

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA- FISIOLOGIA

**Implicações metabólicas da exposição intrauterina a uma dieta
hiperlipídica sobre a prole adulta de ratos espontaneamente
hipertensos**

MARCELO AURELIO DA ROCHA

Recife

2017

MARCELO AURELIO DA ROCHA

**Implicações metabólicas da exposição intrauterina a uma dieta
hiperlipídica sobre a prole adulta de ratos espontaneamente
hipertensos**

Dissertação submetida ao Programa de Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Fisiologia, sob a orientação da professora Dra. Glória Isolina Boente Pinto Duarte.

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Rocha, Marcelo Aurélio da

Implicações metabólicas da exposição intrauterina a uma dieta hiperlipídica sobre a prole adulta de ratos espontaneamente hipertensos/ Marcelo Aurélio da Rocha- Recife: O Autor, 2017.

52 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Glória Isolina Boente Pinto Duarte

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Bioquímica e Fisiologia, 2016.

Inclui referências

1. Dieta 2. Feto- desenvolvimento 3. Hipertensão I. Duarte, Glória Isolina Boente Pinto (orientadora) II. Título

613.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-033

Dissertação submetida ao Programa de Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Fisiologia

Aprovado por:

Prof. Dra. Glória Isolina Boente Pinto Duarte
(Orientadora)

Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier
(Universidade Federal de Pernambuco)

Prof. Dra. Vera Lucia Menezes de Lima
(Universidade Federal de Pernambuco)

Profa. Dra. Cristina Oliveira Silva
(Universidade Federal de Pernambuco)

03/10/2013

Agradecimentos

À Deus, pois sem ele nada seria possível.

Aos meus pais pelo apoio incondicional e por nunca me deixarem fraquejar.

A minha noiva por compreender as minhas ausências e sempre estar ao meu lado.

A professora Dra. Glória Isolina Boente Pinto Duarte pelos conselhos, auxílio e por me fazer despertar o gosto pela pesquisa.

A professora Dra. Dayane Aparecida Gomes por aceitar a tarefa de me co-orientar.

Aos companheiros de laboratório Diego Oliveira, Diego Queiroz, Fernanda Elizabeth Ramos, Francine Iane, Georgia Félix, Hicla Stefane, Gyl Souza, José Jairo, Juliana Dantas, Juliana Rocha, Luciana Veloso, Mayra Pereira, Odair Silva, Renata Rocha e Thayane Rebeca pela ajuda e força.

Aos professores Drs. Cristina Oliveira Silva, Fabiano Elias Xavier e Alexandre Descomps.

Aos amigos do LFR Edjair e Léucio Vieira filho.

Ao técnico de laboratório José Antônio Albuquerque, a veterinária Claudia Oliveira, ao secretário de pós-graduação Djalma Silva, ao amigo Edvaldo Mendes e aos funcionários responsáveis pela limpeza Edson e Eduardo.

A todos os professores e amigos da Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia.

Resumo

O crescimento e o desenvolvimento fetal são determinados pelo genoma materno e do feto, bem como pela capacidade da placenta em suprir nutrientes como proteínas e gorduras para este último. Alterações no meio intrauterino que exponha o feto a situações adversas, resulta em adaptações que predispõem a doenças na fase adulta da vida. Neste trabalho foi investigado o impacto do consumo de uma dieta rica em lipídios (DH) e com baixo teor de carboidratos, durante o período gestacional e de lactação, sobre a prole de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) aos seis meses de idade. Para isto, fêmeas foram alimentadas com DH do primeiro dia de gestação até o desmame (DHGL) ou com dieta labina (Presence[®], grupo controle). Um outro grupo de fêmeas, recebendo a DH, foi tratado com pioglitazona (DHGL+ pio) por via oral do primeiro ao 15º dia de gestação. Após o nascimento, as proles foram divididas em 3 grupos de acordo com o padrão materno. O perfil bioquímico foi determinado através de kits comerciais, a concentração plasmática de insulina foi determinada por ELISA. Para avaliação do estresse oxidativo foi determinado os níveis de peroxidação lipídica (TBARS) e glutathione redutase (GSH) no fígado. A pressão arterial (PA) foi mensurada por medida direta em ratos acordados. Preparações de anéis de aortas torácicas foram utilizadas para avaliar a reatividade vascular. A DH aumentou os níveis glicêmicos das matrizes sem alterar triglicérides nem colesterol. A curva ponderal de crescimento até os 4 meses de idade foi similar nos grupos. Entretanto, aos 6 meses de idade a massa corporal do grupo DHGL foi maior ($p < 0,01$) que o controle. Enquanto que o grupo tratado com pio apresentou massa corporal similar ao controle. Ainda, a ingestão de DH induziu aumento dos níveis teciduais de TBARS ($p < 0,05$) e redução dos níveis de GSH, o que pode ter contribuído para a piora da disfunção endotelial apresentada pelos SHRs. O tratamento com pio não melhorou esse parâmetro. A resposta contrátil a fenilefrina foi semelhante em todos grupos experimentais. Não houve alterações nos níveis pressóricos da prole DHGL. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a DH promove um meio intrauterino hiperglicêmico que pode ser a chave para as modificações metabólicas e funcionais encontrada na prole adulta e que, o tratamento das matrizes com pioglitazona, durante os primeiros 15 dias de gestação, protegeu a prole dos efeitos da hiperglicemia sem, contudo, melhorar a disfunção endotelial.

Palavras-chave: Dieta Hiperlipídica. SHR. Estresse Oxidativo. Pioglitazona.

Abstract

Fetal growth and development are determined by the maternal and fetal genome as well as by the placenta's ability to supply nutrients such as proteins and fats to the fetus. Intra-hierarchical changes in the environment that result in unfavorable situations, results in adaptations that result in diseases in the adult phase of life. This work was investigated on the impact of the intake of a diet rich in lipids (DH) and low carbohydrate content, during the gestational period and of lactation, on a offspring of spontaneously hypertensive rats (SHR) at six months of age. For this, the females were fed with DH (DH) or with diet labina (Presence®, control group). Another group of females, receiving DH, was treated with pioglitazone (DHGL + pio) orally first at the 15th day of gestation. After birth, as offspring were divided into 3 groups according to the maternal standard. The biochemical profile was defined by commercial kits, the plasma concentration of insulin was determined by ELISA. To evaluate the oxidative stress, the levels of lipid peroxidation (TBARS) and glutathione reductase (GSH) in the liver were determined. Blood pressure (BP) was measured by direct measurement in agreed rats. Preparation of thoracic aorta rings for evaluation of vascular reactivity. DH increased the glycemic levels of the matrices without changing triglycerides or cholesterol. The weight growth curve up to 4 months of age was similar in the groups. ($P < 0.01$) than the control. While the group treated with pio had body mass. In addition, DH intake induced increased tissue levels of TBARS ($p < 0.05$) and reduced GSH levels, which may have contributed to worsening of endothelial dysfunction. Treatment with pio did not improve this parameter. The response was made in all experimental groups. There are no results in the pressure levels of the DHGL projection. Taken together, our results suggest that DH is a hyperglycemic intrauterine environment that can be used for metabolic and functional modifications found in a offspring, the treatment of pioglitazone matrices during 15 days of gestation protected the offspring from the effects of hyperglycemia without, However, improve endothelial dysfunction.

Keyword: Hyperlipidic Diet. SHR. Oxidative stress. Pioglitazone.

Sumário

Lista de Abreviações	i
Lista de figuras	iii
1. Introdução	12
2. Fundamentação Teórica	15
2.1. Disfunção endotelial	17
2.2 Relaxamento e contração da musculatura lisa vascular	19
2.4 Modelos de hipertensão arterial	20
3. Objetivos	22
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos	22
4. Referências Bibliográficas	23
5.Anexo	29

Lista de Abreviações

AMPc – monofosfato cíclico de

adenosina COX 1 – ciclooxigenase 1

COX 2 – ciclooxigenase 2

DCV – doença cardiovascular

DM 2 – diabetes *mellitus* tipo

2 DH – dieta hiperlipídica

DHGL – dieta hiperlipídica gestação e lactação

DHGL+pio – dieta hiperlipídica gestação e lactação juntamente com a pioglitazona

EDHF – fator hiperpolarizante derivado do endotélio

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

EROS – espécies reativas de oxigênio

GMPc – monofosfato cíclico de

guanina GSH – enzima glutathione

HA – hipertensão arterial

HDL-c – colesterol ligado a lipoproteínas de alta

densidade IL-6 – interleucina 6

i.p. – intraperitoneal

LDLc - colesterol ligado a lipoproteínas de baixa densidade

MAP quinase – proteína quinase ativada por mitógenos

NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

peroxidase NFκB – fator nuclear κB

ON – óxido nítrico

O₂⁻ - radical superóxido

ONOO⁻ - Peroxinitrito RI

– resistência à insulina

SHR - ratos espontaneamente hipertensos

PAD – pressão arterial diastólica

PAS – pressão arterial sistólica

PGE2 – prostaglandina E2

PGE2 α – prostaglandina E2 alfa

PGI2 – prostaciclina 2

pio – pioglitazona

PIP2 - fosfatidil inositol 4,5 bifosfato

PLC - fosfolipase-C

PPAR γ – receptor peroxissomo proliferador-ativador gama

TBARs – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TDZ –tiazolidinadiona

TNF α – fator de necrose tumoral α

TxA2 – troboxano

A2 v.o. – via oral

Lista de figuras

Figura 1: Mecanismos intracelulares envolvidos na contração da musculatura lisa induzida pelo Ca^{2+}	19
--	----

1. Introdução

Na sociedade moderna há uma grande preocupação em relação à saúde da população, uma vez, que há um grande consumo de alimentos industrializados ricos em carboidratos, lipídios e açúcares. Tais alimentos consumidos com frequência e aliados ao sedentarismo podem desencadear a obesidade, considerada mundialmente como um problema de saúde pública. Em 2012, cerca de um bilhão de pessoas, isto é, 12% da população mundial foram consideradas obesas (http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2012/en/). A obesidade é associada comumente a uma série de doenças metabólicas como hipertensão, dislipidemia, diabetes Mellitus tipo 2 (DM 2) e aterosclerose (DEFRONZO ; FERRANNINI, 1991). A associação destas patologias, inicialmente denominada "síndrome X" (IVKOVIC-LAZAR *et al.*, 1992; REAVEN, 1988) e, mais recentemente, "síndrome metabólica" (SM) é caracterizada por hiperinsulinemia e por diferentes graus de resistência à insulina (RI) associada a um conjunto de fatores de riscos metabólicos, os quais aumentam as chances de desenvolver doenças cardíacas, diabetes e acidentes vasculares.

A obesidade materna afeta o conceito desde a sua fase embrionária. Logo, alterações no metabolismo de lipídios e carboidratos que garantem o fornecimento contínuo de nutrientes para o feto, progressivamente promovem acréscimo de adipócitos e secreção de citocinas pró-inflamatórias, além de provocar alterações de hormônios placentários que sustentam o feto através de mecanismos protetores (AQUINO *et al.*, 2003). O desenvolvimento fetal é sustentado pela placenta, o órgão que faz a interface entre o feto e a mãe. Além de exercer importantes funções endócrinas, orquestrando as adaptações materna à gestação e mobilização de recursos para uso fetal, atua como uma barreira seletiva, protetora, reduzindo a exposição do feto para os glicocorticoides, por exemplo. Entretanto, quando sua capacidade de adaptação ou sua função é alterada, o desenvolvimento do feto é comprometido (BURTON *et al.*, 2016) Evidências experimentais sugerem que distúrbios metabólicos são capazes de promover alterações no meio intrauterino. Neste sentido, os principais distúrbios encontrados são a desnutrição, insuficiência placentária, diabetes ou obesidade, que podem programar alterações no desenvolvimento fetal e o surgimento de doenças crônicas degenerativas na vida adulta (PORTHA *et al.*, 2011; EBERLE; AMENT, 2012). O diabetes gestacional induz anormalidades no metabolismo da glicose e secreção de insulina no feto promovendo diminuição do crescimento fetal, observando-se que as proles oriundas de mães diabéticas

apresentam alto risco para o desenvolvimento DM2, obesidade e intolerância a glicose na vida adulta. O excesso de glicose na corrente sanguínea materna atinge o feto por meio da placenta gerando um ambiente pró-inflamatório que prejudica o desenvolvimento embrionário e fetal (PINNEY, *et al.*, 2011).

Os filhos oriundos de mães diabéticas na maioria dos casos apresentam macrosomia causada principalmente pelo excesso de glicose que chega ao embrião através da placenta. A hiperglicemia promove aumento dos níveis de insulina que atua como hormônio do crescimento levando ao crescimento e aumento dos adipócitos fetal. Exposição ao diabetes intrauterino também está relacionado com aumento da dislipidemia, inflamação vascular subclínica e disfunção endotelial que contribuem para o surgimento de doenças cardiovasculares (DCV) na vida adulta (VRACHNIS *et al.*, 2012). O meio intrauterino adverso é capaz de promover alteração no desenvolvimento fetal através de modificações na expressão gênica das células tronco (totipotentes) denominadas modificações epigenéticas que são transmitidas de uma geração de células a outras. O DNA pode sofrer mutações epigenéticas nas extremidades amino terminal das histonas H3 e H4. As mais comuns envolvem metilação e acetilação dos resíduos de lisina na extremidade amino terminal que levam a diminuição da transcrição gênica. Outro tipo de mutação, envolve a metilação do DNA com troca de uma base nitrogenada pela DNA metiltransferase na posição C5, sendo responsável pelo silenciamento gênico e contribuindo para inativação do cromossomo X e regulação da transcrição gênica durante a fase de diferenciação celular (SIMMONS, 2007).

A obesidade durante a gravidez em humanos, além de estar relacionada com risco aumentado para o desenvolvimento de diabetes pode promover trombose venosa, pré-eclampsia e baixo peso ao nascimento. Alterações nutricionais são capazes de modificar a angiogênese e reduzir a expressão gênica relacionada com o crescimento placentário. Tais alterações estariam envolvidas no estresse oxidativo, modificações no transporte de nutrientes para o embrião, inflamação e diminuição do fluxo sanguíneo, o que contribuiria diretamente para a restrição do crescimento intrauterino embrionário, que é associado a DCV na vida adulta (THORNBURG, *et al.*, 2010). Vários estudos relatam que ratos alimentados por dietas hiperlipídicas (DH) desenvolvem RI, mas não uma franca hiperglicemia ou diabetes (ZHAO *et al.*, 2008; FLANAGAN *et al.*, 2008). A origem e os mecanismos das modificações metabólicas induzidas pela DH ainda não estão completamente esclarecidos, embora possam

estar relacionadas ao estresse oxidativo (BRITO *et al.*, 2007). Por outro lado, a maioria dos modelos de DM 2 fundamentados na ingestão de dietas ricas em gordura (acima de 20%), mostram apenas alteração na função pancreática, intolerância a glicose e hipercolesterolemia (WILLET, 2002), o que sugere que a DH pode induzir uma insulino-resistência (ZHANG *et al.*, 2008; NAGAO *et al.*, 2015).

