHI, C. T.; CAMPOS, R. R. Oxidative stress contributes to renovascular hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 21, p. 98-104, 2008.

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

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

PAL, G. K.; PAL, P.; NANDA, N.; AMUDHARAJ, D.; KARTHIK, S. Spectral analysis of heart rate variability (HRV) may predict the future development of essential hypertension. **Medical Hypotheses**, v. 72, p. 183-185, 2009.

PANIS, C.; VICTORINO, V. J.; HERRERA, A. C.; FREITAS, L. F.; DE ROSSI, T.; CAMPOS, F. C.; COLADO SIMÃO, A. N.; BARBOSA, D. S.; PINGE-FILHO, P.; CECCHINI, A. L.; CECCHINI, R. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 133, p. 881-888, 2012.

PARRAT, J. R. Nitric Oxide in sepsis and endotoxaemia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 41, p. S31-S39, 1998.

PERELLÓ, M.; GAILLARD, R. C.; CHISARI, A.; SPINEDI, E. Adrenal enucleation in MSG-damaged hyperleptinemic male rats transiently restores adrenal sensitivity to leptin. **Neuroendocrinology**, v. 78, p. 176-84, 2003.

PERFIELD II, J.; ORTINAU, L. C.; PICKERING, R. T.; RUEBEL, M. L.; MEERS, G. M.; RECTOR, R. S. Altered hepatic lipid metabolism contributes to nonalcoholic fatty liver disease in leptin-deficient Ob/Ob mice. **Journal of Obesity**, p. 1-8, 2013.

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

PINGE-FILHO, P.; TADOKORO, C. E.; ABRAHAMSOHN, I. A. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Cellular Immunology**, v. 193, p. 90-98, 1999.

QUILLOT, D.; FLUCKIGER, L.; ZANNAD, F.; DROUIN, P.; ZIEGLER, O. Impaired autonomic control of heart rate and blood pressure in obesity: role of age and of insulin-resistance. **Clinical Autonomic Research**, v. 11, p. 79-86, 2001.

RAHMOUNI, K.; CORREIA, M. L.; HAYNES, W. G.; MARK, A. L. Obesity-associated hypertension: new insights into mechanisms. **Hypertension**, v. 45, p. 9-14, 2005.

RAVUSSIN, R.; TATARANNI, P. A. The role of altered sympathetic nervous system activity in the pathogenesis of obesity. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 55, p. 793-802, 1996.

RE, R. N. Obesity-Related Hypertension. **The Ochsner Journal**, v. 9, p. 133-136, 2009.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, H.; SIMENTAL-MENDÍA, L. E.; RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, G.; REYES-ROMERO, M. A. Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. **International Journal of Endocrinology**, p. 1-11, 2013.

ROMAGNANO, M. A.; PILCHER, W. H.; BENNETT-CLARKE, C.; CHAFEL, T. L.; JOSEPH, S. A. Distribution of somatostatin in the mouse brain: effects of neonatal MSG treatment. **Brain Research**, v. 234, p. 387-98, 1982.

RUTLEDGE, A. C.; ADELI, K. Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms. **Nutrition Reviews**, v. 65, p. S13-23, 2007.

SADLER, C. J.; WILDING, J. P. H. Reduced ventromedial hypothalamic neuronal nitric oxide synthase and increased sensitivity to NOS inhibition in dietary obese rats: further evidence of a role for nitric oxide in the regulation of energy balance. **Brain Research**, v. 1016 p. 222-228, 2004.

SAKUMA, I.; TOGASHI, H.; YOSHIOKA, M.; SAITO, H.; YANAGIDA, M.; TAMURA, M.; KOBAYASHI, T.; YASUDA, H.; GROSS, S. S.; LEVI, R. NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of L-arginine-derived nitric oxide synthesis, stimulates renal sympathetic nerve activity in vivo. A role for nitric oxide in the central regulation of sympathetic tone? **Circulation Research**, v. 70, p. 607-611, 1992.

SARTORI, C.; LEPORI, M.; SCHERRER, U. Interaction between nitric oxide and the cholinergic and sympathetic nervous system in cardiovascular control in humans. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 106, p. 209-220, 2005.

SCOMPARIN, D. X.; GOMES, R. M.; GRASSIOLLI, S.; RINALDI, W.; MARTINS, A. G.; OLIVEIRA, J. C.; GRAVENA, C.; MATHIAS, P. C. F. Autonomic activity and glycemic homeostasis are maintained by precocious and low intensity training exercises in MSG-programmed obese mice. **Endocrine Journal**, v. 36, p. 510-517. 2009.

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 Science**, v. 359, p. 1021-1044, 2004.

SESSA, W. C. A new approach to weight loss: just activate endothelial NO synthase! **Circulation Research**, v. 111, p. 1111-1112, 2012.

SHAPOVAL, L. N. Nitric Oxide: Involvement in the nervous control of cardiovascular function. **Neurophysiology**, v. 36, p. 466-478, 2004.

SHAPOVAL, L. N.; SAGACH, V. F.; POBEGAILO, L. S. Nitric oxide influences ventrolateral medullary mechanisms of vasomotor control in the cat. **Neuroscience Letters**, v. 132, p. 47-50, 1991.

