



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDA NOVI CORTEGOSO LOPES

**ALTERAÇÕES FUNCIONAIS NA ÁREA
ROSTROVENTROLATERAL DO BULBO EM RATOS
OBESOS: ENVOLVIMENTO DA NO-SINTASE INDUZÍVEL**

Londrina
2016

FERNANDA NOVI CORTEGOSO LOPES

**ALTERAÇÕES FUNCIONAIS NA ÁREA
ROSTROVENTROLATERAL DO BULBO EM RATOS
OBESOS: ENVOLVIMENTO DA NO-SINTASE INDUZÍVEL**

Trabalho submetido ao programa Multicêntrico de Pós-Graduação de Ciências Fisiológicas-Sociedade Brasileira de Fisiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito para defesa de dissertação de mestrado

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marli Cardoso
Martins Pinge

Londrina
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

L864a Lopes, Fernanda Novi Cortegoso.
 Alterações funcionais na área rostroventrolateral do bulbo em ratos
 obesos: envolvimento da no-sintase induzível / Fernanda Novi
 Cortegoso Lopes. - Londrina, 2016.
 51 f. : il.

 Orientador: Marli Cardoso Martins Pinge.
 Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade
 Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa
 Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2016.

 1. Hipertensão. 2. Óxido nítrico. 3. Sistema nervoso simpático. 4.
 Hypertension. 5. Nitrogen oxide. I. Lopes, Fernanda Novi Cortegoso. II.
 Pinge, Marli Cardoso Martins. III. Título.

CDU 612:616.12

FERNANDA NOVI CORTEGOSO LOPES

**ALTERAÇÕES FUNCIONAIS NA ÁREA ROSTROVENTROLATERAL
DO BULBO EM RATOS OBESOS: ENVOLVIMENTO DA NO-SINTASE
INDUZÍVEL**

Trabalho submetido ao programa Multicêntrico de Pós-Graduação de Ciências Fisiológicas-Sociedade Brasileira de Fisiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito para defesa de dissertação de mestrado

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dra. Marli Cardoso Martins
Pinge
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dra. Gislaine Garcia Pelosi Gomes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani
Faculdade de Ciências Farmacêuticas –
UNESP

Londrina, 26 de fevereiro de 2016.

AGRADECIMENTO (S)

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

Aos meus pais, Ariel Cortegoso Lopes e Vera Lúcia Novi, pelo esforço, dedicação e total incentivo à minha formação pessoal e profissional.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Marli Cardoso Martins Pinge, pela oportunidade e incentivo, exemplo de determinação, respeito e profissionalismo.

Aos meus amigos do laboratório de Fisiologia e Fisiopatologia Cardiovascular: Ananda, Blenda, Bruno, Eric, Hiviny, Jaqueline, Lorena, Nathalia pela amizade e aprendizado.

A Natalia Veronez, pelo aprendizado e confiança.

A todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica, pelo convívio e pelos exemplos que resultaram em valiosos ensinamentos.

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

À CAPES pelo apoio financeiro.

LOPES, Fernanda Novi Cortegoso. **Alterações funcionais na área rostroventrolateral do bulbo em ratos obesos:** envolvimento da no-sintase induzível. 2016. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2016.

RESUMO

A literatura descreve que animais obesos apresentam grau baixo de inflamação e alterações na produção de óxido nítrico (NO). O NO exerce papel importante na função cardiovascular, e a produção pela via induzível (iNOS) está vinculada a processos inflamatórios. Na área rostroventrolateral do bulbo (RVLM), o glutamato é um neurotransmissor importante e o NO modula seus efeitos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da microinjeção de L-glutamato na RVLM sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) antes e após microinjeção de inibidores da iNOS, a expressão gênica da iNOS, e dosagem de NO (nitrito) em “punchs” de RVLM e coração. Ratos Wistar recém-nascidos receberam 4 mg/g de peso corporal de glutamato monossódico (MSG) ou salina equimolar nos 5 primeiros dias de vida. Aos 90 dias foram implantadas cânulas-guia na RVLM dos animais e cateterização de artéria femoral após 3 dias. Após 24 horas foi realizado o registro da PAM e FC através do sistema Powerlab. Os efeitos da microinjeção do glutamato (5nm/100nl) foram avaliados antes e após microinjeção de Aminoguanidina (AG) (250pmol/100nl) ou S-methylisothiourrea (SMT) (250 pmol/100 nl) ou salina fisiológica (100 nL) na RVLM. A obesidade foi evidenciada pelo aumento do índice de Lee dos grupos MSG (salina 34,27±0,69 n=5; AG 32,27±0,25 n=5; SMT 33,66±0,44 n=5) em relação aos CTRs (salina 30,56±0,33 n=5; AG 31,21±0,32 n=6; SMT 31,17±0,32 N=6) e aumento de peso das gorduras perigonadal e retroperitoneal. O aumento da PAM pelo L-glutamato foi maior no grupo MSG após AG (antes: 40±7,93 mmHg; após AG: 61±4,39 mmHg, n=5) e SMT (antes: 45,30±7,58 mmHg; após SMT: 65,25±2,42 mmHg, n=5). Na FC houve aumento no grupo CTR após AG (antes 77,88±12,12 bpm; depois 131,7±12,12 bpm, n=5) e SMT também. A análise da expressão gênica para a iNOS não mostrou diferenças entre os grupos. A dosagem de NO na RVLM mostrou também que não há diferenças entre controle e obeso. Nossos dados sugerem um papel para o óxido nítrico nas respostas cardiovasculares da RVLM em ratos obesos. No entanto, a origem dessa alteração pode ser decorrente de outra isoforma que não a iNOS.

Palavras-Chave: Hipertensão. Simpático. Óxido nítrico. Frequência cardíaca.

LOPES, Fernanda Novi Cortegoso. **Functional alterations by nitric oxide in rostral ventrolateral medulla of obese rats: involvement of inos isoform.** 2016. 51 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2016.

ABSTRACT

The literature reports that obese animals present low grade of inflammation and changes in the production of nitric oxide (NO). NO plays an important role in cardiovascular function, and the production via the inducible (iNOS) is linked to inflammatory processes. In rostral ventrolateral medulla (RVLM), glutamate is an important neurotransmitter and NO modulates its effects. The objective of this study was to evaluate the effects of L-glutamate microinjection in RVLM on mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) before and after microinjection of iNOS inhibitors, gene expression of iNOS and dosage of NO (nitrite) in "punches" of the RVLM and heart. Newborn Wistar rats received 4 mg / g body weight of monosodium glutamate (MSG) or equimolar saline within the first 5 days of life. At 90 days were implanted guide cannulas to RVLM of animals and artery catheterization after 3 days. After 24 hours was performed the record of MAP and HR through Powerlab system. The effects of glutamate microinjection (5nm / 100nL) were evaluated before and after microinjection aminoguanidine (AG) (250pmol / 100nL) or S-methylisothiourrea (SMT) (250 pmol / 100 nL) or physiological saline (100 nL) at RVLM . Obesity was evidenced by increased Lee index MSG groups (MSG saline 34.27 ± 0.69 n = 5; AG 32.27 ± 0.25 n = 5; SMT 33.66 ± 0.44 n = 5) in relation to control (CTR saline 30.56 ± 0.33 n = 5; AG 31.21 ± 0.32 n = 6; SMT 31.17 ± 0.32 n = 6) and increased weight of the perigonadal and retroperitoneal fat. The increased MAP by L-glutamate was higher in the MSG group after AG (before: 40 ± 7.93 mm Hg; after: 61 ± 4.39 mmHg, n = 5) and SMT (before: 45.30 ± 7.58 mm Hg, after: 65.25 ± 2.42 mmHg, n = 5). HR was increased after AG in CTR group (before: 77.88 ± 12.12 bpm, after: 131.7 ± 12.12 bpm, n = 5) and also SMT. The analysis of gene expression for iNOS also showed no difference between groups. The dosage of NO in the RVLM showed also no differences between control and obese animals. Our data suggest a role for nitric oxide in the RVLM in cardiovascular responses of obese rats. However, the origin of this change may be due to another isoform than iNOS.

Keywords: Hypertension. Sympathetic. Nitric oxide. Heart rate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Esquema representativo do protocolo experimental.22
- Figura 2** – (A) Mapa da superfície ventral do bulbo com localização bilateral da área RVLM. XII Nervo craniano; C1: Primeiro nervo cervical; (B) 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 espinhal do trigêmeo; py: Trato Piramidal..28
- Figura 3** – Parâmetros espectrais basais da pressão arterial sistólica (PAS) de ratos CTR (controle, n=16) e MSG (obeso, n=15), batimento a batimento calculado através da análise autorregressiva. Variância total e LF (low frequency) absolutos. Teste de comparação múltipla Anova one way seguido do pós teste de Tukey-Kramer. Valores expressos como média \pm EPM.30
- Figura 4** – Parâmetros espectrais basais da análise do intervalo de pulso (IP) calculados de séries temporais espectrais autoregressivas do período basal dos grupos CTR (controle, n=16) e MSG (obeso, n=15). Teste de comparação múltipla Anova one way seguido do pós teste de Tukey-Kramer. Valores expressos como média \pm EPM, * $p < 0,05$ vs. CTR; ** $p < 0,01$ vs. CTR..31
- Figura 5** – Efeitos da microinjeção de L-glutamato antes e após salina sobre os parâmetros da pressão arterial média (PAM) (A) e frequência cardíaca (FC) (B) em ratos CTR (controle) e MSG (obeso) não anestesiados. Teste t-Student pareado. Valores expressos como média \pm EPM.....33
- Figura 6** – Efeitos da microinjeção de L-glutamato antes e após Aminoguanidina (AG) sobre os parâmetros da pressão arterial média (PAM) (A) e frequência cardíaca (FC) (B) em ratos CTR (controle) e MSG (obeso) não anestesiados. Teste t-Student

	pareado. Valores expressos como média ± EPM, p<0,05. * p<0,05 vs. CTR AG antes; #p<0,05 vs. CTR AG antes..	35
Figura 7	– Efeitos da microinjeção de L-glutamato antes e após S-methylisothiourea sobre os parâmetros da pressão arterial média (PAM) (A) e frequência cardíaca (FC) (B) em ratos CTR e MSG não anestesiados. Teste t-Student pareado. Valores expressos como média ± EPM. * p < 0,05 vs. SMT MSG antes; # p<0,05 vs. SMT CTR antes.....	37
Figura 8	– Expressão gênica de iNOS em punches de RVLM por RT-PCR e animais CTR (controle) e MSG (obeso). Teste t-Student não pareado. Valores expressos como média ± EPM.....	38
Figura 9	– Dosagem de nitrito em punches de RVLM em animais CTR (controle) e MSG (obeso). Teste t-Student não pareado. Valores expressos como média ± EPM.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos da administração subcutânea de MSG ou salina equimolar no período neonatal em ratos adultos.	27
Tabela 2 - Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos controle (CTR) e obesos (MSG) acordados.....	29
Tabela 3 - Sensibilidade barorreflexa espontânea de animais CTR e MSG no período basal.....	32
Tabela 4 - Variação da resposta ao L-glutamato na RVLM de ratos CTR e MSG acordados tratados com salina.	32
Tabela 5 - Variação da resposta ao L-glutamato na RVLM de ratos CTR e MSG acordados tratados com Aminoguanidina.	34
Tabela 6 - Variação da resposta ao L-glutamato na RVLM de ratos CTR e MSG acordados tratados com S-methylisothiourea.	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Aminoguanidina
AGL	Ácidos graxos livres
ARC	Núcleo arqueado do hipotálamo
BH ₄	(-6R) 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina
CNA	Comprimento nasoanal
cNOS	óxido nítrico sintase constitutiva
CTR	Controle
DCV	Doenças cardiovasculares
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FC	Frequência cardíaca
FMN	Flavina mononucleótido
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
MSG	Glutamato monossódico
mtNOS	Óxido nítrico sintase mitocondrial
NA	Núcleo ambíguo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NTS	Núcleo do trato solitário
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
RVLM	Área rostroventrolateral do bulbo
SM	Síndrome metabólica
SMT	S-methylisothiurea
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

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1.1 OBESIDADE	13
1.2 SÍNDROME METABÓLICA	13
1.3 OBESIDADE MSG.....	14
1.4 ÓXIDO NÍTRICO.....	15
1.5 ÁREA ROSTROVENTROLATERAL DO BULBO (RVLM).....	17
JUSTIFICATIVA	18
OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	19
MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 ANIMAIS	20
4.2 INDUÇÃO DA OBESIDADE.....	20
4.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DA OBESIDADE	20
4.4 IMPLANTE DE CÂNULAS-GUIA DIRECIONADAS À RVLM.....	21
4.5 CATETERIZAÇÃO DA ARTÉRIA E VEIA FEMORAL.....	21
4.6 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES.....	21
4.7 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	22
4.8 MARCAÇÃO E HISTOLOGIA DO CÉREBRO	22
4.9 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA E FREQUÊNCIA CARDÍACA.....	23
4.10 ANÁLISE DO BARORREFLEXO ESPONTÂNEO.....	23
4.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA INOS DA ÁREA RVLM	24
4.12 DOSAGEM DE NITRITO NA RVLM.....	25
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
RESULTADOS	27

5.1	CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE MSG	27
5.2	HISTOLOGIA E LOCALIZAÇÃO DA ÁREA RVLM.....	27
5.3	PARÂMETROS CARDIOVASCULARES	28
5.3.1	Pressão Arterial e Frequência Cardíaca Basal.....	28
5.3.2	Parâmetros Espectrais da Pressão Arterial Sistólica (PAS)	29
5.3.3	Parâmetros Espectrais do Intervalo de Pulso (IP)	30
5.3.4	Análise do Barorreflexo Espontâneo	31
5.3.5	Microinjeção de L-glutamato Antes e Após Tratamento com Salina em Ratos Controle e MSG.....	32
5.3.6	Microinjeção de L-glutamato Antes e Após Tratamento com Aminoguanidina (AG) em Ratos CTR e MSG.....	33
5.3.7	Microinjeção de L-glutamato Antes e Após Tratamento com S- methylisothiourea (SMT) em Ratos CTR e MSG.	36
5.4	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA INOS POR RT-PCR E DOSAGEM DE NITRITO EM PUNCHS DE RVLM	38
DISCUSSÃO		40
CONCLUSÃO		43
REFERÊNCIAS.....		44

1 INTRODUÇÃO

3 1.1 OBESIDADE

5 A obesidade é atualmente o principal fator de risco para o
6 desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV), podendo ocorrer de forma
7 independente ou concomitante com outros fatores de risco. No Brasil, as DCV são
8 causas de aproximadamente 30% de todas as mortes. Destas, aproximadamente
9 50% ocorrem em adultos com idades entre 30-69 anos (Aballay *et al.*, 2013). A
10 obesidade também leva ao aumento do quadro pré-diabético e quando associado
11 pode originar comorbidades como câncer, derrame, aterosclerose, hipertensão e
12 doenças cardiovasculares (DCV), além de impactar consideravelmente a saúde
13 mundial. Em 2013 a associação médica americana de saúde declarou a obesidade
14 como uma doença (Sansbury e Hill, 2014).