Anteriormente, nossa equipe mostrou que uma nova dieta rica em lipídeos (58%) mas baixa em carboidratos (25%), utilizada por um curto período de tempo, aumentou os níveis de glicose, colesterol e triglicérides ao mesmo tempo que induziu um discreto aumento de pressão arterial em ratos da linhagem Wistar, que foi revertido quando da substituição da DH por uma dieta padrão (da SILVA, 2010). No presente trabalho, nós hipotetizamos que o consumo de DH por matrizes com hipertensão arterial bem estabelecida induziria importantes agravos na prole.

2. Fundamentação Teórica

A hipertensão arterial (HA) é uma doença que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, sendo um importante fator de risco para DCV, cerebral e renal. Ela é responsável por 25% dos casos de cardiopatia isquêmica e 40% dos acidentes vasculares cerebrais (AVC). No Brasil, em 2007, ocorreram 308.466 óbitos por doenças do aparelho circulatório, o que correspondeu a 29,4% do total de óbitos no país e a 32% das causas definidas de morte. Nesse mesmo ano, entre todas as causas específicas, a doença cérebro-vascular foi à primeira causa de óbito na população com 96.089 óbitos. Os óbitos por enfarte do miocárdio foram 71.207 (VI Diretrizes Brasileira de Hipertensão, 2010).

A soma dos óbitos por enfarte do miocárdio e as demais doenças isquêmicas do coração resultou em 91.653 óbitos, sendo a segunda causa de morte na população brasileira. Sucessivamente, inquéritos populacionais sugerem que a prevalência de HA está acima de 30% (VI Diretrizes Brasileira de Hipertensão, 2010), o que a torna um grande problema de saúde pública com baixas taxas de controle. Por outro lado, 40% da população brasileira esta com excesso de peso e 10 a 15 % das pessoas são obesas. Frequentemente, o indivíduo obeso apresenta elevação dos níveis séricos de triglicérides (BARROSO *et al.*, 2002), de colesterol associado à lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) e uma diminuição do colesterol associado à lipoproteína de alta densidade (HDL-c), que representam dislipidemias associadas ao risco de DCV (KATTAN, 1999; RIBEIRO FILHO *et al.*, 2006). A obesidade associada à hipertensão, RI, microalbuminúria e DM 2, constitui o conjunto de anormalidades que formam o quadro conhecido por SM (REAVEN, 1988 ; RIBEIRA FILHO *et al.*, 2006).

A hipertensão associada ao DM é uma das maiores causas de hipertrofia ventricular esquerda (HVE) cuja progressão resulta em descompensação e, geralmente, em insuficiência cardíaca. O papel da dieta rica em lipídeos e do aumento da concentração de ácidos graxos no plasma sobre a hipertrofia cardíaca resultante da hipertensão ainda não está claro. Alguns estudos sugerem que o aumento da captação de ácidos graxos pelo miocárdio resultaria em disfunção sistólica, dilatação da câmara do ventrículo esquerdo, apoptose e hipertrofia cardíaca e que o uso de pioglitazona – uma tiazolidinadiona (TDZ) utilizada no tratamento do diabetes - reduziria a hipertrofia cardíaca consequente a HA (KATO *et al.*, 2008). Ademais, foi mostrado que as TDZs poderiam reduzir a aterosclerose (CHEN *et al.*, 2001) e ter efeitos

benéficos na remodelagem pós-infarto (GENG *et al.*, 2006). Mais recentemente, foi mostrado que pacientes portadores de DM2 ou intolerantes a glicose, apresentaram redução do volume de gordura visceral que é independente da redução dos níveis de glicose (KODAMA *et al.*, 2013)

A pioglitazona aumenta a sensibilidade de tecidos como fígado, adipócitos e músculos à insulina (ZHAO, 2012). Ela se liga ao receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama (PPAR γ) promovendo uma redução da RI e dos níveis glicêmicos (SAIKI *et al.*, 2007). Nos adipócitos, promove redução dos níveis plasmáticos de ácidos graxos e modulação da expressão de adiponectinas promovendo melhora no quadro de RI no músculo (CHUNG *et al.*, 2009). Também, foi observado que a pioglitazona apresenta um efeito de proteção vascular pela redução do estresse oxidativo, inibindo a lesão renal e a disfunção endotelial (TAUGUCHI *et al.*, 2012).

A presença dos receptores PPAR γ na musculatura lisa vascular e a sua ativação desempenha um efeito protetor cardiovascular pela regulação da produção de citocinas pró-inflamatórias, fibrinólise, modulação de macrófagos e fibrose. Nesse contexto, salienta-se que no processo inflamatório vascular também há participação de derivados do ácido araquidônico como as ciclooxigenases (COX), que em mamíferos possui duas isoformas a COX-1 constitutiva sendo encontrada em vários tecidos e na musculatura lisa endotelial, cuja função esta ligada a manutenção da homeostase. A isoforma COX-2 pode ser induzida por agentes inflamatórios como lipopolissacarídeos e citocinas. O aumento da expressão vascular dessa isoforma esta diretamente ligada a processos patológicos como aterosclerose, hipertensão e obesidade. Aumento da expressão de COX-2 também esta relacionada ao aumento na resposta contrátil a noradrenalina na prole de ratas diabéticas pelo aumento na produção de prostanoídes vasoconstritores como TxA₂, PGE₂ e PGF_{2 α} (RAMOS-ALVES e QUEIROZ, *et al.* 2012). A ativação do receptor nuclear PPAR γ reduz o estresse oxidativo vascular pela inibição da expressão e síntese de citocinas pró-inflamatórias, IL-6, NF- κ B, NADPH oxidase e COX-2 (MARTÍN, *et al.*, 2012). Os receptores PPAR γ também são encontrados nas células endoteliais, onde está envolvido com a regulação da oxidação, a coagulação sanguínea, a proliferação celular, inflamação, apoptose (ZHAO *et al.*, 2012).

Mutações ou ruptura nos receptores PPAR γ são responsáveis pelo estabelecimento da HA , prejuízo no relaxamento dependente do endotélio e redução na produção de ON, assim como,

promove o estresse oxidativo vascular e transcrição de fatores pró-inflamatórios (KLEINHENZ, J. M., *et al*, 2009).

2.1. Disfunção endotelial

O endotélio desempenha um papel fundamental na regulação do fluxo sanguíneo e do tônus vasomotor, através da liberação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras. A sua ampla distribuição e localização na interface sangue/tecido favorece o desempenho de diversas funções relacionadas à homeostase vascular (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980). Dentre as substâncias vasoconstritoras liberadas pelo endotélio destaca-se os derivados do ácido araquidônico (BATLOUNI *et al.*, 2001), ânion superóxido (VANHOUTTE, 1988), a endotelina-1 (YANAGISAWA *et al.*, 1988), a angiotensina II (VELTMARET *et al.*, 1991) e o fator de ativação plaquetária.

O endotélio relaxa a musculatura lisa vascular através do ON (FURCHGOTT, 1983; HUTCHINSON *et al.*, 1987; PALMER *et al.*, 1987), da prostaciclina (PGI₂) (MONCADA *et al.*, 1976) e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (FELETOU & VANHOUTTE, 1988). O ON além de possuir a função relaxante sobre a musculatura lisa vascular, também atua inibindo a proliferação celular, agregação plaquetária e adesão de leucócitos na parede vascular. A capacidade de homeostase endotelial é comprometida no processo fibrinolítico, pois a produção e liberação de ON estão reduzidas (VIARO *et al.*, 2000). Ludmer *et al.* (1986), foram os primeiros a caracterizar a disfunção endotelial em humanos, através da demonstração de que artérias coronárias com aterosclerose se contraem em resposta à acetilcolina, enquanto artérias coronárias normais vasodilatam. Após essa observação, vários estudos demonstraram que em situações fisiológicas, o endotélio mantém o tônus vasomotor reduzido, inibe a proliferação de células musculares lisas, inibe a agregação plaquetária e previne a adesão de leucócitos. A disfunção endotelial pode ser avaliada através da medida vasodilatação dependente do endotélio, em resposta a agonistas que induzem a liberação de ON ou ainda através da medida da capacidade de modulação do ON sobre a resposta contrátil induzida por agentes vasoconstritores, como agonistas α -adrenérgicos (HSUE *et al.*, 2004).

A disfunção endotelial está presente em diversas doenças metabólicas e/ou cardiovasculares, como na obesidade, intolerância à glicose, DM, hipertensão arterial e dislipidemias. Em todas essas condições, foi verificado que ocorre RI e uma menor resposta a agentes vasodilatadores dependentes de endotélio (HSUE *et al.*, 2004). O endotélio e outros componentes da parede vascular são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio (EROS), como os ânions superóxido (O_2^-) que possuem uma grande capacidade de reagir com o ON, formando o radical peroxinitrito ($ONOO^-$) que está envolvido com o estresse oxidativo e inúmeros processos de lesão celular, como alterações nos ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (POTENZA, *et al* 2009).

A obesidade é um dos fatores que contribuem diretamente para a disfunção endotelial, uma vez, que a hipertrofia dos adipócitos induz inflamação sistêmica pela liberação de adipocitocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral α (TNF- α), leptina e IL-6. Esse processo inflamatório sistêmico é mediado pelo fator nuclear kappa B (NF- κ B), cuja ativação promove aumento na produção de EROs e reduz a produção de ON nas células endoteliais em resposta à insulina (KOBAYASI, *et al* 2010).

O sistema heme-oxigenase é um dos mecanismos de defesa do organismo contra o estresse oxidativo. Esse sistema é formado por duas isoformas heme-oxigenase 1 (heme-ox1) e a heme-oxigenase 2 (heme-ox2). Em ratos hipertensos, a heme-ox1 apresenta importante papel na redução da hipertrofia miocárdica, no estresse oxidativo e no processo inflamatório sistêmico (CAO, *et al* 2011). Em ratos Zucker obesos e diabéticos tratados com cobalto protoporfirina (CoPP), que estimula o sistema heme-oxigenase, observou-se um aumento da heme-ox1, que levou a melhora na sensibilidade a insulina e no remodelamento do tecido adiposo principalmente pelo aumento nos níveis séricos de adiponectina e MAP quinase (NICOLAI, *et al* 2009). Camundongos obesos (ob) tratados com CoPP apresentaram aumento nos níveis séricos de adiponectina, redução do acúmulo de gordura abdominal e visceral, redução nos níveis plasmáticos de TNF- α , IL-6 e IL-1 β que contribuíram também para aumento na sensibilidade à insulina e glicose (LI, *et al* 2008). A ativação da heme-ox1 em ratos SHR diabéticos tratados com cloreto de estanho ($SnCl_2$) reduziu os marcadores para o estresse oxidativo como O_2^- e 3-NT (neurotrofina 3) e aumentou a expressão de proteínas anti-apoptóticas, Bcl-2 e AKT. A ativação dos receptores PPAR γ também promove aumento nos níveis proteicos de heme-ox1(CAO, *et al* 2008).

2.2 Relaxamento e contração da musculatura lisa vascular

A contração da musculatura lisa vascular em condições fisiológicas pode ocorrer pelo aumento na concentração citoplasmática do íon cálcio $[Ca^{2+}]_i$ ou através da estimulação promovida por agonistas (fenilefrina e noradrenalina) nos receptores de membrana. A ligação de um agonista vasoconstritor ao receptor, estimula a fosfolipase- C (PLC) via subunidade α da proteína G. A PLC hidrolisa o fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP₂) na membrana plasmática formando 1,4,5 trifosfato de inositol (IP₃) e 1,2 diacilglicerol (DAG), aquele se difunde pela membrana celular para o citosol e o DAG ativa a proteína quinase C (PKC). O IP₃ no citosol estimula a abertura de canais de cálcio sensíveis a IP₃ no retículo sarcoplasmático (RS) levando ao aumento $[Ca^{2+}]_i$ que irá ativar proteínas contráteis levando a contração. O DAG juntamente com o Ca^{2+} irá ativar a PKC que irá regular vários processos celulares que culminarão com a regulação do transporte transmembranar de Ca^{2+} e q sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} (MORGADO, *et al.*, 2011). O aumento nos níveis citoplasmático de Ca^{2+} promove interação do mesmo com a calmodulina formando o complexo Ca^{2+} -calmodulina (CaM). Esse complexo liga-se a cadeia leve de miosina pela enzima quinase (MLCK) levando a fosforilação do sitio regulatório da cadeia leve da miosina (MLC), o que aumenta a atividade da ATPase na miosina e induz a contração muscular (HIRANO, *et al.* 2007) (Figura 1).

O relaxamento da musculatura lisa vascular ocorre principalmente pelo acoplamento de agentes vasorrelaxantes aos receptores. Esses agentes estimulam a síntese de segundos mensageiros cíclicos como AMP_c (monofosfato cíclico de adenosina) e GMP_c (monofosfato cíclico de guanina), cujo aumento citoplasmático promove a síntese de PKG e PKA que irão promover o vasorrelaxamento pelos seguintes mecanismos: redução do influxo do Ca^{2+} , captação de Ca^{2+} pelo RS, hiperpolarização da membrana plasmática pela abertura de canais de K^+ ; fechamento de canais sensíveis ao Ca^{2+} , diminuição da sensibilidade da MLC a esse íon e a ruptura da ligação entre a MLCK e a actina (REMBOLD, 1992; ROBERTS, *et al.* 2013).