- SHARMA, K.; DANOFF, T. M.; DEPIERO, A.; ZIYADEH, F.N. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages and glomerular mesangial cells by elevated glucose levels: possible mediation via protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 207, p. 80-88, 1995.
- SHIBAO, C.; GAMBOA, A.; DIEDRICH, A.; ERTL, A. C.; CHEN, K. Y.; BYRNE, D. W.; FARLEY, G.; PARANJAPE, S. Y.; DAVIS, S. N.; BIAGGIONI, I. Autonomic contribution to blood pressure and metabolism in obesity. **Hypertension**, v. 49, p. 27-33, 2007.
- SHIMABUKURO, M.; OHNEDA, M.; LEE, Y.; UNGER, R. H. Role of nitric oxide in obesity-induced beta cell disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, p. 290-295, 1997.
- SHIMOKAWA, H.; TSUTSUI, M. Nitric oxide synthases in the pathogenesis of cardiovascular disease: lessons from genetically modified mice. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 459, p. 959-967, 2010.
- SILVA, B. R.; PERNOMIAN, L.; BENDHACK, L. M. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 1-5, 2012.
- SIWY, J.; ZOJA, C.; KLEIN, J.; BENIGNI, A.; MULLEN, W.; MAYER, B.; MISCHAK, H.; JANKOWSKI, J.; STEVENS, R.; VLAHOU, A.; KOSSIDA, S.; PERCO, P.; BAHLMANN, F. H. Evaluation of the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Rat as a model for human disease based on urinary peptidomic profiles. **PLoS One**, v. 7, p. 1-10, 2012.
- SKALICKY, J.; MUZAKOVA, V.; KANDAR, R.; MELOUN, M.; ROUSAR, T.; PALICKA V. Evaluation of oxidative stress and inflammation in obese adults with metabolic syndrome. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 46, p. 499-505, 2008.
- SKRAPARI, I.; TENTOLOURIS, N.; PERREA, D.; BAKOYIANNIS, C.; PAPAZAFIROPOULOU, A.; KATSILAMBROS, N. Baroreflex sensitivity in obesity: relationship with cardiac autonomic nervous system activity. **Obesity**, v. 15, p. 1685-1693, 2007.
- SMITH, M. M.; MINSON, C. T. Obesity and adipokines: effects on sympathetic overactivity. **The Journal of Physiology**, v. 590, p. 1787-1801, 2012.
- SOUZA, F.; MARCHESINI, J. B.; CAMPOS, A. C. L.; MALAFAIA, O.; MONTEIRO, O. G.; RIBEIRO, F. B.; ALVES, H. F. P. Efeito da vagotomia troncular em ratos injetados na fase neonatal com glutamato de sódio: estudo biométrico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 16, 2001.
- SOUZA, H. C.; DE ARAÚJO, J. E.; MARTINS-PINGE, M. C.; COZZA, I. C.; MARTINS-DIAS, D. P. Nitric oxide synthesis blockade reduced the baroreflex sensitivity in trained rats. **Auton Neuroscience**, v. 150, p. 38-44, 2009.
- SUN, X.; PAN, H.; TAN, H.; YU, Y. High free fatty acids level related with cardiac dysfunction in obese rats. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 95, p. 251-29, 2012.

SVIDNICKI, P. V.; DE CARVALHO LEITE, N.; VENTURELLI, A. C.; CAMARGO, R. L.; VICARI, M. R.; DE ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F.; NOGAROTO, V.; GRASSIOLLI, S. Swim training restores glucagon-like peptide-1 insulinotropic action in pancreatic islets from monosodium glutamate-obese rats. **Acta Physiologica**, p. 1-11, 2013.

TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING ELECTROPHYSIOLOGY. Heart rate variability - Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. **European Heart Journal**, v. 17, p. 354-381, 1996.

TEFF, K. L. Visceral nerves: vagal and sympathetic innervation. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 32, p. 569-571, 2008.

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

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

TOGASHI, H.; SAKUMA, I.; YOSHIOKA, M.; KOBAYASHI, T.; YASUDA, H.; KITABATAKE, A.; SAITO, H.; GROSS, S. S.; LEVI, R. A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 262, p. 343-347, 1992.

TOKAREV, D.; JEZOVA, D. Effect of nitric oxide inhibition on blood pressure and corticosterone responses in adult rats neonatally treated with glutamate. **Physiological Research**, v. 49, p. S87-S94, 2000.

TONHAJZEROVA, I.; JAVORKA, M.; TRUNKVALTEROVA, Z.; CHROMA, O.; JAVORKOVA, J.; LAZAROVA, Z.; CILJAKOVA, M.; JAVORKA, K. Cardio-respiratory interaction and autonomic dysfunction in obesity. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 59, p. S709-S718, 2008.

VALERIO, A.; CARDILE, A.; COZZI, V.; BRACALE, R.; TEDESCO, L.; PISCONTI, A.; PALOMBA, L.; CANTONI, O.; CLEMENTI, E.; MONCADA, S.; CARRUBA, M. O.; NISOLI, E. TNF-alpha downregulates eNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 2791-2798, 2006.

VANUCCHI, H.; MOREIRA, E. A. M.; DA CUNHA, D. F.; JUNQUEIRA-FRANCO, M. V. M.; BERNARDES, M. M.; JORDÃO JR, A. A. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa anti-oxidante. **Medicina**, v. 31, p. 31-44, 1998.

VAZIRI, N. D.; WANG, X. Q.; OVEISI, F.; RAD, B. Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. **Hypertension**, v. 36, p. 142-146, 2000.

- VOLTERA, A. F.; CESARETTI, M. L. R.; GINOZA, M.; KOHLMANN JR, O. Efeito da indução de obesidade neuroendócrina sobre a hemodinâmica sistêmica e a função ventricular esquerda de ratos normotensos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 52, p. 47-54, 2008.
- WANG, D. S.; XIE, H. H.; SHEN, F. M.; CAI, G. J.; SU, D. F. Blood pressure variability, cardiac baroreflex sensitivity and organ damage in experimentally hypertensive rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 32, p. 545-552, 2005.
- WANG, Y.; GOLLEDGE, J. Neuronal nitric oxide synthase and sympathetic nerve activity in neurovascular and metabolic systems. **Current Neurovascular Research**, v. 10, p. 81-89, 2013.
- WEI, S. G.; ZHANG, Z. H.; YU, Y.; FELDER, R. B. Systemically administered tempol reduces neuronal activity in paraventricular nucleus of hypothalamus and rostral ventrolateral medulla in rats. **Journal of Hypertension**, v. 27, p. 543-550, 2009.
- WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, stress and diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, p. 1111-1119, 2005.
- WILLIAMS, G.; BROWN, T.; BECKER, L.; PRAGER, M.; GIROIR, B. P. Cytokine-induced expression of nitric oxide synthase in C2C12 skeletal muscle myocytes. **The American Journal of Physiology**, v. 267, p. R1020-R1025, 1994.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight**. 311. Geneva: WHO Technical Report Series, 2012.
- ZANZINGER, J.; CZACHURSKI, J. Chronic oxidative stress in the RVLM modulates sympathetic control of circulation in pigs. **Pflugers Arch: European Journal of Physiology**, v. 439, p. 489-494, 2000.
- ZELEZNÁ, B.; MAIXNEROVÁ, J.; MATYŠKOVÁ, R.; HAUGVICOVÁ, R.; BLOKEŠOVÁ, D.; MALETÍNSKÁ, L. Anorexigenic effect of cholecystokinin is lost but that of CART (cocaine and amphetamine regulated transcript) peptide is preserved in monosodium glutamate obese mice. **Physiology Research**, v. 58, p. 717-723, 2008.
- ZHANG, C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. **Basic Research in Cardiology**, v. 103, p. 398-406, 2008.
- ZHANG, F.; CASEY, R. M.; ROSS, M. E.; IADECOLA, C. Aminoguanidine ameliorates and L-arginine worsens brain damage from intraluminal middle cerebral artery occlusion. **Stroke**, v. 27, p. 317-323, 1996.

