

**Instituto Presbiteriano Mackenzie**  
**Fundo Mackenzie de Pesquisa**  
**MACKPESQUISA**

**INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS DE SAL NAS ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS  
E RENAIS EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE RESISTENCIA A  
INSULINA.**

**Proponente: Profa. Dra. Vera de Moura Azevedo Farah**  
**CCBS - Curso de Farmácia**

**Pesquisadores/Colaboradores: Prof. Dra. Patrícia Fiorino**  
**CCBS - Curso de Ciências Biológicas**  
**Prof. Dr. Manassés C. Fonteles**

São Paulo 20 de Fevereiro de 2010

## RESUMO

Disfunções metabólicas como resistência à insulina e hiperinsulinemia, presentes no diabetes mellitus tipo 2 (DM2), quando associadas em um mesmo indivíduo com dislipidemia, obesidade e hipertensão arterial (HA) constituem a chamada síndrome metabólica (SM), aumentando o risco para doenças cardiovasculares. O alto índice de mortalidade cardiovascular associada com a SM e o aumento da prevalência dela no mundo industrializado tem despertado grande interesse na investigação, assim como no manejo e prevenção em todo o mundo. Quadro semelhante à SM pode ser induzido experimentalmente através de alterações na dieta. Por exemplo, a administração de uma dieta rica em frutose, inicia uma série de eventos metabólicos resultando em hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, HA, resistência à insulina e intolerância à glicose. Em animais, a adição de frutose na água de beber induz alterações metabólicas e fisiológicas semelhantes às encontradas na SM humana.

O estudo dos mecanismos de controle de pressão arterial (PA) nas últimas décadas evidenciou várias substâncias e sistemas fisiológicos que interagem de maneira complexa e com redundância para manter a PA em níveis adequados nas mais diversas situações. A disfunção desses sistemas de controle de PA resulta na HA. Está bem estabelecido que a HA é uma doença complexa, de determinação multifatorial e poligênica na maioria dos casos. Diversos estudos sugerem que o manejo do sódio está envolvido na patogênese da HA, assim como alterações no balanço homeostático do sistema renina-angiotensina (SRA).

Existe uma estreita relação entre o metabolismo de glicose e o SRA. Agentes farmacológicos que bloqueiem o SRA, além de controlarem a HA auxiliam no tratamento da nefropatia e da doença cardiovascular no DM. Além disso, diferentes estudos têm demonstrado que o aumento do consumo de frutose promove ativação do SRA contribuindo para o aumento da PA verificado nesse modelo.

Estudos clínicos têm demonstrado que o aumento da variabilidade da PA está diretamente relacionado com a morbi-mortalidade cardiovascular, além de

facilitar a lesão de órgãos alvos. Em relação à frequência cardíaca (FC), estudos da modulação autonômica sugerem diminuição da variabilidade da FC em diferentes situações de risco isoladas para a doença cardiovascular, como por exemplo, na HA e no DM. Animais submetidos à sobrecarga salina apresentam aumento da variabilidade da PA e da FC, sugerindo um aumento na modulação simpática para o coração e para a vasculatura. A variabilidade da PA também estava aumentada em camundongos submetidos a uma dieta rica em frutose, associado ao aumento da PA sugerindo, portanto, aumento na modulação simpática para a vasculatura.

Pacientes diabéticos são frequentemente sensíveis a dietas ricas em sal e seu acréscimo na dieta pode predispor a complicações renais, podendo gerar a nefropatia e promover o aceleração das complicações microvasculares condizentes com o desenvolvimento da nefropatia diabética, entidade clínica de maior relevância no prognóstico da doença. O método de perfusão renal extracorpóreo tem sido uma importante ferramenta no entendimento da função renal em diversas condições fisiopatológicas, uma vez que as alterações neuroendócrinas observadas no animal como um todo são eliminadas, e as lesões glomerulares podem ser avaliadas diretamente no rim, bem como as alterações funcionais e de transporte quando presentes.

Estes dados em conjunto sugerem que a associação de diferentes fatores de risco cardiovascular, tais como a ingestão de frutose e sal em um mesmo indivíduo, pode potencializar as alterações na função renal e cardiovascular. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar os parâmetros cardiovasculares e sua modulação autonômica através da análise espectral pelo método auto-regressivo e a função renal utilizando o método de perfusão renal extracorpóreo, além da contribuição do SRA nesses parâmetros, em ratos submetidos à sobrecarga de frutose e sal.

