



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Tiago Batschauer

Alterações cardiovasculares, comportamentais, metabólicas e endócrinas induzidas pelo estresse crônico em ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica

Florianópolis

2019

Tiago Batschauer

Alterações cardiovasculares, comportamentais, metabólicas e endócrinas induzidas pelo estresse crônico em ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Fleury Fina Speretta
Coorientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Batschauer, Tiago

Alterações cardiovasculares, comportamentais, metabólicas e endócrinas induzidas pelo estresse crônico em ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica / Tiago Batschauer ; orientador, Guilherme Fleury Fina Speretta, coorientador, Adair Roberto Soares dos Santos, 2019. 65 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Alterações cardiovasculares. 3. Hipertensão. 4. Dieta hiperlipídica . 5. Estresse crônico. I. Speretta, Guilherme Fleury Fina . II. Santos, Adair Roberto Soares dos . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências. IV. Título.

Tiago Batschauer

Alterações cardiovasculares, comportamentais, metabólicas e endócrinas induzidas pelo estresse crônico em ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Geisson Marcos Nardi, Dr.
Instituição UFSC

Prof. Marcelo Farina, Dr.
Instituição UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Neurociências.

Prof. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, Dr.
Coordenador do Programa

Prof. Guilherme Fleury Fina Speretta, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2019

Este trabalho, é dedicado a todos os meus professores (as), do ensino fundamental a pós-graduação, que com toda certeza, contribuíram para me conduzir a esse fascínio pelo conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, como a própria cronologia da palavra sugere, agradeço ao colega e psicólogo do IFC-Brusque, MSc.Tiago Fernandes, por ter me motivado a ingressar no mestrado.

Aos meus pais, que sempre prezaram por me fornecer uma educação de qualidade, e pelo apoio na decisão de me dedicar exclusivamente a pós-graduação, durante esses dois anos.

A Dra. Caroline C. Espírito Santo e ao Dr. Fernando S. Fiorin, que além de terem sido triviais para os meus primeiros passos, com certeza são amigos que levarei para o resto da vida.

A Bruna B. Simas (IC), por me ensinar e colaborar com os procedimentos cirúrgicos utilizados no protocolo experimental.

Ao meu orientador Dr. Guilherme F. F. Speretta, que do primeiro ao último mês da minha formação, jamais deixou-me sem suporte, e indubitavelmente, não poderia ter sido melhor.

Ao MSc. Raul M. de Souza, por uma amizade genuína, dentro e fora da universidade, e um colaborador indispensável na realização dos experimentos.

A todos os técnicos do departamento, como o ilustre seu Carlos H. Espíndola e o Heitor Copatti, que com o auxílio nos cuidados dos animais e na limpeza, foram vitais para a concretização deste trabalho.

A todos os professores do programa de pós-graduação em neurociências, que em cada disciplina cursada, me oportunizaram uma dádiva inestimável, o conhecimento.

Aos professores Dr. Eduardo L.G. Moreira e Dr. Wagner L. Reis pela colaboração na revisão do artigo, análise estatística e realização das dosagens hormonais.

Ao Júlio M. Cordeiro (IC), pela amizade construída, pelo seu engajamento no aprendizado, e seu trivial auxílio na realização dos experimentos.

A minha namorada Jennifer Dorow, pelo apoio incondicional a minha decisão de ingressar no programa de neurociências e ao empréstimo dos seus ouvidos, no treinamento das falas para apresentações de seminários, palestras e defesa.

Aos integrantes do LaFiC (laboratório de fisiologia cardiometabólica) que, com proveitosas discussões nas reuniões do laboratório, contribuíram substancialmente para minha formação acadêmica.

A todos os demais amigos, docentes e discentes que fizeram parte desta jornada acadêmica e/ou dos churrascos realizados.

A CAPES e UFSC pelo suporte financeiro.

RESUMO

Atualmente, a obesidade é considerada uma epidemia, e está associada a doenças cardiovasculares (DCV) e transtornos afetivos, como a ansiedade. O estresse psicológico também é proposto como fator de risco para DCV e psiquiátricas. No entanto, não é completamente conhecido se o estresse crônico exacerba as mudanças fisiológicas e comportamentais, induzidas pela obesidade. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da associação da dieta hiperlipídica (DH) e a exposição a um protocolo de estresse crônico variável (ECV) sobre a função cardiovascular e endócrina, atividade autonômica, metabolismo, adiposidade e parâmetros comportamentais em ratos. Ratos Wistar machos (60-70 dias de idade) foram divididos em quatro grupos: dieta padrão (DP)-controle, DH-controle, DP-ECV e DH-ECV. Os grupos DH-controle e DH-ECV foram alimentados com uma DH por seis semanas, e nos últimos dez dias, os grupos DH-ECV e DP-ECV foram expostos ao ECV. A DH produziu distúrbios metabólicos e aumentou os níveis sanguíneos de angiotensina II e leptina. Tanto o ECV quanto a DH aumentaram a pressão arterial e a modulação do sistema nervoso simpático para o coração e vasos e diminuíram a atividade do barorreflexo. A associação entre ECV e DH exacerbou a resposta simpática cardíaca, e aumentou os valores basais da frequência cardíaca (FC). Porém, tanto o ECV quanto a DH, não afetaram a resposta da pressão arterial aos agentes vasoativos e aos níveis de nitrato na aorta. O teste comportamental do labirinto em cruz elevado revelou que o ECV diminuiu a exploração do braço aberto no labirinto. Em conjunto, nossos resultados indicam que uma dieta rica em gorduras associada ao estresse emocional, aumenta o risco de DCV, mas não de ansiedade evocada pelo ECV, e alterações metabólicas e endócrinas relacionadas à DH.

Palavras-chave: Angiotensina II. Barorreflexo, Obesidade.

ABSTRACT

Obesity has been labeled as epidemic and it is associated with cardiovascular diseases and affective disorders, such as anxiety. Psychological stress is also proposed as a risk factor for cardiovascular and psychiatry diseases. However, it is not completely understood whether chronic stress exacerbates the physiological and behavioral changes induced by obesity. Thus, this study aimed to evaluate the effects of the association of high-fat diet (HFD) feeding and exposure to a chronic variable stress (CVS) protocol on cardiovascular and endocrine function, autonomic activity, metabolism, adiposity, and behavioral parameters in rats. Male Wistar rats (60-70 days old) were divided into four groups: control-standard chow diet (SD), control-HFD, CVS-SD and CVS-HFD. The control-HFD and CVS-HFD groups were fed with HFD for six weeks, and in the last ten days, the CVS-HFD and CVS-SD groups were exposed to CVS. HFD produced metabolic disorders and increased blood levels of angiotensin II and leptin. Either the CVS or HFD increased blood pressure and the sympathetic nervous system modulation to the heart and vessels and decreased baroreflex activity. CVS and HFD association exacerbated the cardiac sympathetic response and increased basal values of heart rate. Neither CVS nor HFD affected blood pressure response to vasoactive agents and aorta nitrate. The behavioral test of the elevated plus maze revealed that CVS decreased exploration of the open arm of the elevated plus maze. Taken together, our results indicate that overnutrition associated with emotional stress increases the risk for cardiovascular diseases, but not of anxiety evoked by CVS, and metabolic and endocrine changes related to HFD.

Keywords: Angiotensin II. Baroreflex. Obesity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –Linha do tempo: protocolo experimental.....	35
Figura 2 – A) Massa corporal, B) Ingestão alimentar, C) Ingestão de energia.....	49
Figura 3 – Modulação autonômica vascular e cardíaca: A) atividade simpática, B) atividade parassimpática, C) atividade cardíaca intrínseca (FCi), D) pressão arterial média, E) frequência cardíaca (FC), F) potência do espectro da banda de baixa frequência (BF) da pressão arterial sistólica (PAS).....	56
Figura 4 - Atividade barorreflexa: A) ganho para cima, B) ganho para baixo C) ganho total, D) regressão não-linear do barorreflexo	58
Figura 5 – Reatividade vascular e nível de nitrato na aorta: A) curva dose-resposta fenilefrina, B) curva dose-resposta nitroprussiato de sódio, C) níveis de nitrato/nitrito na aorta abdominal.....	60
Figura 6 – Labirinto em cruz elevado: A) porcentagem de entradas no braço aberto, B) porcentagem de tempo no braço aberto, C) número total de entradas no braço fechado.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Protocolo semanal de estresse crônico variável (ECV).....	37
Tabela 2 Adiposidade, perfil lipídico, glicemia, níveis hormonais e massa adrenal.....	53
Tabela 3 Análise não linear da atividade barorreflexa (platô mínimo da frequência cardíaca, platô máximo da frequência cardíaca, variação da frequência cardíaca, pressão arterial média e o ganho)	62
Tabela 4 Reatividade vascular: análise farmacológica.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang I - Angiotensina I
Ang II - Angiotensina II
AT₁ - Receptor de Angiotensina Tipo I
CT - Colesterol Total
DCV - Doenças Cardiovasculares
DH - Dieta Hiperlipídica
ECA - Enzima Conversora de Angiotensina
ECV - Estresse Crônico Variável
EPM - Erro Padrão da Média
FC - Frequência Cardíaca
FCi - Frequência Cardíaca Intrínseca
HDL - Lipoproteína de Alta Densidade
HLC - Hormônio Liberador de Corticotrofina
HLH - Hidroperóxidos Lipídicos Hepáticos
HPA - Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
IP - Intervalo de Pulso
LDL - Lipoproteína de Baixa Densidade
NPS - Nitroprussiato de Sódio
ON - Óxido Nítrico
ONSe - Óxido Nítrico Sintase Endotelial
PA - Pressão Arterial
PAM - Pressão Arterial Média
PAS - Pressão Arterial Sistólica
PVN - Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
SNA - Sistema Nervoso Autônomo
SNC - Sistema Nervoso Central
SNS - Sistema Nervoso Simpático
SRA - Sistema Renina-Angiotensina
TA - Transtorno de Ansiedade
TG - Triglicerídeos
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
VLDL - Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	17
1.1 Estresse Crônico e Função Cardiovascular	17
1.2 Obesidade e Alterações Cardiovasculares	21
1.3 Obesidade e Estresse Crônico	27
2.0 HIPÓTESE DO TRABALHO	30
3.0 JUSTIFICATIVA	30
4.0 OBJETIVO GERAL	32
4.1 Objetivos Específicos	32
5.0 MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1 Animais.....	33
5.2 Desenho Experimental.....	33
5.3 Dieta.....	36
5.4 Estresse Crônico Variável (ECV)	37
5.5 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	38
5.6 Preparação Cirúrgica.....	39
5.7 Mensuração de Parâmetros Cardiovasculares.....	40
5.8 Infusão de Agentes Vasoativos.....	40
5.9 Avaliação da Atividade Autonômica Cardíaca, Vascular e Frequência Cardíaca Intrínseca (FCi)	41
5.10 Avaliação da Atividade Barorreflexa.....	42
5.11 Medições de Soro, Plasma e Tecidos.....	44
5.12 Reatividade Vascular e Drogas Vasoativas.....	46
5.13 Análise Estatística.....	47
6.0 RESULTADOS	47
6.1 Massa Corporal e Ingestão Alimentar.....	47
6.2 Massa Adrenal.....	50
6.3 Tecido Adiposo.....	50
6.4 Níveis Plasmáticos de Hormônios.....	51
6.5 Perfil Lipídico Sérico e Glicose.....	52

6.6 Perfil Lipídico Hepático e Hidroperóxidos Lipídicos.....	52
6.7 Parâmetros Cardiovasculares Basais.....	55
6.8 Modulação Autonômica Cardíaca, Vascular e Frequência Cardíaca Intrínseca (FCi)	57
6.9 Atividade Barorreflexa.....	59
6.10 Reatividade Vascular e Concentração de Nitrado na Aorta.....	63
6.11 Labirinto em Cruz Elevado.....	65
7.0 DISCUSSÃO.....	67
8.0 CONCLUSÃO.....	72
9.0 DESDOBRAMENTOS DO ESTUDO.....	74
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

1. INTRODUÇÃO

1.1 ESTRESSE CRÔNICO E FUNÇÃO CARDIOVASCULAR

O estresse pode ser definido como uma percepção subjetiva de uma mudança ambiental comum ao indivíduo a um ambiente adverso, que geralmente culmina em um conjunto de respostas fisiológicas, permitindo uma adaptação a essa nova condição (Joels *et al.*, 2009). Diferentes estressores, tanto de natureza física quanto psicológica, estimulam regiões distintas do sistema nervoso central (SNC) para promover respostas apropriadas (Scharf *et al.*, 2012). A exposição ao estresse crônico ou a sobrecarga da alostase (mecanismos endógenos que restabelecem a homeostase durante situações desafiadoras) conduzem a uma resposta adaptativa inadequada em vários órgãos, que resultam em alterações que culminam em quadros fisiopatológicos tais como: doenças cardiovasculares (Rosengren *et al.*, 2004), distúrbios psicológicos (Charney *et al.*, 2004) e desregulação metabólica (Liu *et al.*, 2014).

Alguns estudos têm correlacionado fatores psicossociais, como o estresse e transtornos psiquiátricos como a ansiedade e a depressão, com o desenvolvimento de alterações cardiovasculares (Knox *et al.*, 1998; Rozanski *et al.*, 1999). A ansiedade, por exemplo, tem sido associada com hipertensão e doença coronariana por um longo tempo (Miles *et al.*, 1951). Por definição, a ansiedade no contexto dos transtornos de ansiedade (TA) é crônica e persistente, portanto, pode ter muito mais consequências fisiológicas do que a ansiedade transitória (Garipey *et al.*, 2010). A diminuição da variabilidade da frequência cardíaca (FC), o comprometimento da função vagal e o desequilíbrio da resposta inflamatória parecem estar associados aos TA (Chalmers *et al.*, 2014). Por conseguinte, existe uma alta probabilidade dos TA aumentar o risco de doenças cardiovasculares (DCV) (Garfield *et al.*, 2014). Em roedores, tem sido consistentemente demonstrado, que o estresse psicossocial crônico promove a ativação de células mielóides periféricas e centrais (macrófagos/micróglias) que aumentam a sinalização neuroinflamatória e contribuem para o desenvolvimento e manutenção do comportamento tipo-ansioso (Hanke *et al.*, 2012; Wohleb *et al.*, 2013; Ramirez *et al.*, 2016).

Ademais, roedores submetidos a protocolos de estresse, também apresentam alterações metabólicas, como o aumento dos níveis séricos de colesterol total, VLDL, LDL e triglicérides (Neves et al., 2009). Além dos fatores de risco cardiovasculares conhecidos (hipertensão, hiperlipidemia, diabetes, etc.), Gullette e colaboradores (1997) demonstraram que o estresse mental, definidas como sentimentos de tensão, frustração e tristeza, estavam associadas com o dobro de risco de isquemia miocárdica na hora subsequente. O estudo Interheart, realizado em 52 países com uma amostra de 24.767 pacientes, examinou a associação entre estresse psicológico e infarto do miocárdio (Rosengren *et al.*, 2004). Neste estudo, os fatores psicológicos avaliados foram divididos em quatro categorias: eventos do trabalho, de casa, financeiro e eventos estressantes da vida. Os dados confirmaram que pacientes com infarto do miocárdio, apresentaram níveis de estresse significativamente mais elevados em uma ou mais das quatro categorias (Rosengren *et al.*, 2004). Muitos outros estudos epidemiológicos têm confirmado essa relação entre estresse e patologias cardiovasculares (Haines *et al.*, 1987; Kawachi *et al.*, 1994; Knox *et al.*, 1998; Schwartz *et al.*, 2012).

A ativação do sistema nervoso autônomo (SNA) e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) são características da resposta ao estresse, e influenciam a função de outros órgãos. Estudos pré-clínicos dão suporte à hipótese de que as alterações cardiovasculares desencadeadas pelo estresse estão associadas a disfunções no balanço autonômico cardíaco e na atividade do barorreflexo (Grippeo *et al.*, 2002; 2008), que são medidas importantes para avaliar a função autonômica (Negrao et al., 1992; Grippeo et al., 2008; Flues et al., 2010; Crestani et al., 2011). A diminuição na sensibilidade do barorreflexo têm sido apontada como fator de risco para desenvolvimento de diferentes patologias cardiovasculares (Farrell *et al.*, 1991; Takase *et al.*, 1992). Já foi demonstrado, que ratos submetidos a um protocolo de estresse crônico variável (ECV) apresentaram redução na resposta taquicárdica do barorreflexo (Grippeo *et al.*, 2008). Ratos expostos a um protocolo de ECV também apresentaram taquicardia de repouso, na qual foi associada a um aumento no tônus simpático cardíaco (Grippeo *et al.*, 2002; Grippeo *et al.*, 2003). Desse modo, esses achados sugerem que modificações na atividade barorreflexa e no equilíbrio autonômico cardíaco, parecem constituir as complicações cardiovasculares desencadeadas pela exposição prolongada a estímulos aversivos.

O endotélio também possui uma importante participação na fisiopatologia do sistema cardiovascular. Existe amplo consenso na literatura, quanto ao papel fundamental da disfunção endotelial nos efeitos adversos do estresse no sistema cardiovascular (Lind *et al.*, 2002; Spieker *et al.*, 2002; Gottdiener *et al.*, 2003). Curtos períodos de eventos estressantes induzem episódios temporários de disfunção endotelial, enquanto que o estresse frequente e repetitivo, promove o comprometimento da reatividade vascular (Black *et al.*, 2002). O eixo HPA e o SNA são os primeiros a responderem a situações estressantes (Wirtz *et al.*, 2006). Esses achados sugerem que a disfunção endotelial induzida pelo estresse, provavelmente está relacionada às respostas mediadas por esses dois sistemas. Em outras palavras, a atividade simpática aumentada em associação com alterações hormonais, provavelmente resultarão em distúrbios na função endotelial. Vale ressaltar que alterações na reatividade vascular têm sido propostas como um dos mecanismos fisiopatológicos da hipertensão (Conway, 1958; Crestani *et al.*, 2011; Ghiadoni *et al.*, 2012). Um estudo pré-clínico *in vivo* demonstrou que diferentes protocolos de estresse crônico promovem alterações na reatividade vascular à agentes vasoconstritores e vasodilatadores (Duarte *et al.*, 2015).