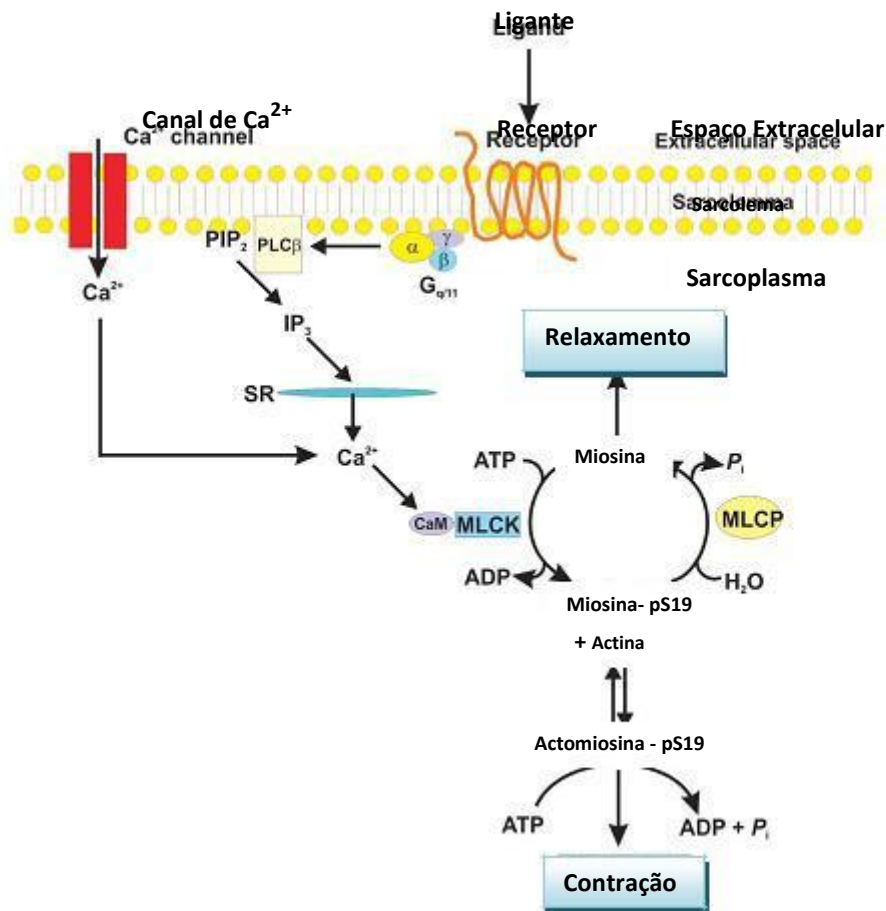


Figura 1. Mecanismos intracelulares envolvidos na contração da musculatura lisa induzida pelo Ca^{2+} . CaM, calmodulina; Gq/11 membro da subfamília da heterotrimérica proteína G com subunidades α , β e γ ; IP₃, 1,4,5 trifosfato de inositol; MLCK, quinase da cadeia leve da miosina; PIP₂ fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (modificado de WALSH, 2011).

2.4 Modelos de hipertensão arterial

Na tentativa de estudar a HA humana vários modelos foram desenvolvidos, dentre os quais a hipertensão renovascular (modelo de Goldblatt) hipertensão neurogênica (desnervação dos barorreceptores sino aórticos), hipertensão dependente de mineralocorticóides (ou modelo DOCA-sal ; que consta da associação de injeções de desoxicorticosterona + cloreto de sódio na água de beber) , hipertensão por estenose da aorta, hipertensão por inibição crônica do óxido nítrico e o modelo de hipertensão de origem genética . O primeiro modelo de hipertensão genética foi o GH, originado de uma cepa de ratos Nova Zelândia (FAZAN *et al.*,

2001). Em seguida, o rato espontaneamente hipertenso (SHR) obtido originalmente do cruzamento ‘inbred’ de seus controles normotensos Wistar-Kyoto com ratos Wistar ‘inbred’ (OKAMOTO; AOKI, 1963). A pressão arterial dessa linhagem apresenta valores normais até a quarta semana. A partir da 4ª semana a pressão arterial dos SHRs aumenta de forma importante até a 12ª semana. Este aumento continua de modo gradual até a 20ª semana de idade, alcançando entre 180 e 200 mmHg de pressão sistólica. A importância desse modelo é sua semelhança com a hipertensão humana, motivo pelo qual é um dos mais usados na investigação dos mecanismos implicados no desenvolvimento e manutenção da HA. A pressão sistólica da cepa WKY sofre um aumento até a 10ª semana, estabilizando em 126 mm de Hg.

Nos estágios precoces da hipertensão desenvolvida em SHR, o débito cardíaco (DC) está aumentado e a resistência periférica total (RPT) normal, mas com a evolução do quadro, o DC retorna ao normal e a RPT aumenta. Com a progressão da hipertensão, o modelo SHR paulatinamente desenvolve alterações na estrutura cardíaca que culmina em hipertrofia do ventrículo esquerdo entre 6-24 meses de idade (ENGELMAN, 1987) e fibrose cardíaca. Nos estágios finais, a função cardíaca começa a ser comprometida e o DC é reduzido em função do desenvolvimento de uma insuficiência cardíaca congestiva (FROLICH, 1977 *apud* FAZAN *et al.*, 2001). A frequência cardíaca (FC) desses animais é mais elevada que os seus controles WKY desde a terceira semana apresentando uma correlação positiva com os níveis de pressão até a sexta semana de vida (para revisão DORNAS & SILVA, 2011). O modelo SHR apresenta disfunção endotelial, aumento do estresse oxidativo, redução da biodisponibilidade de óxido nítrico e níveis plasmáticos elevados do peptídeo atrial natriurético (PAN) (ROMERO *et al.*, 2013). As quatro semanas de idade foi observado ainda, alterações estruturais nas artérias de resistência de SHR, com maior espessura na camada média (RIZZONI *et al.*, 1994). Ainda foi observado aumento da sensibilidade à noradrenalina antes mesmo do aparecimento da hipertensão arterial (MULVANI & NYBORG, 1980). Logo, pelas características deste modelo, aparentemente é o mais próximo da HA em humanos, embora sejam reconhecidas suas limitações.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de uma dieta hiperlipídica sobre ratos espontaneamente hipertensos (SHR), visando corroborar na elucidação de alguns mecanismos que desencadeiam as doenças metabólicas.

3.2 Objetivos específicos

Investigar se o aumento da ingestão calórica em SHR promove um aumento exacerbado nos níveis pressóricos e compreender as suas consequências sobre o coração;

Analisar o perfil lipídico e glicêmico das matrizes e prole adulta;

Determinar os níveis de peroxidação lipídica pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), bem como glutathione redutase (GSH) no fígado;

Avaliar o relaxamento vascular dependente de endotélio induzido por acetilcolina na aorta isolada desses animais;

Avaliar a resposta contrátil induzida por fenilefrina nos anéis de aorta isolados.

Determinar os níveis pressóricos na prole adulta;

Avaliar os parâmetros anatômicos.

4. Referências Bibliográficas

- AQUINO, M. M. A., PEREIRA, G.B., AMARAL, E., PARPINELLI, M.A., PASSINI JUNIOR, R. Revendo diabetes e gravidez, **Rev. Ciênc. Méd.**, Campinas, 12 (01), 99-106, 2003.
- BARROSO, S. G.; ABREU, V. G.; FRANCISCHETTI, E. A. A participação do tecido adiposo visceral na gênese da hipertensão e doença cardiovascular aterogênica. Um conceito emergente. **Arq. Bras. Cardiol.**, 78 (6), 618-630, 2002.
- BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Rev. Bras. Hipertens.**, 8: 328-338, 2001.
- BERLEZE, K. J., *et al.*, Gestational and Postnatal Low Protein Diet Alters Insulin Sensitivity in Female Rats, **Exp Biol Med (Maywood)**, 234(12):1437-44, 2009.
- BRITO, V. B.; FOLMER, V.; SOARES, J. C. M.; SILVEIRA, I. D.; ROCHA, J. B. T. Long-term sucrose and glucose consumption decreases the δ -aminolevulinate dehydratase activity in mice. **Nutrition**, 23: 818-826, 2007.
- BURTON GJ, FOWDEN AL, THORNBURG KL Placental Origins of Chronic Disease. **Physiol Rev.**, 96(4):1509-15065, 2016.
- CAO, J.; DRUMMOND, G.; INOUE, K.; SODHI, K.; LI, X. Y.; OMURA, S. Upregulation of Heme Oxygenase-1 Combined with Increased Adiponectin Lowers Blood Pressure in Diabetic Spontaneously Hypertensive Rats through a Reduction in Endothelial Cell Dysfunction, Apoptosis and Oxidative Stress. **Int. J. Mol. Sci.**, 9: 2388-2406, 2008.
- CAO, J.; SODHI, K.; PURI, N.; MONU, S. R.; REZZANI, R.; ABRAHAM, N. G. High fat diet enhances cardiac abnormalities in SHR rats: Protective role of heme oxygenase/adiponectin axis. **Diabetol. Metab. Syndr.**, 1-13, 2011.
- CHEN, Z.; ISHIBASHI, S.; PERREY, S.; OSUGA, J.; GOTODA, T. *et al.* Troglitazone inhibits atherosclerosis in apolipoproteinE-knockout mice: pleiotropic effects on CD36 expression and HDL. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 21: 372-377, 2001.
- CHUNG, S. S.; KIM, M.; YOUN, B.; LEE, N. S.; PARK, J. W.; LEE, I. K.; LEE, Y. S.; KIM, J. B.; CHO, Y. M.; LEE, H. K.; PARK, K. S. Glutathione peroxidase 3 mediates the antioxidant effect of peroxisome proliferator-activated receptor γ in human skeletal muscle cells. **Mol. Cell. Biol.**, 9: 20-30, 2009.
- COHEN, G.; KIM, M.; OGWU, V. A modified catalase assay suitable a plate reader and for the analysis of brain cell cultures. **J. Neurosci. Methods.**, 67: 53-56, 1996.
- DA SILVA, O. A. Estudo dos efeitos de uma nova tiazolidinadiona sobre a disfunção metabólica causada por dieta hiperlipídica em ratos Wistar. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

DEFRONZO, R. A.; FERRANNINI, E. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. **Diabetes Care**, 14: 173-194, 1991.

DORNAS, W. C; SILVA, M. Animal models for the study of arterial hypertension. **J. Biosci.**, 36: 731–737, 2011.

EBERLE C, AMENT C. Diabetic and metabolic programming: mechanisms altering the intrauterine milieu. **ISRN Pediatr**. 2012; 2012: 1- 11

ENGELMANN, G. L.; VITULLO, J. C.; GERRITY, R. G. Morphometric analysis of cardiac hypertrophy during development, maturation and senescence in spontaneously hypertensive rats. **Circ. Res.**, 60: 487-494, 1987.

FAZAN, J. R. R.; SILVA; V. J. D.; SALGADO, H. C. Modelos de hipertensão arterial. **Rev. Bras. Hipertens.**, 8 (1): 19-29, 2001.

FELETOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **Br. J. Pharmacol.**, 93 (3): 515-524, 1988.

FLANAGAN, A. M.; BROWN, J. L.; SANTIAGO, C. A.; AAD, P. Y.; SPICER, L. J.; SPICER, T. High-fat diets promote insulin resistance through cytokine gene expression in growing female rats. **J. Nut. Biochem.**, 19(8): 505-513, 2008.

FROHLICH, E. D. The adrenergic nervous system and hypertension: State of the art. **Mayo. Clin. Proc.**, 52: 361-368, 1977.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 27: 288(5789): 373-376, 1980.

FURCHGOTT, R. F. Role of endothelium in response of vascular smooth muscle. **Circ. Res.**, 53: 557-573, 1983.

GENG, D. F.; WU, W.; JIND, M.; WANG, J. F.; WU, Y. M. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand. Rosiglitazone on left ventricular remodeling in rats with myocardial infarction. **Int. J. Cardiol.**, 113: 86–91, 2006.

HIRANO, K. Current Topics in the Regulatory Mechanism Underlying the Ca²⁺ Sensitization of the Contractile Apparatus in Vascular Smooth Muscle. **J. Pharmacol. Sci.**, 104: 109-115, 2007.

HUTCHINSON, P. J; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Comparative pharmacology of EDRF and nitric oxide on vascular strips. **Eur. J. Pharmacol.**, 141(3): 445-451, 1987.

HSUEH W. A.; LYON C. J.; QUIÑONES M. Insulin resistance and the endothelium. **Am. J. Med.**, 117: 109-117, 2004.

IVKOVIC-LAZAR, T.; LEPSANOVIC, L.; BABIC, L.; STOKIC, E.; TESIC, D.; MEDIC-STOJANOSKA, M. The metabolic X syndrome: 4 case reports. **Med. Pregl.**, 45: 210-214, 1992.

JAYESH, B.; MAJITHIYA, T.; PARAMAR, A.; BALARAMAN, R. Pioglitazone, a PPAR gamma agonist, restores endothelial function in aorta of streptozotocin-induced diabetic rats. **Cardiovasc. Res.**, 66: 150–161, 2005.

KATO, M. F.; SHIBATA, R.; OBATA, K.; MIYACHI, M.; YAZAWA, H.; TSUBOI, K.; YAMADA, T.; NISHIZAWA, T.; NODA et al. Pioglitazone attenuates cardiac hypertrophy in rats with salt-sensitive hypertension: role of activation of AMP-activated protein kinase and inhibition of Akt. **J. Hypertens.**, 26(8): 1669-1676, 2008.

KLEINHENZ, J. M., KLEINHENZ D.J; YOU S, RITZENTHALER J.D, HANSEN, J.M.; ARCHER, D.R. ; SUTLIFF R.L.; HART, C.M. Disruption of endothelial peroxisome proliferator-activated receptor-gamma reduces vascular nitric oxide production. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 297: H1647–H1654, 2009.

KNIGHT, S. F. et al. Endothelial dysfunction and the development of renal injury in spontaneously hypertensive rats fed a high fat diet. **Hypertension.**, 51: 352-359, 2008.

KOBAYASI R.; AKAMINE E. H.; DAVEL A. P.; RODRIGUES M. A.; CARVALHO, C. R.; ROSSONI, L. V. Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice. **J. Hypertens.**, 28 (10): 2111-2119, 2010.

KODAMA N, TAHARA N, TAHARA A, HONDA A, NITTA Y, MIZOGUCHI M, KAIDA H, ISHIBASHI M, ABE T, IKEDA H, NARULA J, FUKUMOTO Y, YAMAGISHI S, IMAIZUMI T. Effects of pioglitazone on visceral fat metabolic activity in impaired glucose tolerance or type 2 diabetes mellitus. **J Clin Endocrinol Metab.**, 98(11):4438-4445, 2013.

LAHLOU, S.; DUARTE, G. P. Hypotensive action of bromocriptine in the DOCA-salt hypertensive rat: contribution of spinal dopamine receptors. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, 12 (6): 599-606, 1998.

LI, M.; KIM, D. H.; TSENOVOY, P. L.; PETERSON, S. J.; REZZANI, R.; RODELLA, L. F.; ARONOW, W. S.; IKEHARA, S. ; ABRAHAM, N. G. Treatment of Obese Diabetic Mice With a HemeOxygenase Inducer Reduces Visceral and Subcutaneous Adiposity, Increases Adiponectin Levels, and Improves Insulin Sensitivity and Glucose Tolerance, **Diabetes.**, 57 : 1526-1535, 2008.