15 A obesidade se desenvolve por um desequilíbrio energético: as
16 calorias consumidas são maiores que as utilizadas nos processos como
17 termogênese, respiração e digestão (Tseng *et al.*, 2010). Ela possui origem
18 multifatorial sendo o resultado de interações entre fatores genéticos, psicológicos,
19 socioeconômicos, culturais e ambientais. O tratamento da obesidade é um processo
20 complicado, pois esses fatores que a influenciam interagem de diversas maneiras.
21 Para atuar diretamente nos mecanismos que provocam o desequilíbrio energético,
22 pesquisas sugerem que mudanças na função vascular poderiam regular a
23 homeostase metabólica e outros estudos mostram que o óxido nítrico pode ter papel
24 importante na regulação do metabolismo sistêmico, composição corporal e
25 sensibilidade à insulina (Fu *et al.*, 2005; Jobgen *et al.*, 2009).

27 1.2 SÍNDROME METABÓLICA

28
29 Outra condição, denominada síndrome metabólica (SM), também
30 está relacionada à obesidade. É uma entidade clínica que representa um grupo de
31 fatores de risco cardiometabólicos e caracterizada pela obesidade abdominal,
32 resistência à insulina, hipertensão, hipertrigliceridemia, estado pró-inflamatório
33 sistêmico e redução do nível de colesterol HDL. A presença de SM está associada a
34 um risco aumentado de eventos cardiovasculares e de mortalidade (Lambert *et al.*,

35 2010).

36 Diferentes modelos experimentais têm sido propostos com o intuito
37 de elucidar a fisiopatologia da SM. Dentre eles podemos citar os modelos animais de
38 mutação gênica, tais como camundongos ob/ob - que não produzem o hormônio
39 leptina, desenvolvendo obesidade por hiperfagia e resistência à insulina (Perfield *et*
40 *al.*, 2013); camundongos db/db e ratos obesos Zucker (OZR) (Iida *et al.*, 1996), que
41 possuem mutação gênica do receptor da leptina, causando obesidade, hiperfagia e
42 hipertensão (Siwy *et al.*, 2012), bem como em roedores que recebem
43 suplementação alimentar rica em lipídeos e/ou carboidratos cronicamente (Demigne
44 *et al.*, 2006; Rutledge e Adeli, 2007), ou ainda um modelo de obesidade
45 hipotalâmica, objeto do presente estudo, onde os animais são submetidos à
46 administração subcutânea de glutamato monossódico (MSG), um aminoácido
47 excitatório lesivo ao sistema nervoso central quando administrado em altas
48 concentrações (Kizer *et al.*, 1977; Hirata *et al.*, 1997).

49

50 1.3 OBESIDADE MSG

51

52 A obesidade desenvolvida pela administração subcutânea de MSG
53 em ratos neonatos ocorre devido ao fato da barreira hematoencefálica não estar
54 completamente desenvolvida logo após o nascimento permitindo o seu acesso no
55 sistema nervoso central (Kizer *et al.*, 1977). A lesão ocorre principalmente em
56 neurônios localizados no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC). Provoca edema
57 intracelular e necrose neuronal que causa a destruição de corpos celulares de
58 neurônios do ARC, eminência média e outras áreas cerebrais (Olney, 1969; Kizer *et*
59 *al.*, 1977). O ARC é o principal alvo dos efeitos deletérios do MSG injetado,
60 acometendo 80 a 90% de seus neurônios (Olney, 1969).

61 O efeito da administração de glutamato monossódico (MSG) no
62 período neonatal tem sido extensivamente estudado em relação aos efeitos
63 metabólicos (Olney, 1969; Balbo *et al.*, 2000; Macho *et al.*, 2000; Dolnikoff *et al.*,
64 2001; Perello *et al.*, 2003), porém poucos estudos avaliaram a função
65 cardiovascular. Dados do nosso laboratório evidenciaram que ratos tratados com
66 MSG são hipertensos (Cunha *et al.*, 2010), possuem aumentada modulação
67 simpática para o coração (Da Cunha *et al.*, 2011), alterações barorreflexas (Karlen-
68 Amarante *et al.*, 2012) e aumentada atividade simpática renal (Da Silva Mattos *et al.*,

69 2012). A literatura (Tokarev *et al.*, 1997) mostra que animais MSG apresentam
70 alterações na produção de NO e que mudanças cardiovasculares podem participar
71 dessas alterações. Dados recentes mostraram que na obesidade MSG ocorre uma
72 menor produção de óxido nítrico (NO) endotelial, além de maior estresse oxidativo
73 sistêmico (Da Cunha *et al.*, 2014). No entanto, não se sabe quais as possíveis
74 alterações do NO no controle cardiovascular central.

75

76 1.4 ÓXIDO NÍTRICO

77

78 O óxido nítrico (NO) é um gás lipossolúvel com meia-vida
79 extremamente curta (4-10 segundos) e produzido por praticamente todas as células
80 humanas. É sintetizado enzimaticamente a partir do aminoácido L-arginina, por um
81 grupo de hemoproteínas, as sintases de óxido nítrico (NOS), e requer a presença de
82 cofatores como nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), flavina
83 adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleótido (FMN) e (-6R) 5,6,7,8-
84 tetrahydrobiopterina (BH₄) (Li e Poulos, 2005).

85

86 A literatura tem identificado três principais isoformas da NOS: NOS
87 neuronal (nNOS ou NOS I) presente no cérebro, medula espinhal, gânglios
88 simpáticos, nervos periféricos, células epiteliais do estômago, útero, pulmão e
89 músculo esquelético; NOS endotelial (eNOS ou NOS III) encontrada em células
90 endoteliais, músculo liso vascular e músculo cardíaco (Moncada e Higgs, 1993;
91 Forstermann e Sessa, 2012), sendo estas duas isoformas expressas
92 constitutivamente e uma terceira isoforma induzível da NOS (iNOS ou NOS II), cujas
93 fontes podem ser células endoteliais, células epiteliais, macrófagos, neutrófilos,
94 células do músculo liso vascular e fibroblastos, e sua ativação está relacionada com
95 estados inflamatórios. Alguns trabalhos descrevem ainda uma quarta forma de NOS
96 localizada nas mitocôndrias de diferentes órgãos (NOS mitocondrial - mtNOS)
(Giulivi *et al.*, 1998; Finocchietto *et al.*, 2009).

97

98 O NO tem múltiplas ações biológicas: transmissão e plasticidade
99 sináptica, aprendizado, memória, agregação plaquetária, função imunológica,
100 interação endotélio-leucócito, angiogênese, neuromodulador no sistema nervoso
101 central (SNC) e periférico, podendo regular mecanismos fisiológicos de forma aguda
102 ou crônica (Forstermann e Sessa, 2012). No entanto, o NO é mais conhecido como
potente regulador do fluxo sanguíneo e foi primeiramente denominado como fator

103 relaxante derivado do endotélio (Furchgott e Zawadzki, 1980). Por outro lado, o NO
104 é potencialmente tóxico. A toxicidade se faz presente particularmente em situações
105 de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do
106 sistema antioxidante (Moncada e Higgs, 2006; Forstermann e Sessa, 2012).

107 O NO tem estreita ligação com a obesidade, pois possui papel
108 importante nas causas diretas da obesidade como: fome e saciedade, absorção de
109 nutrientes e gasto energético. Dados da literatura mostram que a biodisponibilidade
110 de NO via eNOS (presente no tecido adiposo e músculos esqueléticos) está
111 diminuída em animais obesos e com diabetes (Bender *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008)
112 e em humanos também (Higashi *et al.*, 2001; Gruber *et al.*, 2008). A
113 biodisponibilidade depende do balanço entre a geração e a degradação, ou seja,
114 uma das hipóteses é que a diminuição pode ser devido a menor expressão da
115 atividade da enzima NOS ou pela reação do NO com espécies reativas. Por outro
116 lado, estudos mostram que a enzima iNOS, presente nas células β -pancreáticas,
117 aorta, músculos esqueléticos, fígado e tecido adiposo, está aumentada
118 (Shimabukuro *et al.*, 1997; Weisberg *et al.*, 2003; Noronha *et al.*, 2005; Sugita *et al.*,
119 2005; Mantena *et al.*, 2009).

120 O NO participa do processo inflamatório de duas formas diferentes.
121 O NO produzido pela via induzível, como o que ocorre em macrófagos, tem ações
122 pró-inflamatórias (o qual é estimulado por TNF- α , IL-1 e IL-6), enquanto que o NO
123 produzido pela via constitutiva parece possuir ações anti-inflamatórias (Das, 2001).
124 Além disso, sabe-se que o NO, tanto da via neuronal quanto induzível possui
125 atividade modulatória sobre o sistema nervoso central, e nos neurônios da área
126 rostroventrolateral do bulbo (RVLM), local da saída simpática para o controle da
127 função cardiovascular, já foram avaliados quanto à sua participação (Shapoval *et al.*,
128 1991; Patel *et al.*, 2001; Martins-Pinge *et al.*, 2007).

129 Entretanto, existe controvérsia a respeito dos efeitos do NO nessa
130 área do bulbo. Alguns investigadores descreveram aumentos na PA com a
131 administração de L-arginina e doadores de NO (Hirooka *et al.*, 1996; Martins-Pinge
132 *et al.*, 1997), enquanto outros obtiveram decréscimos ((Shapoval *et al.*, 1991;
133 Zanzinger *et al.*, 1995; Tseng *et al.*, 1996; Kagiya *et al.*, 1997). É possível que
134 esses efeitos contraditórios estejam embasados nas diferentes concentrações
135 utilizadas pelos pesquisadores, espécies animais utilizadas, e também o estado de
136 consciência. Dados da literatura mostraram que, altas doses de NO na RVLM levam

137 a quedas na PA, enquanto doses menores produzem aumentos (Morimoto *et al.*,
138 2000). Além disso, as isoformas nNOS e iNOS estão envolvidas com a atividade dos
139 neurônios da RVLM, modificando a neurotransmissão do glutamato (Martins-Pinge
140 *et al.*, 2007)

141

142 1.5 ÁREA ROSTROVENTROLATERAL DO BULBO (RVLM)

143

144 Sabendo que a obesidade é uma condição precursora de várias
145 fisiopatologias, dentre elas a hipertensão, o sistema nervoso simpático apresenta-se
146 como um importante alvo de alteração funcional na obesidade (Shibao *et al.*, 2007).
147 Dessa forma, a área rostroventrolateral do bulbo (RVLM) que é uma das regiões
148 cerebrais primárias envolvidas na geração da condução simpática, é uma possível
149 candidata a sofrer modulação pela obesidade. A atividade dos neurônios da RVLM é
150 regulada por neurotransmissores excitatórios e inibitórios e alterações tanto na
151 excitação quanto na inibição destes neurônios influenciam diversos estados
152 fisiológicos e patológicos (Guertzenstein e Silver, 1974; Dampney, 1994; Patel *et al.*,
153 2001; Mueller, 2007). Na área RVLM, os neurônios pré-motores são responsáveis
154 pela condução do tônus excitatório para neurônios pré-ganglionares simpáticos
155 localizados na coluna intermédio lateral (IML) e nesta sinalização neural, o glutamato
156 parece ser um importante neurotransmissor (Guertzenstein e Silver, 1974; Dampney,
157 1994). A microinjeção de L-glutamato na RVLM de ratos anestesiados (Bachelard *et*
158 *al.*, 1990; Martins-Pinge *et al.*, 2005) produz aumento de PA.