A ativação da resposta ao estresse produz mudanças na circuitaria encefálica, afetando a vigilância para estímulos sensoriais, promovendo respostas emocionais de medo, evitação e estimulação fisiológica periférica (Brotman *et al.*, 2007). Tais respostas incluem ativação do SNA, do eixo HPA e elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias na ausência de agentes patogênicos (Steptoe *et al.*, 2012).

De maneira geral, o SNA, é ativado em segundos após a exposição a um estímulo estressor, induzindo tanto respostas simpáticas quanto parasimpáticas. As catecolaminas, aumentam a FC e reduzem a variabilidade da FC (oscilações dos intervalos entre os batimentos cardíacos), otimizando o fluxo sanguíneo para os tecidos musculares, e elevando a temperatura do tronco corporal (Chrousos *et al.*, 1992). A maior atividade do sistema nervoso simpático (SNS) provoca o aumento da FC, da força de contração do miocárdio e efeitos pressores, além de afetar o metabolismo e o sistema imunológico (Huang *et al.*, 1997; Goebel *et al.*, 2000). A resposta ao estresse pode envolver a ativação simultânea inicial de ambos sistemas, simpático e parasimpático, seguidos por uma diminuição da atividade do sistema nervoso parassimpático, sustentando a FC elevada, evocada pelo estresse (Carrive, 2006).

Os dados apresentados acima claramente mostram uma relação entre estresse e comprometimentos na função cardiovascular. Alterações na atividade autonômica e na

função vascular parecem compor importantes mecanismos envolvidos nas complicações cardiovasculares induzidas pelo estresse crônico.

1.2 OBESIDADE E ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES

A obesidade, considerada uma epidemia do século XXI, é definida como uma massa corporal desproporcional em relação a altura, e com acúmulo excessivo de tecido adiposo que geralmente é acompanhada por inflamação crônica sistêmica (Collaboration, 2016). A obesidade é associada com o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2, hipertensão, doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer e outras condições patológicas crônicas (Williams *et al.*, 2015). Estima-se que cerca de 39% da população mundial apresenta obesidade ou sobrepeso, apesar de décadas de esforço para retardar o progresso dessa epidemia (OMS, 2015). Esta alta prevalência, traduz em um custo global de saúde, equivalente a 2,8% do produto interno bruto mundial, ou aproximadamente 2 trilhões de dólares (Dobbs *et al.*, 2014).

Os distúrbios associados a obesidade representam maiores ameaças para a saúde pública do que a fome ou a desnutrição (Bhupathiraju *et al.*, 2016). Já a obesidade infantil também está gerando grandes preocupações, pois tem sido associada a complicações metabólicas e doenças crônicas até na idade adulta (Koletzko *et al.*, 2011).

Os tecidos adiposos são classificados com base na sua localização no corpo, e dois tipos são categorizados: o tecido adiposo subcutâneo e o tecido adiposo visceral (Gonzalez-Muniesa *et al.*, 2017). Tecidos adiposos viscerais incluem o intra-abdominal, tecido adiposo perirrenal e pericárdico (Gonzalez-Muniesa *et al.*, 2017). Já é conhecido que o excesso de tecido adiposo resulta em uma disfunção deste tecido, caracterizada microscopicamente por hipertrofia dos adipócitos e a infiltração de macrófagos e/ou aumento da liberação de adipocinas pró-inflamatórias e diminuição da liberação de adipocinas anti-inflamatórias (Gonzalez-Muniesa *et al.*, 2015). Estes fenômenos contribuem para um ambiente resistente à insulina e pró-inflamatório. Várias vias de sinalização têm sido propostas para explicar a causa do início dos processos inflamatórios associados a obesidade, incluindo estresse oxidativo (Le Lay *et al.*, 2014), estresse do retículo endoplasmático (Ozcan *et al.*, 2004) e hipóxia do tecido adiposo (Trayhurn *et al.*, 2004).

Embora a lista de desfechos clínicos associados à obesidade seja extensa, o número e a gravidade dessas complicações parecem depender da presença adicional de depósitos de gordura nos depósitos adiposos internos, como o tecido adiposo visceral abdominal, e ao redor de tecidos normalmente magros, como o coração, o fígado e os rins, um fenômeno conhecido como deposição de gordura ectópica (Despres *et al.*, 2006) (Despres & Lemieux, 2006; Rosen & Spiegelman, 2014; Shulman, 2014).

Existe um fenótipo específico, chamado de “*obeso metabolicamente saudável*” que apresenta menos gordura visceral, menor infiltração de macrófagos no tecido adiposo e menor tamanho dos adipócitos, o que conduz a um perfil inflamatório mais favorável, embora uma meta-análise tenha relatado que esses indivíduos tenham um risco aumentado de desenvolver diabetes tipo 2 em comparação aos seus controles magros (Bell *et al.*, 2014).

Evidências consistentes, também apontam que o modo como o tecido adiposo gerencia o excesso de energia, e a hipóxia produzida pelo crescimento patológico dos adipócitos, tem um forte efeito no perfil de risco cardiometabólico de um indivíduo, sensibilidade à insulina e dislipidemia (altos níveis de triglicerídeos ou baixos níveis de lipoproteína de alta densidade) (Gonzalez-Muniesa *et al.*, 2015).

Um estudo em larga escala, onde a distribuição de gordura corporal foi medida em tomografias computadorizadas em 12.443 indivíduos, revelou que o valor absoluto da área de gordura visceral se correlacionou positivamente com os riscos cardiovasculares associados à obesidade, todavia, os riscos cardiovasculares não aumentaram com o aumento da gordura subcutânea (Hiuge-Shimizu *et al.*, 2012). Assim, os tecidos adiposos na obesidade subcutânea podem funcionar normalmente com a liberação esperada de adipocinas antiinflamatórias, enquanto os tecidos adiposos na obesidade visceral liberam uma quantidade excedente de adipocinas pró-inflamatórias, e suprimem a secreção de adipocinas anti-inflamatórias, que contribui para o comprometimento metabólico e cardiovascular sistêmico, associado a distúrbios relacionados à obesidade (Ouchi *et al.*, 2011; De Heredia *et al.*, 2012).

Estudos pré-clínicos tem apontado que a ingestão de uma dieta hiperlipídica (DH) promove aumento da pressão arterial (Boustany *et al.*, 2005; Pinheiro *et al.*, 2007; Leite *et al.*, 2013; Speretta *et al.*, 2016a). Nesse sentido, recentemente foi demonstrado que ratos alimentados por sete semanas com DH, apresentaram aumento na pressão arterial, na qual foi acompanhada de redução na resposta de bradicardia do barorreflexo, aumento na modulação simpática da pressão arterial sistólica (PAS) e cardíaca (Speretta *et al.*, 2016a). Dessa forma,

parece que as alterações na atividade autonômica contribuem para a hipertensão induzida pelo excesso de tecido adiposo. Recentemente foi demonstrado *in vitro* que a DH aumentou a vasoconstrição dependente de noradrenalina (Liu et al., 2015) e reduziu a vasodilatação dependente de acetilcolina (Trzepizur et al., 2015) e óxido nítrico (ON) (Sweazea et al., 2010). Essas alterações foram associadas com inflamação, aumento do estresse oxidativo, redução na atividade da enzima óxido nítrico síntase endotelial (ONSe) e menor síntese de ON (Sweazea et al., 2010; Liu et al., 2015; Trzepizur et al., 2015).

Além do mais, inúmeros estudos também demonstraram uma forte associação entre o excesso de tecido adiposo e alterações neuroendócrinas e metabólicas, como o aumento dos níveis plasmáticos de leptina e angiotensina II (Ang II), aumento da atividade do SNS, diminuição da sensibilidade do barorreflexo e alterações na função vascular, contribuindo para o desenvolvimento da hipertensão arterial (Boustany *et al.*, 2005; Hall *et al.*, 2010; Speretta *et al.*, 2019).

Um importante mecanismo de regulação da pressão arterial (PA), o sistema renina-angiotensina (SRA) age através da produção de renina e seu precursor prorenina, pelas células justaglomerulares do rim (Singh & Williams., 2017). A principal função da renina é clivar o angiotensinogênio (uma globulina derivada do fígado) formando angiotensina I (Ang I), onde a enzima conversora de angiotensina (ECA) cliva a Ang I para formar Ang II, considerada a principal efetora desse sistema (Singh & Williams., 2017). A diminuição da pressão de perfusão renal, a redução da concentração do íon sódio que alcança as células da mácula densa, componente tubular do aparelho justaglomerular nos rins, ou a estimulação dos receptores β_1 adrenérgicos renais, provocam a liberação de renina com subsequente síntese de Ang II (Hodge *et al.*, 1966; Cowley *et al.*, 1972; Hackenthal *et al.*, 1990). A queda acentuada do volume plasmático, por exemplo, durante uma hemorragia, causa mudanças inversas da concentração da Ang II devido a alterações na taxa de secreção de renina (Hodge *et al.*, 1966), e a estimulação do SRA nessas condições está associada com a secreção de aldosterona pelas glândulas adrenais (Mulrow *et al.*, 1962). Os efeitos fisiológicos da Ang II também envolvem a vasoconstrição direta e a potencialização das ações do sistema nervoso autônomo simpático (Liang *et al.*, 1978).

Todos os componentes do SRA, incluindo precursores e enzimas necessárias para a produção de Ang II, já foram identificados no encéfalo, sugerindo que a Ang II possa agir como neurotransmissor no SNC (Grobe *et al.*, 2008; Wright *et al.*, 2013; De Kloet *et al.*,

2015) o considerável de evidências sugere que uma hiperatividade do SRA no encéfalo contribui para o desenvolvimento de alterações cardiovasculares (Steckelings *et al.*, 1992; Blume *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 2013).

A leptina, um hormônio produzido por adipócitos, é liberada em proporção à gordura total e atua principalmente no hipotálamo para manter a homeostase energética e a massa corporal normal (Farooqi *et al.*, 2009). A leptina atuando no SNC pode promover o aumento da atividade simpática, contribuindo para a elevação da PA associada a obesidade (Rahmouni, 2014; Hall *et al.*, 2015). Além disso, humanos com mutações que promovem perda da função dos receptores de leptina, têm baixa PA, apesar de obesidade severa (Simonds *et al.*, 2014). A hipertensão induzida pela obesidade em coelhos, é acompanhada por um aumento dos níveis plasmáticos de leptina e pode ser bloqueada pela infusão central de um antagonista da leptina (Prior *et al.*, 2010; Armitage *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2013).

Um estudo já demonstrou uma interação entre a leptina e o SRA na regulação do SNA (Hilzendeger *et al.*, 2012). A infusão central de leptina aumentou os componentes do SRA em regiões específicas do encéfalo. Por outro lado, a inibição central do receptor tipo I da Ang II ou o animal “knockout” global para a ECA reduz os níveis circulantes de leptina (Hilzendeger *et al.*, 2012). Essas evidências sugerem que o SRA encefálico, desempenha um papel facilitatório nas respostas nervosas simpática, à leptina. Também já foi observado, que a obesidade pode conduzir a uma resistência seletiva a leptina, de modo que o efeito anoréxico da leptina seja atenuado, porém sua ação estimulatória do SNA e da PA permaneçam intactas (Mark, 2013).

Esses achados suportam a ideia de que a obesidade é um fator de risco para doenças cardiovasculares, e que alterações na atividade autonômica, metabólica, endócrina e na função vascular parecem constituir importantes mecanismos envolvidos nessa associação.

1.3 OBESIDADE E ESTRESSE CRÔNICO

O estilo de vida moderno nas sociedades industrializadas é caracterizado pelo aumento da ingestão de alimentos processados, sedentarismo e aumento do estresse psicológico. Assim, não é surpreendente que as taxas de obesidade e complicações relacionadas ao estresse têm aumentado exponencialmente nas últimas décadas (Kyrou *et al.*, 2008).

O estresse tem sido associado com alterações nas preferências alimentares e quantidade de alimentos consumidos (Ulrich-Lai *et al.*, 2015a). Para a maioria das pessoas, o estresse influencia tanto a quantidade quanto os tipos de alimentos que eles comem. Por exemplo, aproximadamente 35-60% das pessoas relatam comer mais calorias totais quando estão sob estresse, enquanto aproximadamente 25% a 40% das pessoas relatam comer menos (Epel *et al.*, 2004). Além disso, para muitas pessoas, o estresse altera a seleção de alimentos para uma maior proporção de calorias provenientes de alimentos altamente palatáveis (McCann *et al.*, 1990; Groesz *et al.*, 2012; Tryon *et al.*, 2013). Essa seleção alterada de alimentos é referida como "*comfort food*" - termo que reflete a ideia de que a ingestão de alimentos palatáveis reduzem as respostas ao estresse, proporcionando assim um meio potencial para aumentar a sensação de bem-estar e, conseqüentemente, aliviar o estresse (Ulrich-Lai *et al.*, 2015a). De fato, a ingestão de alimentos palatáveis e/ou ricos em carboidratos, está associada a melhora do humor, diminuição da percepção de estresse e menor concentração de cortisol plasmático (Anderson *et al.*, 1987; Dube *et al.*, 2005; Gibson, 2006).

Entretanto, já é conhecido de longa data, que o medo do estresse antecipado, inibe a ingestão de alimentos (Schachter *et al.*, 1968). Acredita-se que essa supressão da alimentação é adaptativa e promove a sobrevivência quando o medo é desencadeado por perigo real (em outras palavras, evitar o perigo iminente tem prioridade sobre a alimentação) porém, pode se tornar mal-adaptativo quando medo prolongado interrompe a alimentação em estados com falta de energia (Ulrich-Lai *et al.*, 2015).

Um estudo já demonstrou que ratos submetidos a um protocolo de ECV, resultou em uma diminuição da ingestão de alimentos, e a associação do estresse com o consumo de alimentos palatáveis, induziu um perfil ansiogênico (Ortolani *et al.*, 2011). Os dados atuais apontam que a combinação de estresse e acesso a alimentos de conforto, aspectos comuns da vida moderna, podem constituir um elo entre estresse, comportamento alimentar e ansiedade.

Fatores psicossociais parecem ser o elo de ligação na associação de ansiedade persistente e alterações cardiovasculares, uma vez que estudos clínicos e pré-clínicos demonstraram seu importante papel na etiologia e progressão de DCV e do TA (Rozanski *et al.*, 1999; Grippo, 2009; Sgoifo *et al.*, 2014). Entre numerosos fatores psicossociais, o estresse psicológico tem sido reconhecido como um fator de risco para alterações cardiovasculares e transtornos psiquiátricos (Steptoe *et al.*, 2012; Inoue, 2014). Assim, estudos apontam para um

papel do estresse crônico na associação entre TA e DCV (Rozanski *et al.*, 1999; Grippo, 2009; Sgoifo *et al.*, 2014; Crestani, 2016). Curiosamente, a ansiedade também pode ser um gatilho para a obesidade (Garipey *et al.*, 2010). E o contrário também parece ser verdadeiro, o aumento da massa de tecido adiposo e a obesidade pode aumentar a vulnerabilidade à depressão e ansiedade (Hryhorczuk *et al.*, 2013).

Nesse sentido, a obesidade apresenta efeitos imediatos e duradouros na saúde física, social e emocional (Haslam *et al.*, 2005; Dreber *et al.*, 2017) e o estresse crônico aumenta os efeitos neuroendócrinos e metabólicos deletérios de uma DH (Kuo *et al.*, 2007), levando a uma ligação recíproca entre obesidade e transtornos afetivos, incluindo o TA (Stunkard *et al.*, 2003; Faith *et al.*, 2011; Mansur *et al.*, 2015).

Embora um recente estudo pré-clínico do nosso grupo de pesquisa tenha demonstrado que ratos alimentados com uma DH e submetidos a um protocolo de ECV por 4 semanas, não apresentaram alterações sobre a FC, pressão arterial média (PAM) e regulação barorreflexa, não é completamente entendido se o ECV exacerba outras funções fisiológicas (por exemplo, função endócrina e autonômica). Além disso, o papel da combinação entre ECV e DH em parâmetros comportamentais como ansiedade e sua relação com complicações cardiovasculares nunca foram avaliados.

Esses dados mostram uma clara associação entre a obesidade e o estresse crônico. Como discutido acima, a obesidade e o estresse crônico constituem fatores de risco individuais para desenvolvimento de doenças cardiovasculares e desordens comportamentais. Entretanto, mais estudos são necessários para compreender as alterações cardiovasculares e comportamentais induzidas pela combinação desses fatores, bem como os mecanismos envolvidos com essas alterações.

2.0 HIPÓTESE DO TRABALHO

Desse modo, a hipótese do presente estudo é que a associação entre a ingestão de uma DH e o ECV pode potencializar as alterações cardiovasculares, metabólicas, endócrinas e comportamentais desencadeadas individualmente por estes fatores.