Palavras-chave: frutose, perfusão renal, sal, variabilidade da pressão arterial, SM, sistema renina-angiotensina

## 1. Introdução

O número de indivíduos resistentes à insulina e portadores de diabetes mellitus tipo 2 tem aumentado progressivamente devido ao crescente número de pessoas com obesidade e sobrepeso (ZANELLA *et al.*, 2001). Disfunções metabólicas como resistência à insulina e hiperinsulinemia presentes no diabetes mellitus tipo 2 quando associadas em um mesmo indivíduo com dislipidemia, obesidade e hipertensão arterial sistêmica constituem a chamada SM e aumenta significativamente o risco para diversas doenças cardiovasculares. (ECKEL *et al.*, 2005). De fato, está bem estabelecido que os principais responsáveis pela doença cardiovascular sejam fatores isolados como dislipidemia, tabagismo, sedentarismo, obesidade e diabetes (LOPES *et al.*, 2001).

A SM é considerada como uma doença da civilização moderna estando intimamente relacionada à alimentação inadequada e ao sedentarismo (ZIMMET *et al.*, 2001). O aumento da incidência da SM devido a uma maior prevalência da relação sobrepeso/obesidade tem sido observado na população geral em todo o mundo (FORD *et al.*, 2002). O alto índice de mortalidade cardiovascular associada com esta doença e o aumento da prevalência dela no mundo industrializado tem despertado grande interesse na investigação assim como no manejo e na prevenção da SM em todo o mundo (ISOMAA *et al.*, 2001).

Quadro semelhante à SM, com características semelhantes às encontradas em humanos, pode ser induzido experimentalmente através de alterações na dieta. Por exemplo, camundongos C57BL/6J quando alimentados com dieta hipercalórica desenvolvem um modelo de diabete tipo 2 com a presença de obesidade, hiperinsulinemia, aumento da resistência à insulina e intolerância à glicose (SURWIT *et al.*, 1988). A administração de uma dieta rica em frutose, um açúcar presente nos produtos industrializados a fim de adoçar os alimentos, inicia uma série de eventos metabólicos resultando em hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, hipertensão, resistência à insulina e intolerância à glicose (NAKAGAWA *et al.*, 2005). A inibição da enzima fosfofrutoquinase, responsável pela inibição da via

glicolítica, é o principal fator responsável pela fisiopatologia dos distúrbios metabólicos oriundos de uma dieta rica em frutose (VASDEV *et al.*, 2004).

Uma dieta rica em frutose também tem sido relacionada com o aumento da obesidade observada nos países industrializados já que esse açúcar pode favorecer o ganho de peso, pois ao contrário da glicose, a frutose não estimula a secreção de insulina e leptina, e sim de hormônios ligados a estimulação do apetite (TEFF *et al.*, 2004). Além disso, a frutose é mais lipogênica do que a própria glicose, causando aumento dos níveis de triglicérides circulantes (HALLFRISCH, 1990).

De fato, animais submetidos à dieta rica em frutose apresentaram alterações metabólicas como resistência à insulina, aumento de triglicérides além de desenvolverem hipertensão, distúrbios semelhantes aqueles encontrados na SM (FARAH *et al.*, 2006; SUZUKI *et al.*, 1997). A adição de frutose na água de beber na concentração de 10 a 20% também pode induzir alterações metabólicas e fisiológicas semelhantes às encontradas na SM (DAI & MCNEILL, 1995).

O estudo dos mecanismos de controle de pressão arterial nas últimas décadas evidenciou um grande número de substâncias e de sistemas fisiológicos que interagem de maneira complexa e com redundância para manter a pressão arterial em níveis adequados nas mais diversas situações. A disfunção desses sistemas de controle de pressão arterial (PA), então, resultaria na hipertensão arterial. Está bem estabelecido que a hipertensão não é uma doença simples com causa única em todos os indivíduos afetados (LIFTON, 1996), mas sim uma doença complexa, de determinação multifatorial e poligênica na maioria dos casos.

A interação assim como as modificações que os sistemas fisiológicos sofrem de fatores ambientais como, por exemplo, conteúdo de frutose e/ou sal na dieta, tem dificultado determinar se estas alterações são causadores primários da hipertensão ou simplesmente consequência de disfunções primárias ainda desconhecidas (KRIEGER, 1999).