LUDMER, P. L.; SELWYN, A. P.; SHOOK, T. L. ; WAYNE, R. R.; MUDGE, G. H.; ALEXANDER, R. W.; GANZ, P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. **N. Engl. J. Med.**, 315 (17): 1046-1051, 1986.

MARTIN, A.; PEREZ-GIRON, J. V.; HERNANZ, R.; PALACIOS, R.; BRIONES, A. M.; FORTUÑO, A.; ZALBA, G.; SALAICES, M.; ALONSO, M. J. Peroxisome proliferator-activated receptor-g activation reduces cyclooxygenase-2 expression in vascular smooth

muscle cells from hypertensive rats by interfering with oxidative stress, **J. Hypertens.**, 30: 315-326, 2012.

MONCADA, S.; GRYGLEWSKI, R.; BUNTING, S.; VANE, J. R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, 21, 263(5579): 663-665, 1976.

MORGADO, M.; CAIRRAÑO, E.; SANTOS-SILVA, A. J.; VERDE, I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. **Cell. Mol. Life Sci.**, 69: 247-266, 2012.

MULVANY, M.J., NYBORG, N. An increased calcium sensitivity of mesenteric resistance vessels in young and adult spontaneously hypertensive rats. **Br J Pharmacol.**, 71(2):585-596, 1980.

NAGAO M, ASAI A, SUGIHARA H, OIKAWA S. Fat intake and the development of type 2 diabetes. **Endocr J.**, 62(7):561-572, 2015

NICOLAI, A.; LI, M.; KIM, D.H.; PETERSON, S.T.; VANELLA, L.; POSITANO, V. et al. Heme Oxygenase-1 Induction Remodels Adipose Tissue and Improves Insulin Sensitivity in Obesity-Induced Diabetic Rats, **Hypertension**, 53: 508-505, 2009.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn. Circ. J.**, 27: 282-293, 1963.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327: 524-526, 1987.

PECANHA, F. M.; WIGGERS, G. A.; BRIONES, A. M.; PEREZ-GIRON, J. V.; MIGUEL, M.; GARCIA-REDONDO, A. B.; VASSALLO, D. V.; ALONSO, M. J.; SALAICES, M. The role of cyclooxygenase (cox)-2 derived prostanoids on vasoconstrictor responses to phenylephrine is increased by exposure to low mercury concentration. **J. Physiol. Pharmacol.**, 61: 29-36, 2010.

PINNEY, S. E., *et al.*, Metabolic Programming, Epigenetics, and Gestational Diabetes Mellitus. **Curr. Diab. Rep.** 12:67–74, 2012. DOI 10.1007/s11892-011-0248-1

PLAGEMANN , A. Maternal diabetes and perinatal programming. **Early Hum dev.**,87(11):743-7, 2011.

PORTHA B. *et al.*, Early-Life Origins of Type 2 Diabetes: fetal programming of the beta-cell mass. **Exp Diabetes Res.** 2011: 01-16, 2011.

POTENZA, M. A.; GAGLIARDI, S.; BENEDICTIS, L.; ZIGRINO, A.; BENAGIANO, V.; QUON, M. J.; MONTAGNANI, M.; TIRAVANTI, E.; COLANTUONO, G.; FEDERICI, A.; LORUSSO, L. Treatment of spontaneously hypertensive rats with rosiglitazone ameliorates cardiovascular pathophysiology via antioxidant mechanisms in the vasculature. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, 297: 685–694, 2009.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. **Lancet**, 2 (8567): 1057-1058, 1987.

RABELO, L. A.; CÔRTEZ, S. F.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; LEMOS, V. S. Endothelium dysfunction in LDL receptor knockout mice: a role for H₂O₂. **Br. J. Pharmacol.**, 138: 1215-1220, 2003.

RAMOS-ALVES, F. E.; QUEIROZ, D. B.; SANTOS-ROCHA, J.; DUARTE, G. P.; XAVIER, F. E. Increased Cyclooxygenase-2-Derived Prostanoids Contributes to the Hyperreactivity to Noradrenaline in Mesenteric Resistance Arteries from Offspring of Diabetic Rats. **Plos One**, 7: 1-9, 2012.

REAVEN, G. M. Metabolic syndrome: Pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease. **Circulation**, 106: 286-288, 1988.

REMBOLD, C. M. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle, **Hypertension**, 20: 128-137, 1992.

RIBEIRO-FILHO, F. F.; MARIOSIA, L. S.; FERREIRA, S. R. G.; ZANELLA, M. T. Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, 50 (2), 230-237, 2006.

RIZZONI D., CASTELLANO, M., PORTERI, E., BETTONI, G., MUIESAN, M.L., AGABITI-ROSEI, E. Vascular structural and functional alterations before and after the development of hypertension in SHR. *Am J Hypertens.*, 7(2):193-200, 1994.

ROBERTS, O. L.; KAMISHIMA, T.; BARRETT-JOLLEY, R.; QUAYLE, J. M.; DART, C. Exchange protein activated by cAMP (Epac) induces vascular relaxation by activating Ca²⁺-sensitive K⁺ channels in rat mesenteric artery. **J. Physiol.**, 1-36, 2013.

ROMERO, M.; CANIFFI, C.; BOUCHET, G.; ELES GARAY, R.; LAUGHLIN M. M.; TOMAT, A.; ARRANZ, C.; COSTA, M. A. Sex differences in the beneficial cardiac effects of chronic treatment with atrial natriuretic peptide in spontaneously hypertensive rats. **Plos. One** 8 (8): 71992, 1-8, 2013.

SAIKI, R.; OKAZAKI, M.; IWAI, S.; KUMAI, T.; KOBAYASHI, S. and OGUCHI, K. Effects of Pioglitazone on Increases in Visceral Fat Accumulation and Oxidative Stress in Spontaneously Hypertensive Hyperlipidemic Rats Fed a High-Fat Diet and Sucrose Solution. **J. Pharmacol. Sci.**, 105: 157-167, 2007.

SIMMONS, R. A., Developmental origins of diabetes: the role of epigenetic mechanisms, **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.** 14:13–16, 2007.

TAGUCHI, K.; OKADA, A.; YASUI, T.; KOBAYASHI, T.; ANDO, R.; TOZAWA, K. and KOHRI, K. Pioglitazone, a peroxisome proliferator activated receptor agonist, decreases renal crystal deposition, oxidative stress and inflammation in hyperoxaluric rats. **J. Urol.**, 188: 1002-1011, 2012.

THORNBURG, K.L., *et al.*, The placenta is a programming agent for cardiovascular disease, **Placenta**, 31(Suppl): S54–S59, 2010. doi:10.1016/j.placenta.2010.01.002.

VANHOUTTE, P. M. Epithelium-derived relaxing factor(s) and bronchial reactivity. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 138 (6 Pt 2): 24-30, 1988.

VIARO, F., *et al.*, Expressão da oxido nítrico sintetases na fisiologia de doenças cardiovasculares, **Arq. Bras. Cardiol.**, 74(4), 365-379, 2000.

VRACHNIS, N., *et al.*, Impact of Maternal Diabetes on Epigenetic Modifications Leading to Diseases in the Offspring, **Exp.Diab. Res.**, 538474, 01-06, 2012. doi:10.1155/2012/538474

WALSH, M. P.; Vascular Smooth Muscle Myosin Light Chain Diphosphorylation: Mechanism, Function, and Pathological Implications. **IUBMB Life.**, 63: 987-1000, 2011.

WEISS, C. S.; HAGENMÜLLER, M.; PICHLER, M.; MÜNZ, S.; OCHS, M.; BUSS, S.J.; BEKEREDJIAN, R.; KATUS, H. A.; HARDT, S. E. Activation of PPARgamma by pioglitazone does not attenuate left ventricular hypertrophy following aortic banding in rats. **Naunyn. Schmied. Arch. Pharmacol.**, 381 (4): 285-295, 2010.

WILLET, W. C. Dietary fat plays a major role in obesity: no. **Obes. Rev.**, 3: 59-68, 2002.

YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; GOTO, K.; MASAKI, T. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. **J. Hypertens.**, 6 (4): 188-191, 1988.

ZHAO, S.; CHU, Y.; ZHANG, C. *et al.* Diet-induced central obesity and insulin resistance in rabbits. **J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.**, 92 (1): 105 - 111, 2008.

ZHAO, Z.; LUO, Z.; WANG, P.; SUN, J.; YU, H.; CAO, T.; NI, Y.; CHEN, J.; YAN, Z.; LIU, D.; ZHU, Z. Rosiglitazone Restores Endothelial Dysfunction in a Rat Model of Metabolic Syndrome through PPARγ-and PPARδ-Dependent Phosphorylation of Akt and Enos. **PPAR Research.**, 1-9, 2011.

ZHAO, D.; MCCULLY, B. H.; BROOKS, V. L. Rosiglitazone improves insulin sensitivity and baroreflex gain in rats with diet-induced obesity. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 343(1): 206-213, 2012.

http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2012/en/.

5. Anexo

ARTIGO: a ser submetido à revista “**Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**”

Dieta rica em lipídeos e baixa em carboidratos consumida durante o período perinatal exacerba a disfunção vascular mas não modifica os níveis pressóricos da prole adulta de ratos espontaneamente hipertensos

Marcelo Aurélio da Rocha¹; Fabiano Elias Xavier¹; Saad Lahlou²; Glória Pinto Duarte¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Recife, PE, Brasil.

² Universidade Federal do Ceará (UFC), Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Fortaleza, CE, Brasil

Correspondência para: Glória Pinto Duarte, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife – PE, Brasil, CEP: 50670-901, Fone PABX: (81) 2126.8530 / Fax: (81) 2126.8976, duarte.gloria@gmail.com

Palavras-chave: Ratos espontaneamente hipertensos; Estresse oxidativo; Pioglitazona; Dieta hiperlipídica.

Número de palavras:

Número de figuras e tabelas:

Tipo de manuscrito: artigo original

Resumo

Objetivos: Analisar os efeitos do consumo de uma dieta rica em lipídeos (DH) e baixa em carboidratos, durante o período gestacional e de lactação, sobre o perfil metabólico, a pressão arterial média e a reatividade vascular da prole de ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

Métodos: SHR fêmeas (280 - 300g), foram alimentadas com DH do primeiro dia de gestação até o desmame (DHGL), ou com DHGL e tratadas com pioglitazona (10 mg/kg/dia via oral) nos primeiros 15 dias de gestação (DHGL+pio). As matrizes controles receberam dieta padrão (Presence[®]). As proles foram divididas em 3 grupos de acordo com o padrão alimentar materno. Os níveis de glicose, triglicerídeos e colesterol plasmáticos foram determinados nas matrizes logo após o desmame, assim como nas proles aos 6 meses de idade. Níveis de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) foram determinados, assim como pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). A reatividade vascular foi avaliada em anéis de aorta isolados.

Resultados: A prole DHGL apresentou hipertrigliceridemia, aumento dos níveis de TBARS e redução de GSH quando comparada aos grupos controle. O tratamento com pioglitazona reduz esses níveis. O relaxamento vascular induzido por Ach encontra-se prejudicado, entretanto a resposta a fenilefrina é de magnitude similar ao grupo controle. A PAM e FC foram similares em todos grupos experimentais.

Conclusão: A DH induziu hiperglicemia materna e promoveu hipertrigliceridemia, aumento da gordura epididimal e do estresse oxidativo na prole adulta, o que pode ter contribuído para piora da disfunção vascular nestes animais. O tratamento das matrizes, durante os primeiros 15 dias de gestação, com a pioglitazona protegeu a prole dos efeitos da hiperglicemia. sem, contudo, afetar a resposta contrátil a doses crescentes ao agonista fenilefrina e o relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina

Palavras-chave: Dieta hiperlipídica; SHR; Estresse oxidativo; pioglitazona

Introdução

Um conjunto de evidências epidemiológicas e experimentais sugerem que alterações hormonais e metabólicas durante o período perinatal, pode estar associado com o desenvolvimento de componentes relacionados a síndrome metabólica (SM) na vida adulta, incluindo intolerância a glicose, resistência a insulina e hipertensão arterial¹. A SM aumenta o risco de fibrilação atrial, hipertrofia ventricular esquerda e disfunção diastólica^{2,3}. A obesidade é caracterizada por um excesso de ingesta em relação ao gasto energético, sendo aceito que a obesidade humana está relacionada ao estilo de vida e outros fatores dietéticos¹. Os mecanismos responsáveis pela programação perinatal que pode levar a obesidade e a modificação do metabolismo ainda não estão completamente esclarecidos. Entretanto, o crescimento alarmante da obesidade tem estimulado a busca de fármacos para seu tratamento. Nesse sentido, os agonistas do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ) são promissores, uma vez que como sensibilizadores da insulina além de reduzir a hiperglicemia podem reduzir a pressão arterial e o estresse oxidativo além promover outros benefícios cardiovasculares. Previamente, nossa equipe avaliou o impacto de uma dieta rica em lipídeos (DH, 58%) e com baixo carboidrato (25%), consumida durante apenas 6 semanas, sobre ratos normotensos jovens da linhagem Wistar, observando-se que a dieta foi capaz de induzir hiperglicemia, hipercolesterolemia, intolerância a insulina, obesidade e um discreto aumento da pressão arterial sistólica (PAS) sem alterações da pressão arterial diastólica (PAD) ou da frequência cardíaca (FC), sugerindo que a dieta seria capaz de iniciar o processo que poderia conduzir a SM⁴. No presente trabalho, nós testamos a hipótese de que a oferta da DH com baixo carboidrato para SHR desde o primeiro dia de gestação até o desmame, seria capaz de promover precocemente distúrbios metabólicos e cardiovasculares na prole, os quais poderiam conduzir a um quadro semelhante a SM.

Materiais e Métodos

Animais

Dezoito fêmeas nulíparas espontaneamente hipertensas (SHR), 280-300g, foram acasaladas aos 3 meses de idade e divididas aleatoriamente em 3 grupos: i) Controle - receberam ração padrão Labina; ii) dieta hiperlipídica receberam dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação (DHGL) e iii) dieta hiperlipídica + pioglitazona (DHGL+ Pio) – receberam DH nos

períodos de gestação e lactação, associando-se um tratamento com pioglitazona (10mg/kg/dia via oral) durante 15 dias. Após o nascimento, as proles foram reduzidas a 6 animais por matriz e subdivididas em grupos de acordo com o padrão alimentar da mãe. As matrizes que rejeitaram algum filhote foram descartadas do protocolo. Os animais foram criados e mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco, a temperatura constante (22 ± 2 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas, água e dieta *ad libitum*. O acompanhamento da ingestão alimentar foi realizado semanalmente.