3.0 JUSTIFICATIVAS

Através de um modelo animal de estresse, já bem estabelecido na literatura, é de trivial importância investigarmos possíveis mecanismos fisiopatológicos que estão envolvidos nas alterações cardiovasculares, comportamentais, endócrinas e metabólicas induzidas pelo estresse e/ou o consumo de uma dieta hiperlipídica. Além do mais, *insights* mecanicistas são essenciais para propormos estratégias de tratamentos ou prevenção para tais alterações. Esperamos, que em nosso trabalho anterior, não houve alterações na FC, PAM e atividade barorreflexa dos animais ECV ou DH, devido a uma provável habituação aos estímulos aversivos durante as quatro semanas do protocolo de ECV. Além disso, o período de DH foi menor do que aquele utilizado usualmente por nosso grupo de pesquisa. Nesse sentido, alteramos o tempo de duração do protocolo, para um desenho experimental mais similar aos encontrados na literatura. Por este motivo, é de fundamental importância, elucidarmos os mecanismos fisiopatológicos das alterações cardiovasculares induzidas pelo estresse crônico e uma dieta rica em gordura.

4.0 OBJETIVO GERAL

Avaliar as consequências da exposição ao estresse crônico sobre o metabolismo, função cardiovascular, endócrina e o comportamento tipo-ansioso em ratos alimentados com dieta hiperlipídica.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a. Avaliar as consequências da exposição ao estresse crônico sobre a ingestão alimentar, massa corporal, adiposidade, massa adrenal, alterações endócrinas e metabólicas em ratos alimentados com dieta hiperlipídica;

b. Avaliar as consequências da exposição ao estresse crônico sobre a pressão arterial e frequência cardíaca basais, a atividade do barorreflexo, atividade autonômica para o coração e frequência cardíaca intrínseca em ratos alimentados com dieta hiperlipídica;

c. Avaliar as consequências da exposição ao estresse crônico sobre o teste comportamental do labirinto em cruz elevado em ratos alimentados com dieta hiperlipídica;

5.0 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Ratos Wistar machos (60-70 dias de idade) foram obtidos no biotério da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e encaminhados ao Departamento de Ciências Fisiológicas pelo menos sete dias antes do início dos procedimentos experimentais. Os ratos foram mantidos em caixas coletivas de polipropileno (3-4 ratos / caixa) com alimento (ver descrição da dieta abaixo) e água fornecida *ad libitum* em sala com temperatura controlada (22 ± 2 °C) e umidade ($55 \pm 10\%$). As luzes estavam acesas das 07:00 h às 19:00 h. As condições de moradia e os procedimentos experimentais foram realizados seguindo protocolos aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da UFSC (protocolo nº 3587130516), que atende as diretrizes brasileiras e internacionais de uso e bem-estar animal.

5.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os ratos foram divididos em quatro grupos experimentais: controle e dieta padrão (controle-DP; n = 10); controle e DH (controle-DH; n = 10); ECV e dieta padrão (ECV-DP; n = 10); e ECV e DH (ECV-DH; n = 10). Os ratos dos grupos controle-DH e ECV-DH foram alimentados com DH por 6 semanas, e nos últimos dez dias antes de completar este período, os grupos ECV-DH e ECV-DP foram expostos ao protocolo ECV. Os grupos controle-DP e controle-DH permaneceram em repouso até o final da 6ª semana do protocolo experimental. A DP ou DH foi oferecida no mesmo período.

O teste comportamental foi realizado no final da 6ª semana de DP ou DH, e 24 horas após o último estímulo de estresse. Os ratos foram transferidos para a sala experimental em suas caixas e permaneceram 60 minutos para se adaptarem às novas condições ambientais antes de iniciar o teste do labirinto em cruz elevado.

Após o teste comportamental, os ratos de todos os grupos experimentais foram submetidos ao preparo cirúrgico para implante de catéteres nos vasos femorais, e as avaliações cardiovasculares foram realizadas 24 e 48 horas depois. Todos os registros

cardiovasculares foram feitos na fase clara do ciclo claro-escuro, onde os ratos tendem a ser menos ativos. Para evitar a influência do estresse agudo do manuseio e transporte de ratos nos dias de registro cardiovascular, os ratos foram transferidos para a sala dos experimentos em suas caixas, e tiveram 60 minutos para se adaptar às condições experimentais da sala antes de iniciarem os registros cardiovasculares. Além disso, durante os registros cardiovasculares, os ratos não foram manipulados. Para assegurar parâmetros cardiovasculares estáveis, 20 minutos de parâmetros cardiovasculares basais foram registrados nos dois dias de teste antes do início dos testes. No primeiro dia, os ratos receberam infusões intravenosas de fenilefrina e nitroprussiato de sódio (NPS) em uma ordem aleatória. Então, os ratos receberam administração intravenosa de metilatropina e propranolol em uma ordem aleatória. No segundo dia, ratos foram tratados com metilatropina e propranolol na sequência oposta à do dia 1. No dia seguinte, após 8 horas de jejum, o sangue foi coletado através da ponta da cauda e a concentração de glicose no sangue foi medida usando tiras de teste. Em seguida, os ratos foram eutanasiados com uma dose excessiva de anestésico inalatório (isoflurano, 4-5% em 100% O₂) e então, o sangue foi coletado por punção cardíaca, para análises do perfil lipídico, dosagens de leptina e Ang II. O coração, as glândulas supra-renais e os tecidos adiposos (epididimal, retroperitoneal e mesentérico) foram removidos e pesados enquanto que o uma amostra do fígado foi coletada para análise do perfil lipídico hepático. Um fragmento da aorta descendente também foi removido, para determinação da concentração de nitrato, na mesma. A **figura 1** apresenta uma representação esquemática do protocolo completo.

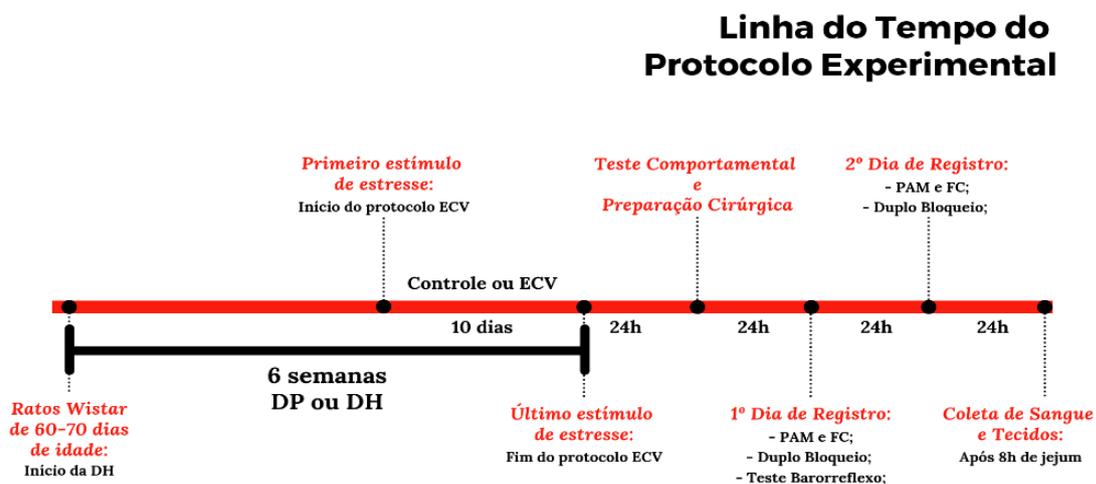


Figura 1. Desenho Experimental. ECV, estresse crônico variável; DH, dieta hiperlipídica; DP, dieta padrão; PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca.

5.3 DIETA

Os grupos experimentais receberam DP (Biobase, Águas Frias, SC, Brasil) ou DH por 6 semanas. A dieta DP continha 22g de proteína, 48g de carboidratos, 4g de gordura total, 8g de fibra e 200mg de sódio por 100g de dieta. A DH era composta de ração padrão de rato + amendoim, chocolate ao leite e biscoitos de maizena na proporção de 3: 2: 2: 1, como descrito anteriormente (Estadella *et al.*, 2004; Speretta *et al.*, 2012), e continha 13g de proteína, 40g de carboidrato, 19g de gordura total, 4g de fibra e 73mg de sódio por 100 g de dieta. Os valores calóricos das dietas foram aproximados: 3,16 kcal/g para DP e 3,82kcal/g para DH (Speretta *et al.*, 2016b; Simas *et al.*, 2018). A ingestão de alimentos e massa corporal foram registrados 3 vezes por semana. A ingestão de alimentos foi determinada subtraindo-se os alimentos acumulados após 48 horas, da quantidade conhecida disponível dois dias antes, em cada caixa coletiva. Em seguida, calculou-se uma média do consumo individual, dividindo-se o consumo total da caixa pelo número de ratos nela mantidos (Simas *et al.*, 2018).

5.4 ESTRESSE CRÔNICO VARIÁVEL (ECV)

O protocolo ECV foi usado como um regime de estresse heterotípico como descrito anteriormente (Duarte *et al.*, 2015). O protocolo de 10 dias do ECV consistiu na exposição diária a diferentes estressores inevitáveis e imprevisíveis (estresse de contenção, serragem úmida, frio, estresse de nado, inversão do ciclo de luz, privação de alimento/água e isolamento) (conforme Tabela 1). Durante este período, os ratos dos grupos controle não foram perturbados, exceto, para a limpeza das caixas no biotério.

Tabela 1- Protocolo de estresse crônico variável (ECV).

Dia: Tipo de estresse e cronograma

- 1: 10:00h contenção, 60 min; 19:00h serragem úmida durante a noite;
 - 2: 15:00h, frio (4°C) e isolamento social por 60 min; 19:00h, luzes acesas durante a noite;
 - 3: 12:00h, luzes apagadas por 180 min; 16:30 h, nado forçado por 5 min;
 - 4: 07:30h, serragem úmida durante o dia; 19:00h, privação de água e comida durante a noite;
-

-
- 5:** 13:00 h, nado forçado por 5 min; 19:00 h, isolamento social durante a noite;
- 6:** 14:00 h, frio (4°C) e isolamento social por 20 min; 15:30h , luzes apagadas por 120 min;
- 7:** 19:00 h, serragem úmida e luzes acesas durante a noite;
- 8:** 19:00h isolamento social e privação de água e alimento durante a noite;
- 9:** 16:00h contenção, 60 min; 19:00 luzes acesas durante a noite;
- 10:** 08:00h nado forçado por 5 min; 10:00 restrição, 60 min;
-

5.5 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

O LCE foi usado para avaliar o conflito entre o medo inato de ratos em ambientes abertos versus seu desejo de explorar novos ambientes, um paradigma bem estabelecido para avaliar o comportamento semelhante à ansiedade (Pellow *et al.*, 1985; Rodgers *et al.*, 1997). O aparato, feito de madeira e fórmica, consiste de dois braços abertos (50 x 10 cm), opostos a dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm), elevados a 50 cm do solo. A área de junção dos quatro braços (plataforma central) mede 10 x 10 cm. Cada animal foi colocado no centro do labirinto de frente para um braço aberto. Eles foram observados por 5 min, com os seguintes parâmetros avaliados: as entradas e o tempo nos braços abertos, bem como o número de entradas nos braços fechados. Considerou-se uma entrada quando as quatro patas do animal estavam dentro do braço. Estes dados foram utilizados para calcular a porcentagem de entradas nos braços abertos [% EA: entradas nos braços abertos / (entrada nos braços abertos + entradas nos braços fechados) x 100]; porcentagem de tempo nos braços abertos [% TBA: tempo nos braços abertos / (tempo nos braços abertos + tempo nos braços fechados) x 100]. O número de entradas nos braços fechados foi usado como um índice de atividade locomotora (Rodgers *et al.*, 1997). As experiências foram conduzidas numa sala com temperatura controlada (23°C, humidade entre 40% - 60%) e intensidade de baixa luminosidade (12 lux).

5.6 PREPARAÇÃO CIRÚRGICA

Os ratos foram anestesiados com cetamina (80 mg/mL/kg, ip; Cristália, Itapira, SP) e xilazina (7 mg/mL/kg, ip, Agener Union, Embu/SP) e um cateter de polietileno (um segmento de 4cm de PE-10 ligado ao calor a um segmento de 15cm de PE-50; Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA) preenchido com uma solução de solução salina (0,9%) contendo heparina (50 UI/mL, Cristália, São Paulo, Brasil) foi inserido na aorta abdominal através da artéria femoral

para registro cardiovascular. Um segundo cateter foi implantado na veia femoral para a infusão de drogas. Ambos os cateteres foram tunelizados sob a pele e exteriorizados no dorso dos ratos. Após a cirurgia, os ratos foram tratados com uma formulação de poliantibiótico de estreptomicina e penicilina (560 mg/mL/kg, im) para prevenir infecção, e receberam o anti-inflamatório não-esteróidal flunixinina meglumina (0,5 mg/mL/kg, sc) para analgesia pós-operatória. Os ratos foram alojados em caixas individuais ao longo do período após a cirurgia. Procedimentos cirúrgicos semelhantes têm sido utilizados sistematicamente (Crestani *et al.*, 2010; Costa-Ferreira *et al.*, 2016; Simas *et al.*, 2018) e nossos experimentos de padronização indicaram que os ratos são completamente recuperados 24h após o procedimento cirúrgico, sem alterações significativas na massa corporal, PAM ou FC.

5.7 MENSURAÇÃO DE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES

A cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão (MLT0380, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália). A pressão arterial pulsátil foi registrada utilizando um amplificador (AVS Projetos, São Carlos, Brasil) e uma placa de aquisição (PowerLab, ADInstruments) conectada a um computador pessoal. Os valores de PAM e FC foram derivados de registros de pressão arterial pulsátil.

5.8 INFUSÃO DE AGENTES VASOATIVOS

Infusão intravenosa de cloridrato de fenilefrina, agonista do receptor adrenérgico α_1 (70 $\mu\text{g/mL}$ a 0,4 mL/min/kg; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e doador de óxido nítrico NPS (100 $\mu\text{g/mL}$ a 0,8 mL/min/kg; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi realizada utilizando uma bomba de infusão (KD Scientific, Holliston, MA) (Costa-Ferreira *et al.*, 2016; Simas *et al.*, 2018). As infusões das drogas vasoativas foram randomizadas e o segundo tratamento só foi dado quando os parâmetros cardiovasculares retornaram aos valores obtidos antes da administração de drogas vasoativas (o intervalo entre as infusões foi de aproximadamente 5 min). A fenilefrina causou um efeito pressor incremental enquanto o NPS evocou respostas depressoras incrementais. As infusões duraram de 20 a 30 segundos, resultando na administração de uma dose total de 9-14 $\mu\text{g/kg}$ de fenilefrina e 26-40 $\mu\text{g/kg}$ de NPS.

5.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AUTÔNOMICA CARDÍACA, VASCULAR E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA INTRÍNSECA (FCi)

A avaliação do tônus autonômico cardíaco e da FCi (a frequência cardíaca sob bloqueio farmacológico da atividade autonômica cardíaca, representando a atividade do marcapasso cardíaco) foi realizada por injeção intravenosa em bolus do antagonista do receptor muscarínico metilatropina (3 mg/ml/kg, iv; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e o antagonista β -adrenérgico cloridrato de propranolol (4 mg/ml/kg, iv; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Para facilitar as comparações, selecionamos essas doses de medicamentos com base em estudos anteriores que avaliaram as alterações autonômicas evocadas por estressores crônicos e DH (Costa-Ferreira *et al.*, 2016; Simas *et al.*, 2018). O protocolo foi realizado em 2 dias. No primeiro dia, os ratos de todos os grupos experimentais receberam administração intravenosa de metilatropina e propranolol em uma ordem aleatória. O intervalo de tratamento entre as drogas foi de 10 minutos. No dia seguinte, ratos foram tratados com metilatropina e propranolol na sequência oposta àquela realizada no primeiro dia (Costa-Ferreira *et al.*, 2016; Simas *et al.*, 2018).

A atividade do sistema nervoso parassimpático foi determinada pela mudança na FC basal causada pela metilatropina, enquanto a atividade do SNS foi determinada pela mudança da FC após o tratamento com propranolol. A FCi foi determinada após o tratamento combinado com propranolol e metilatropina (Costa-Ferreira *et al.*, 2016; Simas *et al.*, 2018). A atividade simpática vasomotora foi avaliada por meio da análise da variabilidade da PAS, que foi realizada com software personalizado (CardioSeries v2.4 - <http://www.danielpenteado.com>), conforme descrito anteriormente (Speretta *et al.*, 2019). Por breves instantes, os espectros foram integrados em bandas de baixa frequência (LF; 0,2–0,75 Hz) e alta frequência (0,75–3 Hz) e os resultados são apresentados como valores absolutos (mmHg²)

5.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BARORREFLEXA

A análise da atividade barorreflexa foi realizada por dois métodos: (i) a técnica de análise sequencial e (ii) a abordagem farmacológica clássica. No método da sequência, a

sensibilidade barorreflexa espontânea foi calculada para avaliar a função barorreflexa sobre o intervalo fisiológico das oscilações na pressão arterial, sem quaisquer manipulações farmacológicas. Para isso, utilizando o software Cardioseries v2.4 (<http://www.danielpentead.com>), os valores batimento a batimento da PAS e o intervalo de pulso (IP) foram analisados para identificar sequências em que o aumento da PAS esteve associado ao alongamento do IP (sequências para cima), ou decréscimos da PAS foram associados com o encurtamento do IP (sequências para baixo) (Bertinieri *et al.*, 1988; Barbosa *et al.*, 2017). A sequência barorreflexa foi considerada quando o coeficiente de correlação (r) entre a variação da pressão arterial e a resposta do intervalo do pulso reflexo foi maior ou igual a 0,8. A sequência foi determinada a partir da inclinação da regressão linear da pressão arterial sistólica e do intervalo de pulso e dividida em ganho UP (barorreflexo calculado a partir das sequências para cima), ganho DOWN (barorreflexo calculado a partir das sequências para baixo) e ganho TOTAL (barorreflexo calculado de todas as sequências, para cima e para baixo combinados).