ANEXO

ANEXO A

ESTUDO COMPLEMENTAR

Participação do Óxido Nítrico nos Efeitos Cardiovasculares do Glutamato em Ratos Obesos MSG não Anestesiados

1 INTRODUÇÃO

A área rostroventrolateral do bulbo (RVLM) é uma das regiões cerebrais primárias envolvidas na geração da condução simpática. Contém neurônios pré-motores que enviam projeções excitatórias diretas para os neurônios pré-ganglionares simpáticos localizados na coluna intermediolateral da medula espinhal (IML). Neste local fazem sinapse com os neurônios pós-ganglionares, que inervam os efetores do sistema cardiovascular para o coração, vasos sanguíneos e glândula adrenal (DAMPNEY, 1994). A atividade dos neurônios da RVLM é regulada por neurotransmissores excitatórios como o L-glutamato e inibitórios como o ácido γ -aminobutírico (GABA) e alterações tanto na excitação quanto na inibição destes neurônios influenciam diversos estados fisiológicos e fisiopatológicos. Já está bem estabelecida a importância da área RVLM no controle do sistema cardiovascular (GUERTZENSTEIN; SILVER, 1974; DAMPNEY, 1994; PATEL et al., 2001; MUELLER, 2007) e, portanto essa área é um possível alvo de modulação do sistema cardiovascular frente a alterações fisiológicas ou patológicas.

A literatura tem mostrado que o NO exerce importante influência sobre os neurônios da RVLM, modulando sua atividade tônica e fásica sobre a função cardiovascular (SHAPOVAL, 1991; KAJIYAMA et al., 1997; FREDA et al., 1999; HIROOKA et al., 1996). Martins-Pinge et al. (1997) mostraram que o NO pode ter um efeito excitatório na RVLM de ratos acordados, provavelmente em associação com sinapses glutamatérgicas por meio de mecanismos que envolvem a ativação do GMP cíclico (MARTINS-PINGE et al., 1999). Já no estudo de Kimura et al. (2005), os resultados sugerem que a expressão em excesso da iNOS no RVLM causa resposta hipertensiva via ativação do sistema nervoso simpático, provavelmente atribuída ao aumento no estresse oxidativo. A literatura ainda não está totalmente esclarecida em relação ao papel do NO na RVLM em condições fisiológicas, já que as condições

experimentais dos vários estudos parecem interferir nas conclusões (MORIMOTO et al., 2000). No entanto, parece haver consenso quanto a sua importante função moduladora sobre os neurônios dessa área.

O grupo de Stocker (2007) estudou a contribuição dos neurônios da RVLM na elevação da PA em ratos obesos induzidos pela dieta hipercalórica. Seus dados evidenciaram que os neurônios da RVLM contribuem na elevação da atividade simpática neste tipo de hipertensão, oferecendo assim a primeira identificação da região do SNC que contribui para a hipertensão arterial induzida pela obesidade. No estudo de Huber e Schreihofner (2011) foi observado um aumento da atividade angiotensinérgica e diminuição da Gabaérgica nos neurônios da RVLM de ratos obesos Zucker. Porém, o conhecimento dos mecanismos neurais dos neurônios da RVLM nas alterações cardiovasculares induzidas pela obesidade MSG, permanece desconhecido, assim como a relação do glutamato e NO na RVLM nesse modelo de obesidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o envolvimento do óxido nítrico nas respostas cardiovasculares ao L-glutamato na área rostroventrolateral do bulbo (RVLM) em ratos acordados.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Avaliar a sensibilidade glutamatérgica em animais controle e obesos pela microinjeção de L-glutamato na área RVLM e observar o efeito da microinjeção de um *scavenger* de óxido nítrico (Caboxy-PTIO) sobre essa resposta em parâmetros de pressão arterial e frequência cardíaca, em animais não anestesiados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Departamento de Ciências Fisiológicas (CIF) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade (CEEA, processo nº 33645/2010-29).

Animais

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

Indução da Obesidade

Ratos Wistar receberam durante os cinco (5) primeiros dias de vida injeções intradérmicas de glutamato monossódico (4mg/g) (Sigma Co., MO, USA) e os animais controle receberam salina equimolar (MATHIAS et al., 2007). A obesidade foi caracterizada pelo cálculo do Índice de Lee para cada animal aos 90 dias de vida usando a fórmula ($\sqrt[3]{\text{peso corporal/comprimento naso-anal} \times 1000}$) e peso das gorduras retroperitoneal e perigonadal, onde peso corporal e comprimento são dados em gramas (g) e centímetros (cm), respectivamente (BERNARDIS; PATTERSON, 1968).

Implante de cânulas-guia direcionadas ao RVLM

Aos 90 dias de vida, os animais controles e MSG foram submetidos à cirurgia estereotáxica de acordo com a técnica utilizada por Martins-Pinge et al. (1997).

Sob anestesia de pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.), os animais foram posicionados no aparelho estereotáxico (Insight) para implante e fixação com resina acrílica de cânulas-guia direcionadas bilateralmente à área RVLM utilizando-

se as seguintes coordenadas: AP= -2,5; L= 1,8 mm em relação à sutura lambdóide (atlas de PAXINOS; WATSON, 1998). Após esta cirurgia, os animais receberam uma dose profilática de poli-antibiótico veterinário com estreptomicina e penicilina e voltaram ao biotério por 3 dias para recuperação cirúrgica.

Cateterização da artéria e veia femorais

Os animais controle e MSG foram submetidos à cirurgia sob anestesia de tribromoetanol (250 mg/kg, i.p.) para implantação de cateteres na artéria e veia femorais com o objetivo de monitorização da pressão arterial e administração de drogas se necessário, respectivamente.

Os cateteres eram constituídos por segmentos de polietileno PE-10 (4-5cm) soldados a segmentos de polietileno PE-50 (12-13 cm), previamente preenchidos com solução salina 0,9% e anticoagulante (15 U/mL de heparina em solução salina) e obstruídos com um ocluser.

Após a implantação dos cateteres, os mesmos foram exteriorizados na região dorsal do animal através de um trocar por via subcutânea e fixados à pele por sutura cirúrgica. Os animais foram mantidos em caixas individuais durante todo o período pós-operatório.