Todos protocolos foram realizados de acordo com “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*”, publicado pelo “US National Institute of Health” (NIH publicações 85-23, revisado em 1996) e aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (Processo 23076.014562/2012-02).

Caracterização dietética

A dieta padrão (controle) foi obtida da Presence[®] (São Paulo, Brasil) e a dieta experimental foi produzida no Laboratório de Reatividade Cardiovascular – ICBS/UFAL e oferecida sob a forma de pellets. A composição dietética foi expressa como porcentagem (%) da energia metabolizável: 14% de lipídeos, 64% de carboidratos, 23% de proteínas para dieta controle; 57,8% de lipídeos, 25% de carboidratos, 17% de proteínas para DH. Os conteúdos minerais e vitamínicos da DH foram adicionados de acordo com as necessidades de animais de experimentação descritas nas normas do Instituto Americano de Nutrição (AIN 93-G) Growth Purified.

Dosagem de glicose, triglicérides, colesterol, teste de tolerância a glicose e a insulina

Aos 6 meses de idade, os animais foram colocados em jejum de 12 horas e amostras de sangue foram obtidas através do plexo retro-orbital, sob anestesia com pentobarbital sódico (50 mg/kg) via intraperitoneal (i.p.), centrifugadas a 4.000 r.p.m. por 15 minutos, determinando-se os níveis de glicose, triglicérides, colesterol total e colesterol HDL, utilizando-se kits enzimáticos específicos (Labtest Diagnóstica S.A., Minas Gerais, Brasil). Foi realizado ainda, o teste de tolerância à glicose (TTG) e teste de tolerância à insulina (TTI). Para isto, os animais em jejum de 12 h receberam glicose (2 g/kg) via i. p. Após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, a glicemia foi determinada com o auxílio de um glicosímetro (Accu-Chek[®],

Roche Diagnostics). Após 48 horas, os animais foram submetidos a novo jejum para o TTI. Depois de determinada a glicemia basal (T_0), foi injetada uma dose de 1,5 U/kg de insulina regular humana (Humulin R – 100U/ml, Lilly) via i.p. Em seguida, os níveis de glicose foram determinados temporalmente aos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. A razão da constante de decaimento da glicose (Kitt) foi calculada usando a fórmula $0,693/t_{1/2}$. O tempo de meia vida da glicose ($t_{1/2}$) foi calculado, usando a análise da queda do quadrado da concentração de glicose plasmática durante o decaimento da fase linear⁵. Além do TTI, a insulina foi dosada por ELISA (Rat/mouse insulin, Millipore Corporation, Billerica, 01821 MA, USA).

Avaliação do estresse oxidativo

Os níveis de peroxidação lipídica foram mensurados pela dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), tais como o malondialdeído (MDA), modificado por Ohkawa e cols., (1979)⁶. Para a quantificação dos níveis tissulares de MDA, 1g de cada fragmento de fígado foi colocado em 5 mL de tampão KCl-EDTA (1,15%) e homogeneizado por 30 segundos. Em seguida, 50µL foi transferido para um tubo contendo 950µL da solução de 0,8% de TBA, 8,1% de SDS, 20% de ácido acético e água, incubando-se em banho maria, à 95 °C por 60 minutos. Posteriormente, os tubos foram imediatamente resfriados em gelo para bloquear a reação. Foram adicionados 0,25 mL de água destilada e 1,25mL de n-butanol, homogeneizando-se por mais 30 segundos. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 4.000 r.p.m. e a leitura da fase orgânica foi realizada em espectrofotômetro na absorbância de 532nm. Os resultados foram expressos em nmol MDA/mg de proteína.

A atividade da enzima antioxidante GSH foi mensurada de acordo com o método modificado por SEDLAK & LINDSAY, (1968)⁷. Após a eutanásia dos animais, o fígado foi homogeneizado em tampão KCl-EDTA resfriado (1,15%; 1:5; p/v). Em seguida, 400 µL foram transferidos para um tubo contendo 400 µL de KCl-EDTA e 400 µL de TCA a 10%. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 2400 r.p.m. a 4°C. Foi coletado 100 µL do sobrenadante e transferido para um tubo contendo 400 µL de tampão TRIS-EDTA (500mM), 400 µL de água destilada e 100 µL de DTNB (4mM em metanol). Após 5 minutos de reação, a leitura foi realizada em espectrofotômetro na absorbância de 412nm. Os resultados foram expressos em nmol GSH/mg de proteína.

Avaliação da pressão arterial e da frequência cardíaca

Os ratos foram cateterizados segundo Lahlou & Duarte (1998)⁸. Após 24 horas de repouso cirúrgico, o catéter arterial foi conectado a um transdutor e o sinal de pressão registrado em um sistema de aquisição de dados (modelo Power Lab 4/35, ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Austrália). 30 minutos após adaptação ao ambiente, foi mensurado a pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC). A pressão arterial média (PAM) foi calculada através da fórmula: $PAD + [(PAS - PAD)/3]$ e a frequência cardíaca (FC) foi obtida por derivação do sinal de PA.

Peso corporal, peso dos órgãos

Ao fim de 6 meses, os animais foram pesados, anestesiados e retirados o coração, rins, fígado para determinação do peso úmido. Os coxins adiposos peri epididimal e retroperitoneal foram pesados para calcular o índice de adiposidade (peso dos coxins/peso corporal) (Tabela 1).

Preparação dos anéis de aorta torácica

Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) e exsangüinados. A aorta torácica foi removida, dividida em segmentos de 3mm de comprimento, imersos em solução de Krebs Henseleit modificado, cuja composição (em mM): NaCl 118; KCl 4,7; NaHCO₃ 25; CaCl₂.2H₂O 2,5; glicose 11; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄.7H₂O 1,2 e EDTA 0,01; gaseificada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Para obtenção do registro de tensão isométrica, cada anel vascular foi colocado em um sistema para órgãos isolados. Dois fios de metal foram inseridos no lúmen das artérias. Um fio metálico foi fixado à parede do banho e o outro conectado verticalmente ao transdutor de tensão isométrica (Letica Scientific Instruments, TRI-210) conectado a um sistema de aquisição de dados (Powerlab, AD Instruments). Os anéis de aorta torácica foram submetidos a uma tensão de repouso de 1 g, a qual foi reajustada a cada 15 minutos.

Protocolo experimental

Após estabilização de 45 minutos os anéis foram contraídos com solução de KCl 75mM, onde foi observado a máxima contração. A integridade endotelial foi avaliada pelo relaxamento induzido pela acetilcolina (10 mM) nos anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (FEN, 10 mM), onde a contração correspondeu a 50-70% da contração ao KCl. Quando o relaxamento à acetilcolina foi maior do que 30%, foi considerado como demonstrativo da integridade funcional do endotélio. Após 60 min, realizaram-se as curvas de concentração-resposta cumulativa para acetilcolina (Ach, 10^{-10} M - 10^{-5} M). A preparação foi lavada e ficou em repouso durante 60 minutos realizando-se em seguida a curva concentração-resposta cumulativa para FEN (10^{-9} M - 10^{-4} M). A preparação foi lavada até retornar aos valores basais, foi pré-contraída com FEN (10 mM). Ao atingir o platô, foi realizada uma curva concentração-resposta para nitroprussiato de sódio (NPS, 10^{-10} M – 10^{-4} M).

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m), n representa o número de animais utilizados em cada experimento. As curvas concentração resposta foram analisadas por análise de variância (ANOVA) a duas vias, seguida pelo pós- teste de Bonferroni. Dados foram analisados pelo teste t de Student não pareado ou ANOVA a uma via seguida do teste de Tukey (comparações múltiplas) quando apropriado. Valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Resultados

Características das matrizes

A ingestão alimentar (em gramas /dia) das matrizes submetidas à DHGL foi significativamente ($p < 0,01$) reduzida quando comparada ao controle. Entretanto, o grupo DHGL+ pio teve a ingestão similar ao controle (Figura 1). O consumo energético médio (KJ) das matrizes controle, DHGL e DHGL+ pio foram semelhantes ($p > 0,05$) (Figura 1). Porém, o consumo hídrico do grupo DHGL foi menor ($p < 0,05$) do que o grupo controle (valores não mostrados).

Os níveis de glicose das fêmeas DHGL foram elevados ($127,4 \pm 4,2$ vs. $93,7 \pm 2,2$ mg/dL controle vs. $95,9 \pm 7,1$ DHGL+pio ; $p < 0,001$) quando comparado aos demais grupos. Triglicerídeos, colesterol total e colesterol HDL foram similares.

Após 12 h de jejum as curvas de decaimento dos níveis plasmáticos de glicose foram semelhantes (Figura 2A, ANOVA a duas vias). O mesmo comportamento foi observado no teste de tolerância à insulina (Figura 2B, ANOVA a duas vias).

Características da prole

A massa corporal da prole de todos os grupos no desmame foram similares. Entretanto, a partir da 6^a semana, a massa corporal da prole DHGL foi maior ($p < 0,001$) do que a prole controle. A partir da 9^a semana, a massa corporal da prole DHGL+ pio foi menor ($p < 0,001$) do que os outros grupos (Figura 4).

Aos 6 meses de idade, a prole DHGL apresentou níveis de triglicérides maior que o controle ($46,4 \pm 4,7$ vs. $16,4 \pm 2,3$ mg/dL, respectivamente). Esses níveis foram reduzidos na prole DHGL+pio ($22,6 \pm 2,0$ mg/dL). Os níveis plasmáticos de glicose e colesterol total foram similares nos três grupos. A prole DHGL apresentou níveis de colesterol HDL ($26,7 \pm 1,6$ mg/dL) similar ao controle ($31,6 \pm 2,1$ mg/dL). No teste de tolerância à glicose, a resposta máxima para todos os grupos foi aos 15 minutos. Entretanto aos 15 e 30 minutos, os animais DHGL apresentaram níveis glicêmicos mais elevados ($p < 0,01$) do que o grupo controle e DHGL+ pio. No TTI não houve diferença entre os três grupos (Figura 3A e 3B). Os níveis plasmáticos de insulina foram similares nos 3 grupos (figura não mostrada).

Quantificação de TBARs e GSH teciduais

A prole DHGL adulta apresentou níveis teciduais de TBARs maiores ($p < 0,05$) do que a controle. O tratamento com pio reduziu esses níveis. Ainda, os níveis teciduais de GSH da prole DHGL foram reduzidos ($p < 0,05$) quando comparados ao controle (Figura 5)

Pressão arterial e frequência arterial das proles adultas de SHRs não anestesiados

Aos seis meses de idade, os valores de PAS, PAD e FC foram similares em todos os grupos (Figura 6).

Reatividade Vascular

Aos seis meses de idade as proles SHRs controle, DHGL e DHGL+pio não apresentaram diferenças nas contrações em resposta ao α -agonista fenilefrina (figura 7) e nem ao doador de ON, nitroprussiato de sódio (figura 9). No entanto, houve prejuízo no relaxamento para acetilcolina no grupo DHGL quando comparados ao grupo controle, que não foi melhorado no grupo tratado com pio (figura 8).

Discussão

Neste trabalho nós mostramos que uma dieta rica em lipídeos (57,8%) mas baixa em carboidratos, é capaz de promover uma hiperglicemia moderada nas matrizes que consumiram durante o período de gestação e lactação. Foi observado que a ingestão energética dos dois tipos de dieta (padrão e DH) foi similar em todas as proles no período da gestação, mas no período de lactação - fase crítica do desenvolvimento do neonato - houve um aumento significativo desde a primeira semana, na ingestão energética das matrizes que consumiram DH, o que poderia explicar algumas modificações metabólicas encontradas na prole como a hipertrigliceridemia e o aumento do estresse oxidativo. O acúmulo de metabólitos de lipídeos nos tecidos pode contribuir para a redução da sensibilidade à insulina, entretanto neste trabalho não houve diferenças nos níveis de insulina entre as proles dos vários grupos experimentais, o que não significa que a sinalização para insulina não esteja prejudicada, uma vez que se trata de ratos SHR. A pioglitazona é uma tiazolidinadiona que tem alta afinidade pelo PPAR γ que tem uma forte relação com doenças metabólicas como o diabetes, a obesidade e exerce um papel importante na fisiopatogenia vascular⁹. Este fármaco é muito utilizado para reduzir a hiperglicemia no diabetes tipo 2, sendo reportado por baixar a pressão arterial e promover outros benefícios cardiovasculares. As tiazolidinadionas são também conhecidas por atuar sobre a óxido nítrico síntase induzível (iNOS) e sobre as ciclooxigenases, inibindo o processo inflamatório¹⁰. O aumento nos níveis de TBARS tecidual encontrado em ratos da prole DHGL pode estar diretamente ligado ao aumento do estresse oxidativo pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), NADPH oxidase e citocinas pró-inflamatórias que contribuiriam diretamente para o agravamento da disfunção endotelial encontrada em ratos da cepa SHR^{11,12}. Nossos achados mostram que a pioglitazona foi capaz de proteger as matrizes e a prole expostas a DH, ocorrendo redução do estresse oxidativo. Resultados semelhantes foram encontrados em ratos diabéticos¹³.