Para a abordagem farmacológica clássica, os valores pareados de alterações de PAM e FC evocados pela infusão de fenilefrina e NPS foram plotados para gerar funções logarítmicas sigmóides (Korner *et al.*, 1972; Head *et al.*, 1987; Crestani *et al.*, 2010). A análise das curvas sigmóides foi baseada em cinco parâmetros: a) menor platô de FC (P_1 ; em batimentos/min; ou seja, bradicardia reflexa máxima); b) platô superior da FC (P_2 ; em batimentos/min; isto é, taquicardia reflexa máxima); c) variação da FC (em batimentos/min; i.e., diferença entre os dois platôs superior e inferior); d) pressão arterial média (PA_{50} ; em mmHg), que é o valor da PAM que promove 50% de variação na FC) e o ganho (G ; em batimentos/min por mmHg), que é a inclinação da porção linear da curva (Head *et al.*, 1987; Crestani *et al.*, 2010).

5.11 AVALIAÇÕES NO SORO, PLASMA E TECIDOS

O sangue foi centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos a 4-8°C. Os níveis séricos de triglicerídeos (TG) e colesterol total (CT) foram determinados pelo método colorimétrico utilizando kits comerciais (Laborlab, São Paulo, Brasil), com sensibilidade de 0,7 mmol. L⁻¹ e 0,14 mmol. L⁻¹, respectivamente (Simas *et al.*, 2018). O plasma foi utilizado para determinar as concentrações de leptina (Kits ELISA para rato/murganho de Millipore, EZML-82K), que

foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante. O plasma também foi usado para determinar os níveis de corticosterona e Ang II usando radioimunoensaios específicos após extração com etanol ou cartucho de octadecilsilano ativado (SEP-COLUMN, Peninsula Laboratories, Belmont, CA, EUA), como descrito anteriormente (Elias *et al.*, 1997; Mecawi *et al.*, 2013). As sensibilidades dos radioimunoensaios e os coeficientes de variação intra e interensaio foram de 0,4 µg/dL, 5,1% e 8,4%, para corticosterona e 0,4 pg/mL, 4,2% e 10,3% para Ang II, respectivamente.

A análise dos níveis de glicose de jejum foi avaliada utilizando tiras de teste padrão (Accu-Chek Performa; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). Resumidamente, os ratos foram suavemente contidos, e a ponta da cauda (~ 1-2 mm) foi cortada usando uma tesoura cirúrgica para coleta de sangue. A primeira gota foi descartada, e a segunda gota foi coletada para a determinação da concentração de glicose no sangue em jejum (Simas *et al.*, 2018).

Para a determinação do conteúdo hepático de TG e CT, amostras de fígado (~ 100 mg) foram transferidas para tubos de ensaio contendo NaCl 1M e T18 UltraTurrax homogeneizado (IKA, Campinas, SP, Brasil). Em seguida, foram adicionados 2 mL de solução de clorofórmio/metanol (2: 1), misturados e centrifugados durante 10 min a 3500 x g. A fase metanólica foi então transferida para outro tubo de ensaio e seca em banho-maria. Uma solução composta por Triton x100/metanol (2: 1) foi adicionada para ressuspender as amostras para determinação do teor de TG e CT hepático. O experimento foi realizado pelo método colorimétrico enzimático de acordo com as instruções do fabricante (Biotécnica®, Varginha, MG, Brasil).

Hidroperóxidos lipídicos hepáticos (HLH) foram quantificados pelo método de oxidação de ferro com xilenol laranja (FOX2), como descrito anteriormente (Nourooz-Zadeh *et al.*, 1994). O princípio do método baseia-se na rápida oxidação de Fe⁺² (ferroso) a Fe⁺³ (férico) em ácido mediado por peróxidos lipídicos. Resumidamente, alíquotas de 50 µL do fígado previamente homogeneizado foram centrifugadas a 5.000 g por 5 min com 200 µL de metanol. O sobrenadante (18 mL) foi adicionado em uma placa com 2 mL de metanol (amostra em branco) ou 2 mL de 10 mM trifetilfosfina. A placa foi coberta e mantida à temperatura ambiente durante 30 min. Em seguida, 180 µL do reagente de trabalho FOX2, composto por 1 mM de xilenol laranja, 2,5 mM de sulfato de amônio preparado em 250 mM de H₂SO₄ e 4,4 mM de butil-hidroxitolueno, foram adicionados a cada poço. A placa foi

mantida no escuro durante 30 min e a absorvência foi lida a 560 nm. A absorvência da amostra (com metanol) foi subtraída da absorbância da amostra tratada com trifenilfosfina. Os resultados são expressos em $\mu\text{mol} \cdot 100 \text{ mg}$ de tecido hepático.

Para a determinação do nitrato/nitrito da parede vascular (NO_x , metabólitos do óxido nítrico), a aorta abdominal foi coletada e homogeneizada em 200 μL de ácido acético 0,1 N frio e centrifugada a 3.000 rpm / 5min. Vinte e cinco microlitros de tecido homogeneizado foram utilizados para determinação do teor de proteína (Bradford, 1976). Cinquenta microlitros de etanol absoluto a frio foram adicionados a 25 μL de tecido homogeneizado, misturados e mantidos a -20°C por 30 min. As amostras foram centrifugadas durante 5 min (10.000 rpm) a 4°C e o sobrenadante foi recolhido. A determinação do teor de NO_x no sobrenadante foi realizada por quimiluminescência de NO/O_3 utilizando um analisador de NO (Sievers 280 NO Analyzer, Boulder CO, USA). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ de proteína (Hampl *et al.*, 1996).

5.12 REATIVIDADE VASCULAR A DROGAS VASOATIVAS

As mudanças graduais na PAM evocadas pela infusão intravenosa do agente pressor fenilefrina e o agente depressor NPS foram plotadas para gerar curvas dose-resposta (Costa-Ferreira *et al.*, 2016). Curvas dose-resposta foram construídas para cada agente vasoativo, calculando-se a quantidade de droga infundida e a PAM a cada 2 segundos após o início da infusão. O efeito máximo (E_{max}) e a dose que promove 50% da resposta máxima da PAM (ED_{50}) para cada agente vasoativo foram comparados em todos os grupos experimentais.

5.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A ANOVA de duas vias para medidas repetidas (estresse e dieta como fatores independentes e tempo como uma medição repetida) seguida pelo teste post-hoc de Student-Newman-Keuls foi usada para analisar as curvas de tempo para massa corporal, ingestão de alimentos e consumo de energia. Os outros dados foram analisados usando ANOVA de duas vias (estresse e dieta como fatores independentes), seguido pelo teste post-hoc de Student-Newman-Keuls. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

6.0 RESULTADOS

6.1. MASSA CORPORAL E INGESTÃO ALIMENTAR

A ANOVA de duas vias com medidas repetidas indicou efeitos significativos para a dieta [F = 5,2; P < 0,05] por semanas [F = 520,5; P < 0,0001], e para interação dieta x semanas [F = 16,0; P < 0,0001] na massa corporal (g). Comparações post hoc revelaram um aumento progressivo da massa corporal da primeira para a última semana nos grupos controle-DP, controle-DH, ECV-DP e ECV-DH (P < 0,0001 para todos; Figura 2).

A ANOVA de duas vias com medidas repetidas indicou efeitos significativos para a dieta [F = 12,95; P < 0,001], por semanas [F = 25,45; P < 0,0001], para interação dieta x semana [F = 12,98; P < 0,0001], e para a interação ECV x semanas [F = 3,95; P < 0,01] na ingestão de alimentos (g). Comparações post hoc revelaram (i) uma redução na ingestão de alimentos nos grupos ECV-DH e controle-DH na 2ª semana (P < 0,05 para ambos), nos grupos controle-DH e ECV-DP na 6ª semana (P < 0,05 para ambos) quando comparado à 1ª semana, além de um aumento da ingestão de alimentos no grupo ECV-DP na 5ª semana (P < 0,05), quando comparado à 1ª semana (P < 0,05), (ii) redução na ingestão de alimentos no grupo controle-DH quando comparado ao grupo controle-DP na 6ª semana (P < 0,05), (iii) redução na ingestão de alimentos no grupo ECV-DH quando comparado aos grupos controle-DP, ECV-DP e controle-DH na 6ª semana (P < 0,005 para todos); e (iv) redução na ingestão de alimentos no grupo ECV-DH na 6ª semana quando comparado ao mesmo grupo na 1ª, 2ª, 3ª, 4ª e 5ª semana (P < 0,0001; P < 0,0001; P < 0,0001; P < 0,005; P < 0,05 ; Figura 2).

A ANOVA de duas vias com medidas repetidas indicou efeitos significativos para a dieta [F = 17,90; P < 0,001], por semanas [F = 24,81; P < 0,0001], para interação dieta x semana [F = 15,10; P < 0,0001], e para a interação ECV x semanas [F = 3,64; P < 0,05] na ingestão de energia (kcal/dia). A análise post hoc mostrou uma diminuição na ingestão de energia (i) no controle-DP quando comparado ao grupo controle-DH e ECV-DH (P < 0,0001; para ambos) e ECV-DP quando comparado aos grupos controle-DH e ECV-DH na 1ª semana (P < 0,0001; para ambos); (ii) grupo controle-DH na 1ª semana quando comparado ao mesmo grupo na 2ª, 3ª, 4ª e 5ª semana (P < 0,0001 para todos) e o grupo ECV-DH na primeira semana quando comparado ao mesmo grupo 2ª, 3ª, 4ª e 5ª semanas (P < 0,005; P < 0,0001; P

< 0,0001; $P < 0,0001$; $P < 0,0001$, respectivamente); (iii) grupo controle-DP quando comparado ao grupo ECV-DH na 2ª semana ($P < 0,05$) e no grupo ECV-DP na 5ª semana quando comparado ao mesmo grupo na 6ª semana ($P < 0,05$); e (iv) grupo ECV-DH quando comparado ao grupo controle-DP na 6ª semana ($P < 0,05$; Figura 2).

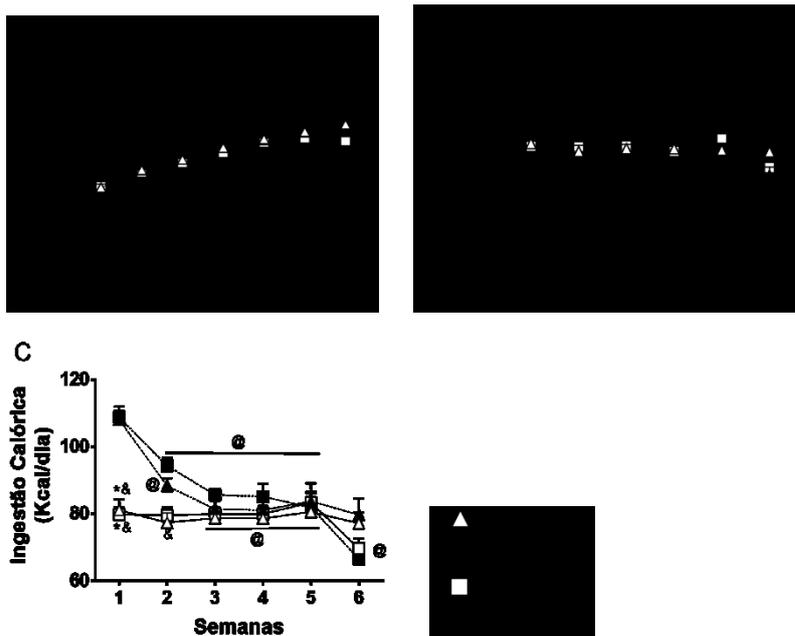


Figura 2. A) Massa corporal, B) Ingestão de alimentos, C) Ingestão de energia em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou hiperlipídica (DH) e expostos a estresse crônico variável (ECV) ou controle. Os resultados são apresentados como média \pm EPM. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida do teste de Student-Newman-Keuls. * diferente do respectivo grupo DP dentro da mesma condição; # diferente do respectivo grupo controle; & diferente do controle-DP; @ diferente da semana 0 para o painel A e diferente da semana 1 para os painéis B e C; $P < 0,05$; controle-DP, $n = 9$, control-DH, $n = 10$, ECV-DP, $n = 10$, ECV-DH, $n = 9$.

6.2 MASSA ADRENAL

A análise da massa adrenal relativa indicou efeitos da DH [$F(1, 32) = 6,27$; $P < 0,05$], mas sem efeitos do ECV [$F(1, 32) = 4,07$; $P = 0,05$] ou entre esses fatores [$F(1, 32) = 0,02$; $P = 0,88$]. A análise post hoc revelou aumento da massa adrenal relativa no grupo controle-DH quando comparado ao grupo ECV-DP ($P < 0,05$; Tabela 2).

6.3 TECIDO ADIPOSEO

A análise da massa relativa do tecido adiposo epididimal mostrou efeitos da DH [F (1,30) = 25,03; P < 0,0001]. A massa relativa do tecido adiposo retroperitoneal e mesentérico mostrou efeito da DH para ambos [F (1,30) = 67,85; P < 0,0001], [F (1,30) = 59,86; P < 0,0001], respectivamente. A análise post hoc mostrou aumento do tecido adiposo epididimal relativo no grupo ECV-DH quando comparado aos grupos controle-DP e ECV-DP (P < 0,05 para ambos) e no grupo controle-DH quando comparado aos grupos controle-DP e ECV-DP (P < 0,0001 e P < 0,01, respectivamente). Além disso, os grupos controle-DH e ECV-DH apresentaram aumento dos tecidos adiposo retroperitoneal e mesentérico quando comparados aos grupos controle-DP e ECV-DP (P < 0,0001 para todos; Tabela 2).

6.4 CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE HORMÔNIOS

A análise das concentrações plasmáticas de leptina indicaram um efeito da DH [F (1,27) = 19,86; P < 0,0001], e o teste post hoc mostrou concentrações de leptina aumentada nos grupos controle-DH e ECV-DH quando comparados com os grupos controle-DP e ECV-DP (p < 0,05 para ambos; Tabela 2).

A análise das concentrações plasmáticas de Ang II também indicaram um efeito da DH [F (1,23) = 22,90; P < 0,0001]. O teste post hoc demonstrou concentrações mais elevadas de Ang II no grupo ECV-DH quando comparado aos grupos controle-DP e ECV-DP (P < 0,05 para ambos; Tabela 2).

A mensuração das concentrações plasmáticas de corticosterona não mostraram efeitos da DH [F (1,27) = 1.652; P = 0,20], do ECV [F (1,27) = 0.8516; P = 0,36] ou da interação entre os fatores [F (1,27) = 0.06672; P = 0.80] (Tabela 2).

6.5 PERFIL LIPÍDICO SÉRICO E GLICOSE

A análise das concentrações de TG indicaram apenas efeitos da DH [F (1, 30) = 24,76; P < 0,0001], e análise post hoc demonstrou que a concentração de TG foi maior nos grupos controle-DH e ECV-DH quando comparados aos grupos controle-DP e ECV-DP (P <

0,05 para todos, Tabela 2). A comparação da concentração de CT indicou efeitos apenas de CVS [F (1, 28) = 15,11; P < 0,001], e a análise post hoc mostrou que o CT estava diminuído nos grupos controle-ECV e ECV-DH quando comparado ao grupo controle-DH (P < 0,05 para ambos, Tabela 2).

A análise da glicemia de jejum indicou efeitos da DH [F (1, 23) = 4,58; P < 0,05], mas sem efeitos do ECV [F (1, 23) = 2,12; P = 0,16] e interação ECV x DH [F (1, 23) = 0,0001; P = 0,99]. A análise post hoc não revelou diferenças entre os grupos (Tabela 2).

6.6 PERFIL LIPÍDICO HEPÁTICO E HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS

Análises da concentração hepática de TG indicaram efeitos apenas da DH [F (1,23) = 20,83; P < 0,0001] e análise post hoc mostrou que os níveis hepáticos de TG foram maiores no grupo ECV-DH quando comparados com os grupos controle-DP e ECV-DP (P < 0,05) e no grupo controle-DH quando comparado ao grupo controle-DP (P < 0,05).

A comparação da concentração hepática de CT não indicou efeitos do ECV [F (1,23) = 2,47; P = 0,13] ou DH [F (1,23) = 0,65; P = 0,42] ou interação ECV x DH [F (1,23) = 0,05; P = 0,82] (Tabela 2).

A análise dos níveis de HLH revelou apenas efeitos da DH [F (1,16) = 13,28; P < 0,05) e análise post hoc revelou maiores níveis de HLH no grupo ECV-DH quando comparado ao grupo controle-DP (P < 0,05) e um aumento nos níveis de HLH no grupo controle-DH quando comparado ao grupo controle-DP (P < 0,05, Tabela 2).

Tabela 2. Adiposidade, perfil lipídico hepático e plasmático, hidroperóxidos lipídicos hepáticos, glicemia, níveis hormonais e massa adrenal nos animais controle ou expostos ao ECV, alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH).