159 A contribuição dos neurônios da RVLM na elevação da pressão
160 arterial média em ratos obesos induzidos por dieta hipercalórica foi avaliada em
161 animais anestesiados (Stocker *et al.*, 2007). Esses dados evidenciaram que os
162 neurônios da RVLM contribuem para a elevação da atividade simpática nesse
163 modelo de obesidade. No entanto, a informação a cerca dos mecanismos envolvidos
164 na hipertensão derivada da obesidade ainda são escassos e, em particular, neste
165 modelo de obesidade induzida pelo glutamato monossódico, poucos estudos foram
166 realizados. Além disso, não existem registros a cerca da participação da RVLM
167 nesse modelo de obesidade, assim como o envolvimento do NO nessa área sobre a
168 função cardiovascular.

1 **JUSTIFICATIVA**

2

3 Em trabalhos anteriores (Da Cunha *et al.*, 2014) foi verificado que
4 animais obesos MSG possuem inflamação sistêmica, observada pelo aumento de
5 prostaglandinas, e estresse oxidativo. Também foi observado um aumento da
6 expressão da iNOS no coração de ratos obesos e o tratamento com inibidor da iNOS
7 reverteu as alterações autonômicas cardíacas.

8 Dessa forma, considerando que a iNOS parece estar envolvida em
9 processos inflamatórios, que a obesidade parece caracterizar-se por uma
10 inflamação sistêmica de baixo grau, e que alterações cardiovasculares
11 possivelmente de origem central possam estar envolvidas na obesidade MSG, nosso
12 estudo se propôs a avaliar a participação da iNOS nas alterações cardiovasculares
13 do glutamato na RVLM de animais controle e obesos MSG.

1 OBJETIVOS

2

3 3.1 OBJETIVO GERAL

4

5 O objetivo geral deste estudo foi avaliar o papel do óxido nítrico da
6 via induzível (iNOS) na área rostroventrolateral do bulbo em ratos com obesidade
7 MSG.

8

9 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

10

11 3.2.1- Avaliar a sensibilidade glutamatérgica em animais controle e
12 obesos MSG, tratados com salina fisiológica na área RVLM,
13 em parâmetros de pressão arterial e frequência cardíaca, em
14 animais não anestesiados;

15 3.2.2- Avaliar a sensibilidade glutamatérgica em animais controle e
16 obesos MSG, tratados com aminoguanidina ou s-
17 methylisothiourea (inibidores da iNOS) na área RVLM, em
18 parâmetros de pressão arterial e frequência cardíaca, em
19 animais não anestesiados;

20 3.2.3- Analisar a expressão gênica da enzima iNOS na área RVLM
21 em ratos controle e obesos;

22 3.2.4- Realizar a dosagem indireta de NO, por meio do nitrito, em
23 punches de RVLM de ratos controle e obesos;

1 **MATERIAIS E MÉTODOS**

2
3 Este trabalho foi realizado no Departamento de Ciências Fisiológicas
4 (CIF) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Estadual de Londrina
5 (UEL). Os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em
6 Experimentação Animal da UEL (processo número 33645/2010-29).

7 8 **4.1 ANIMAIS**

9
10 Para esta pesquisa foram utilizados ratos Wistar, provenientes do
11 biotério central da Universidade Estadual de Londrina, os quais foram submetidos a
12 cruzamentos realizados no biotério setorial do departamento de Ciências
13 Fisiológicas. Os filhotes aos 21 dias de vida foram desmamados e mantidos em
14 gaiolas coletivas (máximo de cinco animais) à temperatura constante de 21 ± 2 °C,
15 com ciclo claro/escuro de 12 horas. Água e ração foram fornecidas “ad libitum”.

16 17 **4.2 INDUÇÃO DA OBESIDADE**

18
19 Para indução da obesidade MSG, ratos Wistar neonatos receberam
20 durante os cinco (5) primeiros dias de vida, injeções subcutâneas de glutamato
21 monossódico (4mg/g) (Sigma Co., MO, USA) e os animais controle receberam
22 solução de salina 12 equimolar (De Freitas Mathias *et al.*, 2007).

23 24 **4.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DA OBESIDADE**

25
26 A obesidade foi caracterizada pelo cálculo do Índice de Lee para
27 cada animal aos 90 dias de vida usando a fórmula: $\sqrt[3]{\text{peso corporal/comprimento}}$
28 nasoanal x 1000, e também através do peso das gorduras retroperitoneal e
29 perigonadal, onde o peso corporal e o comprimento são dados em g e cm,
30 respectivamente (Bernardis e Patterson, 1968).

31
32
33

34 4.4 IMPLANTE DE CÂNULAS-GUIA DIRECIONADAS À RVLM

35

36 Aos 90 dias de vida, os animais foram submetidos à cirurgia
37 estereotáxica de acordo com a técnica utilizada por Martins-Pinge (Martins-Pinge *et*
38 *al.*, 1997). Sob anestesia de Cetamina (100 mg/kg) e Cloridrato de Xylasina (20
39 mg/kg), as cânulas-guia foram implantadas e fixadas com resina acrílica em direção
40 à área RVLM, utilizando-se as seguintes coordenadas: AP= -3,0; L= 1,8 mm em
41 relação à sutura lambdóide (Paxinos e Watson, 2009). Após esta cirurgia, os animais
42 receberam uma dose profilática de poli-antibiótico veterinário (40.000 UI) com
43 estreptomicina e penicilina e voltaram ao biotério para recuperação da cirurgia por 3
44 dias.

45

46 4.5 CATETERIZAÇÃO DA ARTÉRIA E VEIA FEMORAL

47

48 Após os 3 dias de recuperação da estereotaxia, os animais foram
49 submetidos à uma nova cirurgia sob anestesia de Cetamina (100 mg/kg) e Cloridrato
50 de Xylasina (20 mg/kg), para cateterização da artéria e veia femoral com o objetivo
51 de monitorização da pressão arterial e administração de substâncias quando
52 necessário, respectivamente. Após 24 horas, os animais foram submetidos ao
53 registro basal da pressão arterial, seguido do protocolo experimental.

54

55 4.6 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES

56

57 O registro da pressão arterial (PA) foi realizado com os animais
58 acordados e com livre movimentação. A cânula arterial do animal foi acoplada a um
59 transdutor de pressão (Powerlab modelo MLT0380) conectado a um sistema de
60 registro computadorizado (Powerlab/ ADInstruments). Durante o período de registro
61 os animais foram mantidos dentro de caixas individuais em ambiente silencioso.
62 Após meia hora de registro basal da PA, os animais foram submetidos ao protocolo
63 experimental.

64

65

66

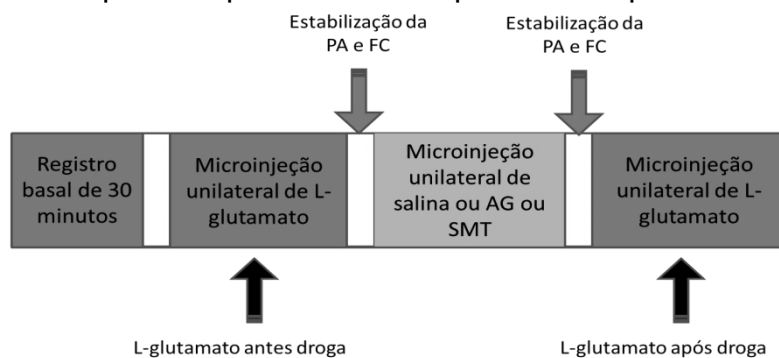
67 4.7 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

68

69 Após o registro basal da pressão arterial foi realizada a microinjeção
 70 de L-glutamato (5nmol/100 nl) unilateralmente ao RVLM. Após retorno dos
 71 parâmetros basais foi realizada a microinjeção no mesmo sítio de uma das seguintes
 72 substâncias: Aminoguanidina (AG) (250 pmol/100nl) (Sigma Co., MO, USA) ou S-
 73 methylisothiurea (SMT) (250 pmol/100 nl) (MP Biomedicals, LLC., France)
 74 (inibidores da iNOS) ou salina fisiológica (100 nl). Após 5 minutos foi realizada uma
 75 segunda microinjeção de glutamato (5 nmol/100nl). Esse procedimento foi realizado
 76 nos animais dos grupos CTR e MSG. As concentrações das substâncias
 77 microinjetadas foram baseadas em trabalhos da literatura (Southan *et al.*, 1995;
 78 Martins-Pinge *et al.*, 2005).

79

80 **Figura 1** – Esquema representativo do protocolo experimental



81

82

83 4.8 MARCAÇÃO E HISTOLOGIA DO CÉREBRO

84

85 Logo após a eutanásia dos animais com sobredose de anestésico,
 86 os sítios de microinjeção foram marcados com uma solução de Azul de Evans 2%,
 87 em volume de 100 nl. Depois, os animais tiveram seus cérebros retirados e
 88 colocados em formalina 10% para posterior realização dos cortes histológicos.

89

90 O cérebro foi seccionado em micrótomo de congelamento (Leica)
 91 através de cortes de 40 μ m para a região da RVLM. Os cortes obtidos foram
 92 posicionados e fixados em lâminas de vidro e corados pela técnica do vermelho
 93 neutro 1%. Somente os animais que tiveram os sítios marcados na área do RVLM

94

95 4.9 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA E FREQUÊNCIA CARDÍACA 96

97 O registro da pressão arterial pulsátil foi realizado utilizando o
98 software LabChart 7.0 (ADInstruments, Bella Vista, Austrália), que é capaz de
99 detectar pontos de inflexão nos pulsos de pressão e gerar séries, batimento-a-
100 batimento, com valores de IP e PAS para cada ciclo cardíaco. Para efetuar a análise
101 da variabilidade esses dados do intervalo de pulso (IP) e pressão arterial sistólica
102 (PAS) no domínio da frequência foram convertidos para o programa computacional
103 CardioSeries v2.4 (<http://www.danielpenteado.com>) (Souza e Tezini, 2013). As
104 séries temporais, batimento-a-batimento, com valores de IP e PAS foram re-
105 amostradas em 10 Hz (1 valor a cada 100 ms) por interpolação cúbica do tipo spline,
106 para regularização do intervalo de tempo entre os batimentos. Cada serie foi dividida
107 em segmentos com 512 valores cada com sobreposição de 50 % (Protocolo de
108 Welch). Cada segmento foi examinado visualmente e os segmentos com artefatos
109 ou transientes foram excluídos. Cada segmento estacionário de IP e PAS teve seu
110 espectro calculado pela Transformada Rápida de Fourier (FFT), após janelamento
111 do tipo Hanning, e inspecionado visualmente. Os espectros que fugiam do padrão
112 foram descartados. Os segmentos considerados adequados foram integrados em
113 bandas de baixa frequência (LF; 0,20 - 0,75 Hz) e alta frequência (HF; 0,75 - 3,00
114 Hz), e os resultados foram expressos em unidades absolutas (ms^2 ou mmHg^2) e
115 normalizadas (un). Os valores normalizados foram obtidos por meio do cálculo da
116 potência relativa das bandas de LF e HF levando em consideração a potência total
117 de espectro menos a potência da banda de muito baixa frequência (VLF; < 0,20 Hz).
118 Para avaliar o balanço simpátovagal cardíaco, calculou-se a razão entre a potência
119 das bandas de LF e HF (LF/HF) do espectro do IP.

120

121 4.10 ANÁLISE DO BARORREFLEXO ESPONTÂNEO

122

123 A sensibilidade barorreflexa (SBR) foi avaliada no domínio do tempo
124 por meio do Método da Sequência. Utilizando-se o programa computacional
125 CardioSeries v2.4 (<http://www.danielpenteado.com>), séries temporais batimento-a-
126 batimento com valores de IP e PAS foram utilizadas para análise da SBR. As séries
127 temporais foram analisadas em busca de sequências de quatro ou mais batimentos
128 nos quais aumentos progressivos da PAS foram acompanhados por aumentos

129 progressivos do IP, ou reduções progressivas da PAS foram acompanhadas por
130 reduções progressivas do IP. Para detecção das alterações da PAS e do IP foram
131 utilizados os limiares de 0 mmHg e 0 ms, respectivamente. Após detecção de uma
132 rampa de PAS (sequência de quatro ou mais batimentos nos quais aumentos ou
133 reduções progressivas da PAS foram acompanhados, ou não, de aumentos ou
134 reduções do IP), o programa computacional buscava por alterações no IP sem
135 qualquer intervalo, ou seja, delay de zero batimentos. Uma sequência barorreflexa
136 só foi utilizada quando o coeficiente de correlação (r) entre os valores de PAS e IP
137 foi maior ou igual a 0,8. A SBR foi determinada a partir da média da inclinação da
138 reta da regressão linear entre os valores de PAS e IP de cada sequência
139 barorreflexa encontrada.

140

141 4.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA iNOS DA ÁREA RVLM

142

143 A expressão de RNAm foi estimada através da quantificação por
144 PCR em tempo real (RT-PCR) em 5-8 amostras por grupo, sendo eles, CTR e MSG.
145 O cérebro foi retirado e em baixa temperatura com gelo seco, com separação da
146 porção bulbar para secção de uma fatia de 1 mm na altura da área RVLM.
147 Considerando o Núcleo Ambíguo (NA) como referência anatômica cerebral e com o
148 auxílio de uma agulha para “punchs”, foi coletado bilateralmente amostras de tecido
149 cerebral da área RVLM. Após este procedimento os punchs foram armazenados em
150 -80°C com 500 μl de Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para posterior extração
151 do RNAm. O protocolo para quantificação foi descrito por (Sanchez-Lemus *et al.*,
152 2009) com algumas modificações.