Interessantemente, os níveis de colesterol são baixos nesta linhagem e a DH não foi capaz de aumentá-los, aparentemente a linhagem SHR apresenta resistência para o desenvolvimento de uma hipercolesterolemia, o que é corroborado por outros autores¹⁴. O consumo da DH pelas matrizes não estabeleceu uma franca obesidade, embora sejam encontrados valores de gordura epididimal maiores que na prole cujas matrizes consumiram dieta padrão isocalórica. É possível que no envelhecimento desses animais, o ganho de massa corporal e de gordura nos coxins epididímais tendam a refletir um traço de obesidade mais evidente. As consequências da exposição a elevados níveis de lipídeos sobre a função endotelial são bastante documentadas^{15,16}, mas em nosso trabalho, foi observado que houve prejuízo apenas do relaxamento dependente do endotélio, enquanto que ao utilizar o doador de NO foi mostrado que não houve diferença entre as respostas das artérias dos três grupos. Dessa forma, pode-se inferir que a dieta não foi capaz de modificar a resposta vasodilatadora ao NPS, mas pode-se dizer que a dieta pode promover efeitos deletérios sobre o relaxamento vascular, os quais podem estar associados a uma menor disponibilidade de fatores relaxantes, como o ON, ou ser associada a um desequilíbrio existente entre fatores contráteis, como os derivados do metabolismo do ácido araquidônico e o sistema renina angiotensina. Estudos anteriores já foram capazes de demonstrar diminuição no relaxamento endotélio-dependente em ratas prenhes submetidas à DH¹⁷ e na prole diabética^{18,19} que contribuem para o estabelecimento de um quadro de hipertensão arterial. No nosso modelo, a PAS que já é cerca de 200 mmHg, aparentemente não foi agravada ou já se encontra no platô. Aparentemente, a exposição à DH não foi capaz de desencadear mais precocemente uma insuficiência cardíaca. Entretanto, não deve ser perdido de vista que a maioria das DH também tem elevados níveis de carboidratos, o que possivelmente possa explicar o aumento de PA em ratos normotensos⁴. Em ratos Wistar anestesiados, foi mostrado que a DH com elevados teores de carboidrato reduz os níveis pressóricos e a sensibilidade dos barorreceptores²⁰. Boss *et al* (2013) observaram que SHR alimentados com uma dieta com teor similar ao que usamos em lipídeos e com 2,2% em carboidratos, reduziu a PA e a hipertrofia cardíaca²¹. Outro estudo com SHR alimentados com uma DH contendo 40% de lipídios durante 9 semanas, apresentaram diminuição do relaxamento vascular dependente do endotélio, redução da PAM e prejuízo na resposta barorreflexa²². Os resultados obtidos no presente estudo, necessitam de aprofundamento em algumas questões que se iniciam no modelo utilizado, tão complexo quanto a própria etiologia da hipertensão humana. Outro grande questionamento é se os níveis de carboidratos utilizados

na nossa dieta são suficientes para desmascarar efeitos que são vistos no consumo de outras dietas ricas em carboidratos, encontradas na literatura. Um aprofundamento sobre o envolvimento das ciclooxigenases e da insulina na resposta vascular do modelo utilizado é necessário.

Agradecimentos: Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE). Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Declaração: os autores declaram não haver conflitos de interesse científico neste estudo.

Referências

1. Aerts, L.; Van Assche, F. A. Intra-uterine transmission of disease. **Placenta** 24: 905-911, 2003.
2. Azevedo, A.; Bettencourt, P.; Almeida, P. B. et al. Increasing number of components of the metabolic syndrome and cardiac structural and functional abnormalities-cross-sectional study of the general population. **BMC Cardiovasc Disord.** 7 (17): 1-9, 2007.
3. De las Fuentes, L.; Brown, A. L.; Mathews, S. J. et al. Metabolic syndrome is associated with abnormal left ventricular diastolic function independent of left ventricular mass. **Eur Heart J.** 28(5): 553-559, 2007.
4. Silva, O A. Estudo dos efeitos de uma nova tiazolidinadiona sobre disfunção metabólica causada por dieta hiperlipídica em ratos Wistar. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 72p, 2012.
5. Bonora, E.; Moghetti, P.; Zancanaro, C.; Cigolini, M.; Querena, M.; Cacciatori, V. et al. Estimates of *in vivo* insulin action in man: Comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J Clin Endocrinol Metab**, 68: 374-378, 1989.
6. Ohkawa, H.; Ohishi, I.; Yagi, Ê. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, **Anal. Biochem.**, 95: 351-358, 1979.
7. Sedlak, J.; Lindsay, R.H. Estimation of total, protein-bound, nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.**, 25(1): 192-205, 1968.
8. Lahlou, S. & Duarte, G., Bromocriptina-induced tachycardia in conscious rats: blunted response following isoproterenol pretreatment for 5 days, **Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam.** 48(3): 165-74, 1998.
9. Hwan, J.; Kleinhenz, D. J.; Lassegue, B. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands regulate endothelial membrane superoxide production. **Am J Physiol Cell Physiol.** 288:C899–C905, 2005.
10. Kadiiska, M. B.; Bonini, M. G.; Ruggiero, C. et al. Thiazolidinedione Treatment Decreases Oxidative Stress in Spontaneously Hypertensive Heart Failure Rats Through

- 339 Attenuation of Inducible Nitric Oxide Synthase–Mediated Lipid Radical Formation .
 340 **Diabetes** 61:586–596, 2012
- 341 11. KOBAYASI, R.; AKAMINE, E.H.; DAVEL, A.P., et al., Oxidative stress and
 342 inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity
 343 in mice, **J. Hypertens**, 28:2111–2119, 2010.
- 344 12. Wu, L.; Ashraf, M. H. N.; Facci, M. et al. Dietary approach to attenuate oxidative stress,
 345 hypertension, and inflammation in the cardiovascular system, **PNAS**, 101: 7094-7099, 2004.
- 346 13. Samaghardian, S.; Borji, A.; Delkhosh, M. B., et al. Safranal Treatment Improves
 347 Hyperglycemia, Hyperlipidemia and Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic
 348 Rats, **J. Pharm Pharm Sci**, vol. 16(2), 352 - 362, 2013
- 349 14. Lindberg, A. R.; Schuschke, D. A.; Miller, F. N. Spontaneously Hypertensive Rats Are
 350 Resistant to the Development of Hypercholesterolemia, **Am. J. Hypertension**, 8:1001-
 351 1008, 1995.
- 352 15. Jenkins, T.A.; Nguyen, J. C.; Hart, J. L.; Decreased vascular H₂S production is associated
 353 with vascular oxidative stress in rats fed a high-fat western diet, **Naunyn Schmiedebergs**
 354 **Arch Pharmacol** (2016)389(7):783–90.10.1007/s00210-016-1244-4.
- 355 16. Roberts, C. K.; Barnard, R.J.; Sindhu, R.K.; Jurczak, M.; Ehdaie, A.; Vaziri, N.D.; A
 356 high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant
 357 imbalance and depresses NOS protein expression.; **J Appl Physiol** (1985) (2005) 98(1):203–
 358 10.10.1152/jappphysiol.00463.2004.
- 359 17. Gerber, R. T.; Holemans, K.; O'bren-cooker, I.; et al., Cholesterol-independent
 360 endothelial dysfunction in virgin and pregnant rats fed and diet high in saturad fat. **J.**
 361 **Physiol.**, 1 (517): 607-616, 1999.
- 362 18. Ramos-Alves, F. E.; de Queiroz, D. B.; Santos-Rocha, J.; Duarte, G. P.; Xavier, F. E.
 363 Increased cyclooxygenase-2-derived prostanoids contributes to the hyperreactivity to
 364 noradrenaline in mesenteric resistance arteries from offspring of diabetic rats. **PLoS One**.
 365 7(11):e50593, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0050593.
- 366 19. Ramos-Alves, F. E.; de Queiroz, D. B.; Santos-Rocha, J.; Duarte, G. P.; Xavier, F. E.
 367 Effect of age and COX-2-derived prostanoids on the progression of adult vascular dysfunction
 368 in the offspring of diabetic rats. **Br J Pharmacol**. Aug; 166(7):2198-208, 2012b. doi:
 369 10.1111/j.1476-5381.2012.01945.x.

20. Ai, J.; Liang, F.; Zhou, H.; Zhao, J.; Wang, N.; Zhu, S.; Yang, B. Mechanism of impaired baroreflex sensitivity in Wistar rats fed a high-fat and -carbohydrate diet. **Br. J. Nutr.**, 2010.
21. Bossi, J. D.; Lin, H.Y.; Sloan, C., *et al.*, A low-carbohydrate/high-fat diet reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats without deleterious changes in insulin resistance, **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 304: H1733–H1742, 2013.
22. Kim, B. H. *et al.*, The Effects of High Dietary Lard on Hypertension Development in Spontaneously Hypertensive Rats, **J Med Food.**, 13 (5) 2010, 1263–1272, 2010.

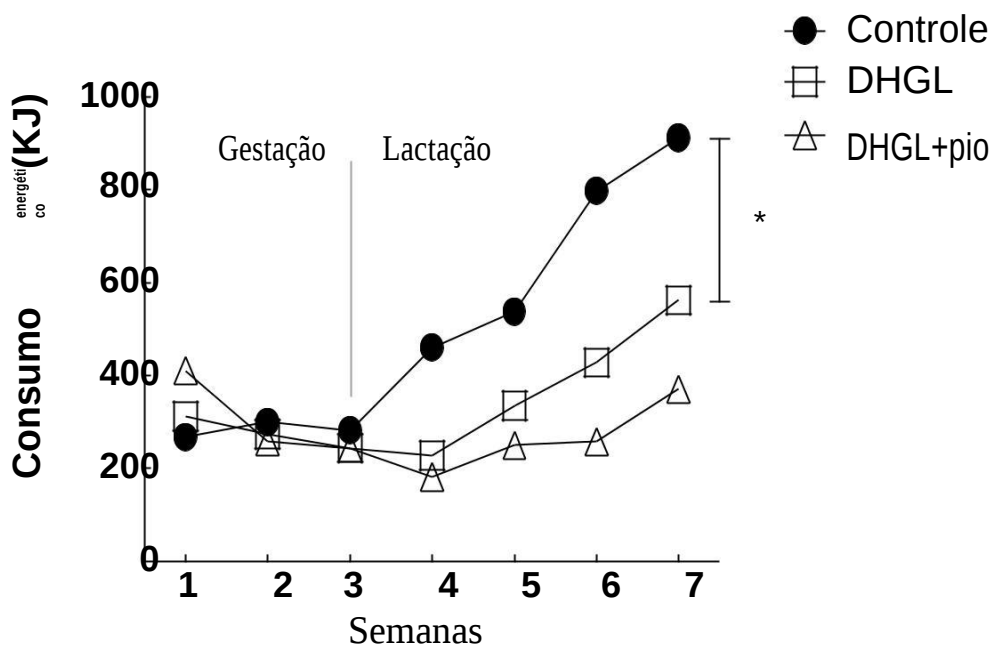
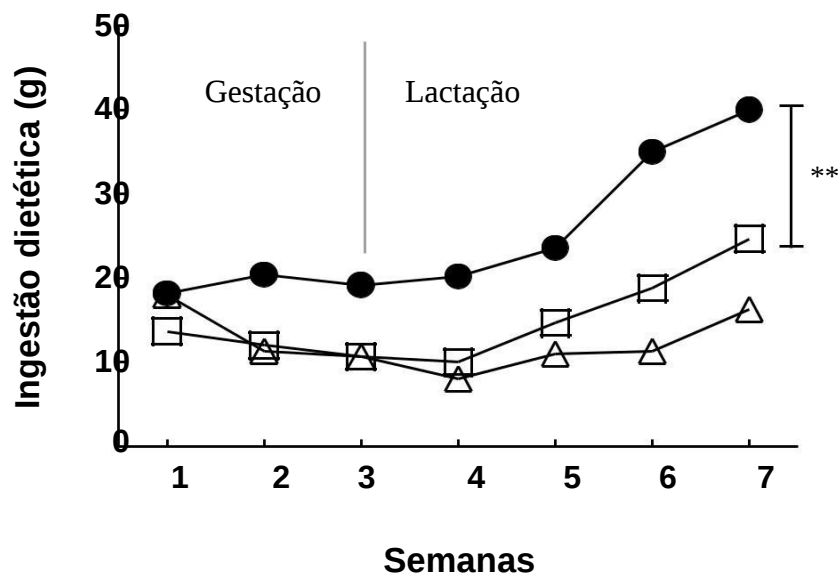


Figura 1 - Média da ingestão dietética (painel superior) e consumo energético (painel inferior) das matrizes que receberam dieta controle (C), dieta hiperlipídica (DHGL) e dieta hiperlipídica + pioglitazona por via oral no período de gestação e lactação (DHGL+pio). Os resultados são apresentados como média $\pm$ e.p.m.; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (ANOVA duas vias); $n = 6$ ratos por grupo.

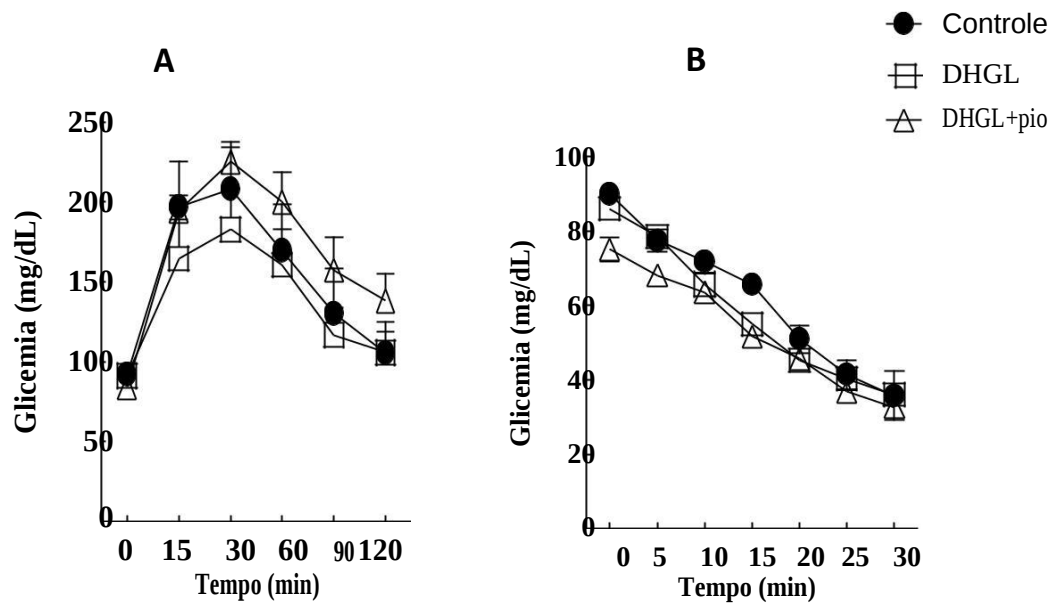


Figura 2: Teste de tolerância à glicose (painel A) e teste de tolerância a insulina (painel B) das matrizes após desmame. Os resultados são apresentados como média $\pm$ e.p.m. $^{\dagger\dagger}p < 0,001$ (DHGL versus Controle); $^*p < 0,05$ (DHGL+pio vs.DHGL) ANOVA (duas vias); $n = 6$ animais por grupo.