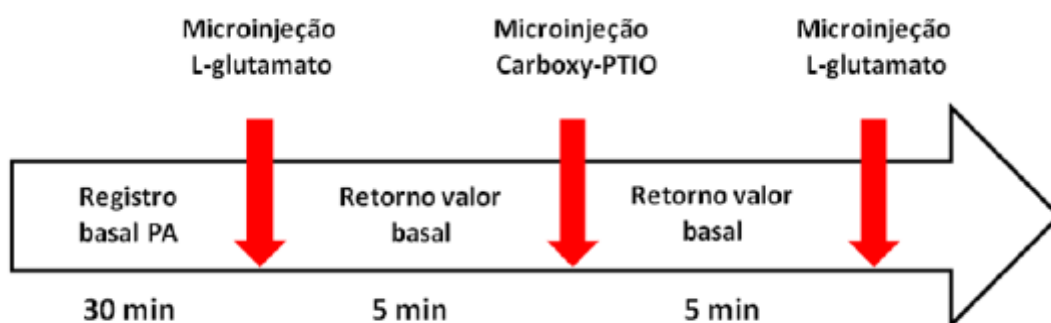
Registro cardiovascular

O registro direto da PA e FC foi realizado 24 horas após o procedimento cirúrgico de implantação dos cateteres, permitindo a recuperação dos animais dos efeitos anestésicos.

A cânula arterial do animal foi acoplada a um transdutor de pressão (MLT0380, ADInstruments) conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (Powerlab, 4/20T, ADInstruments), obtendo-se assim a pressão pulsátil, PAM e FC. Durante o período de registro os animais foram mantidos dentro de caixas individuais em ambiente silencioso. O registro basal foi obtido por pelo menos 30 minutos de registro. Em seguida os animais que foram submetidos ao protocolo experimental.

Protocolo experimental

Após o registro basal da PA de animais controles e obesos, foi realizada a microinjeção unilateral de L-glutamato (5nmol/100nl) (MARTINS-PINGE et al., 2007) seguido do carboxy-PTIO (*scavenger* de NO, 1nmol/100nl) (BUSNARDO et al., 2010) de acordo com o esquema:



Ao final do protocolo experimental os animais foram eutanasiados com uma dose letal de anestésico e em seguida realizado os procedimentos de marcação dos sítios de microinjeção e retirada do cérebro para posterior análise histológica.

Marcação e histologia do cérebro

Logo após a eutanásia dos animais, os sítios de microinjeção foram marcados com uma solução de azul de Evans 2% (100nl). Depois, os animais tiveram seus cérebros retirados e colocados em formalina 10% para posterior análise histológica.

Os cérebros foram cortados em micrótomo de congelamento através de cortes de 25µm de espessura e corados pela técnica do vermelho neutro 1%.

A confirmação do sítio de microinjeção unilateral na RVLM foi detectada através da visualização de corte histológico com marcação com corante Azul de Evans e auxílio do Atlas Paxinos e Watson (1998) e por meio de um mapa da superfície ventral do bulbo. Somente os animais que tiveram os sítios marcados na área do RVLM foram considerados como animais experimentais.

Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa estatístico "INSTAT" (GraphPad, San Diego, CA). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Mudanças nas respostas máximas induzidas por microinjeção de drogas na área RVLM foram analisadas pelo teste *t de Student* pareado. As comparações entre os grupos controles e experimentais foram analisadas pelo teste Anova One Way, seguido de Newman Keuls post hoc, considerando as diferenças significantes para um valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da obesidade MSG

O tratamento com MSG durante os cinco primeiros dias de vida em filhotes de ratos Wistar induziu a obesidade em ratos adultos, como indicado por um aumento do índice de Lee e aumento das gorduras retroperitoneal e perigonadal nos animais MSG quando comparados aos animais controle (Tabela 1). Além disso, ratos MSG mostraram um menor peso corporal e CNA que os ratos controle. Estas observações constituem a caracterização da obesidade em ratos MSG.

Tabela 1 – Efeitos da administração neonatal de MSG em ratos adultos.

	CTR (n=7)	MSG (n=8)
Peso (g)	362 ± 11.74	293 ± 10.80*
Comprimento naso-anal (cm)	24.57 ± 0.20	20.56 ± 0.42*
Índice de Lee	28.97 ± 0.12	32.33 ± 0.57*
Gordura Perigonadal (g)	3.11 ± 0.31	6.67 ± 0.27*
Gordura Retroperitoneal (g)	2.85 ± 0.35	5.42 ± 0.40*

CTR (controle); MSG (obeso MSG). Valores expressos como média ± EPM

* $p < 0,05$ vs. grupo controle

4.2 Histologia e localização da área RVLM

A confirmação do sítio de microinjeção unilateral na RVLM foi realizada através da visualização de corte histológico corado com azul de Evans, auxílio do Atlas Paxinos e Watson (1998) e por meio de um mapa da superfície ventral do bulbo (Figura 1). Somente os ratos com marcação da microinjeção na

área RVLM foram considerados para análise, tendo o núcleo Ambíguo (NA) como referência para localização da RVLM (Figura 2).

Figura 1 – Mapa da superfície ventral do bulbo com localização bilateral da área RVLM. XII Nervo craniano; C1: Primeiro nervo cervical.