153

154 Foram extraídos RNA individuais de cada homogenato seguido de
155 purificação usando kit SV RNA total (Promega). Logo após, foram feitos os DNA
156 complementares (cDNA) que foram usados 2 μg de RNA total e ENZIMA M-
157 MLV (Reverse transcriptase) e OLIGO DT conforme recomendações do fabricante.
158 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As amostras foram tratadas com DNase I para
159 síntese de cDNA por transcrição reversa de acordo com o protocolo fornecido pelo
160 fabricante. O cDNA obtido foi então armazenado a -20C . As amostras foram
161 submetidas à amplificação por método de Real Time qPCR usando Platinum SYBR
162 Green (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) Supermix-UDG e oligonucleotídeos
específicos da enzima iNOS. A reação do PCR em tempo real foi realizada em 20 μl

163 de uma mistura contendo 10 µl SYBR Green PCR (Applied Biosystems, Foster City,
164 CA, USA), 2 µl de cDNA e 0,3 µM de cada primer para reação específica no DNA
165 Engine Opticon™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Os primers específicos da enzima
166 iNOS foram: sense primer: AGGCCACCTCGGATATCTCT, antisense primer:
167 GTGAGGTTTCCCGTTGAAG.

168 A amplificação foi realizada a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos
169 de 95°C por 15 seg e 56-60°C por 60 seg. ao final da amplificação, a especificidade
170 de cada PCR foi confirmada pela determinação da temperatura do melt do produto
171 do PCR. As diluições seriais de cDNA dos ratos foram utilizadas para determinação
172 da curva de calibração. Cada amostra individual foi quantificada pela determinação
173 do limiar do ciclo e usando a curva de calibração. A quantidade relativa de RNA foi
174 normalizada pelo gene 18S do RNA ribossomal (rRNA) (controle endógeno) e
175 expresso como unidades arbitrárias.

176

177 4.12 DOSAGEM DE NITRITO NA RVLM

178

179 A concentração de óxido nítrico foi obtida através de “punchs” da
180 RVLM do bulbo de animais CTR e MSG. O método foi realizado pela dosagem de
181 nitrito como descrito por (Panis *et al.*, 2011) com algumas modificações. Para
182 adaptação foi considerado o peso seco de cada amostra mantendo a concetração
183 de 100 mg/peso úmido de tecido/ mililitro de PBS. Todos os reagentes foram obtidos
184 da Sigma Chemical Co.

185 O punch de RVLM foi homogeneizado em tampão fosfato-salina
186 (PBS) para uma concentração final de 100 mg/ peso úmido de tecido/ ml de PBS.
187 Foi centrifugado a 10,000 rpm por 10 minutos para obtenção de sobrenadantes. O
188 sobrenadante foi desproteinizado pela adição de 0,8 vol de 75 mM de solução de
189 ZnSO₄ (Merck), misturado utilizando vórtex e depois centrifugado a 10,000 rpm por 2
190 minutos a 25°C. Após, foi adicionado 1,1 vol de solução 55mM NaOH (Merck) para
191 cada sobrenadante. As amostras foram homogeneizadas no vórtex e centrifugadas
192 novamente a 10,000 rpm por 5 minutos a 25°C. O sobrenadante final foi recuperado
193 e diluído em solução tampão de glicina (45g/l pH 9,7, Merck) em uma proporção de
194 3:1.

195 Grânulos de Cadmio (Fluka) armazenados em solução 100 nM
196 H₂SO₄ (Merck) foram lavados três vezes em água destilada estéril e adicionada

197 solução de 5mM CuSO₄ em tampão glicina-NaOH (15 g/L, pH 9,7, Merck) por 5
198 minutos e grânulos foram usados com 10 minutos. O tratamento com Cadmio é
199 usado para converter todo nitrato das amostras em nitrito, possibilitando maior
200 precisão do total de NO nas amostras originais. Os grânulos ativados (100-400 mg
201 aproximadamente 1-3 grânulos) foram adicionados ao sobrenadante e gentilmente
202 misturados por 10 minutos. Alíquotas de 40 µL foram transferidas para microplacas
203 de 96 poços para posterior determinação de nitrito. Para cada poço foi adicionado o
204 mesmo volume de reagente Griess (reagente I: 50 mg de Naftiletileno em 250 ml de
205 água destilada; reagente II: 5 g de ácido sulfanílico em 500 ml de 3 M HCl, Sigma).
206 Depois foi incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. Para determinar a
207 concentração de nitrito nas amostras, foi preparado uma curva de calibração pela
208 diluição de NaNO₂ (Merck) em água destilada estéril para criar uma amplitude de
209 250 para 0 nM. A absorbância foi lida em 550 nm usando o leitor de microplacas
210 padrão (ELX800 Biotek, Minnesota USA). Os resultados finais foram expressos em
211 mM de nitrito/mg de tecido.

212

213 4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

214

215 A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o
216 programa estatístico GraphPad Prism (San Diego, CA). Os resultados foram
217 expressos como média ± erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os
218 grupos controles e experimentais passaram pelo teste de normalidade de
219 Kolmogorov-Smirnov e foram analisadas pela análise de variância ANOVA One-way
220 seguida do teste de Tukey-Kramer para análise entre grupos, ou test t-Student
221 pareado e não-pareado para avaliar as diferenças entre dois grupos de animais,
222 considerando p<0,05.

1 RESULTADOS

3 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE MSG

5 O tratamento com MSG durante os cinco primeiros dias de vida em
6 filhotes de ratos Wistar induziu a obesidade em ratos adultos, como indicado por um
7 aumento do índice de Lee e aumento da gordura perigonadal e retroperitoneal nos
8 animais MSG (salina/ AG/ SMT) quando comparados aos seus respectivos CTR
9 (salina/ AG/ SMT). Foi evidenciado também que os animais dos grupos MSG (salina/
10 AG/ SMT) apresentaram um menor ganho de peso e menor comprimento nasoanal
11 em comparação aos seus respectivos grupos CTR (salina/ AG/ SMT) (Tabela 1).

13 **Tabela 1** - Efeitos da administração subcutânea de MSG ou salina equimolar no
14 período neonatal em ratos adultos.

	CTR			MSG		
	SALINA (N=5)	AG (N=5)	SMT (N=6)	SALINA (N=5)	AG (N=5)	SMT (N=5)
PESO (g)	325±5	312±7,84	326±6,25	271±8,43*	274±14,35*	271±14,87*
COMPRIMENTO NASO- ANAL (cm)	22,5±0,22	21,80±0,37	22,08±0,30	18,9±0,33*	19,88±0,13*	19,20±0,26*
ÍNDICE DE LEE	30,57±0,3 3	31,13±0,43	31,17±0,32	34,27±0,69*	33,01±0,25*	33,66±0,44*
GORDURA PERIGONADAL (g)	1,86±0,3	1,46±0,18	1,67±0,22	3,40±0,32*	3,15±0,47*	4,10±0,37*
GORDURA RETROPERITONEAL (g)	1,93±0,22	1,89±0,27	2,06±0,29	3,29±0,19*	3,64±0,43*	4,08±0,56*

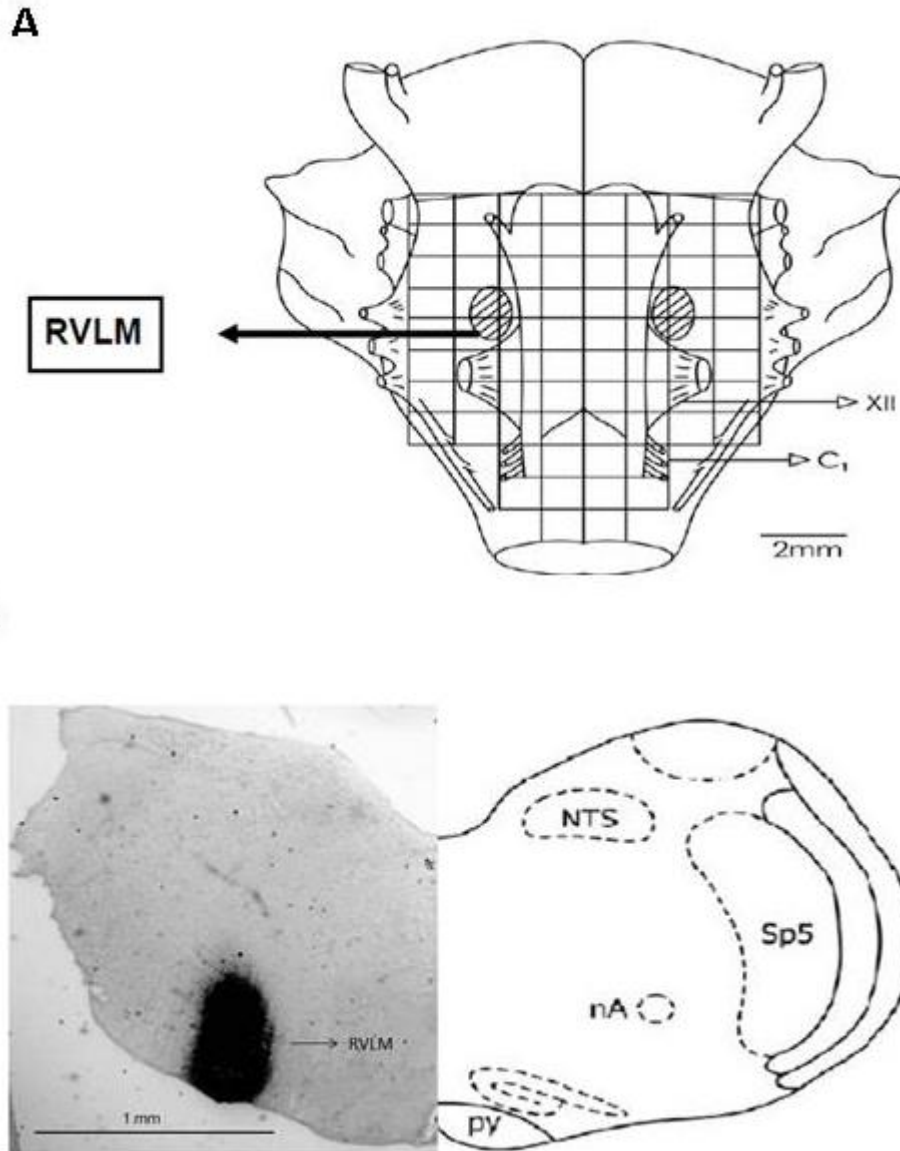
15 CTR (controle); MSG (obeso); salina; AG (Amoniguanidina); SMT (S-methylisothiurea).
16 Teste t-Student. Valores expressos como média ± EPM; * $p < 0,05$ vs. respectivo CTR.

17 **Fonte:** Lopes, F. N. C., 2016.
18
19

20 5.2 HISTOLOGIA E LOCALIZAÇÃO DA ÁREA RVLM

21
22 A confirmação do sítio de microinjeção unilateral na RVLM foi
23 realizada através da visualização de corte histológico corado com azul de Evans, e
24 auxílio do Atlas Paxinos & Watson (1998) e por meio de um mapa da superfície
25 ventral do bulbo (Figura 2A). Somente os ratos com marcação da microinjeção na
26 área RVLM foram considerados para análise, tendo o núcleo Ambíguo (NA) como
27 referência para localização da RVLM (Figura 2B).

28 **Figura 2–** (A) Mapa da superfície ventral do bulbo com localização bilateral da área
 29 RVLM. XII Nervo craniano; C1: Primeiro nervo cervical; (B) Corte
 30 histológico e diagrama da região bulbar com a marcação do sítio central
 31 de injeção na RVLM. NTS: Núcleo Trato Solitário; nA: Núcleo Ambíguo;
 32 Sp5: núcleo espinhal do trigêmeo; py: Trato Piramidal. **Fonte:** Lopes, F. N.
 33 C., 2016.



34

35 5.3 PARÂMETROS CARDIOVASCULARES

36

37 5.3.1 Pressão Arterial e Frequência Cardíaca Basal

38

39 Os valores de referência para a pressão arterial média (PAM) e
 40 frequência cardíaca (FC) para cada grupo foram obtidos como o valor médio do
 41 período de registro basal de pelo menos 30 minutos para cada animal. Os dados
 42 mostraram que não houve diferença na PAM e FC basal entre os grupos. Nós

43 constatamos que os animais MSG não apresentaram hipertensão comparada aos
44 animais CTR, sendo seus níveis pressóricos semelhantes (tabela 2).

45

46 **Tabela 2** – Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca
47 (FC) de ratos controle (CTR) e obesos (MSG) acordados.

48

49

50

51

52

53

54

55

	CTR	MSG
	(n=16)	(n=15)
PAM (mmHg)	110±1	111±2
FC (bpm)	342±6	357±9

56 CTR (controle); MSG (obeso). Teste t-Student não pareado. Valores expressos como média
57 ± EPM.

58 **Fonte:** Lopes, F. N. C., 2016.