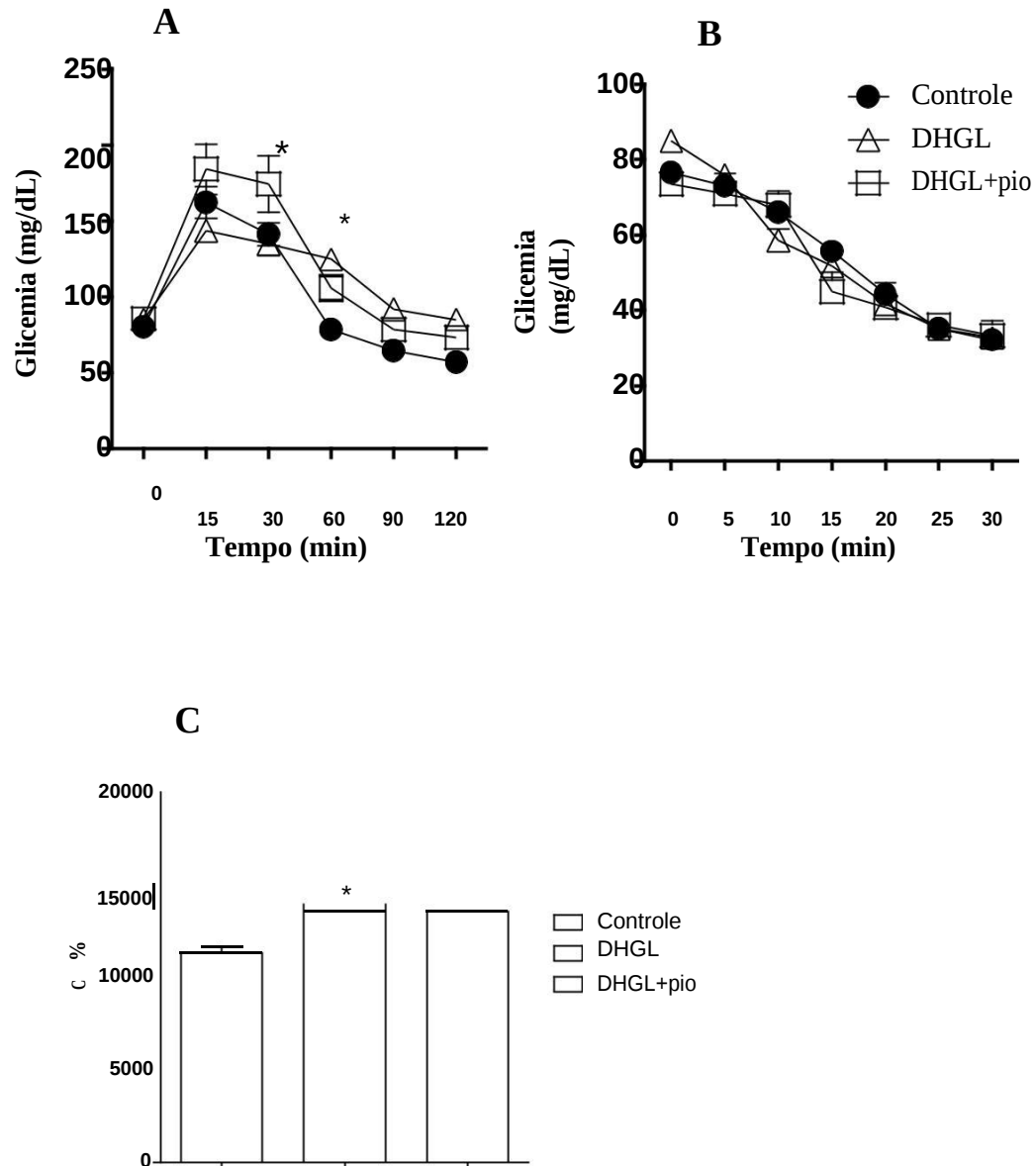


Figura 3: Teste de tolerância à glicose (painel A) e teste de tolerância a insulina (painel B) e área abaixo da curva do TGG (painel C) da prole SHR com 6 meses de idade . Os resultados são apresentados como média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$ (DHGL versus Controle); * $p < 0,05$ (DHGL+pio vs. controle) ANOVA (duas vias); $n = 6$ animais por grupo.

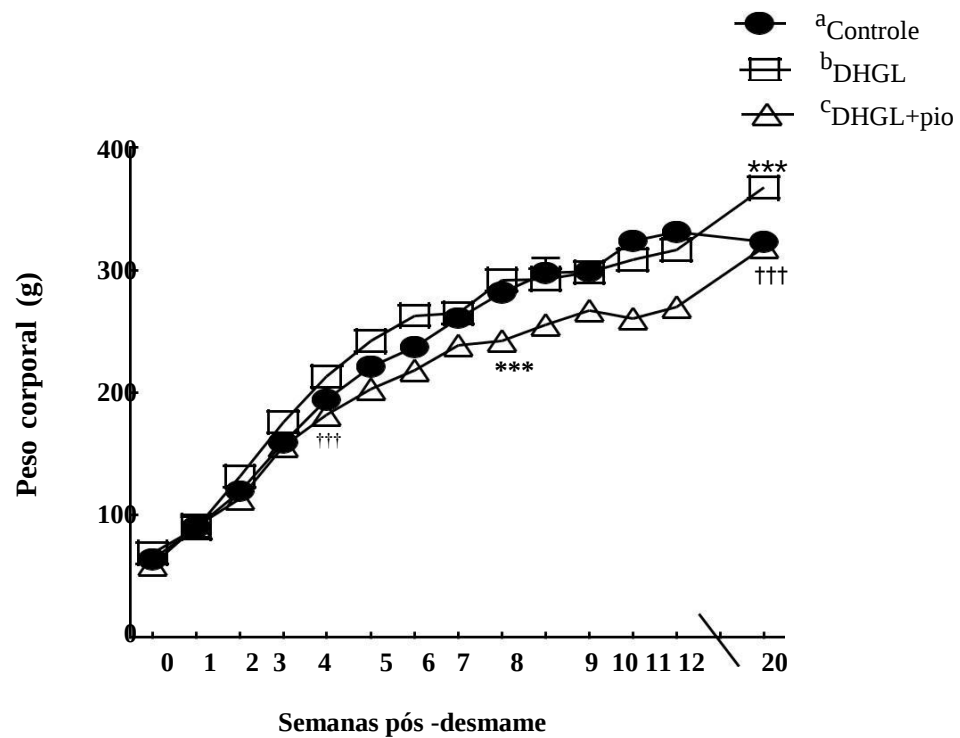


Figura 4: Curso temporal pós-desmame das proles de ratos espontaneamente hipertensos expostos, durante a fase de gestação e lactação, a dieta padrão (Controle), dieta hiperlipídica (DHGL) e dieta hiperlipídica+pioglitazona (DHGL + pio). Os resultados são apresentados como medi $\pm$ EPM. *** $p < 0,001$ a-c; ††† $p < 0,001$ b-c. ANOVA (duas vias): $n = 6$ animais por grupo.

Parâmetros			
	Controle	DHGL	DHGL+ pio
Peso (g)	323,0 ± 4,3	363,0 ± 7,7 ^{**}	319,0 ± 6,4 ^{††}
Coração úmido (mg)	1385,0 ± 19,0	1431,0 ± 45,0	1296,0 ± 83,0
Coração/peso corporal (mg/g)	429,0 ± 3,2	396,0 ± 19,0	406,0 ± 18,0
Rim direito (mg)	1300,0 ± 22,0	1400,0 ± 30,0 [*]	1273,0 ± 55,0 [†]
Rim direito/peso corporal (mg/g)	411,0 ± 6,9	398,0 ± 15,0	400,0 ± 21,0
Rim esquerdo (mg)	1384,0 ± 13,0	1487,0 ± 42,0	1307,0 ± 58,0 [†]
Rim esquerdo/peso corporal (mg/g)	429,0 ± 6,1	412,0 ± 19,0	410,0 ± 12,0
Gordura retroperitoneal	653,0 ± 57,0	728,0 ± 42,0	649,0 ± 93,0
Gordura retroperitoneal / peso corporal (mg/g)	2,0 ± 0,2	2,3 ± 0,2	2,0 ± 0,3
Gordura epididimal (mg)	773,0 ± 56,0	1099,0 ± 37,0 ^{**}	825,0 ± 96,0 [†]
Gordura epididimal/peso corporal (mg/g)	7,5 ± 0,5	11,0 ± 0,5 ^{**}	8,2 ± 1,0
Fígado (g)	14,0 ± 0,5	14,0 ± 0,2	14,0 ± 0,6

441

442 **Tabela 1:** Parâmetros anatômicos das proles expostas a dieta padrão (Controle), dieta
443 hiperlipídica durante a gestação e lactação (DHGL) e dieta hiperlipídica + pioglitazona

(DHGL+pio) aos 6 meses de idade. Os resultados são apresentados como média ± e.p.m. * p < 0,05 ;
^{**} p < 0,01 ; ^{***} p < 0,001; [†] p < 0,05; ^{††} p < 0,01

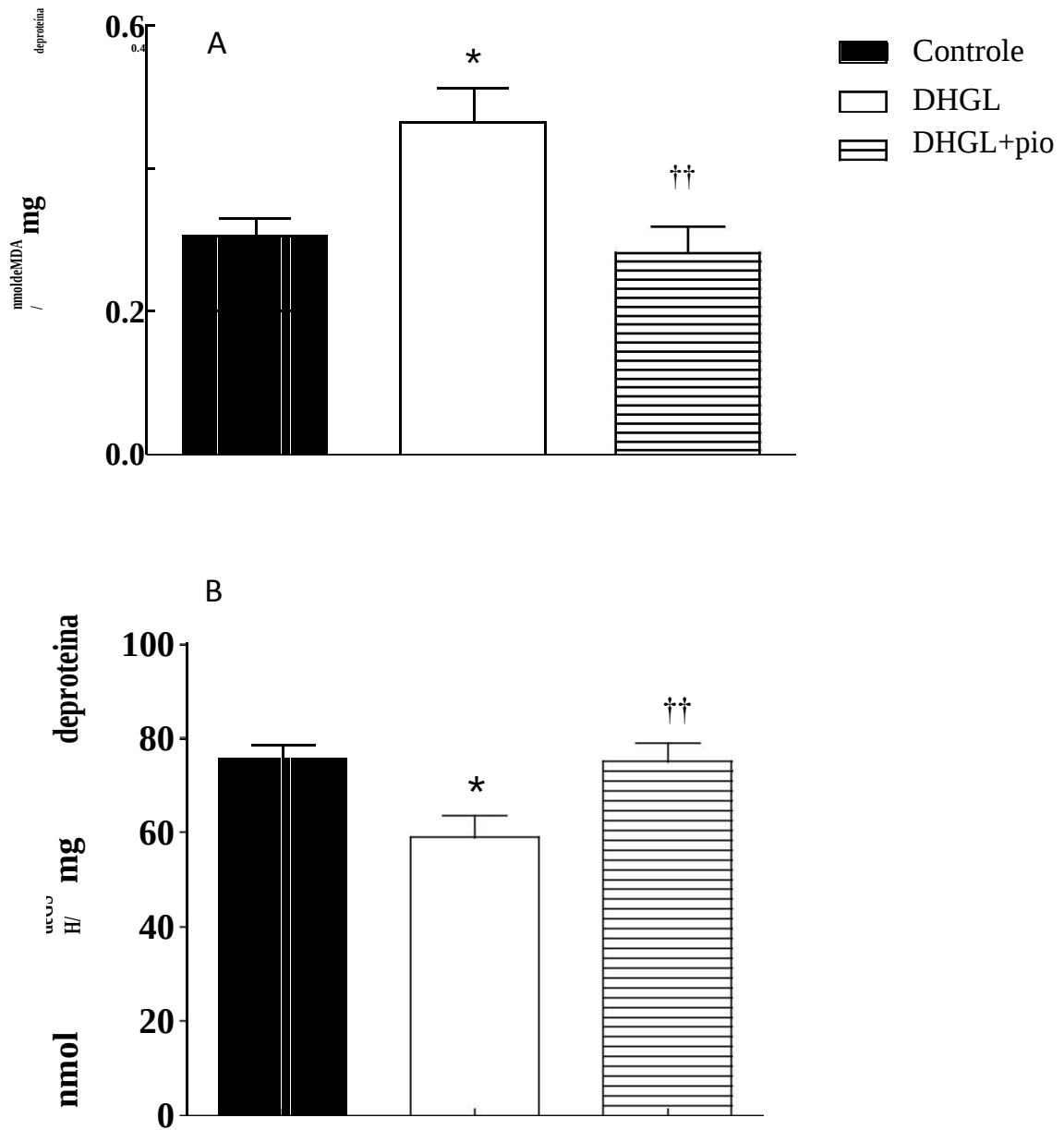


Figura 5: Níveis teciduais de TBARS (painel A) e GSH (painel B) das proles espontaneamente hipertensas, aos 6 meses de idade, expostas durante a gestação e lactação a dieta padrão (Controle), dieta hiperlipídica (DHGL) e dieta hiperlipídica + pioglitazona (DHGL + pio). Os resultados são expressos como média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$ Controle versus DHGL; †† $p < 0,01$ DHGL versus DHGL+pio (ANOVA a uma via); $n = 8$ animais por grupo.