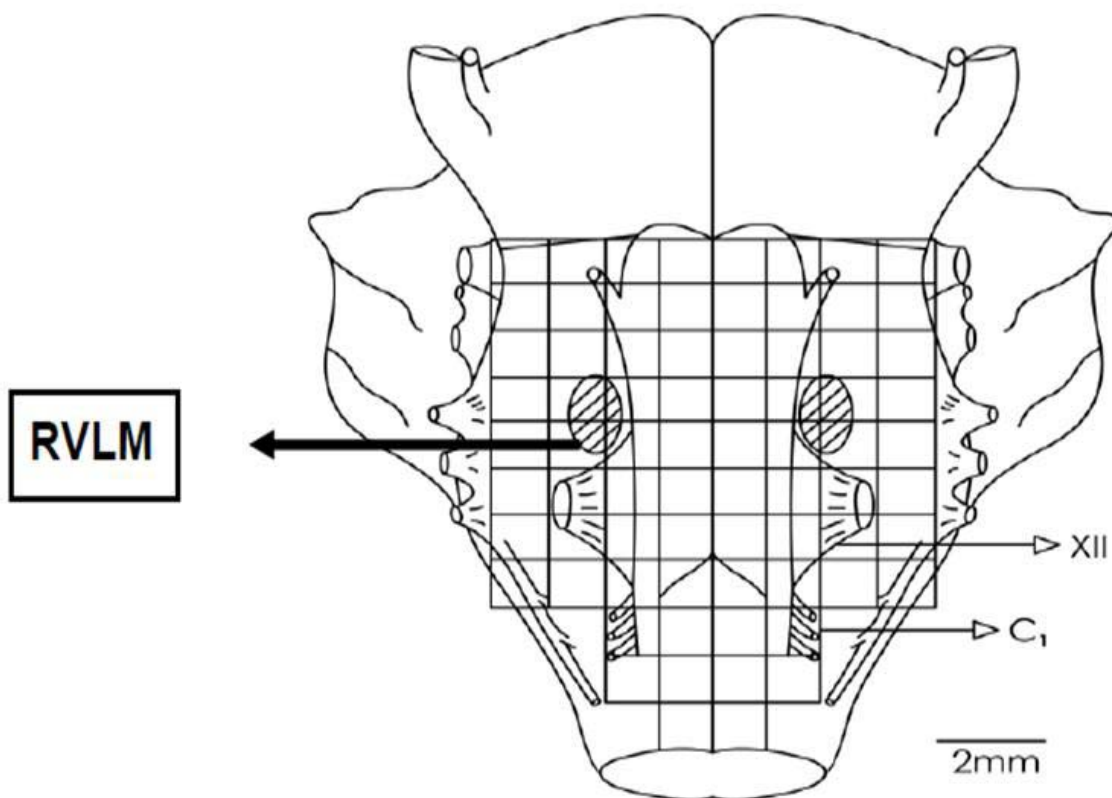
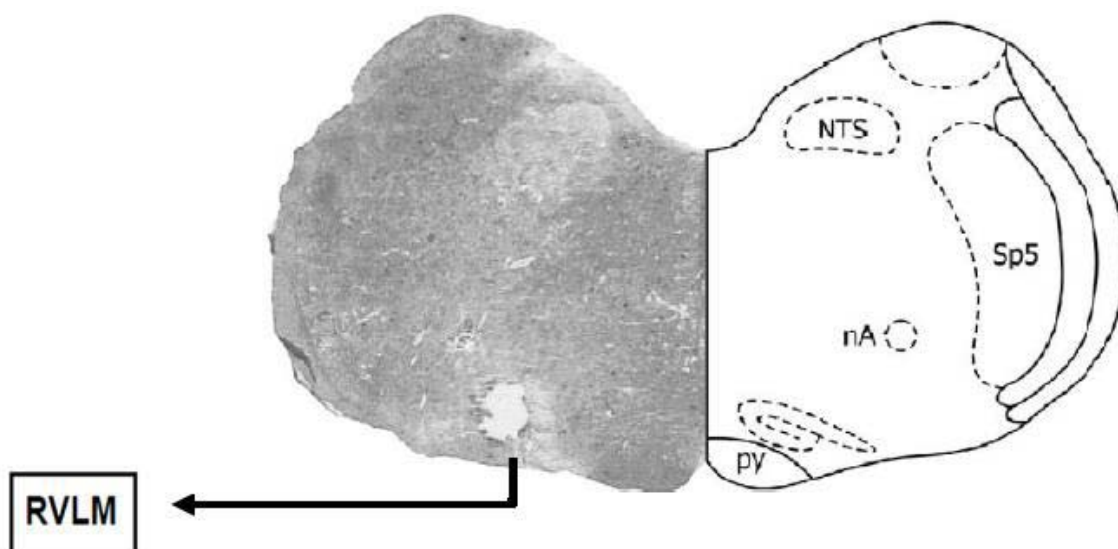


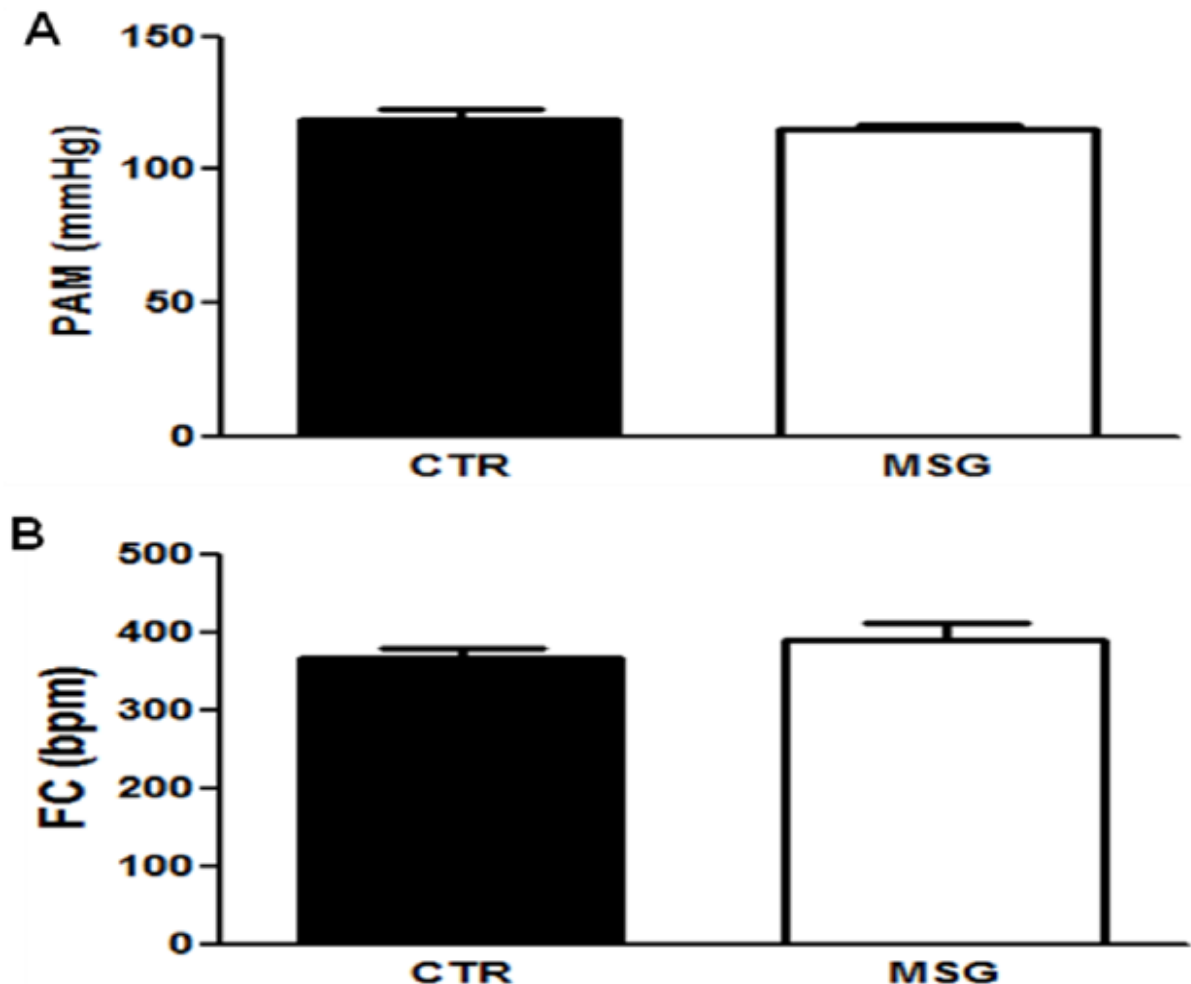
Figura 2 – Corte histológico e diagrama da região bulbar com a marcação do sítio central de injeção na RVLM. NTS: Núcleo Trato Solitário; nA: Núcleo Ambíguo; Sp5: núcleo espinal do trigêmeo; py: Trato Piramidal.