59

60 5.3.2 Parâmetros Espectrais da Pressão Arterial Sistólica (PAS)

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

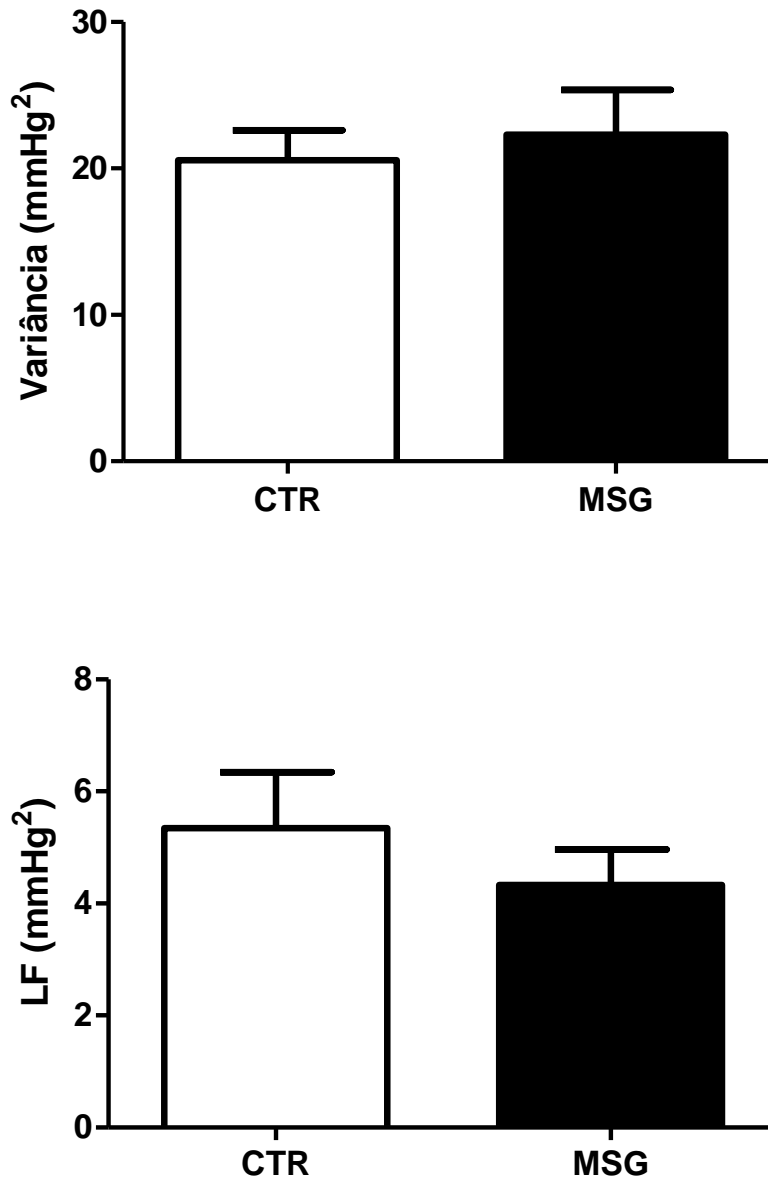
77

78

79

Na análise dos parâmetros espectrais da pressão arterial sistólica não foi observado diferenças entre os grupos CTR e MSG (Figura 3).

80 **Figura 3-** Parâmetros espectrais basais da pressão arterial sistólica (PAS) de ratos
81 CTR (controle, n=16) e MSG (obeso, n=15), batimento a batimento
82 calculado através da análise autorregressiva. Variância total e LF (low
83 frequency) absolutos. Teste de comparação múltipla Anova one way
84 seguido do pós teste de Tukey-Kramer. Valores expressos como média
85 \pm EPM.



86

87 **Fonte:** Lopes, F. N. C., 2016.

88

89 5.3.3 Parâmetros Espectrais do Intervalo de Pulso (IP)

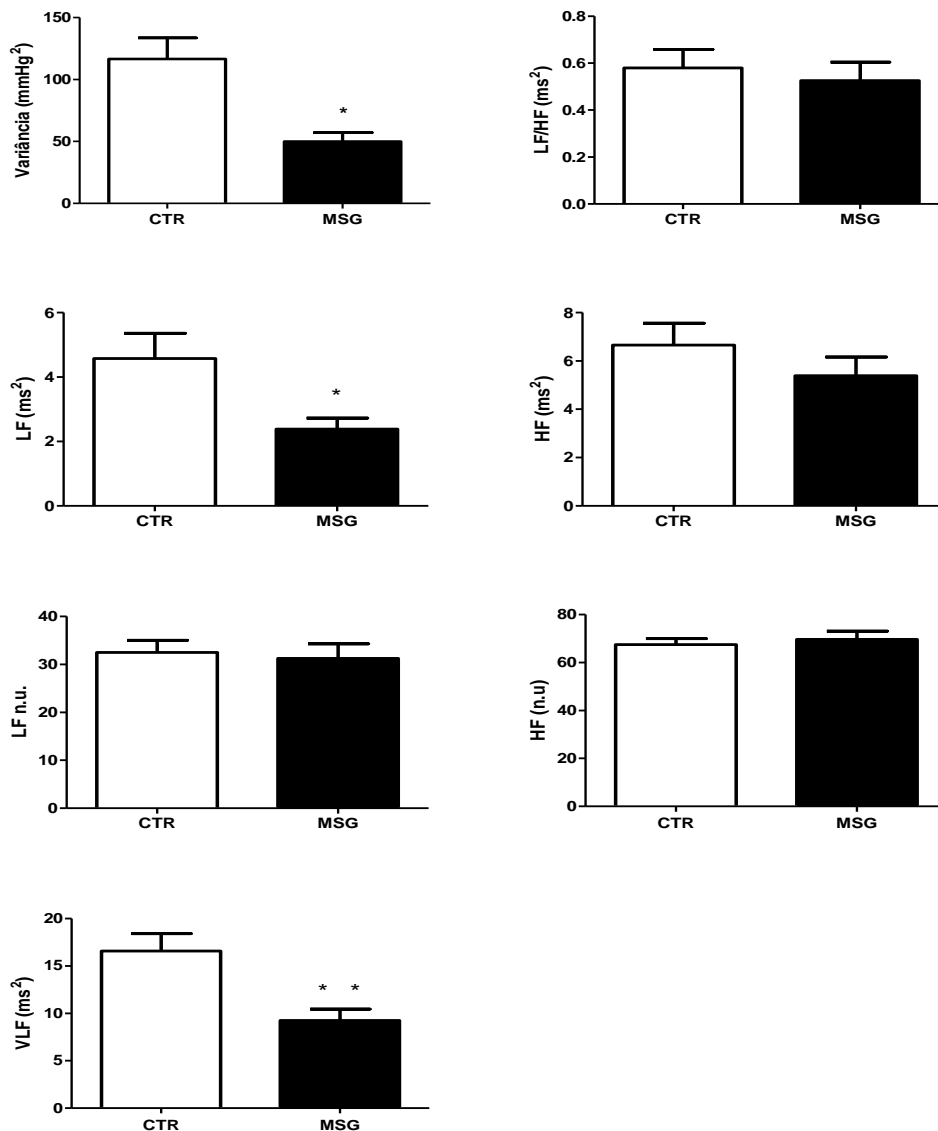
90

91 Na análise do intervalo de pulso foi observada redução da variância,
92 do componente LF absoluto e do VLF no grupo MSG quando comparado com o

93 grupo CTR (Figura 4). Nos parâmetros LF normalizado, HF normalizado e absoluto e
 94 na relação LF/HF não foi observado diferenças.

95

96 **Figura 4** - Parâmetros espectrais basais da análise do intervalo de pulso (IP)
 97 calculados de séries temporais espectrais autoregressivas do período
 98 basal dos grupos CTR (controle, n=16) e MSG (obeso, n=15). Teste
 99 de comparação múltipla Anova one way seguido do pós teste de
 100 Tukey-Kramer. Valores expressos como média \pm EPM, *p<0,05 vs.
 101 CTR; **p<0,01 vs. CTR.



102

103

Fonte: Lopes, F. N. C., 2016.

104

105 5.3.4 Análise do Barorreflexo Espontâneo

106

107

Nos parâmetros basais da análise barorreflexa espontânea não foi
 108 encontrado nenhuma diferença entre os grupos CTR e MSG (Tabela 3).

Tabela 3 - Sensibilidade barorreflexa espontânea de animais CTR e MSG no período basal.

	CTR (n=16)	MSG (n=15)
BEI UP	0,20±0,03	0,14±0,02
BEI DOWN	0,15±0,01	0,14±0,01
BEI ALL	0,18±0,02	0,14±0,02
GAIN UP	1,48±0,14	1,40±0,20
GAIN DOWN	1,45±0,14	1,26±0,16
GAIN ALL	1,48±0,13	1,25±0,13

CTR (controle); MSG (obeso). Teste t-Student não pareado. Valores expressos como média ± EPM.
Fonte: Lopes, F. N. C., 2016.

5.3.5 Microinjeção de L-glutamato Antes e Após Tratamento com Salina em Ratos Controle e MSG.

Não houve diferenças entre os grupos CTR e MSG no aumento da PAM produzido pelo L-glutamato no grupo tratado com salina. Também não foram observadas diferenças significantes na variação da FC (tabela 4; figura 5).

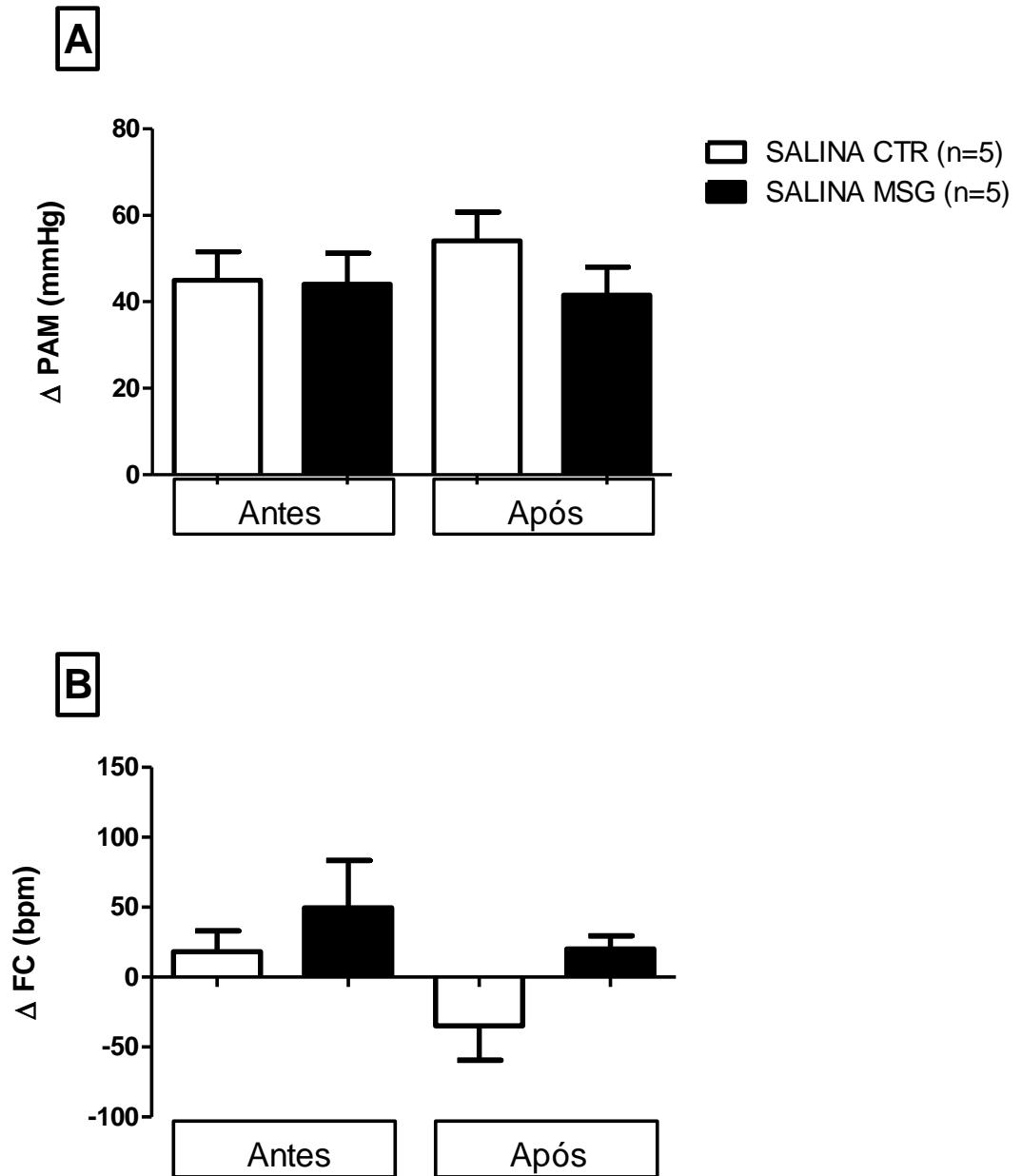
Tabela 4 - Variação da resposta ao L-glutamato na RVLM de ratos CTR e MSG acordados tratados com salina.

	ANTES		APÓS	
	CTR (n=5)	MSG (n=5)	CTR (n=5)	MSG (n=5)
Δ PAM (mmHg)	45±7	44±7	54±7	42±6
Δ FC (bpm)	18±15	50±34	-35±24	20±9

CTR (controle); MSG (obeso). Teste t-Student pareado. Valores expressos como média ± EPM.

Fonte: Lopes, F. N. C., 2016.