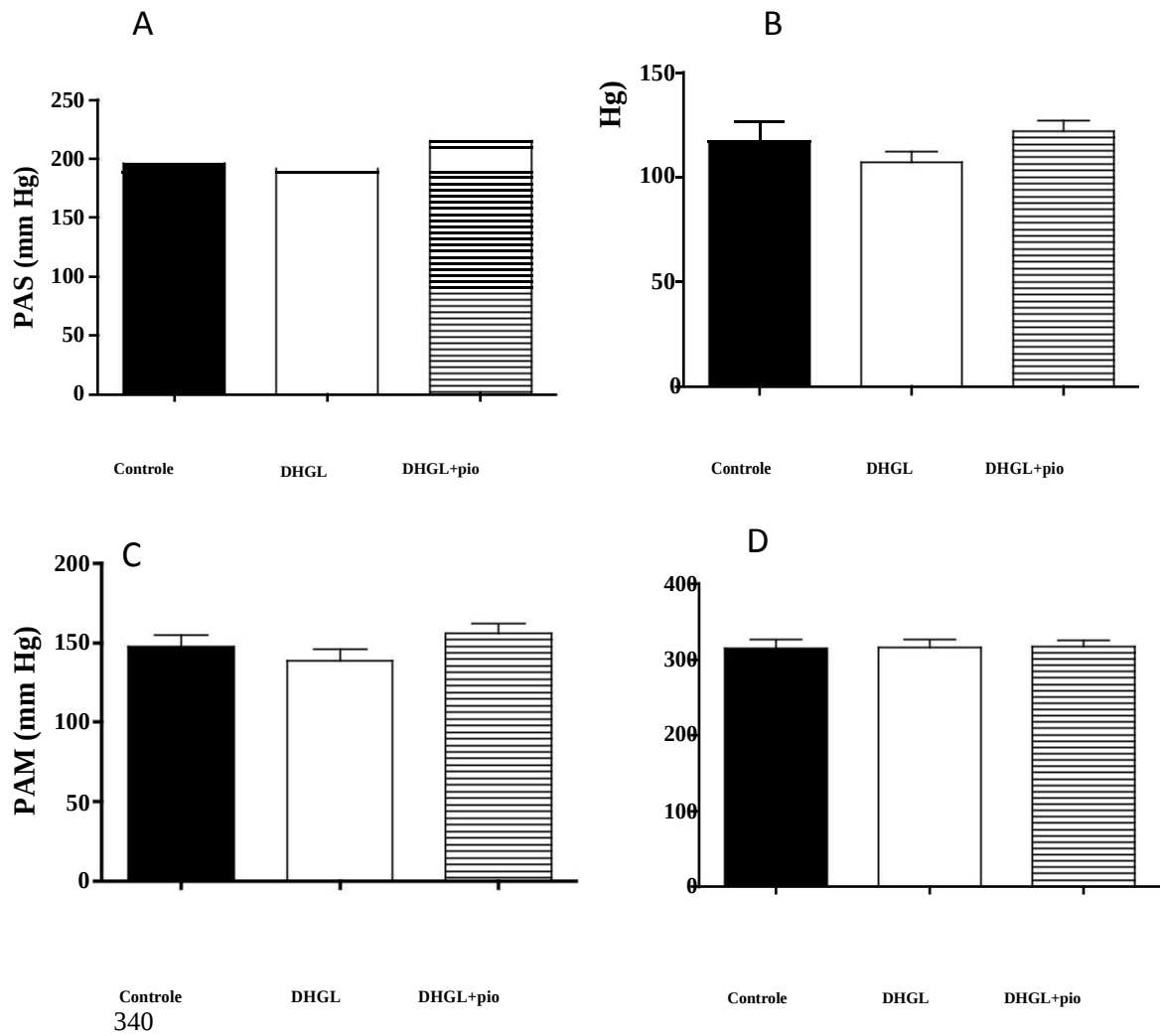


Figura 6: Comparação dos níveis de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM) da prole adulta (6 meses) de ratos espontaneamente hipertensos, não anestesiados, expostos durante a gestação e lactação a dieta padrão (Controle) dieta hiperlipídica (DHGL) e dieta hiperlipidica + pioglitazona (DHGL + pio). Os resultados são apresentados como média± e.p.m.; n = 6 ratos por grupo.

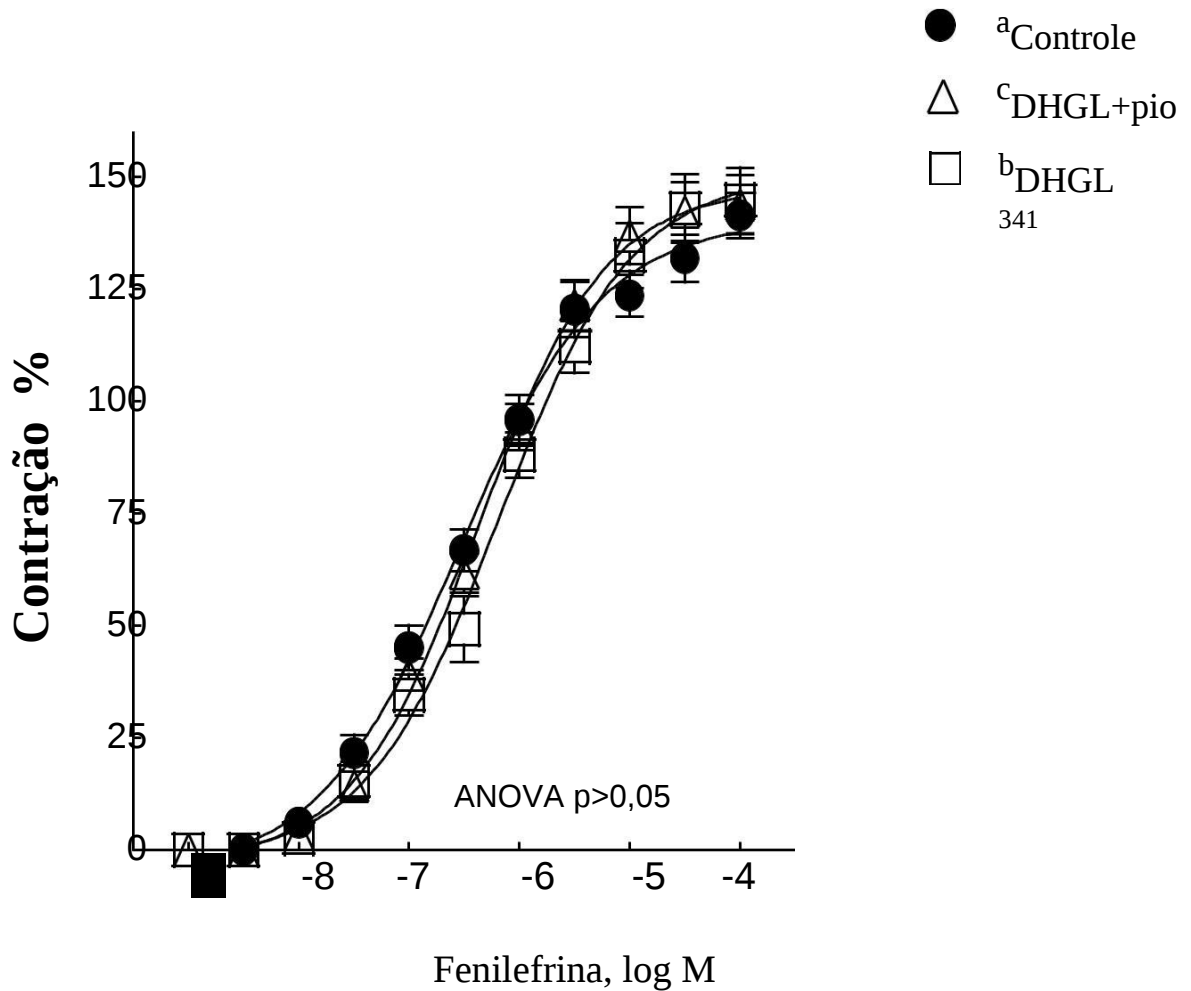


Figura 7: Resposta contrátil a doses crescentes de fenilefrina em anéis de aorta torácica com endotélio oriundos de proles adultas expostas a dieta padrão (Controle), dieta hiperlipídica (DHGL) e dieta hiperlipídica + pioglitazona (DHGL+ pio) durante a gestação e lactação. Os resultados são apresentados como porcentagem da contração ao KCl. Os dados foram expressos como média±e.p.m. * $p>0,05$. (ANOVA a duas vias), $n= 8$ animais por experimento.

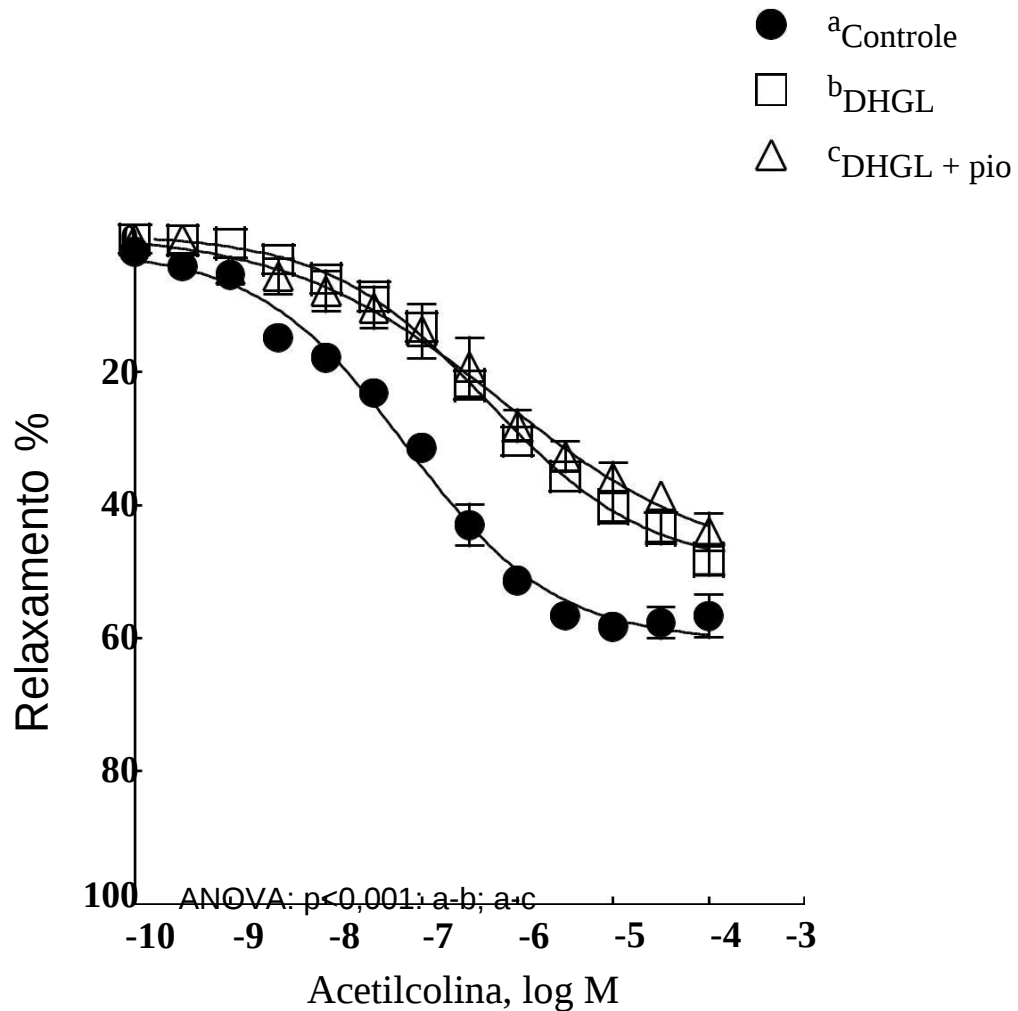


Figura 8: Resposta vaso relaxante a doses crescentes de acetilcolina em anéis de aorta torácica com endotélio, oriundos de proles adultas expostas a dieta padrão (Controle), dieta hiperlipídica (DHGL) e dieta hiperlipídica + pioglitazona (DHGL+ pio) durante a gestação e lactação. Os resultados são apresentados como média $\pm$ e.p.m. ** $p < 0,01$ Controle versus DHGL; ** $p < 0,01$ Controle versus DHGL+pio (ANOVA a duas vias); $n = 8$ animais por experimento.

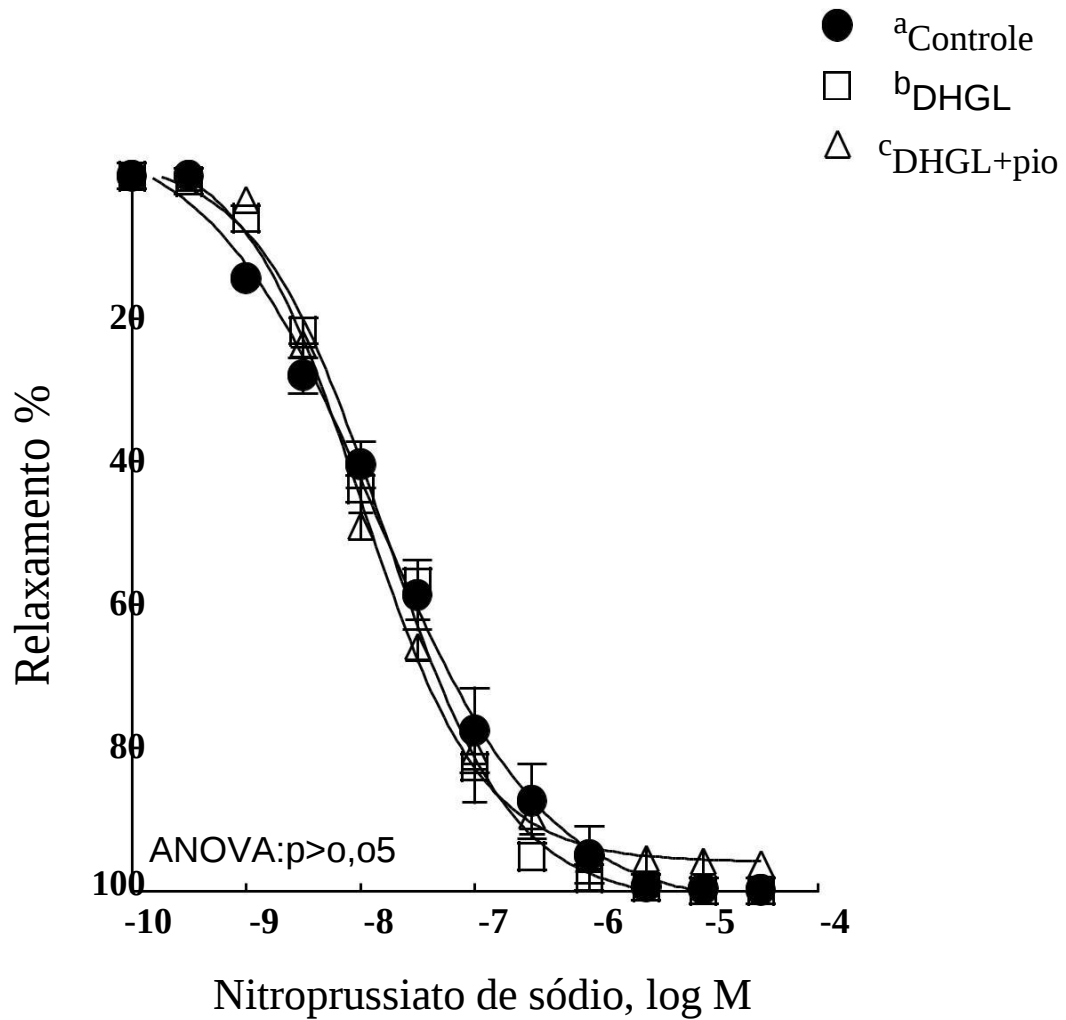


Figura 9: Relaxamento dose-dependente ao nitroprussiato de sódio, em anéis de aorta torácica com endotélio, oriundos de proles adultas expostas a dieta padrão (Controle), dieta hiperlipídica (DHGL) e dieta hiperlipídica + pioglitazona (DHGL+ pio) durante a gestação e lactação. Os resultados são apresentados como média $\pm$ e.p.m. $p > 0,05$ (ANOVA aduas vias); $n = 8$ animais por experimento.