4.3 Pressão arterial e frequência cardíaca basais

Os valores de referência para a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) para cada grupo foram obtidos como o valor médio do período de registro basal de pelo menos 30 minutos para cada animal. Os dados da figura 3 mostram que não houve diferença na PAM e FC basal entre os grupos controle (PAM = 119 ± 4 mmHg, FC = 367 ± 11 bpm, n = 7) e obesos MSG (PAM = 115 ± 2 mmHg, FC = 390 ± 21 bpm, n = 8).

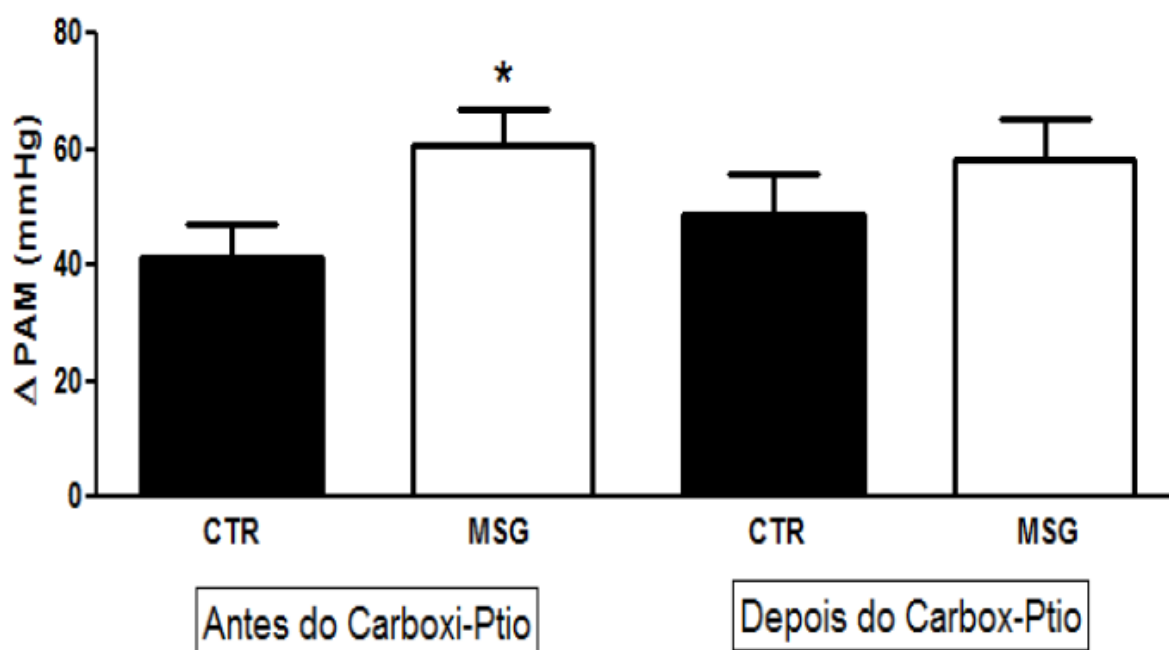
Figura 3 – Efeitos da obesidade MSG sobre a pressão arterial média (PAM) (A) e frequência cardíaca (FC) (B) em ratos acordados. CTR (controle); MSG (obesos MSG).



4.4 Microinjeção de L-glutamato e Carboxi-PTIO em ratos controle e obesos MSG

A primeira microinjeção de L-glutamato produziu um aumento na PAM dos animais CTR e MSG, no entanto, a magnitude desta resposta foi maior nos animais obesos (Δ PAM CTR = 41 ± 6 mmHg; MSG = 61 ± 6 mmHg, $p < 0,05$). Tal diferença estatística não foi mais observada na segunda microinjeção de L-glutamato, que foi realizada após a microinjeção do Carboxi-PTIO, um *scavenger* de NO (Δ PAM CTR = 49 ± 7 mmHg; MSG = 58 ± 7 mmHg) (Figura 4).

Figura 4 – Alterações da PAM induzidas por microinjeção unilateral de L-glutamato antes e depois da microinjeção de Carboxi-PTIO (1nmol/100nl) na RVLM de ratos controle (CTR) e obesos MSG (MSG). * $p < 0,05$ vs. CTR.



4.5 Análise dos valores de FC durante o protocolo experimental de microinjeção na RVLM

As variações da FC durante as respostas pressoras com microinjeções de glutamato na RVLM foram distintas. Alguns animais responderam com aumento de FC (taquicardia) com a microinjeção de L-glutamato antes ou depois do *scavenger*, enquanto outros responderam com diminuição da FC (bradicardia) em reflexo as alterações de PA. (Tabela 2). A figura 5 mostra as