Diversos estudos clínicos e experimentais sugerem que o manejo do sódio esteja envolvido na patogênese da hipertensão arterial (COWLEY *et al.*, 1996; JOHNSON *et al.*, 2002; WEINBERGER, 1996), mostrando uma significativa

associação entre ingestão de sal na dieta e variações de PA (CHOBANIAN *et al.*, 2000). Em particular, pacientes diabéticos frequentemente são sal-sensíveis e acréscimos de sal na dieta podem resultar em aumentos de pressão arterial e risco de eventos cardiovasculares (WEIR, 1998).

A hipertensão arterial está também associada a mecanismos de reabsorção renal de sódio e volume como via final comum de elevação da PA (LIFTON, 1996), sugerindo que o rim apresenta papel dominante na regulação da pressão arterial e participação fundamental no desenvolvimento e na manutenção da hipertensão. Desta forma, fica evidente que algum grau de disfunção renal é essencial para o desenvolvimento e manutenção da hipertensão arterial (COWLEY *et al.*, 1996).

Estes dados em conjunto sugerem que a associação de diferentes fatores de risco, tais como, a ingestão de frutose e sal em um mesmo indivíduo, pode potencializar as alterações tanto na função renal quanto na função cardiovascular. Portanto, o objetivo geral do presente estudo foi investigar os parâmetros cardiovasculares e a função renal em ratos submetidos à sobrecarga de frutose e de salina, ou seja, a dois fatores de risco cardiovascular.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo específico 1: Estudo da função cardiovascular e da modulação autonômica em animais submetidos a 2 fatores de risco cardiovascular: Frutose e Sal**

A manutenção da função cardíaca normal é obtida através da regulação neural cardíaca pela integração da atividade do sistema nervoso simpático e parassimpático. Avanços recentes no estudo da modulação autonômica da função cardiovascular têm utilizado a análise espectral como uma importante ferramenta a fim de avaliar com melhor precisão a participação do simpático e parassimpático no controle cardiovascular em situações fisiológicas ou patológicas. A análise espectral

permite estudar a PA e a frequência cardíaca (FC), avaliados tanto no domínio do tempo como no domínio da frequência (FAZAN Jr. *et al.*, 1997, FARAH *et al.*, 2006, 2007).

Estudos clínicos têm demonstrado que o aumento da variabilidade da pressão arterial está diretamente relacionado com a morbi-mortalidade cardiovascular (KIKUYA *et al.*, 2000), além de facilitar a lesão de órgãos alvos (FRATTOLA *et al.*, 1993; PARATI *et al.*, 1987). Em relação à frequência cardíaca, estudos da modulação autonômica têm demonstrado diminuição da variabilidade da frequência cardíaca em diferentes situações de risco isoladas para a doença cardiovascular, como por exemplo, na hipertensão (BALBINOTT *et al.*, 2005) e no diabetes mellitus (SCHAAN *et al.*, 2004).

Experimentalmente foi demonstrado que animais submetidos à sobrecarga salina apresentam aumento da variabilidade da PA sem alterações na PA e/ou da FC (LACCHINI *et al.*, 2001). Recentemente, estudos preliminares do nosso grupo (FARAH *et al.*, 2008) demonstraram que a sobrecarga salina na água de beber durante 10 dias em ratos, aumentou a variabilidade da FC e da PA, sugerindo um aumento na modulação simpática para o coração e para a vasculatura. A variabilidade da PA também estava aumentada em camundongos submetidos a uma dieta rica em frutose, durante oito semanas, associado ao aumento da pressão arterial e do componente de baixa frequência, sugerindo, portanto, aumento na modulação simpática para a vasculatura (FARAH *et al.*, 2006).

Como a associação de diferentes fatores de risco cardiovascular em um mesmo indivíduo pode potencializar ainda mais as alterações na modulação autonômica cardiovascular, um dos objetivos do presente estudo foi avaliar a pressão arterial, a frequência cardíaca, os aspectos morfo-funcionais do coração com o uso do ecocardiograma e a modulação autonômica do sistema cardiovascular em animais submetidos a dois fatores de risco na dieta: frutose e sal.