Grupos	Controle DP	Controle DH	ECV DP	ECV DH
Tecido adiposo epididimal (g/100g mc)	1.1 ± 0.1 (n = 8)	2.3 ± 0.7* (n = 9)	1.3 ± 0.3 (n = 8)	1.9 ± 0.4* (n = 9)

Tecido adiposo retroperitoneal (g/100g mc)	1.0 ± 0.2 (n = 9)	2.1 ± 0.1* (n = 9)	1.0 ± 0.1 (n = 8)	1.8 ± 0.1**& (n = 10)
Tecido adiposo mesentérico (g/100g mc)	0.8 ± 0.1 (n = 9)	1.6 ± 0.1* (n = 9)	0.6 ± 0.1 (n = 8)	1.7 ± 0.2**& (n = 8)
Colesterol hepático total (mg/g)	1.2 ± 0.1 (n = 6)	1.2 ± 0.1 (n = 8)	0.9 ± 0.1 (n = 5)	1.1 ± 0.1 (n = 8)
TG hepático (mg/g)	2.4 ± 0.4 (n = 6)	6.7 ± 1.2* (n = 8)	2.8 ± 0.3 (n = 5)	8.5 ± 1.2**& (n = 8)
HLH (µmol/100 mg)	6.2 ± 0.8 (n = 5)	14.8 ± 1.4 (n = 5)	11.4 ± 1.9 (n = 4)	14.9 ± 1.9& (n = 6)
CT plasmático (mg/dL)	111 ± 6 (n = 10)	131 ± 7 (n = 8)	97 ± 3 (n = 8)	97 ± 5 [#] (n = 7)
TG plasmático (mg/dL)	48 ± 2 (n = 10)	75 ± 7* (n = 9)	46 ± 7 (n = 7)	80 ± 5**& (n = 8)
Glicose sanguínea (mg/dL)	106 ± 2 (n = 6)	113 ± 2 (n = 8)	111 ± 5 (n = 5)	118 ± 2 (n = 8)
Leptina (ng/mL)	2.2 ± 0.5 (n = 7)	9.5 ± 1.6* (n = 8)	3.0 ± 0.7 (n = 8)	8.1 ± 1.9**& (n = 8)
Angiotensina II (pg/mL)	190 ± 24 (n = 6)	510 ± 11* (n = 8)	253 ± 82 (n = 7)	819 ± 154**& (n = 7)
Corticosterona (µg/dL)	11.1 ± 6.0 (n = 7)	9.2 ± 4.6 (n = 7)	9.8 ± 6.5 (n = 8)	7.0 ± 3.0 (n = 7)
Massa adrenal (g/g mc)	0.02 ± 0.003 (n = 9)	0.02 ± 0.002 (n = 8)	0.02 ± 0.003 (n = 9)	0.02 ± 0.003 (n = 10)

Todos os valores são apresentados como médias \pm erro padrão da média (EPM). ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$; * diferente dos respectivos grupos DP; # diferente do seu controle; & diferente do grupo controle-DP. CT: colesterol total; TG: triglicerídeo; HLH: Hidroperóxido lipídico hepático. A discrepância no número de animais em algumas análises apresentada na tabela se deve a coleta de tecidos e sangue desigual entre os grupos por diferentes motivos.. Por exemplo, quantidade insuficiente de sangue coletada, amostras hemolisadas, e a quantidade de reagentes insuficientes para todas as amostras.

6.7 PARÂMETROS CARDIOVASCULARES BASAIS

A análise da PAM mostrou efeito da DH [F (1,27) = 6,67; $P < 0,05$], do ECV [F (1,27) = 4,50; $P < 0,05$] e uma interação entre esses fatores [F (1,27) = 4,28; $P < 0,05$] (Figura 3). O teste post hoc revelou maior PAM nos grupos controle-DH, ECV-DP e ECV-DH quando comparado ao grupo controle-DP ($P < 0,05$ para todos; Figura 3.a). A análise da FC mostrou efeito da DH [F (1,28) = 5,70; $P < 0,05$] e do ECV [F (1,28) = 11,22; $P < 0,05$], mas sem interação entre ambos [F (1,28) = 0,38; $P = 0,54$]. O teste post hoc mostrou aumento da FC no grupo ECV-DH quando comparado aos grupos controle-DH, ECV-DP e controle-DP ($P < 0,05$; Figura 3.b).

A análise da LF da PAS (ou seja, tônus simpático vascular) mostrou efeitos da DH [F (1,28) = 9,18; $P < 0,05$] e interação ECV x DH [F (1,28) = 4,84; $P < 0,05$]. O teste post hoc mostrou um aumento na LF da modulação simpática da PAS nos grupos controle-DH, ECV-DH e ECV-DP quando comparado ao grupo controle-DP ($P < 0,05$ para todos; Figura 3).

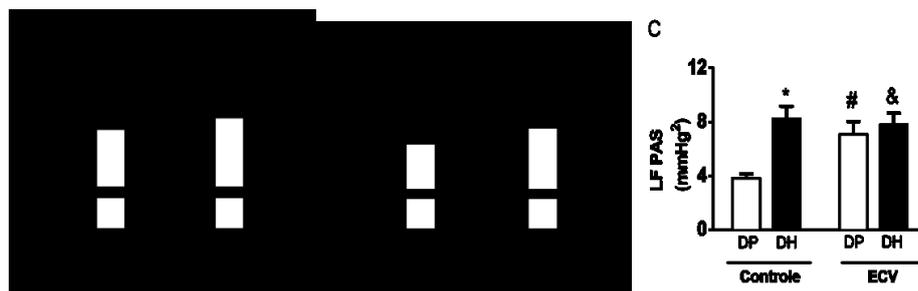


Figura 3. Basal A) pressão arterial média (PAM), E) frequência cardíaca (FC) e C) baixa frequência (LF) da pressão arterial sistólica (PAS) em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) e expostos ao estresse crônico variável (ECV) ou controle. Os resultados são apresentados como média \pm EPM. ANOVA de duas vias seguida do teste de Student-Newman-Keuls. * diferente do respectivo grupo DP dentro da mesma condição; # diferente do respectivo grupo controle; & diferente do controle-DP; $P < 0,05$; Controle-DP, n = 8-9, controle-DH, n = 8-9, ECV-DP, n = 7-8, ECV-DH, n = 5-8.

6.8 MODULAÇÃO AUTONÔMICA CARDÍACA, VASCULAR E FREQUÊNCIA CARDÍACA INTRÍNSECA (FCi)

A análise da alteração da FC induzida pela administração intravenosa de metilatropina não indicou efeito do ECV [F (1,24) = 3,74; P = 0,06] ou da DH [F (1,24) = 0,01; P = 0,92] (Figura 4.a). A análise da alteração da FC induzida pela administração intravenosa de propranolol indicou efeito da DH [F (1,24) = 19,39; P < 0,001] e do ECV [F (1,24) = 10,02; P < 0,05], mas sem interação entre esses fatores [F (1,24) = 0,01; P = 0,91;]. O teste post hoc mostrou aumento na alteração da FC após a administração de propranolol no grupo ECV-DH quando comparado ao grupo controle-DP (P < 0,001), no grupo ECV-DH quando comparado aos grupos ECV-DP e controle-DH (P < 0,05 para ambos), e nos grupos ECV-DP e controle-DH quando comparado ao grupo controle-DP (P < 0,05 para ambos; Figura 4.b).

A análise dos valores da FC após tratamento combinado com propranolol e metilatropina (i.e., para avaliar a FCi) revelou apenas efeito da DH [F (1,24) = 7,80; P < 0,05], e o teste post hoc mostrou aumento na FCi no grupo controle-DH quando comparado aos grupos controle-DP e ECV-DP (P < 0,05 para ambos; Figura 4.c).

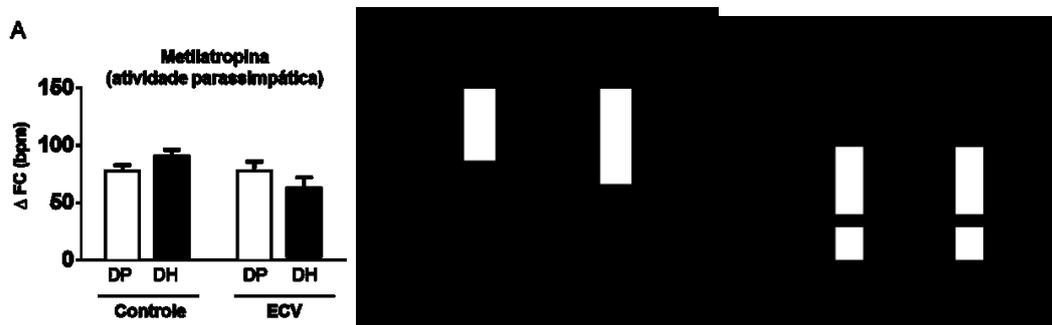


Figura 4. Frequência cardíaca (FC) delta (Δ) evocada pela administração de A) propranolol e B) metilatropina, e C) FC intrínseca (FCi), valores da FC após tratamento combinado com metilatropina e propranolol em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) e expostos ao estresse crônico variável (ECV) ou controle. Os resultados são apresentados como média \pm EPM. ANOVA de duas vias seguida do teste de Student-Newman-Keuls. * diferente do respectivo grupo DP dentro da mesma condição; #

diferente do respectivo grupo controle; & diferente do controle-DP; $P < 0,05$; Controle-DP, $n = 8-9$, controle-DH, $n = 8-9$, ECV-DP, $n = 7-8$, ECV-DH, $n = 5-8$.

6.9 ATIVIDADE BARORREFLEXA

A análise da função barorreflexa, avaliada pelo método de análise sequencial, mostrou efeito da DH no ganho UP [$F(1,27) = 4,41$; $P < 0,05$], DOWN [$F(1,27) = 4,46$; $P < 0,05$] e ganho TOTAL [$F(1,27) = 5,57$; $P < 0,05$], assim como interação DH e ECV para todos os parâmetros [$F(1,27) = 20,84$; $P < 0,0001$; $F(1,27) = 4,43$; $P < 0,05$; e $F(1,27) = 11,44$; $P < 0,05$; respectivamente]. O teste post hoc mostrou diminuição nos ganhos UP, DOWN e TOTAL, no grupo controle-DH quando comparado ao grupo controle-DP ($P < 0,001$; $P < 0,05$ e $P < 0,05$ respectivamente) e diminuição do ganho UP e ganho TOTAL nos grupos ECV-DH e ECV-DP quando comparados ao grupo controle-DP ($P < 0,05$ para ambos; Figura 5).

Os resultados da análise não linear da atividade barorreflexa mostraram efeitos do ECV em P_1 [$F(1,21) = 10,14$; $P < 0,05$], variação da FC [$F(1,21) = 4,94$; $P < 0,05$] e G [$F(1,21) = 11,30$; $P < 0,05$]; bem como efeito de DH em P_1 [$F(1,21) = 9,35$; $P < 0,05$] e no ganho [$F(1,21) = 4,45$; $P < 0,05$]. Contudo, a análise não indicou o efeito do ECV em P_2 [$F(1,21) = 0,42$; $P = 0,52$] e PA_{50} [$F(1,21) = 1,63$; $P = 0,22$]; ou o DH em P_2 [$F(1,21) = 2,16$; $P = 0,16$] e PA_{50} [$F(1,21) = 2,14$; $P = 0,16$]. O teste post hoc revelou uma diminuição no reflexo bradicárdico (P_1) e G nos grupos controle-DH, ECV-DP e ECV-DH quando comparado ao grupo controle-DP ($P < 0,05$ para todos; Figura 5 e Tabela 3).





Figura 5. A) Ganho UP (barorreflexo calculado a partir das sequências para cima), B) Ganho DOWN (barorreflexo calculado a partir das sequências para baixo), C) Ganho TOTAL (barorreflexo calculado a partir de todas as sequências, combinadas) e D) análise de regressão não linear do barorreflexo correlacionando Δ pressão arterial média (PAM) e Δ frequência cardíaca (FC) (símbolos em curvas indicam a PA_{50}) em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) e expostos ao estresse crônico variável (ECV) ou controle. Os resultados são apresentados como média \pm EPM. ANOVA de duas vias seguida do teste de Student-Newman-Keuls. Controle-DP, n = 7, controle-DH, n = 9, ECV-DP, n = 7-8, ECV-DH, n = 7.

Tabela 3. Atividade barorreflexa (G , P_1 , P_2 , variação da FC, G e PA_{50}) em ratos controle ou expostos ao ECV alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH).

Grupo	Controle DP	Controle DH	ECV DP	ECV DH
G (bpm/mmHg)	-2.6 ± 0.2	$-1.8 \pm 0.3^*$	$-1.5 \pm 0.1^\#$	$-1.2 \pm 0.2^\&$
P_1 (bpm)	-64 ± 2	$-48 \pm 4^*$	$-48 \pm 2^\#$	$-39 \pm 6^\&$
P_2 (bpm)	120 ± 10	97 ± 15	108 ± 16	91 ± 7
Variação da FC (bpm)	184 ± 11	156 ± 17	145 ± 15	131 ± 13
BP_{50} (Δ mmHg)	-5.8 ± 0.9	-7.3 ± 2.2	-6.8 ± 3.4	-12.8 ± 2.7

Todos os valores são apresentados como médias \pm o EPM. ANOVA de duas vias seguida do teste de Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$; * diferente dos respectivos grupos DP; # diferente do controle; e diferente do grupo

controle-DP. P₁: menor patamar da FC, isto é, bradicardia reflexa máxima; P₂: platô da FC superior, ou seja, taquicardia reflexa máxima; Variação da FC: diferença entre os níveis de platô superior e inferior; PA₅₀: pressão arterial média, que é a PAM em 50% da variação da FC; e G: ganho médio, que é a inclinação média das curvas entre +1 e -1 da derivação padrão do PA₅₀. controle-DP, n = 7; controle-DH, n = 6; ECV-DP, n = 7, ECV-DH, n = 5.

6.10 REATIVIDADE VASCULAR E CONCENTRAÇÃO DE NITRATO NA AORTA

Na análise da reatividade vascular, quando a variável Emax em resposta à infusão de fenilefrina foi medida, não encontramos efeitos do ECV [F (1,19) = 1,45; P = 0,24], da DH [F (1,19) = 0,10; P = 0,74] ou interação ECV x DH [F (1,19) = 1,37; P = 0,25]. A variável Emax em resposta à infusão de NPS também não apresentou efeitos do ECV [F (1,19) = 1,41; P = 0,24], DH [F (1,19) = 1,71; P = 0,20] ou interação ECV x DH [F (1,19) = 0,70; P = 0,41]. A variável ED₅₀ em resposta à fenilefrina não mostrou efeitos do ECV [F (1,23) = 1,91; P = 0,18], DH [F (1,23) = 0,14; P = 0,71] ou interação ECV x DH [F (1,23) = 1,75; P = 0,19]. O mesmo ocorreu com ED₅₀ em resposta ao NPS, não observamos efeitos do ECV [F (1,23) = 1,17; P = 0,29], DH [F (1,23) = 0,25; P = 0,61] ou interação ECV x DH [F (1,23) = 0,64; P = 0,43] (Figura 6 e Tabela 4).

A análise dos níveis de nitrato na aorta abdominal não mostrou efeito da DH [F (1,32) = 1,81; P < 0,18] do ECV [F (1,32) = 0,83; P < 0,37] ou da interação ECV x DH [F (1,32) = 0,17; P < 0,68]. A análise dos níveis plasmáticos de corticosterona não indicou nenhum efeito da DH [F (1,27) = 1,65; P = 0,2097] do ECV [F (1,27) = 0,85; P = 0,36] ou da interação ECV x DH [F (1,27) = 0,06; P = 0,79] (Figura 6).

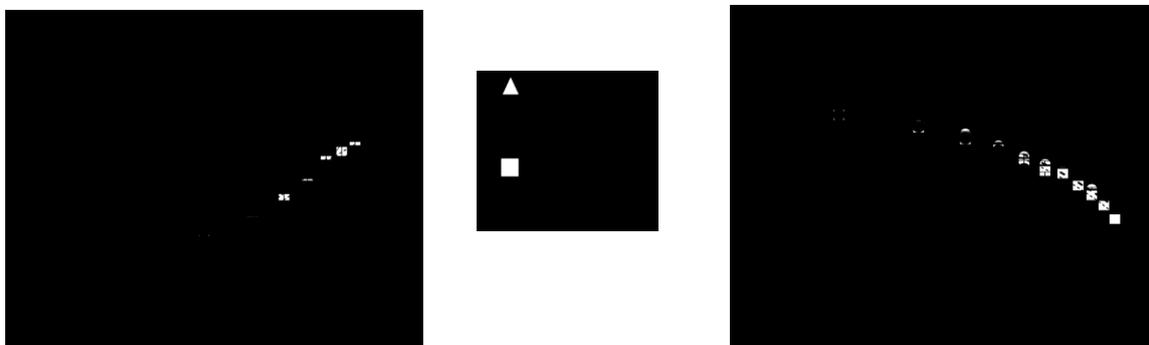




Figura 6. Curvas dose-resposta foram construídas para A) fenilefrina (fenil) e B) nitroprussiato de sódio (NPS) calculando-se a quantidade de droga infundida e a pressão arterial média (PAM) a cada 2s após o início da infusão, e C) níveis de nitrato/nitrito (Nox) na aorta abdominal em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) e expostos a estresse crônico variável (ECV) ou controle. Os resultados são apresentados como média \pm EPM. Controle-DP, n = 9, controle-DH, n = 7, ECV-DP, n = 6, ECV-DH, n = 5, para reatividade vascular; e controle-DP, n = 9, controle-DH, n = 9, ECV-DP, n = 8, ECV-DH, n = 10 para os níveis de nitrato.

Tabela 4. Reatividade vascular (E_{max} e ED_{50}) em ratos controle ou expostos ao ECV alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH).

Grupo	Controle	Controle	ECV	ECV
	DP	DH	DP	DH
E_{max}	29 ± 3	29 ± 5	37 ± 6	25 ± 5
ED_{50}	0.90 ± 0.05	0.89 ± 0.06	0.95 ± 0.02	0.79 ± 0.07

Todos os valores são apresentados como médias \pm EPM. ANOVA de duas vias seguida do teste de Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$. E_{max} : O efeito máximo da amplitude da pressão arterial média (PAM); ED_{50} : a dose que promove 50% da resposta máxima da PAM. Controle-DP, n = 7; controle-DH, n = 6; ECV-DP, n = 7, ECV-DH, n = 5.