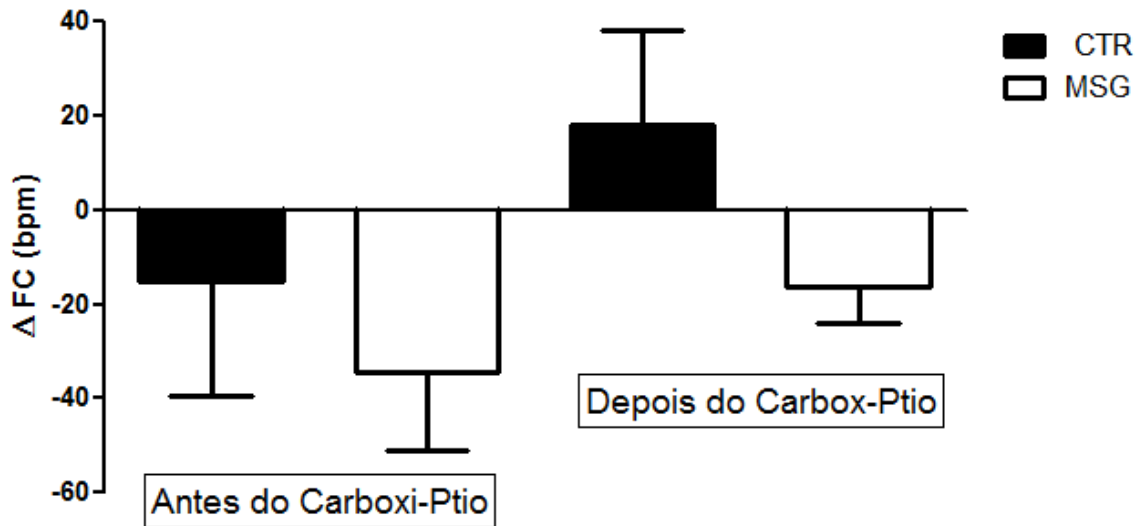
alterações da FC induzidas por microinjeção unilateral de L-glutamato antes e depois da microinjeção de Carboxi-PTIO nos animais controle e obesos MSG.

Tabela 2 – Valores das alterações de FC durante microinjeção de L-glutamato antes (1ª) e depois (2ª) do Carboxi-PTIO nos animais experimentais.

Δ FC	Bradicardia 1ª	Taquicardia 1ª	Bradicardia 2ª	Taquicardia 2ª
CTR	-57 ± 20 (n=4)	41 ± 27 (n=3)	-31 ± 15 (n=3)	55 ± 16 (n=4)
MSG	-48 ± 11 (n=7)	56 (n=1)	-23 ± 4 (n=7)	35 (n=1)

CTR (controle); MSG (obeso MSG). Valores expressos como média ± EPM.

Figura 5 – Alterações da FC induzidas por microinjeção unilateral de L-glutamato antes e depois da microinjeção de Carboxi-PTIO (1nmol/100nl) na RVLM.



5 DISCUSSÃO

A RVLM desempenha um papel chave na regulação da atividade nervosa simpática e da PA. Estudos eletrofisiológicos *in vivo* identificaram neurônios tonicamente ativos na RVLM (GUYENET, 2006). A excitabilidade dos neurônios da RVLM é regulada por uma série de neurotransmissores, incluindo o L-glutamato. Injeção de L-glutamato na área RVLM aumenta descarga neuronal, aumentando a atividade simpática e a PA (GUYENET, 2006).

Neste estudo nós constatamos que os animais MSG não apresentaram hipertensão comparados com os animais controle, sendo seus níveis pressóricos semelhantes. Não sabemos ao certo o motivo dessa inconsistência, já que em outros trabalhos do grupo e neste mesmo, sem a abordagem do SNC, os animais MSG apresentavam hipertensão. Uma possível explicação seria devido a perda de peso após o implante crônico de cânulas a RVLM, fato já observado antes em experimentos realizados com animais MSG e implantes de cânulas no PVN de ratos (MATTOS, 2011).

No presente trabalho, a resposta pressora à microinjeção unilateral de L-glutamato mostrou-se aumentada nos animais obesos quando comparada aos controles, sugerindo que ratos obesos MSG podem ter atividade nervosa simpática elevada originada a partir da atividade dos neurônios na RVLM. Nossos dados corroboram com a literatura que mostra que neurônios da RVLM contribuem para a elevação da atividade simpática na hipertensão derivada da obesidade em diferentes modelos experimentais (HUBER; SCHREIHOFER, 2011; STOCKER et al., 2007; SUHAIMI et al., 2010).

A literatura evidencia que os efeitos do NO na RVLM sobre a regulação da pressão arterial são controversos. Há relatos que o NO na RVLM reduz a pressão arterial por inibir a atividade nervosa simpática; no entanto resultados opostos também têm sido reportados (KISHI; HIROOKA, 2012; KUMAGAI et al., 2012). Provavelmente isso se deva as várias metodologias utilizadas, espécies animais, drogas e concentrações diferentes (MORIMOTO et al., 2000).

Neste estudo, para avaliar a influência do NO na neurotransmissão glutamatérgica na área RVLM dos animais controles e obesos, utilizamos uma droga *scavenger* de NO, o carboxi-PTIO. Nossos resultados mostraram que após a microinjeção de carboxi-PTIO a resposta pressora à microinjeção unilateral de

glutamato não se mostrou mais alterada entre os grupos controle e obeso MSG. Esses dados sugerem a participação do NO na resposta glutamatérgica sobre a atividade dos neurônios da RVLM dos animais obesos MSG. Além disso, deve ser ressaltado que embora não tenha sido estatisticamente significativa, após a microinjeção do *scavenger*, o aumento da PA pelo glutamato teve uma tendência a ser menor nos animais obesos MSG e uma tendência a ser maior nos animais controles. Isso sugere que talvez as vias produtoras de NO possam estar diferentemente reguladas nas duas situações experimentais.

A literatura sugere que a biodisponibilidade de NO endógeno na RVLM pode modular o tônus simpático da área. Ao demonstrar significativa hipotensão e bradicardia após a microinjeção bilateral na RVLM de carboxi-PTIO, o estudo de Chan et al. (2001) evidenciou um possível papel simpatoexcitatório para o NO endógeno na RVLM na manutenção da PAS e FC. Além disso, é possível que os nossos resultados utilizando o carboxi-PTIO possam ser devido à capacidade de “varrer” os EROs que estariam mediando a hipertensão através da ativação do SNS, como mostrado no trabalho de Aoyagi et al. (1999).

As variações da FC durante as respostas pressoras com microinjeções de glutamato na RVLM foram distintas. A bradicardia apresentada por alguns animais se justifica como uma ação dos barorreceptores em reflexo as alterações de PA. Já a taquicardia, podemos especular que ocorreu em virtude da estimulação direta de neurônios excitatórios da RVLM que se projetam para o coração. Efeitos semelhantes já foram observados em outros estudos de microinjeção de glutamato na RVLM (MARTINS-PINGE et al., 2007).

Este estudo é apenas o início da investigação do papel do NO sobre a função cardiovascular controlada pela RVLM em animais obesos MSG. Nosso grupo pretende realizar as análises sobre a interferência das distintas vias enzimáticas de produção de NO, presentes na área RVLM, e que podem estar contribuindo para as alterações observadas sobre a neurotransmissão glutamatérgica ou mesmo sobre outros neurotransmissores que aí se encontram e controlam a função cardiovascular. Pretendemos também relacionar os efeitos cardiovasculares com as alterações na modulação autonômica, através da análise espectral.