141 **Figura 5** – Efeitos da microinjeção de L-glutamato antes e após salina sobre os
 142 parâmetros da pressão arterial média (PAM) (A) e frequência cardíaca
 143 (FC) (B) em ratos CTR (controle) e MSG (obeso) não anestesiados.
 144 Teste t-Student pareado. Valores expressos como média \pm EPM.



145
 146 **Fonte:** Lopes, F. N. C., 2016.

147

148 5.3.6 Microinjeção de L-glutamato antes e após Tratamento com Aminoguanidina
 149 (AG) em Ratos CTR e MSG.

150

151 Nos ratos tratados com AG, a microinjeção de L-glutamato produziu
 152 variação maior na PAM no grupo MSG após o tratamento. No entanto, não alterou
 153 as variações da PAM no grupo CTR. Na variação da FC, ratos do grupo CTR

154 apresentaram aumento maior após o tratamento com AG. Já no grupo MSG o
 155 tratamento com AG não alterou a queda de FC promovida pelo L-glutamato (tabela
 156 5; figura 6).

157

158 **Tabela 5** - Variação da resposta ao L-glutamato na RVLM de ratos CTR e MSG
 159 acordados tratados com Aminoguanidina.

	ANTES		APÓS	
	CTR (n=5)	MSG (n=5)	CTR (n=5)	MSG (n=5)
Δ PAM (mmHg)	50±8	40±8	63±5	61±4*
Δ FC (bpm)	76±12	-23±65	132±12 [#]	-4±47

160

161 CTR (controle); MSG (obeso). Teste t-Student pareado. Valores expressos como média ± EPM. * $p <$
 162 0,05 vs. MSG AG antes; [#] $p <$ 0,05 vs. CTR AG antes.

163 **Fonte:** Lopes, F. N. C., 2016.

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

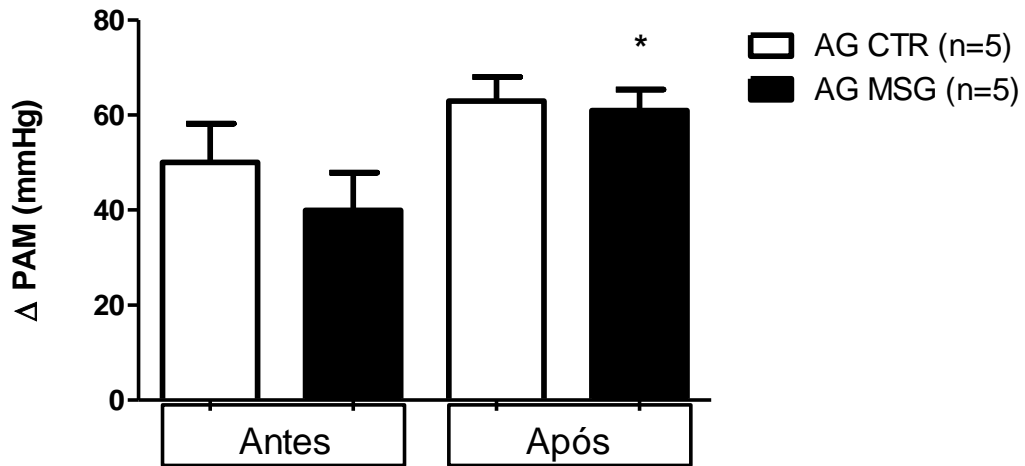
181

182

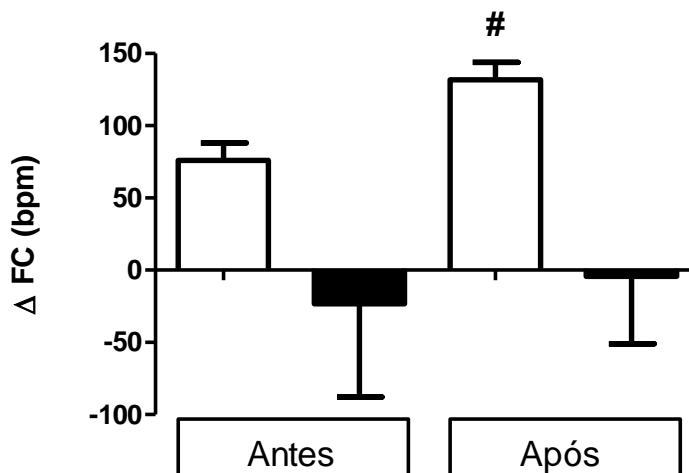
183

184 **Figura 6** - Efeitos da microinjeção de L-glutamato antes e após Aminoguanidina
 185 (AG) sobre os parâmetros da pressão arterial média (PAM) (A) e
 186 frequência cardíaca (FC) (B) em ratos CTR (controle) e MSG (obeso)
 187 não anestesiados. Teste t-Student pareado. Valores expressos como
 188 média \pm EPM, $p < 0,05$. * $p < 0,05$ vs. CTR AG antes; # $p < 0,05$ vs. CTR
 189 AG antes

A



B



190

191 **Fonte:** Lopes, F. N. C., 2016.

192

193

194

195 5.3.7 Microinjeção de L-glutamato Antes e Após Tratamento com S-
196 Methylisothiurea (SMT) em Ratos CTR e MSG

197

198 Nos ratos tratados com SMT, a microinjeção de L-glutamato
199 produziu variação significativa na PAM no grupo MSG após o tratamento, não
200 alterando as variações da PAM no grupo controle. Na variação da FC após o
201 tratamento ambos os grupos apresentaram taquicardia, no entanto somente o grupo
202 CTR apresentou aumento significativo em relação ao seu controle (tabela 6; figura
203 7).

204

205 **Tabela 6** - Variação da resposta ao L-glutamato na RVLM de ratos CTR e MSG
206 acordados tratados com S-methylisothiurea.

	ANTES		APÓS	
	CTR (n=5)	MSG (n=5)	CTR (n=6)	MSG (n=5)
Δ PAM (mmHg)	50±4	45±8	59±5	65±2*
Δ FC (bpm)	43±46	-29±23	119±29 [#]	33±34

207

208 CTR (controle); MSG (obeso MSG). Teste t-Student pareado. Valores expressos como
209 média ± EPM. * $p < 0,05$ vs. MSG SMT antes; [#] $p < 0,05$ vs. CTR SMT antes.

210 **Fonte:** Lopes, F. N. C., 2016.

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

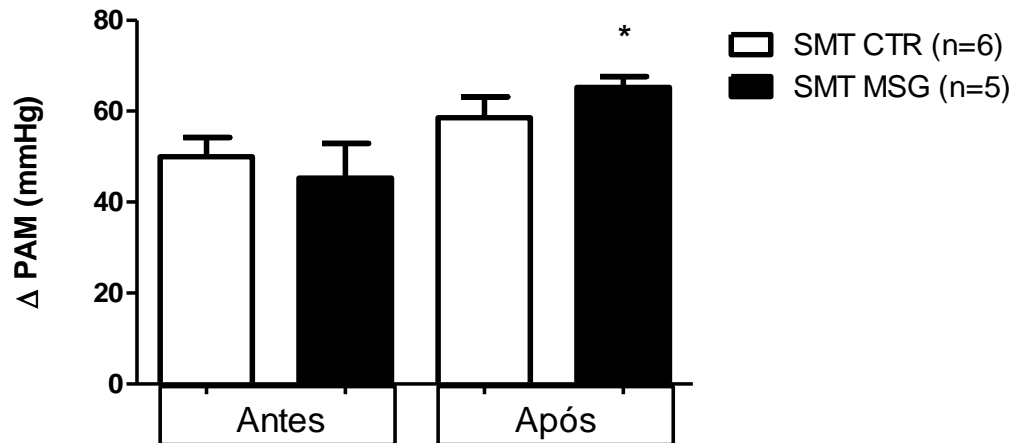
222

223

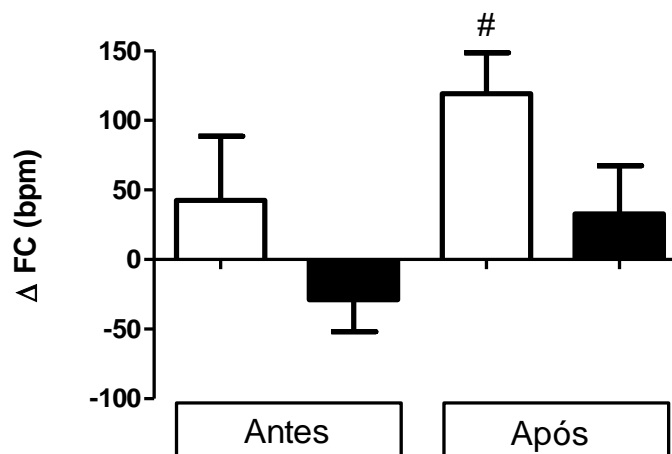
224

225 **Figura 7 -** Efeitos da microinjeção de L-glutamato antes e após S-methylisothiurea
 226 sobre os parâmetros da pressão arterial média (PAM) (A) e frequência
 227 cardíaca (FC) (B) em ratos CTR e MSG não anestesiados. Teste t-
 228 Student pareado. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs.
 229 SMT MSG antes; # $p < 0,05$ vs. SMT CTR antes

A



B



230
 231 **Fonte:** Lopes, F. N. C., 2016.

232

233

234

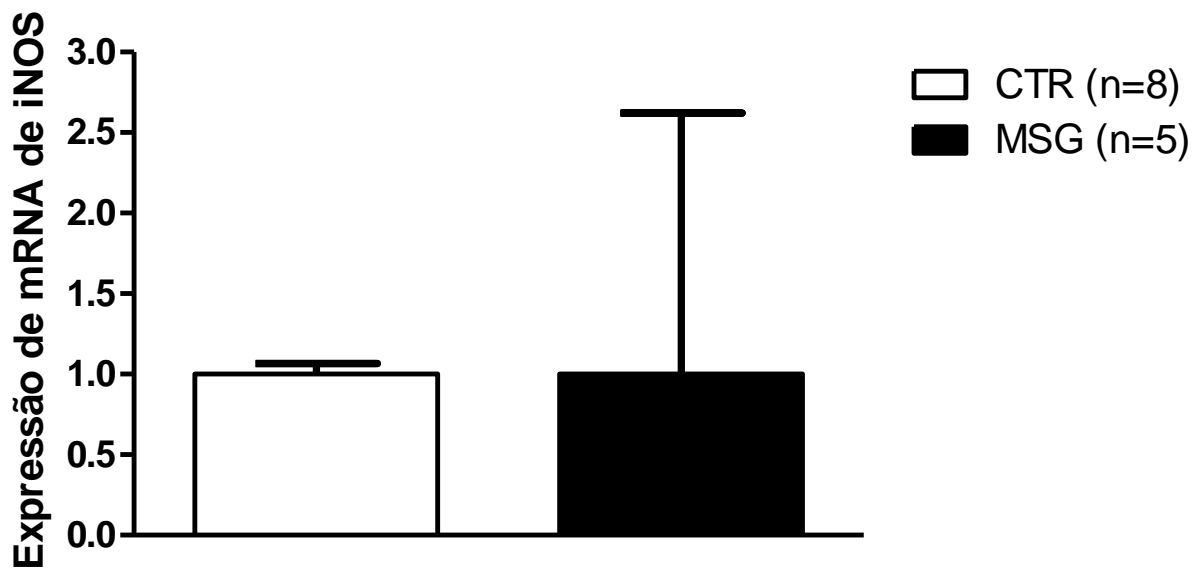
235 5.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA iNOS POR RT-PCR E DOSAGEM DE NITRITO EM
236 PUNCHS DE RVLM

237

238 Os níveis de nitrito foram semelhantes nos “punchs” de RVLM de
239 ratos CTR e MSG (figura 8).

240

241 **Figura 8** – Expressão gênica de iNOS em punchs de RVLM por RT-PCR e animais
242 CTR (controle) e MSG (obeso). Teste t-Student não pareado. Valores
243 expressos como média \pm EPM



244

245 **Fonte:** Lopes, F. N. C., 2016.

246

247 Também não foi observado diferença nos níveis de nitrito entre os
248 grupos CTR e MSG em punchs de RVLM nos animais (figura 9).

249

250

251

252

253

254

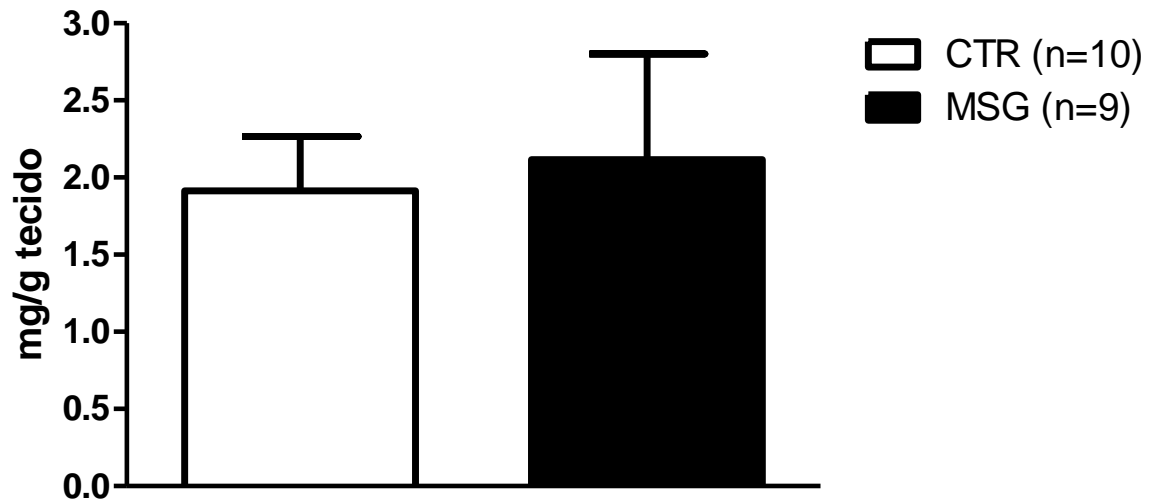
255

256

257

258

259 **Figura 9** – Dosagem de nitrito em punchs de RVLM em animais CTR (controle) e
260 MSG (obeso). Teste t-Student não pareado. Valores expressos como
261 média \pm EPM.