6.11 LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

Comportamento tipo-ansioso foi avaliado no LCE. A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do fator ECV para a porcentagem de tempo nos braços abertos [F (1,30) = 7,40; P < 0,05]. Posteriormente comparações post hoc indicaram que o grupo ECV-DP apresentou diminuição da porcentagem de tempo gasto nos braços abertos em comparação com o grupo controle-DP (P < 0,05). A ANOVA de duas vias não revelou efeitos do ECV [F (1,30) = 0,72; P = 0,40] da DH [F (1,30) = 0,28; P = 0,59] ou da interação ECV x DH [F (1,30) = 2,11; P = 0,15] para a porcentagem de entradas nos braços abertos. Além disso, a análise não mostrou efeitos do ECV [F (1,30) = 1,17; P = 0,28] da DH [F (1,30) = 0,92; P = 0,34] ou a interação ECV x DH [F (1,30) = 0,11; P = 0,74] para o número de entradas nos braços fechados (Figura 7).



Figura 7. A) Porcentagem de entradas nos braços abertos, B) porcentagem de tempo em braços abertos e C) número total de entradas nos braços fechados em ratos alimentados com dieta padrão (DP) ou dieta hiperlipídica (DH) e expostos ao estresse crônico variável (ECV) ou controle. Os resultados são apresentados como média \pm EPM. ANOVA de duas vias seguida do teste de Student-Newman-Keuls. * diferente do respectivo grupo DP dentro da mesma condição; # diferente do respectivo grupo controle; & diferente do controle-DP; P < 0,05; Controle-DP, n = 7-8, controle-DH, n = 10, ECV-DP, n = 10, ECV-DH, n = 7-8.

7.0 DISCUSSÃO

No presente estudo, nós demonstramos que (i) ECV ou DH aumentaram a PAM. No entanto, a associação entre eles não exacerbou essa resposta; (ii) DH ou ECV aumentaram a modulação do SNS para o coração e vasos, além de diminuir a sensibilidade do barorreflexo; (iii) ECV e DH combinados exacerbaram o aumento da atividade do SNS cardíaco, e aumentaram a FC; (iv) a DH promoveu mudanças metabólicas e aumentou os níveis

sanguíneos de Ang II e leptina; e (v) o teste comportamental mostrou que o ECV reduziu a exploração do braço aberto do LCE, mas sem o efeito da DH ou interação entre ECV e DH.

A leptina é um hormônio secretado por adipócitos, e possui um papel trivial na regulação do balanço energético, diminuindo a ingestão de energia e aumentando o gasto calórico (Chan et al., 2003). Porém, apesar da obesidade ser caracterizada pelo aumento dos níveis de leptina, a resistência aos seus efeitos anoréxicos e redutores da massa corporal são bem estabelecidos (Lönnqvist et al., 1995, Considine et al., 1996). No presente estudo, evidenciamos aumento dos níveis de leptina nos animais alimentados com DH, porém, a resistência a leptina parece não ter ocorrido, uma vez que, em nenhum momento observamos aumento exacerbado na ingestão alimentar e calórica nos ratos alimentados com DH. Ao contrário, observamos uma redução da ingestão calórica nos ratos dos grupos ECV, independentemente de terem sido tratados com DP ou DH. Tal fato, provavelmente, está relacionado ao protocolo de ECV, pois ela ocorreu apenas após o início dos estímulos estressores.

Ademais, é amplamente aceito na literatura, que o estresse também altera as preferências alimentares, além da ingestão de alimentos (Ulrich-Lai *et al.*, 2015b). Observamos resultados semelhantes, uma vez que os grupos ECV alimentados com DP ou DH, apresentaram uma diminuição na ingestão de energia e alimentos a partir do início do protocolo ECV. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores que observaram inibição do comportamento alimentar em ratos em jejum expostos ao medo, como choques elétricos leves ou ambientes aversivos (Petrovich *et al.*, 2011; Reppucci *et al.*, 2013). Além disso, considerando o papel do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal na regulação do balanço energético, observou-se uma atenuação do efeito estimulador do neuropeptídeo Y, na alimentação, após a administração do hormônio liberador de corticotrofina (HLC) (Morley *et al.*, 1987; Heinrichs *et al.*, 1999). Também foi demonstrado que um aumento na liberação de noradrenalina e no HLC em resposta ao estresse, suprime o apetite durante o estresse (Halford, 2001; Takeda *et al.*, 2004). Tal mecanismo possivelmente está por trás da redução na ingestão de alimentos e energia, observada nos grupos ECV-DP e ECV-DH, embora não tenhamos encontrado alterações nos níveis de corticosterona circulante, como observado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, utilizando o mesmo protocolo de ECV (Duarte *et al.*, 2015).

A ansiedade têm sido freqüentemente avaliada após o estresse crônico (Ulrich-Lai *et al.*, 2015b). Nesse sentido, o conflito entre aproximação e esquiva é um conceito psicológico importante que tem sido extensivamente usado para melhor compreender a emoção (Aupperle *et al.*, 2010). O paradigma do LCE é um teste etológico para avaliar o comportamento relacionado à ansiedade em roedores. Ao contrário de outros ensaios comportamentais usados para avaliar as respostas de ansiedade que dependem da apresentação de estímulos nocivos (por exemplo, choque elétrico), que normalmente produzem uma resposta condicionada, o labirinto em cruz elevado depende da tendência dos roedores irem para espaços escuros e fechados (aproximação) e um medo incondicionado de alturas/espaços abertos (esquiva) (Pellow *et al.*, 1985; Walf *et al.*, 2007). Aqui mostramos que o grupo ECV-DP apresentou um tempo reduzido gasto nos braços abertos do aparato, indicando assim um efeito ansiogênico do protocolo de estresse crônico. Esses achados são corroborados por evidências anteriores de que o ECV é capaz de induzir tal comportamento (Bulos *et al.*, 2015; Vieira *et al.*, 2018). Curiosamente, mudanças comportamentais no LCE não foram afetadas pela DH. Nossos achados contrastam com um relato recente de que a DH exacerbou o efeito ansiogênico no LCE e no teste de campo aberto evocado por um protocolo de ECV (Yang *et al.*, 2016). No entanto, outros autores relataram uma ausência de interação entre DH e ECV no comportamento semelhante à ansiedade no LCE (Aslani *et al.*, 2015).

No presente estudo, tanto a DH quanto o ECV isolados, aumentaram a atividade do SNS para o coração e diminuíram a sensibilidade do barorreflexo. Além disso, observamos uma exacerbação da resposta da atividade simpática cardíaca, bem como um aumento na FC basal em animais submetidos ao ECV e DH. Sabe-se, que desequilíbrios no equilíbrio autonômico cardíaco e prejuízos na atividade do barorreflexo contribuem para o desenvolvimento da hipertensão (Grippeo *et al.*, 2003; Grippeo, 2009; Hall *et al.*, 2010). Nesse sentido, o aumento da PAM nos grupos controle-DH e ECV-DP, possivelmente está relacionado às alterações autonômicas e barorreflexas. O grupo ECV-DH também aumentou a PAM, embora as mudanças não tenham sido potencializadas pela combinação dos dois fatores. Estes resultados, estão de acordo com estudos anteriores que avaliaram o efeito da DH ou do ECV de forma independente (Grippeo *et al.*, 2003; Grippeo, 2009; Duarte *et al.*, 2015; Speretta *et al.*, 2016b).

Aumentos na leptina sistêmica e na Ang II, foram observados apenas nos grupos DH, e esses efeitos podem estar envolvidos nas respostas cardiovasculares. A leptina ativa o

sistema de melanocortina em várias regiões do SNC (Hall *et al.*, 2010; Da Silva *et al.*, 2015) aumentando a atividade do SNS (Hall *et al.*, 2010) e diminuindo a sensibilidade do barorreflexo (Fardin *et al.*, 2012; Ciriello, 2013). Assim, destacou-se um papel importante da leptina no desenvolvimento e manutenção da hipertensão induzida pela obesidade (Hall *et al.*, 2010; Do Carmo *et al.*, 2016).

O SRA parece ter um papel primário na hipertensão, principalmente um dos seus componentes, a Ang II. Este peptídeo apresenta inúmeros efeitos fisiológicos, dentre eles, a vasoconstrição direta devido ao aumento do influxo de Ca^{2+} , a ativação do SNS (Liang *et al.*, 1978), e o aumento da secreção de vasopressina, a sede e o apetite ao sódio (Blair-West *et al.*, 1998). A importância da Ang II no desenvolvimento da hipertensão associada à obesidade, também é clara, uma vez que o antagonista do receptor de angiotensina tipo 1 (AT_1), losartan, é capaz de reverter o aumento da PA induzida por DH (Boustany *et al.*, 2005). Além disso, foi demonstrado que a Ang II atua nos receptores AT_1 no tronco encefálico e no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), aumentando o PAM (Vieira *et al.*, 2010; De Kloet *et al.*, 2013; Speretta *et al.*, 2016b; Speretta *et al.*, 2019) e o bloqueio de AT_1 no núcleo do trato solitário, diminui a PAM e restaura a sensibilidade do barorreflexo em ratos alimentados com uma DH (Speretta *et al.* 2019). É importante ressaltar que a barreira hematoencefálica parece estar alterada na obesidade (De Kloet *et al.*, 2013), e a Ang II sistêmica pode aumentar as respostas do SRA no SNC. Provavelmente, as alterações cardiovasculares nos grupos DH podem ter sido influenciadas, ao menos em parte, pela atuação sistêmica e central da Ang II.

A DH também aumentou o tecido adiposo e provocou outras alterações metabólicas, como, o aumento dos níveis de glicose no sangue, e alterações no perfil lipídico do sangue e do fígado associados ao aumento do tecido adiposo, o que está em linha com estudos anteriores (Estadella *et al.*, 2004; Speretta *et al.*, 2012; Speretta *et al.*, 2016b). Sabe-se que o acúmulo de gordura, especialmente no tecido adiposo visceral, provoca importantes alterações metabólicas, incluindo a liberação excessiva de ácidos graxos livres, que são armazenados em outros tecidos, e aumenta a síntese e a secreção de adipocinas pró-inflamatórias pelos adipócitos. Essas mudanças estão diretamente associadas ao desenvolvimento de DCV (Despres *et al.*, 2006).

Os aumentos na PAM observados no grupo ECV-DP estão de acordo com estudos prévios que também identificaram aumentos na PAM de roedores submetidos ao protocolo

ECV (Grippe *et al.*, 2003; Grippe, 2009; Costa-Ferreira *et al.*, 2016). Embora não tenhamos encontrado efeito do ECV na FC, observamos um desequilíbrio autonômico cardíaco nesses ratos, revelado pelo aumento do tônus do SNS para os vasos e o coração. Em um estudo anterior com um protocolo de estresse crônico diferente, uma potenciação de longo prazo foi revelada nos gânglios do SNS dos ratos (Alkadhi *et al.*, 2005). Este aumento na eficácia sináptica, pode ser um mecanismo subjacente ao aumento do tônus simpático no grupo ECV. Encontramos também uma diminuição na atividade barorreflexa no grupo ECV-DP. Assim, o comprometimento do barorreflexo induzido pelo ECV provavelmente está relacionado à hiperatividade do SNS. Além disso, como dito acima, a associação entre o comprometimento da atividade barorreflexa e o aumento do SNS pode explicar, pelo menos em parte, o aumento da PAM encontrado nestes ratos.

O papel da disfunção vascular na fisiopatologia da hipertensão está bem estabelecido (Crestani, 2016). No entanto, não observamos qualquer alteração na resposta da pressão arterial ao agente vasoconstritor fenilefrina e ao fármaco vasodilatador NPS. Ausência de respostas também foi observada anteriormente, onde tanto o ECV (Costa-Ferreira *et al.*, 2016) quanto a DH (Fardin *et al.*, 2012) não promoveram alterações na reatividade vascular em resposta a agentes vasoativos em ratos. Embora não tenhamos encontrado alterações na função vascular, inclusive na concentração de nitrato na aorta, encontramos um aumento na LF da PAS, que é um marcador indireto da atividade vascular do SNS (Pagani *et al.*, 1997) nos grupos controle-DH e ECV-DH. Portanto, o aumento do tônus vasomotor simpático também parece contribuir para o aumento evocado pela DH na PAM.

8.0 CONCLUSÃO

Em resumo, a DH provocou distúrbios metabólicos e alterações endócrinas, que não foram afetadas pelo ECV. Por outro lado, os efeitos ansiogênicos evocados pelo ECV não foram afetados pela DH. Além disso, tanto a DH como o ECV provocaram várias alterações cardiovasculares e autonômicas, incluindo aumento da pressão arterial, aumento da atividade vascular e cardíaca do SNS e comprometimento do barorreflexo. Sinergismo relevante entre DH e ECV foi identificado na resposta do SNS cardíaco, bem como nos valores basais da FC, o que pode aumentar o risco de DCV. Os mecanismos de alterações cardiovasculares evocadas pelo ECV parecem ser proeminentemente mediados por mecanismos neurogênicos,

por meio de alterações autonômicas e barorreflexas, enquanto que a DH evoca alterações cardiovasculares por mecanismos neurais e neuroendócrinos. Em conjunto, esses dados indicam que o consumo de uma dieta hiperlipídica associada ao estresse emocional, aumenta o risco de DCV, mas sem afetar a ansiedade evocada pelo ECV e as alterações metabólicas e endócrinas relacionadas à DH.

9.0 DESDOBRAMENTOS DO ESTUDO

De maneira geral, nossos dados demonstram de forma consistente, um forte componente neurogênico e endócrino, no desenvolvimento das alterações cardiovasculares induzidas pelo estresse crônico e/ou DH, no entanto, ainda há lacunas a serem esclarecidas, tais como: a realização de uma análise do SNC, através de uma imunohistoquímica para identificação de uma possível hiperativação dos neurônios adrenérgicos, de áreas como o núcleo paraventricular do hipotálamo, em resposta ao estresse e/ou DH. Outro desdobramento a ser respondido é a investigação dos efeitos do estresse agudo em ratos alimentados com uma DH, e se estes são similares ou mediados pelos mesmos mecanismos dos efeitos cardiovasculares do ECV. Do ponto de vista translacional, mais estudos são necessários, entretanto, é facilmente reconhecido que o estilo de vida moderno, está fortemente associado ao aumento da obesidade e do estresse psicológico, dessa forma, é de trivial importância, uma melhor compreensão dos mecanismos por de trás desses fatores, seus efeitos, e possíveis intervenções como opções de tratamento, já que, doenças cardiovasculares ainda são as principais causas de morte no mundo.

10.0 REFERÊNCIAS

- ALKADHI, K. A.; ALZOUBI, K. H.; ALEISA, A. M.; TANNER, F. L.; NIMER, A. S. Psychosocial stress-induced hypertension results from in vivo expression of long-term potentiation in rat sympathetic ganglia. *Neurobiol Dis*, v. 20, n. 3, p. 849-57, Dec 2005.
- ANDERSON, K. E.; ROSNER, W.; KHAN, M. S.; NEW, M. I.; PANG, S. Y.; WISSEL, P. S.; KAPPAS, A. Diet-hormone interactions: protein/carbohydrate ratio alters reciprocally the plasma levels of testosterone and cortisol and their respective binding globulins in man. *Life Sci*, v. 40, n. 18, p. 1761-8, May 4 1987.
- ARMITAGE, J. A.; BURKE, S. L.; PRIOR, L. J.; BARZEL, B.; EIKELIS, N.; LIM, K.; HEAD, G. A. Rapid onset of renal sympathetic nerve activation in rabbits fed a high-fat diet. *Hypertension*, v. 60, n. 1, p. 163-71, Jul 2012.
- ASLANI, S.; VIEIRA, N.; MARQUES, F.; COSTA, P. S.; SOUSA, N.; PALHA, J. A. The effect of high-fat diet on rat's mood, feeding behavior and response to stress. *Transl Psychiatry*, v. 5, p. e684, Nov 24 2015.
- AUPPERLE, R. L.; PAULUS, M. P. Neural systems underlying approach and avoidance in anxiety disorders. *Dialogues Clin Neurosci*, v. 12, n. 4, p. 517-31, 2010.
- BARBOSA, R. M.; SPERETTA, G. F.; DIAS, D. P. M.; RUCHAYA, P. J.; LI, H.; MENANI, J. V.; SUMNERS, C.; COLOMBARI, E.; COLOMBARI, D. S. A. Increased Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Nucleus of the Solitary Tract Attenuates Renovascular Hypertension in Rats. *Am J Hypertens*, v. 30, n. 4, p. 435-443, Apr 1 2017.
- BELL, J. A.; KIVIMAKI, M.; HAMER, M. Metabolically healthy obesity and risk of incident type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Obes Rev*, v. 15, n. 6, p. 504-15, Jun 2014.
- BERTINIERI, G.; DI RIENZO, M.; CAVALLAZZI, A.; FERRARI, A. U.; PEDOTTI, A.; MANCIA, G. Evaluation of baroreceptor reflex by blood pressure monitoring in unanesthetized cats. *Am J Physiol*, v. 254, n. 2 Pt 2, p. H377-83, Feb 1988.
- BHUPATHIRAJU, S. N.; HU, F. B. Epidemiology of Obesity and Diabetes and Their Cardiovascular Complications. *Circ Res*, v. 118, n. 11, p. 1723-35, May 27 2016.
- BLACK, P. H.; GARBUTT, L. D. Stress, inflammation and cardiovascular disease. *J Psychosom Res*, v. 52, n. 1, p. 1-23, Jan 2002.
- BLAIR-WEST, J. R.; CAREY, K. D.; DENTON, D. A.; WEISINGER, R. S.; SHADE, R. E. Evidence that brain angiotensin II is involved in both thirst and sodium appetite in baboons. *Am J Physiol*, v. 275, n. 5 Pt 2, p. R1639-46, Nov 1998.