REFERÊNCIAS

- AOYAGI, K.; AKIYAMA, K.; SHAHRZAD, S.; TOMIDA, C.; HIRAYA-MA, A.; NAGASE, S.; TAKEMURA, K.; KOYAMA, A.; OHBA, S.; NARITA, M. Formation of guanidinosuccinic acid, a stable nitric oxide mimic, from argininosuccinic acid and nitric oxide-derived free radicals. **Free Radical Research**, v. 31, p. 59-65, 1999.
- BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B.D. Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, v. 40, p. 527-528, 1968.
- BUSNARDO, C.; CRESTANI, C. C.; TAVARES, R. F.; RESSTEL, L. B. M.; CORREA, F. M. A. Cardiovascular responses to L-glutamate microinjection into the hypothalamic paraventricular nucleus are mediated by a local nitric oxide-guanylate cyclase mechanism. **Brain Research**, v. 1344, p. 87-95, 2010.
- CHAN, S. H. H.; WANG, L. L.; WANG, S. H.; CHAN, J. Y. H. Differential cardiovascular responses to blockade of nNOS or iNOS in rostral ventrolateral medulla of the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 33, p. 606-614, 2001.
- DAMPNEY, R. A. L. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiological Reviews**, v. 74, p. 323-364, 1994.
- FREDA, B. J.; GAITONDE, R. S.; LILLANEY, R.; ALLY, A. Cardiovascular responses to muscle contraction following microdialysis of nitric oxide precursor into ventrolateral medulla. **Brain Research**, v. 828, p. 60-67, 1999.
- GUERTZENSTEIN, P. G.; SILVER, A. Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. **Journal of Physiology**, v. 242, p. 489-503, 1974.
- GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, p. 335-46, 2006.
- HIROOKA, Y.; POLSON, J. W.; DAMPNEY, R. A. L. Pressor and sympathoexcitatory effects of nitric oxide in the rostra ventrolateral medulla. **Journal of Hypertension**, v. 14, p. 1317-1324, 1996.
- HUBER, D. A.; SCHREIHOFER, A. M. Altered regulation of the rostra ventrolateral medulla in hypertensive obese Zucker rats. **American Journal of Physiology. Heart and Circulation Physiology**, v. 301, p. H230-H240, 2011.
- KAGIYAMA, S.; TSUCHIHASHI, T.; ABE, I.; FUJISHIMA, M. Cardiovascular effects of nitric oxide in the rostra ventrolateral medulla of rats. **Brain Research**, v. 757, p. 155-158, 1997.
- KIMURA, Y.; HIROOKA, Y.; SAGARA, Y.; ITO, K.; KISHI, T.; SHIMOKAWA, H.; TAKESHITA, A.; SUNAGAWA, K. Overexpression of inducible nitric oxide synthase in rostral ventrolateral medulla causes hypertension and sympathoexcitation via an increase in oxidative stress. **Circulation Research**, v. 96, p. 252-260, 2005.

KISHI, T.; HIROOKA, Y. Oxidative stress in the brain causes hypertension via sympathoexcitation. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 1-8, 2012.

KUMAGAI, H.; OSHIMA, N.; MATSUURA, T.; IIGAYA, K.; IMAI, M.; ONIMARU, H.; SAKATA, K.; OSAKA, M.; ONAMI, T.; TAKIMOTO, C.; KAMAYACHI, T.; ITOH, H.; SARUTA, T. Importance of rostral ventrolateral medulla neurons in determining efferent sympathetic nerve activity and blood pressure. **Hypertension Research**, v. 35, p. 132-141, 2012.

MARTINS-PINGE, M. C.; ARAÚJO, G. C.; LOPES, O. U. Nitric oxide-dependent guanylyl cyclase participates in the glutamatergic neurotransmission within the rostral ventrolateral medulla of awake rats. **Hypertension**, v. 34, p. 748-751, 1999.

MARTINS-PINGE, M. C.; BARALDI-PASSY, I.; LOPES, O. U. Excitatory effects of nitric oxide within the rostral ventrolateral medulla of free moving rats. **Hypertension**, v. 30, p. 704-707, 1997.

MARTINS-PINGE, M. C.; GARCIA, M. R.; ZOCCAL, D. B.; CRESTANI, C. C.; PINGE-FILHO, P. Differential influence of iNOS and nNOS inhibitors on rostral ventrolateral medullary mediated cardiovascular control in conscious rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 131, p. 65-69, 2007.

MATHIAS, P. C.; GRASSIOLLI, S.; ROCHA, D. N.; SCOMPARIN, D. X.; GRAVENA, C. Transplantation of pancreatic islets from hypothalamic obese rats corrects hyperglycemia of diabetic rats. **Transplantation Proceedings**, v. 39, p. 193-195, 2007.

MATTOS, A. M. S. **Alterações cardiovasculares, autonômicas e comportamentais derivadas da obesidade induzida por glutamato monossódico em ratos**. 2011. 86f. Dissertação (Mestrado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

MORIMOTO, S.; SASAKI, S.; MIKI, S.; KAWA, T.; NAKAMURA, K.; ITOH, H.; NAKATA, T.; TAKEDA, K.; NAKAGAWA, M.; FUSHIKI, S. Nitric oxide is an excitatory modulator in the rostral ventrolateral medulla in rats. **American Journal of Hypertension**, v. 13, p. 1125-1134, 2000.

MUELLER, P. J. Exercise training attenuates increases in lumbar sympathetic nerve activity produced by stimulation of the rostral ventrolateral medulla. **Journal Applied Physiology**, v. 102, p. 803-813, 2007.

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, p. 814-824, 2001.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 4. ed. New York: Academic Press, 1998.

SHAPOVAL, L. N.; SAGACH, V. F.; POBEGAILO, L. S. Nitric oxide influences ventrolateral medullary mechanisms of vasomotor control in the cat. **Neuroscience Letters**, v. 132, p. 47-50, 1991.

STOCKER, S. D.; MEADOR, R.; ADAMS, J. M. Neurons of the rostral ventrolateral medulla contribute to obesity-induced hypertension in rats. **Hypertension**, v. 49, p. 640-646, 2007.

SUHAIMI, F. W.; YUSOFF, N. H.; DEWA, A.; YUSOF, A. P. Role of excitatory amino acid input in rostral ventrolateral medulla neurons in rats with obesity-induced hypertension. **Acta Neurologica Belgica**, v. 110, p. 57-64, 2010.