262

263 **Fonte:** Lopes, F. N. C., 2016.

1 DISCUSSÃO

2
3 No presente trabalho confirmamos os dados da literatura a cerca do
4 modelo MSG em que o tratamento com glutamato monossódico nos 5 primeiros dias
5 de vida dos animais levou a obesidade neuroendócrina. Essa constatação foi devido
6 ao fato dos animais MSG apresentarem um maior índice de Lee e peso das
7 gorduras retroperitoneal e perigonadal, além de menor comprimento nasoanal e
8 ganho de peso que os animais controle. Foi observado nos parâmetros
9 cardiovasculares que a PAM e FC basais apresentaram resultados semelhantes,
10 não havendo diferença estatística entre os grupos controle e obeso; o mesmo
11 ocorrendo para a modulação simpática da pressão arterial sistólica. Quando
12 realizadas as microinjeções de L-glutamato foram analisadas as variações de PAM e
13 FC antes e após os três tratamentos agudos realizados. No grupo AG, foi observado
14 maior aumento da PAM do grupo MSG após o tratamento e maior aumento da FC
15 no grupo CTR depois do tratamento. O mesmo se observou após o tratamento com
16 SMT. Não houve, no entanto, alterações significantes após o tratamento com salina.
17 Esses resultados sugerem o envolvimento da iNOS na neurotransmissão
18 glutamatérgica da RVLM em ratos obesos. No entanto, não observamos alterações
19 significantes na expressão da iNOS, bem como nos níveis de NO na área RVLM
20 entre os grupos.

21 Apesar dos animais MSG não apresentarem ganho de peso maior
22 do que os animais CTR, eles ganharam mais gordura perigonadal e retroperitoneal.
23 Tais condições podem estar relacionadas aos efeitos já evidenciados em outros
24 trabalhos, onde se observou menor liberação do hormônio do crescimento levando
25 ao baixo desenvolvimento corporal, atrofia da hipófise, gônadas e nervo óptico
26 (Zelezna *et al.*, 2009). O aumento da gordura sem aumento do peso corporal neste
27 modelo pode ser explicado não por aumento da ingesta alimentar como observado
28 em outros modelos de obesidade, mas provavelmente devido a uma menor taxa
29 metabólica (Maletinska *et al.*, 2006; Zelezna *et al.*, 2009)

30 Neste estudo não foi observado nos animais MSG alteração na
31 pressão arterial de repouso, diferente de estudos anteriores do laboratório onde se
32 demonstrou que ratos Wistar que receberam a mesma dose de MSG nos primeiros 5
33 dias de vida apresentaram hipertensão arterial na idade adulta, sendo os parâmetros
34 cardiovasculares coletados da mesma forma (Cunha *et al.*, 2010). Voltera e

35 colaboradores (Voltera *et al.*, 2008) observaram que a PAM de animais MSG
36 anestesiados quando medida de forma direta os animais apresentavam hipertensão
37 e quando a medida era de forma indireta com animais acordados, por pletismografia
38 de cauda, os mesmos não se apresentavam hipertensos. No nosso caso, a única
39 diferença estava no fato dos animais do presente estudo terem sido submetidos ao
40 procedimento de implante de cânulas-guia, três dias antes da cateterização. Nossa
41 hipótese para essa discrepância seria que os animais deste protocolo passam por
42 uma cirurgia estereotáxica e no período de recuperação perdem peso e, por
43 consequência, gordura corporal. Como é sabido que o tecido adiposo pode secretar
44 hormônios e citocinas que podem interferir nos níveis de PA (Rumantir *et al.*, 1999),
45 dessa forma podemos sugerir que a perda de gordura pelo animal MSG tenha sido a
46 responsável por normalizar os níveis da PA. Além disso, a leptina é um hormônio
47 secretado pelos adipócitos e há dados na literatura evidenciando que ela promove
48 aumento da atividade simpática (Hall *et al.*, 2001). Dessa forma, se há diminuição de
49 gordura corporal deveria haver diminuição também da secreção de leptina, que
50 poderia ser responsável pela menor ativação do SNS, revertendo o quadro de
51 hipertensão arterial. Além disso, no presente estudo a modulação simpática para a
52 pressão arterial não se mostrou alterada para os animais obesos comparados ao
53 controle.

54 Há autores na literatura que observaram pelo modelo de dieta
55 hipercalórica que os animais obesos estavam normotensos (Carroll *et al.*, 2006;
56 Chen *et al.*, 2010). Entretanto, em modelo de dieta hiperlipídica foi observado
57 aumento da pressão arterial em animais obesos (Dobrian *et al.*, 2001; Stocker *et al.*,
58 2007) e utilizando diferentes linhagens também foi observada a presença ou não de
59 hipertensão em animais obesos (Huber e Schreihofner, 2011). Tais estudos sugerem
60 que determinadas dietas alimentares e diferentes linhagens podem interferir para o
61 aumento ou não da pressão arterial de repouso. No entanto, apesar de não
62 apresentarem alterações basais nos níveis de PA, a literatura sugere que áreas do
63 sistema nervoso central possuem atividade alterada devido ao aumento na ingesta
64 de lipídeos, como ocorre após inibição tônica do núcleo paraventricular do
65 hipotálamo com muscimol, promovendo maior queda na atividade simpática nos
66 animais obesos (Chen *et al.*, 2010). Esse estudo sugere que um dos mecanismos
67 envolvidos nas alterações cardiovasculares na obesidade, é o aumento no tônus
68 simpático.

69 A RVLM é uma área bulbar responsável pela regulação da atividade
70 nervosa simpática e da PA. O L-glutamato é um neurotransmissor, entre outros,
71 responsável pela excitabilidade dos neurônios dessa área. Quando realizada
72 injeções de L-glutamato na RVLM observa-se aumento da descarga neuronal
73 contribuindo para o aumento da atividade simpática e da PA (Guyenet, 2006). Dados
74 da literatura acerca das alterações na neurotransmissão glutamatérgica na RVLM
75 observaram que em ratos obesos Zucker a microinjeção de antagonista não-seletivo
76 (ácido quinurênico) promovem mudanças semelhantes na pressão arterial,
77 frequência cardíaca e atividade simpática entre animais controle e obesos (Huber &
78 Schreihof, 2011). Nesse estudo os autores sugerem que possivelmente o aumento
79 da pressão arterial nesses animais obesos possa ser devido ao aumento do tônus
80 angiotensinérgico e diminuição do tônus gabaérgico.

81 No presente trabalho, a resposta pressora à microinjeção unilateral
82 de L-glutamato antes dos tratamentos não se mostrou aumentada nos animais MSG
83 quando comparada aos CTR, corroborando os dados de Huber e Schreihof, 2011.
84 No entanto, após a microinjeção dos inibidores da iNOS as respostas pressoras ao
85 glutamato foram maiores nos animais obesos. Esses resultados sugerem a
86 participação da isoforma iNOS sobre o controle glutamatérgico da PA nos animais
87 obesos. No entanto, os níveis de nitrito e a expressão da iNOS na RVLM não se
88 mostraram alterados nos animais obesos. Dessa forma, poderíamos suspeitar que
89 mudanças na expressão de outras isoformas pudessem estar interferindo nesses
90 resultados.

91 No trabalho de Wu e colaboradores (Wu *et al.*, 2014), os autores
92 avaliaram a expressão das isoformas da NOS na RVLM de ratos com síndrome
93 metabólica induzida por dieta rica em frutose por 8 semanas. Os autores
94 observaram que as isoformas iNOS e eNOS estavam inalteradas após a dieta,
95 porém a expressão da nNOS apresentava-se aumentada. Dessa forma, um aumento
96 na atividade de outra isoforma poderia talvez explicar as alterações observadas nos
97 estudos funcionais do glutamato do presente estudo. Essa hipótese precisa ser
98 elucidada em estudos posteriores.

1 **CONCLUSÃO**

2

3

4

5

6

O presente estudo sugere um papel para o óxido nítrico nas respostas cardiovasculares da RVLM em ratos obesos. No entanto, a origem dessa alteração pode ser decorrente de outra isoforma que não a iNOS. Essa comprovação requer novos experimentos.

REFERÊNCIAS

ABALLAY, L. R. et al. Overweight and obesity: a review of their relationship to metabolic syndrome, cardiovascular disease, and cancer in South America. **Nutr Rev**, v. 71, n. 3, p. 168-79, Mar 2013. ISSN 1753-4887 (Electronic) 0029-6643 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23452284> >.

BACHELARD, H.; GARDINER, S. M.; BENNETT, T. Cardiovascular responses elicited by chemical stimulation of the rostral ventrolateral medulla in conscious, unrestrained rats. **J Auton Nerv Syst**, v. 31, n. 3, p. 185-90, Dec 1990. ISSN 0165-1838 (Print) 0165-1838.

BALBO, S. L. et al. Vagotomy reduces obesity in MSG-treated rats. **Res Commun Mol Pathol Pharmacol**, v. 108, n. 5-6, p. 291-6, Nov-Dec 2000. ISSN 1078-0297 (Print) 1078-0297 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11958282> >.

BENDER, S. B. et al. Diet-induced obesity and diabetes reduce coronary responses to nitric oxide due to reduced bioavailability in isolated mouse hearts. **Diabetes Obes Metab**, v. 9, n. 5, p. 688-96, Sep 2007. ISSN 1462-8902 (Print) 1462-8902.

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **J Endocrinol**, v. 40, n. 4, p. 527-8, Apr 1968. ISSN 0022-0795 (Print) 0022-0795 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4868415>>.

CARROLL, J. F.; ZENEBE, W. J.; STRANGE, T. B. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. **Hypertension**, v. 48, n. 1, p. 65-72, Jul 2006. ISSN 1524-4563 (Electronic) 0194-911X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16702491> >.

CHEN, F.; CHAM, J. L.; BADOER, E. High-fat feeding alters the cardiovascular role of the hypothalamic paraventricular nucleus. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 298, n. 3, p. R799-807, Mar 2010. ISSN 1522-1490 (Electronic) 0363-6119 (Linking).

CUNHA, N. V. et al. Cox-2 inhibition attenuates cardiovascular and inflammatory aspects in monosodium glutamate-induced obese rats. **Life Sci**, v. 87, n. 11-12, p. 375-81, Sep 11 2010. ISSN 1879-0631 (Electronic) 0024-3205 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20688085> >.

DA CUNHA, N. V. et al. COX-2 inhibition does not reverse the increased sympathetic modulation in MSG obese rats. **Auton Neurosci**, v. 165, n. 2, p. 201-4, Dec 7 2011. ISSN 1872-7484 (Electronic) 1566-0702 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21824825> >.

DA CUNHA, N. V. et al. Decreased endothelial nitric oxide, systemic oxidative stress, and increased sympathetic modulation contribute to hypertension in obese rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 306, n. 10, p. H1472-80, May 15 2014. ISSN 1522-1539 (Electronic) 0363-6135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24633548> >.

DA SILVA MATTOS, A. M. et al. Renal sympathetic nerve activity is increased in monosodium glutamate induced hyperadipose rats. **Neurosci Lett**, v. 522, n. 2, p. 118-22, Aug 1 2012. ISSN 1872-7972 (Electronic) 0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22705582> >.

DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol Rev**, v. 74, n. 2, p. 323-64, Apr 1994. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8171117> >.

DAS, U. N. Is obesity an inflammatory condition? **Nutrition**, v. 17, n. 11-12, p. 953-66, Nov-Dec 2001. ISSN 0899-9007 (Print) 0899-9007.

DE FREITAS MATHIAS, P. C. et al. Transplantation of pancreatic islets from hypothalamic obese rats corrects hyperglycemia of diabetic rats. **Transplant Proc**, v. 39, n. 1, p. 193-5, Jan-Feb 2007. ISSN 0041-1345 (Print) 0041-1345 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17275504> >.

DEMIGNE, C. et al. Mice chronically fed a westernized experimental diet as a model of obesity, metabolic syndrome and osteoporosis. **Eur J Nutr**, v. 45, n. 5, p. 298-306, Aug 2006. ISSN 1436-6207 (Print) 1436-6207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16649091> >.

DOBRIAN, A. D. et al. Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension. **Hypertension**, v. 37, n. 2 Pt 2, p. 554-60, Feb 2001. ISSN 1524-4563 (Electronic) 0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11230334> >.

DOLNIKOFF, M. et al. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium

glutamate (MSG) treated-rats. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 25, n. 3, p. 426-33, Mar 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11319642> >.