BLUME, A.; LEBRUN, C. J.; HERDEGEN, T.; BRAVO, R.; LINZ, W.; MOLLENHOFF, E.; UNGER, T. Increased brain transcription factor expression by angiotensin in genetic hypertension. *Hypertension*, v. 29, n. 2, p. 592-8, Feb 1997.

BOUSTANY, C. M.; BROWN, D. R.; RANDALL, D. C.; CASSIS, L. A. AT1-receptor antagonism reverses the blood pressure elevation associated with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 289, n. 1, p. R181-6, Jul 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

Brotman, D. J., Golden, S. H., & Wittstein, I. S. (2007). *The cardiovascular toll of stress. The Lancet*, 370(9592), 1089–100.

BULOS, E. M.; POBBE, R. L.; ZANGROSSI, H., JR. Behavioral consequences of predator stress in the rat elevated T-maze. *Physiol Behav*, v. 146, p. 28-35, Jul 1 2015.

CARRIVE, P. Dual activation of cardiac sympathetic and parasympathetic components during conditioned fear to context in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. 33, n. 12, p. 1251-4, Dec 2006.

CHALMERS, J. A.; QUINTANA, D. S.; ABBOTT, M. J.; KEMP, A. H. Anxiety Disorders are Associated with Reduced Heart Rate Variability: A Meta-Analysis. *Front Psychiatry*, v. 5, p. 80, 2014.

CHAN, J.L.; Heist, K.; DEPAOLI, AM.; VELDHUIS, JD.; MANTZOROS, CS. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J Clin Invest*, 2003; 111(9):1409-21.

CHARNEY, D. S.; MANJI, H. K. Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. *Sci STKE*, v. 2004, n. 225, p. re5, Mar 16 2004.

CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*, v. 267, n. 9, p. 1244-52, Mar 4 1992.

CIRIELLO, J. Plasma leptin inhibits the response of nucleus of the solitary tract neurons to aortic baroreceptor stimulation. *Brain Res Bull*, v. 97, p. 96-103, Aug 2013.

COLLABORATION, N. C. D. R. F. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet*, v. 387, n. 10026, p. 1377-1396, Apr 2 2016.

CONSIDINE RV.; SINHA MK.; HEIMAN ML.; KRIAUCIUNAS A.; STEPHENS TW.; NYCE MR.; OHANNESIAN JP.; MARCO CC.; MCKEE LJ.; BAUER TL. Serum

immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med.* 1996 Feb 1; 334(5):292-5.

CONWAY, J. Vascular reactivity in experimental hypertension measured after hexamethonium. *Circulation*, v. 17, n. 4, Part 2, p. 807-10, Apr 1958.

COSTA-FERREIRA, W.; VIEIRA, J. O.; ALMEIDA, J.; GOMES-DE-SOUZA, L.; CRESTANI, C. C. Involvement of Type 1 Angiotensin II Receptor (AT1) in Cardiovascular Changes Induced by Chronic Emotional Stress: Comparison between Homotypic and Heterotypic Stressors. *Front Pharmacol*, v. 7, p. 262, 2016.

COWLEY, A. W., JR.; GUYTON, A. C. Quantification of intermediate steps in the renin-angiotensin-vasoconstrictor feedback loop in the dog. *Circ Res*, v. 30, n. 5, p. 557-66, May 1972.

CRESTANI, C. C. Emotional Stress and Cardiovascular Complications in Animal Models: A Review of the Influence of Stress Type. *Front Physiol*, v. 7, p. 251, 2016.

CRESTANI, C. C.; ALVES, F. H.; BUSNARDO, C.; RESSTEL, L. B.; CORREA, F. M. N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus modulate cardiac component of the baroreflex in unanesthetized rats. *Neurosci Res*, v. 67, n. 4, p. 317-26, Aug 2010.

CRESTANI, C. C.; TAVARES, R. F.; GUIMARAES, F. S.; CORREA, F. M.; JOCA, S. R.; RESSTEL, L. B. Chronic fluoxetine treatment alters cardiovascular functions in unanesthetized rats. *Eur J Pharmacol*, v. 670, n. 2-3, p. 527-33, Nov 30 2011.

DA SILVA, A. A.; DO CARMO, J. M.; DUBINION, J. H.; BASSI, M.; MOKHTARPOURIANI, K.; HAMZA, S. M.; HALL, J. E. Chronic central nervous system MC3/4R blockade attenuates hypertension induced by nitric oxide synthase inhibition but not by angiotensin II infusion. *Hypertension*, v. 65, n. 1, p. 171-7, Jan 2015.

DE HEREDIA, F. P.; GOMEZ-MARTINEZ, S.; MARCOS, A. Obesity, inflammation and the immune system. *Proc Nutr Soc*, v. 71, n. 2, p. 332-8, May 2012.

DE KLOET, A. D.; KRAUSE, E. G.; SHI, P. D.; ZUBCEVIC, J.; RAIZADA, M. K.; SUMNERS, C. Neuroimmune communication in hypertension and obesity: a new therapeutic angle? *Pharmacol Ther*, v. 138, n. 3, p. 428-40, Jun 2013.

DE KLOET, A. D.; LIU, M.; RODRIGUEZ, V.; KRAUSE, E. G.; SUMNERS, C. Role of neurons and glia in the CNS actions of the renin-angiotensin system in cardiovascular control. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 309, n. 5, p. R444-58, Sep 2015.

DESPRES, J. P.; LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, v. 444, n. 7121, p. 881-7, Dec 14 2006.

Dobbs, R. *et al. How the world could better fight obesity* (McKinsey Global Institute, 2014).

DO CARMO, J. M.; DA SILVA, A. A.; WANG, Z.; FANG, T.; ABERDEIN, N.; DE LARA RODRIGUEZ, C. E.; HALL, J. E. Obesity-Induced Hypertension: Brain Signaling Pathways. *Curr Hypertens Rep*, v. 18, n. 7, p. 58, Jul 2016.

DREBER, H.; REYNISDOTTIR, S.; ANGELIN, B.; TYNELIUS, P.; RASMUSSEN, F.; HEMMINGSSON, E. Mental distress in treatment seeking young adults (18-25 years) with severe obesity compared with population controls of different body mass index levels: cohort study. *Clin Obes*, v. 7, n. 1, p. 1-10, Feb 2017.

DUARTE, J. O.; CRUZ, F. C.; LEAO, R. M.; PLANETA, C. S.; CRESTANI, C. C. Stress vulnerability during adolescence: comparison of chronic stressors in adolescent and adult rats. *Psychosom Med*, v. 77, n. 2, p. 186-99, Feb-Mar 2015.

DUBE, L.; LEBEL, J. L.; LU, J. Affect asymmetry and comfort food consumption. *Physiol Behav*, v. 86, n. 4, p. 559-67, Nov 15 2005.

ELIAS, L. L.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, P. C.; MOREIRA, A. C. Effect of plasma osmolality on pituitary-adrenal responses to corticotropin-releasing hormone and atrial natriuretic peptide changes in central diabetes insipidus. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 82, n. 4, p. 1243-7, Apr 1997.

EPEL, E.; JIMENEZ, S.; BROWNELL, K.; STROUD, L.; STONEY, C.; NIAURA, R. Are stress eaters at risk for the metabolic syndrome? *Ann N Y Acad Sci*, v. 1032, p. 208-10, Dec 2004.

ESTADELLA, D.; OYAMA, L. M.; DAMASO, A. R.; RIBEIRO, E. B.; OLLER DO NASCIMENTO, C. M. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition*, v. 20, n. 2, p. 218-24, Feb 2004.

FAITH, M. S.; BUTRYN, M.; WADDEN, T. A.; FABRICATORE, A.; NGUYEN, A. M.; HEYMSFIELD, S. B. Evidence for prospective associations among depression and obesity in population-based studies. *Obes Rev*, v. 12, n. 5, p. e438-53, May 2011.

FARDIN, N. M.; OYAMA, L. M.; CAMPOS, R. R. Changes in baroreflex control of renal sympathetic nerve activity in high-fat-fed rats as a predictor of hypertension. *Obesity (Silver Spring)*, v. 20, n. 8, p. 1591-7, Aug 2012.

FAROOQI, I. S.; O'RAHILLY, S. Leptin: a pivotal regulator of human energy homeostasis. *Am J Clin Nutr*, v. 89, n. 3, p. 980S-984S, Mar 2009.

FARRELL, T. G.; PAUL, V.; CRIPPS, T. R.; MALIK, M.; BENNETT, E. D.; WARD, D.; CAMM, A. J. Baroreflex sensitivity and electrophysiological correlates in patients after acute myocardial infarction. *Circulation*, v. 83, n. 3, p. 945-52, Mar 1991.

FLUES, K.; PAULINI, J.; BRITO, S.; SANCHES, I. C.; CONSOLIM-COLOMBO, F.; IRIGOYEN, M. C.; DE ANGELIS, K. Exercise training associated with estrogen therapy

induced cardiovascular benefits after ovarian hormones deprivation. *Maturitas*, v. 65, n. 3, p. 267-71, Mar 2010.

GARFIELD, L. D.; SCHERRER, J. F.; HAUPTMAN, P. J.; FREEDLAND, K. E.; CHRUSCIEL, T.; BALASUBRAMANIAN, S.; CARNEY, R. M.; NEWCOMER, J. W.; OWEN, R.; BUCHOLZ, K. K.; LUSTMAN, P. J. Association of anxiety disorders and depression with incident heart failure. *Psychosom Med*, v. 76, n. 2, p. 128-36, Feb 2014.

GARIEPY, G.; NITKA, D.; SCHMITZ, N. The association between obesity and anxiety disorders in the population: a systematic review and meta-analysis. *Int J Obes (Lond)*, v. 34, n. 3, p. 407-19, Mar 2010.

GHIADONI, L.; TADDEI, S.; VIRDIS, A. Hypertension and endothelial dysfunction: therapeutic approach. *Curr Vasc Pharmacol*, v. 10, n. 1, p. 42-60, Jan 2012.

GIBSON, E. L. Emotional influences on food choice: sensory, physiological and psychological pathways. *Physiol Behav*, v. 89, n. 1, p. 53-61, Aug 30 2006.

GOEBEL, M. U.; MILLS, P. J.; IRWIN, M. R.; ZIEGLER, M. G. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production after acute psychological stress, exercise, and infused isoproterenol: differential effects and pathways. *Psychosom Med*, v. 62, n. 4, p. 591-8, Jul-Aug 2000.

GONZALEZ-MUNIESA, P.; GARCIA-GERIQUE, L.; QUINTERO, P.; ARRIAZA, S.; LOPEZ-PASCUAL, A.; MARTINEZ, J. A. Effects of Hyperoxia on Oxygen-Related Inflammation with a Focus on Obesity. *Oxid Med Cell Longev*, v. 2015, p. 8957827, 2015.

GONZALEZ-MUNIESA, P.; MARTINEZ-GONZALEZ, M. A.; HU, F. B.; DESPRES, J. P.; MATSUZAWA, Y.; LOOS, R. J. F.; MORENO, L. A.; BRAY, G. A.; MARTINEZ, J. A. Obesity. *Nat Rev Dis Primers*, v. 3, p. 17034, Jun 15 2017.

GOTTDIENER, J. S.; KOP, W. J.; HAUSNER, E.; MCCENEY, M. K.; HERRINGTON, D.; KRANTZ, D. S. Effects of mental stress on flow-mediated brachial arterial dilation and influence of behavioral factors and hypercholesterolemia in subjects without cardiovascular disease. *Am J Cardiol*, v. 92, n. 6, p. 687-91, Sep 15 2003.

GRIPPO, A. J. Mechanisms underlying altered mood and cardiovascular dysfunction: the value of neurobiological and behavioral research with animal models. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 33, n. 2, p. 171-80, Feb 2009.

GRIPPO, A. J.; BELTZ, T. G.; JOHNSON, A. K. Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression. *Physiol Behav*, v. 78, n. 4-5, p. 703-10, Apr 2003.

GRIPPO, A. J.; MOFFITT, J. A.; JOHNSON, A. K. Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 282, n. 5, p. R1333-41, May 2002.

_____. Evaluation of baroreceptor reflex function in the chronic mild stress rodent model of depression. *Psychosom Med*, v. 70, n. 4, p. 435-43, May 2008.

GROBE, J. L.; XU, D.; SIGMUND, C. D. An intracellular renin-angiotensin system in neurons: fact, hypothesis, or fantasy. *Physiology (Bethesda)*, v. 23, p. 187-93, Aug 2008.

GROESZ, L. M.; MCCOY, S.; CARL, J.; SASLOW, L.; STEWART, J.; ADLER, N.; LARAIA, B.; EPEL, E. What is eating you? Stress and the drive to eat. *Appetite*, v. 58, n. 2, p. 717-21, Apr 2012.

GULLETTE, E. C.; BLUMENTHAL, J. A.; BABYAK, M.; JIANG, W.; WAUGH, R. A.; FRID, D. J.; O'CONNOR, C. M.; MORRIS, J. J.; KRANTZ, D. S. Effects of mental stress on myocardial ischemia during daily life. *JAMA*, v. 277, n. 19, p. 1521-6, May 21 1997.

HACKENTHAL, E.; PAUL, M.; GANTEN, D.; TAUGNER, R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev*, v. 70, n. 4, p. 1067-116, Oct 1990.

HAINES, A. P.; IMESON, J. D.; MEADE, T. W. Phobic anxiety and ischaemic heart disease. *Br Med J (Clin Res Ed)*, v. 295, n. 6593, p. 297-9, Aug 1 1987.

HALFORD, J. C. Pharmacology of appetite suppression: implication for the treatment of obesity. *Curr Drug Targets*, v. 2, n. 4, p. 353-70, Dec 2001.

HALL, J. E.; DA SILVA, A. A.; DO CARMO, J. M.; DUBINION, J.; HAMZA, S.; MUNUSAMY, S.; SMITH, G.; STEC, D. E. Obesity-induced hypertension: role of sympathetic nervous system, leptin, and melanocortins. *J Biol Chem*, v. 285, n. 23, p. 17271-6, Jun 4 2010.

HALL, J. E.; DO CARMO, J. M.; DA SILVA, A. A.; WANG, Z.; HALL, M. E. Obesity-induced hypertension: interaction of neurohumoral and renal mechanisms. *Circ Res*, v. 116, n. 6, p. 991-1006, Mar 13 2015.

HAMPL, V.; WALTERS, C. L.; ARCHER, S. L. Determination of nitric oxide by the chemiluminescence reaction with ozone. New York: 1996.

HANKE, M. L.; POWELL, N. D.; STINER, L. M.; BAILEY, M. T.; SHERIDAN, J. F. Beta adrenergic blockade decreases the immunomodulatory effects of social disruption stress. *Brain Behav Immun*, v. 26, n. 7, p. 1150-9, Oct 2012.

HASLAM, D. W.; JAMES, W. P. Obesity. *Lancet*, v. 366, n. 9492, p. 1197-209, Oct 1 2005.

HEAD, G. A.; MCCARTY, R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. *J Auton Nerv Syst*, v. 21, n. 2-3, p. 203-13, Dec 1987.

HEINRICHS, S. C.; RICHARD, D. The role of corticotropin-releasing factor and urocortin in the modulation of ingestive behavior. *Neuropeptides*, v. 33, n. 5, p. 350-9, Oct 1999.

HILZENDEGER, A. M.; MORGAN, D. A.; BROOKS, L.; DELLSPERGER, D.; LIU, X.; GROBE, J. L.; RAHMOUNI, K.; SIGMUND, C. D.; MARK, A. L. A brain leptin-renin angiotensin system interaction in the regulation of sympathetic nerve activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 303, n. 2, p. H197-206, Jul 15 2012.

HIUGE-SHIMIZU, A.; KISHIDA, K.; FUNAHASHI, T.; ISHIZAKA, Y.; OKA, R.; OKADA, M.; SUZUKI, S.; TAKAYA, N.; NAKAGAWA, T.; FUKUI, T.; FUKUDA, H.; WATANABE, N.; YOSHIKUMI, T.; NAKAMURA, T.; MATSUZAWA, Y.; YAMAKADO, M.; SHIMOMURA, I. Absolute value of visceral fat area measured on computed tomography scans and obesity-related cardiovascular risk factors in large-scale Japanese general population (the VACATION-J study). *Ann Med*, v. 44, n. 1, p. 82-92, Feb 2012.

HODGE, R. L.; LOWE, R. D.; VANE, J. R. The effects of alteration of blood-volume on the concentration of circulating angiotensin in anaesthetized dogs. *J Physiol*, v. 185, n. 3, p. 613-26, Aug 1966.

HRYHORCZUK, C.; SHARMA, S.; FULTON, S. E. Metabolic disturbances connecting obesity and depression. *Front Neurosci*, v. 7, p. 177, Oct 7 2013.

HUANG, Q. H.; TAKAKI, A.; ARIMURA, A. Central noradrenergic system modulates plasma interleukin-6 production by peripheral interleukin-1. *Am J Physiol*, v. 273, n. 2 Pt 2, p. R731-8, Aug 1997.

INOUE, N. Stress and atherosclerotic cardiovascular disease. *J Atheroscler Thromb*, v. 21, n. 5, p. 391-401, 2014.

JOELS, M.; BARAM, T. Z. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci*, v. 10, n. 6, p. 459-66, Jun 2009.

KAWACHI, I.; SPARROW, D.; VOKONAS, P. S.; WEISS, S. T. Symptoms of anxiety and risk of coronary heart disease. The Normative Aging Study. *Circulation*, v. 90, n. 5, p. 2225-9, Nov 1994.

KNOX, S. S.; UVNAS-MOBERG, K. Social isolation and cardiovascular disease: an atherosclerotic pathway? *Psychoneuroendocrinology*, v. 23, n. 8, p. 877-90, Nov 1998.