FINOCCHIETTO, P. V. et al. Mitochondrial nitric oxide synthase: a masterpiece of metabolic adaptation, cell growth, transformation, and death. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 234, n. 9, p. 1020-8, Sep 2009. ISSN 1535-3699.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J**, v. 33, n. 7, p. 829-37, 837a-837d, Apr 2012. ISSN 1522-9645 (Electronic) 0195-668X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21890489> >.

FU, W. J. et al. Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats. **J Nutr**, v. 135, n. 4, p. 714-21, Apr 2005. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-6, Nov 27 1980. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836.

GIULIVI, C.; PODEROSO, J. J.; BOVERIS, A. Production of nitric oxide by mitochondria. **J Biol Chem**, v. 273, n. 18, p. 11038-43, May 1 1998. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9556586> >.

GRUBER, H. J. et al. Obesity reduces the bioavailability of nitric oxide in juveniles. **Int J Obes (Lond)**, v. 32, n. 5, p. 826-31, May 2008. ISSN 0307-0565.

GUERTZENSTEIN, P. G.; SILVER, A. Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. **J Physiol**, v. 242, n. 2, p. 489-503, Oct 1974. ISSN 0022-3751 (Print) 0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4455831> >.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 5, p. 335-46, May 2006. ISSN 1471-003X (Print) 1471-003X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16760914> >.

HALL, J. E.; HILDEBRANDT, D. A.; KUO, J. Obesity hypertension: role of leptin and sympathetic nervous system. **Am J Hypertens**, v. 14, n. 6 Pt 2, p. 103S-115S, Jun 2001. ISSN 0895-7061 (Print) 0895-7061 (Linking).

HIGASHI, Y. et al. Effect of obesity on endothelium-dependent, nitric oxide-mediated vasodilation in normotensive individuals and patients with essential hypertension. **Am J Hypertens**, v. 14, n. 10, p. 1038-45, Oct 2001. ISSN 0895-7061 (Print)

0895-7061.

HIRATA, A. E. et al. Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. **Braz J Med Biol Res**, v. 30, n. 5, p. 671-4, May 1997. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9283637> >.

HIROOKA, Y.; POLSON, J. W.; DAMPNEY, R. A. Pressor and sympathoexcitatory effects of nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla. **J Hypertens**, v. 14, n. 11, p. 1317-24, Nov 1996. ISSN 0263-6352 (Print) 0263-6352.

HUBER, D. A.; SCHREIHOFFER, A. M. Altered regulation of the rostral ventrolateral medulla in hypertensive obese Zucker rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 301, n. 1, p. H230-40, Jul 2011. ISSN 0363-6135 (Print) 1522-1539 (Electronic).

IIDA, M. et al. Substitution at codon 269 (glutamine --> proline) of the leptin receptor (OB-R) cDNA is the only mutation found in the Zucker fatty (fa/fa) rat. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 224, n. 2, p. 597-604, Jul 16 1996. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking).

JOBGEN, W. et al. Dietary L-arginine supplementation reduces white fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats. **J Nutr**, v. 139, n. 2, p. 230-7, Feb 2009. ISSN 0022-3166.

KAGIYAMA, S. et al. Cardiovascular effects of nitric oxide in the rostral ventrolateral medulla of rats. **Brain Res**, v. 757, n. 1, p. 155-8, May 16 1997. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9200511> >.

KARLEN-AMARANTE, M. et al. Altered baroreflex and autonomic modulation in monosodium glutamate-induced hyperadipose rats. **Metabolism**, v. 61, n. 10, p. 1435-42, Oct 2012. ISSN 1532-8600 (Electronic) 0026-0495 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22554831> >.

KIM, F. et al. Vascular inflammation, insulin resistance, and reduced nitric oxide production precede the onset of peripheral insulin resistance. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, n. 11, p. 1982-8, Nov 2008. ISSN 1079-5642.

KIZER, J. S.; NEMEROFF, C. B.; YOUNGBLOOD, W. W. Neurotoxic amino acids and structurally related analogs. **Pharmacol Rev**, v. 29, n. 4, p. 301-18, Dec 1977. ISSN 0031-6997 (Print) 0031-6997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/364498> >.

LAMBERT, E. et al. Sympathetic nervous system activity is associated with obesity-induced subclinical organ damage in young adults. **Hypertension**, v. 56, n. 3, p. 351-8, Sep 2010. ISSN 1524-4563 (Electronic) 0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20625075> >.

LI, H.; POULOS, T. L. Structure-function studies on nitric oxide synthases. **J Inorg Biochem**, v. 99, n. 1, p. 293-305, Jan 2005. ISSN 0162-0134 (Print) 0162-0134.

MACHO, L. et al. Late effects of postnatal administration of monosodium glutamate on insulin action in adult rats. **Physiol Res**, v. 49 Suppl 1, p. S79-85, 2000. ISSN 0862-8408 (Print) 0862-8408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10984075> >.

MALETINSKA, L. et al. Effect of cholecystokinin on feeding is attenuated in monosodium glutamate obese mice. **Regul Pept**, v. 136, n. 1-3, p. 58-63, Sep 11 2006. ISSN 0167-0115 (Print) 0167-0115 (Linking).

MANTENA, S. K. et al. High fat diet induces dysregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function in vivo. **Biochem J**, v. 417, n. 1, p. 183-93, Jan 1 2009. ISSN 0264-6021.

MARTINS-PINGE, M. C.; BARALDI-PASSY, I.; LOPES, O. U. Excitatory effects of nitric oxide within the rostral ventrolateral medulla of freely moving rats. **Hypertension**, v. 30, n. 3 Pt 2, p. 704-7, Sep 1997. ISSN 0194-911X (Print) 0194-911X (Linking).

MARTINS-PINGE, M. C. et al. Attenuated pressor responses to amino acids in the rostral ventrolateral medulla after swimming training in conscious rats. **Auton Neurosci**, v. 122, n. 1-2, p. 21-8, Oct 30 2005. ISSN 1566-0702 (Print) 1566-0702 (Linking).

MARTINS-PINGE, M. C. et al. Differential influence of iNOS and nNOS inhibitors on rostral ventrolateral medullary mediated cardiovascular control in conscious rats. **Auton Neurosci**, v. 131, n. 1-2, p. 65-9, Jan 30 2007. ISSN 1566-0702 (Print) 1566-0702 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16905370> >.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med**, v. 329, n. 27, p. 2002-12, Dec 30 1993. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7504210> >.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **Br J Pharmacol**, v. 147 Suppl 1, p. S193-201, Jan 2006. ISSN 0007-1188 (Print)

0007-1188 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16402104> >.

MORIMOTO, S. et al. Nitric oxide is an excitatory modulator in the rostral ventrolateral medulla in rats. **Am J Hypertens**, v. 13, n. 10, p. 1125-34, Oct 2000. ISSN 0895-7061 (Print) 0895-7061.

MUELLER, P. J. Exercise training attenuates increases in lumbar sympathetic nerve activity produced by stimulation of the rostral ventrolateral medulla. **J Appl Physiol (1985)**, v. 102, n. 2, p. 803-13, Feb 2007. ISSN 8750-7587 (Print) 0161-7567 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17053106> >.

NORONHA, B. T. et al. Inducible nitric oxide synthase has divergent effects on vascular and metabolic function in obesity. **Diabetes**, v. 54, n. 4, p. 1082-9, Apr 2005. ISSN 0012-1797 (Print) 0012-1797 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15793247> >.

OLNEY, J. W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, v. 164, n. 3880, p. 719-21, May 9 1969. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5778021> >.

PANIS, C. et al. Trypanosoma cruzi: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. **Exp Parasitol**, v. 127, n. 1, p. 58-65, Jan 2011. ISSN 1090-2449 (Electronic) 0014-4894 (Linking).

PATEL, K. P.; LI, Y. F.; HIROOKA, Y. Role of nitric oxide in central sympathetic outflow. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 226, n. 9, p. 814-24, Oct 2001. ISSN 1535-3702 (Print) 1535-3699 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11568303> >.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. Elsevier/Academic Press, 2009. ISBN 9780123748768. Disponível em: <
<https://books.google.pt/books?id=sQNfmwEACAAJ> >.

PERELLO, M. et al. Adrenal enucleation in MSG-damaged hyperleptinemic male rats transiently restores adrenal sensitivity to leptin. **Neuroendocrinology**, v. 78, n. 3, p. 176-84, Sep 2003. ISSN 0028-3835 (Print) 0028-3835 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14512710> >.

PERFIELD, J. W., 2ND et al. Altered hepatic lipid metabolism contributes to nonalcoholic fatty liver disease in leptin-deficient Ob/Ob mice. **J Obes**, v. 2013, p. 296537, 2013. ISSN 2090-0716 (Electronic) 2090-0708 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23401753> >.

RUMANTIR, M. S. et al. Neural mechanisms in human obesity-related hypertension. **J Hypertens**, v. 17, n. 8, p. 1125-33, Aug 1999. ISSN 0263-6352 (Print) 0263-6352 (Linking).

RUTLEDGE, A. C.; ADELI, K. Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms. **Nutr Rev**, v. 65, n. 6 Pt 2, p. S13-23, Jun 2007. ISSN 0029-6643 (Print) 0029-6643 (Linking).

SANCHEZ-LEMUS, E. et al. In vivo Angiotensin II AT1 receptor blockade selectively inhibits LPS-induced innate immune response and ACTH release in rat pituitary gland. **Brain Behav Immun**, v. 23, n. 7, p. 945-57, Oct 2009. ISSN 0889-1591.

SANSBURY, B. E.; HILL, B. G. Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide. **Free Radic Biol Med**, v. 73, p. 383-99, Aug 2014. ISSN 0891-5849.

SHAPOVAL, L. N.; SAGACH, V. F.; POBEGAILO, L. S. Nitric oxide influences ventrolateral medullary mechanisms of vasomotor control in the cat. **Neurosci Lett**, v. 132, n. 1, p. 47-50, Oct 28 1991. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1787918> >.

SHIBAO, C. et al. Autonomic contribution to blood pressure and metabolism in obesity. **Hypertension**, v. 49, n. 1, p. 27-33, Jan 2007. ISSN 1524-4563 (Electronic) 0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17116758> >.

SHIMABUKURO, M. et al. Role of nitric oxide in obesity-induced beta cell disease. **J Clin Invest**, v. 100, n. 2, p. 290-5, Jul 15 1997. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738.

SIWY, J. et al. Evaluation of the Zucker diabetic fatty (ZDF) rat as a model for human disease based on urinary peptidomic profiles. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e51334, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking).

SOUTHAN, G. J.; SZABÓ, C.; THIEMERMANN, C. Isothioureas: potent inhibitors of nitric oxide synthases with variable isoform selectivity. **Br J Pharmacol**, v. 114, n. 2, p. 510-6, Jan 1995. ISSN 0007-1188 (Print).

SOUZA, H. C. D.; TEZINI, G. Autonomic Cardiovascular Damage during Post-menopause: the Role of Physical Training. **Ageing Dis**, v. 4, n. 6, p. 320-8, Dec 2013. ISSN 2152-5250 (Electronic).

STOCKER, S. D.; MEADOR, R.; ADAMS, J. M. Neurons of the rostral ventrolateral medulla contribute to obesity-induced hypertension in rats. **Hypertension**, v. 49, n. 3, p. 640-6, Mar 2007. ISSN 1524-4563 (Electronic) 0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17190873> >.

SUGITA, H. et al. Inducible nitric-oxide synthase and NO donor induce insulin receptor substrate-1 degradation in skeletal muscle cells. **J Biol Chem**, v. 280, n. 14, p. 14203-11, Apr 8 2005. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

TOKAREV, D. et al. Treatment of neonatal rats with monosodium glutamate attenuates the cardiovascular reactivity to phenylephrine and angiotensin II. **Physiol Res**, v. 46, n. 3, p. 165-71, 1997. ISSN 0862-8408 (Print) 0862-8408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9728502> >.

TSENG, C. J. et al. Cardiovascular effects of nitric oxide in the brain stem nuclei of rats. **Hypertension**, v. 27, n. 1, p. 36-42, Jan 1996. ISSN 0194-911X (Print) 0194-911x.

TSENG, Y. H.; CYPESS, A. M.; KAHN, C. R. Cellular Bioenergetics as a Target for Obesity Therapy. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 6, p. 465-82, Jun 2010. ISSN 1474-1776 (Print).

VOLTERA, A. F. et al. [Effects of neuroendocrine obesity induction on systemic hemodynamics and left ventricular function of normotensive rats]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 52, n. 1, p. 47-54, Feb 2008. ISSN 0004-2730 (Print) 0004-2730.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1796-808, Dec 2003. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738.

WU, H. et al. Regulation of apelin and its receptor expression in adipose tissues of obesity rats with hypertension and cultured 3T3-L1 adipocytes. **Exp Anim**, v. 63, n. 2, p. 257-67, 2014. ISSN 1881-7122 (Electronic) 0007-5124 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24770651> >.

ZANZINGER, J.; CZACHURSKI, J.; SELLER, H. Inhibition of basal and reflex-mediated sympathetic activity in the RVLM by nitric oxide. **Am J Physiol**, v. 268, n. 4 Pt 2, p. R958-62, Apr 1995. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513.

ZELEZNA, B. et al. Anorexigenic effect of cholecystokinin is lost but that of CART (Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript) peptide is preserved in monosodium glutamate obese mice. **Physiol Res**, v. 58, n. 5, p. 717-23, 2009. ISSN 0862-8408 (Print) 0862-8408 (Linking).