KOLETZKO, B.; SYMONDS, M. E.; OLSEN, S. F.; EARLY NUTRITION PROGRAMMING, P.; EARLY NUTRITION, A. Programming research: where are we and where do we go from here? *Am J Clin Nutr*, v. 94, n. 6 Suppl, p. 2036S-2043S, Dec 2011.

KORNER, P. I.; SHAW, J.; WEST, M. J.; OLIVER, J. R. Central nervous system control of baroreceptor reflexes in the rabbit. *Circ Res*, v. 31, n. 5, p. 637-52, Nov 1972.

KUO, L. E.; KITLINSKA, J. B.; TILAN, J. U.; LI, L.; BAKER, S. B.; JOHNSON, M. D.; LEE, E. W.; BURNETT, M. S.; FRICKE, S. T.; KVETNANSKY, R.; HERZOG, H.; ZUKOWSKA, Z. Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat Med*, v. 13, n. 7, p. 803-11, Jul 2007.

KYROU, I.; TSIGOS, C. Chronic stress, visceral obesity and gonadal dysfunction. *Hormones (Athens)*, v. 7, n. 4, p. 287-93, Oct-Dec 2008.

LE LAY, S.; SIMARD, G.; MARTINEZ, M. C.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Oxidative stress and metabolic pathologies: from an adipocentric point of view. *Oxid Med Cell Longev*, v. 2014, p. 908539, 2014.

LEITE, R. D.; DURIGAN RDE, C.; DE SOUZA LINO, A. D.; DE SOUZA CAMPOS, M. V.; SOUZA, M.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; BOUSKELA, E.; KRAEMER-AGUIAR, L. G. Resistance training may concomitantly benefit body composition, blood pressure and muscle MMP-2 activity on the left ventricle of high-fat fed diet rats. *Metabolism*, v. 62, n. 10, p. 1477-84, Oct 2013.

LIANG, C. S.; GAVRAS, H. Renin-angiotensin system inhibition in conscious dogs during acute hypoxemia. Effects on systemic hemodynamics, regional blood flows, and tissue metabolism. *J Clin Invest*, v. 62, n. 5, p. 961-70, Nov 1978.

LIM, K.; BURKE, S. L.; HEAD, G. A. Obesity-related hypertension and the role of insulin and leptin in high-fat-fed rabbits. *Hypertension*, v. 61, n. 3, p. 628-34, Mar 2013.

LIND, L.; JOHANSSON, K.; HALL, J. The effects of mental stress and the cold pressure test on flow-mediated vasodilation. *Blood Press*, v. 11, n. 1, p. 22-7, 2002.

LIU, H.; WAITE, L. Bad marriage, broken heart? Age and gender differences in the link between marital quality and cardiovascular risks among older adults. *J Health Soc Behav*, v. 55, n. 4, p. 403-23, Dec 2014.

LIU, H.; YANG, Z.; HU, J.; LUO, Y.; ZHU, L.; YANG, H.; LI, G. Improvement of thoracic aortic vasoreactivity by continuous and intermittent exercise in high-fat diet-induced obese rats. *Biomed Rep*, v. 3, n. 4, p. 527-532, Jul 2015.

LÖNNQVIST, F.; ARNER P.; NORDFORS L.; SCHALLING M. Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nat Med*. 1995 Sep; 1(9):950-3.

MANSUR, R. B.; BRIETZKE, E.; MCINTYRE, R. S. Is there a "metabolic-mood syndrome"? A review of the relationship between obesity and mood disorders. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 52, p. 89-104, May 2015.

MARK, A. L. Selective leptin resistance revisited. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 305, n. 6, p. R566-81, Sep 15 2013.

MCCANN, B. S.; WARNICK, G. R.; KNOPP, R. H. Changes in plasma lipids and dietary intake accompanying shifts in perceived workload and stress. *Psychosom Med*, v. 52, n. 1, p. 97-108, Jan-Feb 1990.

MECAWI, A. S.; VILHENA-FRANCO, T.; FONSECA, F. V.; REIS, L. C.; ELIAS, L. L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. The role of angiotensin II on sodium appetite after a low-sodium diet. *J Neuroendocrinol*, v. 25, n. 3, p. 281-91, Mar 2013.

- MILES, H. H.; COBB, S. Neurocirculatory asthenia, anxiety and neurosis. *N Engl J Med*, v. 245, n. 19, p. 711-9, Nov 8 1951.
- MORLEY, J. E.; LEVINE, A. S.; GOSNELL, B. A.; KNEIP, J.; GRACE, M. Effect of neuropeptide Y on ingestive behaviors in the rat. *Am J Physiol*, v. 252, n. 3 Pt 2, p. R599-609, Mar 1987.
- MULROW, P. J.; GANONG, W. F. Role of the kidney and the renin-angiotensin system in the response of aldosterone secretion to hemorrhage. *Circulation*, v. 25, p. 213-20, Jan 1962.
- NEGRAO, C. E.; MOREIRA, E. D.; SANTOS, M. C.; FARAH, V. M.; KRIEGER, E. M. Vagal function impairment after exercise training. *J Appl Physiol* (1985), v. 72, n. 5, p. 1749-53, May 1992.
- NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S. P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem*, v. 220, n. 2, p. 403-9, Aug 1 1994.
- NEVES VJ, MOURA MJ, TAMASCIA ML, FERREIRA R, SILVA NS, COSTA R, MONTEMOR PL, NARVAES EA, BERNARDES CF, NOVAES PD, MARCONDES FK. Proatherosclerotic effects of chronic stress in male rats: altered phenylephrine sensitivity and nitric oxide synthase activity of aorta and circulating lipids. *Stress* 2009; 12: 3207-7.
- ORTOLANI, D.; OYAMA, L. M.; FERRARI, E. M.; MELO, L. L.; SPADARI-BRATFISCH, R. C. Effects of comfort food on food intake, anxiety-like behavior and the stress response in rats. *Physiol Behav*, v. 103, n. 5, p. 487-92, Jul 6 2011.
- OUCHI, N.; PARKER, J. L.; LUGUS, J. J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*, v. 11, n. 2, p. 85-97, Feb 2011.
- OZCAN, U.; CAO, Q.; YILMAZ, E.; LEE, A. H.; IWAKOSHI, N. N.; OZDELEN, E.; TUNCMAN, G.; GORGUN, C.; GLIMCHER, L. H.; HOTAMISLIGIL, G. S. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*, v. 306, n. 5695, p. 457-61, Oct 15 2004.
- PAGANI, M.; MONTANO, N.; PORTA, A.; MALLIANI, A.; ABOUD, F. M.; BIRKETT, C.; SOMERS, V. K. Relationship between spectral components of cardiovascular variabilities and direct measures of muscle sympathetic nerve activity in humans. *Circulation*, v. 95, n. 6, p. 1441-8, Mar 18 1997.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, v. 14, n. 3, p. 149-67, Aug 1985.
- PETROVICH, G. D.; LOUGEE, M. A. Sex differences in fear-induced feeding cessation: prolonged effect in female rats. *Physiol Behav*, v. 104, n. 5, p. 996-1001, Oct 24 2011.

PINHEIRO, A. R.; CUNHA, A. R.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Beneficial effects of physical exercise on hypertension and cardiovascular adverse remodeling of diet-induced obese rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, v. 17, n. 5, p. 365-75, Jun 2007.

PRIOR, L. J.; EIKELIS, N.; ARMITAGE, J. A.; DAVERN, P. J.; BURKE, S. L.; MONTANI, J. P.; BARZEL, B.; HEAD, G. A. Exposure to a high-fat diet alters leptin sensitivity and elevates renal sympathetic nerve activity and arterial pressure in rabbits. *Hypertension*, v. 55, n. 4, p. 862-8, Apr 2010.

RAHMOUNI, K. Obesity-associated hypertension: recent progress in deciphering the pathogenesis. *Hypertension*, v. 64, n. 2, p. 215-21, Aug 2014.

RAMIREZ, K.; NIRLAULA, A.; SHERIDAN, J. F. GABAergic modulation with classical benzodiazepines prevent stress-induced neuro-immune dysregulation and behavioral alterations. *Brain Behav Immun*, v. 51, p. 154-68, Jan 2016.

REPPUCCI, C. J.; KUTHYAR, M.; PETROVICH, G. D. Contextual fear cues inhibit eating in food-deprived male and female rats. *Appetite*, v. 69, p. 186-95, Oct 2013.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 21, n. 6, p. 801-10, Nov 1997.

ROSENGREN, A.; HAWKEN, S.; OUNPUU, S.; SLIWA, K.; ZUBAID, M.; ALMAHMEED, W. A.; BLACKETT, K. N.; SITTHI-AMORN, C.; SATO, H.; YUSUF, S.; INVESTIGATORS, I. Association of psychosocial risk factors with risk of acute myocardial infarction in 11119 cases and 13648 controls from 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*, v. 364, n. 9438, p. 953-62, Sep 11-17 2004.

ROZANSKI, A.; BLUMENTHAL, J. A.; KAPLAN, J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation*, v. 99, n. 16, p. 2192-217, Apr 27 1999.

SCHACHTER, S.; GOLDMAN, R.; GORDON, A. Effects of fear, food deprivation, and obesity on eating. *J Pers Soc Psychol*, v. 10, n. 2, p. 91-7, Oct 1968.

SCHARF, S. H.; SCHMIDT, M. V. Animal models of stress vulnerability and resilience in translational research. *Curr Psychiatry Rep*, v. 14, n. 2, p. 159-65, Apr 2012.

SCHWARTZ, B. G.; FRENCH, W. J.; MAYEDA, G. S.; BURSTEIN, S.; ECONOMIDES, C.; BHANDARI, A. K.; CANNOM, D. S.; KLONER, R. A. Emotional stressors trigger cardiovascular events. *Int J Clin Pract*, v. 66, n. 7, p. 631-9, Jul 2012.

SGOIFO, A.; CARNEVALI, L.; GRIPPO, A. J. The socially stressed heart. Insights from studies in rodents. *Neurosci Biobehav Rev*, v. 39, p. 51-60, Feb 2014. Singh, A. & Williams, G. H. *Textbook of Nephro- Endocrinology* 2nd edn (Academic Press, 2017).

SIMAS, B. B.; NUNES, E. A.; CRESTANI, C. C.; SPERETTA, G. F. Cardiovascular and metabolic consequences of the association between chronic stress and high-fat diet in rats. *Stress*, p. 1-10, Feb 10 2018.

SIMONDS, S. E.; PRYOR, J. T.; RAVUSSIN, E.; GREENWAY, F. L.; DILEONE, R.; ALLEN, A. M.; BASSI, J.; ELMQUIST, J. K.; KEOGH, J. M.; HENNING, E.; MYERS, M. G., JR.; LICINIO, J.; BROWN, R. D.; ENRIORI, P. J.; O'RAHILLY, S.; STERNSON, S. M.; GROVE, K. L.; SPANSWICK, D. C.; FAROOQI, I. S.; COWLEY, M. A. Leptin mediates the increase in blood pressure associated with obesity. *Cell*, v. 159, n. 6, p. 1404-16, Dec 4 2014.

SPERETTA, G. F.; ROSANTE, M. C.; DUARTE, F. O.; LEITE, R. D.; LINO, A. D.; ANDRE, R. A.; SILVESTRE, J. G.; ARAUJO, H. S.; DUARTE, A. C. The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats. *Clinics (Sao Paulo)*, v. 67, n. 12, p. 1469-77, Dec 2012.

SPERETTA, G. F.; RUCHAYA, P. J.; DELBIN, M. A.; MELO, M. R.; LI, H.; MENANI, J. V.; SUMNERS, C.; COLOMBARI, E.; BASSI, M.; COLOMBARI, D. S. A. Importance of AT1 and AT2 receptors in the nucleus of the solitary tract in cardiovascular responses induced by a high-fat diet. *Hypertens Res*, Jan 10 2019.

SPERETTA, G. F.; SILVA, A. A.; VENDRAMINI, R. C.; ZANESCO, A.; DELBIN, M. A.; MENANI, J. V.; BASSI, M.; COLOMBARI, E.; COLOMBARI, D. S. Resistance training prevents the cardiovascular changes caused by high-fat diet. *Life Sci*, Jan 8 2016a.

_____. Resistance training prevents the cardiovascular changes caused by high-fat diet. *Life Sci*, v. 146, p. 154-62, Feb 1 2016b.

SPIEKER, L. E.; HURLIMANN, D.; RUSCHITZKA, F.; CORTI, R.; ENSELEIT, F.; SHAW, S.; HAYOZ, D.; DEANFIELD, J. E.; LUSCHER, T. F.; NOLL, G. Mental stress induces prolonged endothelial dysfunction via endothelin-A receptors. *Circulation*, v. 105, n. 24, p. 2817-20, Jun 18 2002.

STECKELINGS, U.; LEBRUN, C.; QADRI, F.; VELTMAR, A.; UNGER, T. Role of brain angiotensin in cardiovascular regulation. *J Cardiovasc Pharmacol*, v. 19 Suppl 6, p. S72-9, 1992.

STEPTOE, A.; KIVIMAKI, M. Stress and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*, v. 9, n. 6, p. 360-70, Apr 03 2012.

STUNKARD, A. J.; FAITH, M. S.; ALLISON, K. C. Depression and obesity. *Biol Psychiatry*, v. 54, n. 3, p. 330-7, Aug 1 2003.

SWEAZEA, K. L.; LEKIC, M.; WALKER, B. R. Comparison of mechanisms involved in impaired vascular reactivity between high sucrose and high fat diets in rats. *Nutr Metab (Lond)*, v. 7, p. 48, 2010.

TAKASE, B.; KURITA, A.; NORITAKE, M.; UEHATA, A.; MARUYAMA, T.; NAGAYOSHI, H.; NISHIOKA, T.; MIZUNO, K.; NAKAMURA, H. Heart rate variability in patients with diabetes mellitus, ischemic heart disease, and congestive heart failure. *J Electrocardiol*, v. 25, n. 2, p. 79-88, Apr 1992.

TAKEDA, E.; TERAOKA, J.; NAKAYA, Y.; MIYAMOTO, K.; BABA, Y.; CHUMAN, H.; KAJI, R.; OHMORI, T.; ROKUTAN, K. Stress control and human nutrition. *J Med Invest*, v. 51, n. 3-4, p. 139-45, Aug 2004.

TAUBMAN MB. Angiotensin II A Vasoactive Hormone With EverIncreasing Biological Roles. *Circulation research*. 2003;92:9–11.

TE RIET L.; VAN ESCH JH.; ROKS AJ.; VAN DEN MEIRACKER AH.; DANSER AJ. Hypertension Renin–Angiotensin–Aldosterone System Alterations. *Circulation research*. 2015;116:960–75.

TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*, v. 92, n. 3, p. 347-55, Sep 2004.

TRYON, M. S.; CARTER, C. S.; DECANT, R.; LAUGERO, K. D. Chronic stress exposure may affect the brain's response to high calorie food cues and predispose to obesogenic eating habits. *Physiol Behav*, v. 120, p. 233-42, Aug 15 2013.

TRZEPIZUR, W.; GACEB, A.; ARNAUD, C.; RIBUOT, C.; LEVY, P.; MARTINEZ, M. C.; GAGNADOUX, F.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Vascular and hepatic impact of short-term intermittent hypoxia in a mouse model of metabolic syndrome. *PLoS One*, v. 10, n. 5, p. e0124637, 2015.

ULRICH-LAI, Y. M.; FULTON, S.; WILSON, M.; PETROVICH, G.; RINAMAN, L. Stress exposure, food intake and emotional state. *Stress*, p. 1-19, Aug 25 2015a.

_____. Stress exposure, food intake and emotional state. *Stress*, v. 18, n. 4, p. 381-99, 2015b.

VIEIRA, A. A.; COLOMBARI, E.; DE LUCA, L. A., JR.; COLOMBARI, D. S.; DE PAULA, P. M.; MENANI, J. V. Importance of angiotensinergic mechanisms for the pressor response to l-glutamate into the rostral ventrolateral medulla. *Brain Res*, v. 1322, p. 72-80, Mar 31 2010.

VIEIRA, J. O.; DUARTE, J. O.; COSTA-FERREIRA, W.; MORAIS-SILVA, G.; MARIN, M. T.; CRESTANI, C. C. Sex differences in cardiovascular, neuroendocrine and behavioral changes evoked by chronic stressors in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 81, p. 426-437, Feb 2 2018.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*, v. 2, n. 2, p. 322-8, 2007.

WILLIAMS, E. P.; MESIDOR, M.; WINTERS, K.; DUBBERT, P. M.; WYATT, S. B. Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. *Curr Obes Rep*, v. 4, n. 3, p. 363-70, Sep 2015. Wirtz PH, Ehlert U, Emini L, Rüdüsüli K, Groessbauer S, Gaab J, Elsenbruch S, von Känel R. Anticipatory cognitive stress appraisal and the acute procoagulant stress response in men. *Psychosom Med* 2006; 68: 851-8.

WOHLEB, E. S.; POWELL, N. D.; GODBOUT, J. P.; SHERIDAN, J. F. Stress-induced recruitment of bone marrow-derived monocytes to the brain promotes anxiety-like behavior. *J Neurosci*, v. 33, n. 34, p. 13820-33, Aug 21 2013. World Health Organization. Obesity and overweight. *WHO* <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> (2015).

WRIGHT, J. W.; HARDING, J. W. The brain renin-angiotensin system: a diversity of functions and implications for CNS diseases. *Pflugers Arch*, v. 465, n. 1, p. 133-51, Jan 2013.

YANG, J. L.; LIU, X.; JIANG, H.; PAN, F.; HO, C. S.; HO, R. C. The Effects of High-fat-diet Combined with Chronic Unpredictable Mild Stress on Depression-like Behavior and Leptin/LepRb in Male Rats. *Sci Rep*, v. 6, p. 35239, Oct 14 2016.