## **2.2 Objetivo específico 2: Estudo da influência do sistema renina-angiotensina em animais submetidos a 2 fatores de risco cardiovascular: Frutose e sal**

Está bem estabelecido que alterações no balanço homeostático do sistema renina-angiotensina (SRA) podem levar a hipertensão arterial (HUMMEL *et al.*, 1966). Os efeitos de agentes farmacológicos que bloqueiam ou antagonizam a ação do SRA sobre a pressão arterial tem sido utilizados para avaliar a contribuição deste sistema na manutenção da homeostasia cardiovascular (BRAND *et al.*, 1988; GAVRAS *et al.*, 1982; PALLER *et al.*, 1984; SANTA JULIANA *et al.*, 1996). Experimentos deste tipo têm evidenciado que em determinadas condições como a desidratação e a restrição salina aumentam a contribuição do SRA, no controle da pressão arterial (BRAND *et al.*, 1988; PALLER *et al.*, 1984).

Evidências tanto clínicas quanto experimentais sugerem uma estreita relação entre o metabolismo de glicose e o SRA (YUSUF *et al.*, 2000). Agentes farmacológicos que bloqueiem o SRA, além de controlarem a hipertensão arterial auxiliam no tratamento da nefropatia e da doença cardiovascular tanto em indivíduos diabéticos (YUSUF *et al.*, 2000; STUBBS *et al.*, 1994) quanto em animais diabéticos (GUO *et al.*, 2005). Além disso, diferentes estudos têm demonstrado que o aumento da frutose na dieta promove ativação do SRA. Por exemplo, Farah *et al.*, (2006) demonstraram aumento da formação de Angiotensina II em camundongos alimentados com dieta rica em frutose. Outros autores demonstraram aumento na expressão do RNA mensageiro do receptor AT1a tecidual em camundongos (SHINOZAKI *et al.*, 2004) e ratos (HSIEH, 2005) tratados com frutose.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a contribuição do SRA na função cardiovascular e renal em animais submetidos a 2 fatores de risco: Frutose e sal.



### **2.3 Objetivo específico 3: Estudo da função renal em animais submetidos a 2 fatores de risco: Frutose e sal**

A nefropatia diabética é uma complicação que acomete de 30% a 40% dos pacientes diabéticos evoluindo inexoravelmente para a insuficiência renal crônica, levando o paciente aos procedimentos de hemodiálise e transplante além de estar associada a um aumento da mortalidade (RITZ *et al.*, 1999). Diversos fatores de risco têm sido descritos para a nefropatia diabética, tais como o grau de hiperglicemia, a duração do diabetes, a presença de hipertensão arterial e fatores genéticos (RITZ *et al.*, 1999). Além disso, a nefropatia diabética constitui um importante fator de risco para a doença cardiovascular (VALMADRID *et al.*, 2000), sendo a principal causa de morte em pacientes com diabetes do tipo II (PANZRAM, 1987).

Pacientes diabéticos são freqüentemente sensíveis a dietas rica em sal (WEIR, 1998) e seu acréscimo na dieta pode predispor a complicações renais, podendo gerar a nefropatia e promover o aceleração das complicações microvasculares condizentes com o desenvolvimento da nefropatia diabética, entidade clínica da maior relevância no prognóstico da doença (JANDELEIT-DAHM *et al.*, 2002; SCHAAN *et al.*, 2004).

O método de perfusão renal extracorpóreo, (FONTELES *et al.*, 1993, 1998, SANTOS-NETO *et al.*, 2006) têm sido uma importante ferramenta no entendimento da função renal em diversas condições fisiopatológicas, uma vez que as alterações neuroendócrinas observadas no animal como um todo são eliminadas, e as lesões glomerulares poderão ser avaliadas diretamente no rim bem como as alterações funcionais e de transporte ainda quando incipientes.

Portanto, nosso objetivo foi o de caracterizar em animais submetidos a 2 fatores de risco adicionados na dieta, sal e frutose, as respostas renais em rim perfundido e isolado do rato. Foram analisados os parâmetros funcionais que incluem transporte de sódio, potássio, água e clearance osmolar, medindo-se ainda os seus efeitos sobre a filtração glomerular e a pressão de perfusão do sistema.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Amostra**

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos normotensos Wistar machos, pesando inicialmente entre 250 - 300g. O peso corporal total foi avaliado no início do estudo e no último dia (21º dia) do protocolo experimental, utilizando balança comercial para pequenos animais (Gehaka, BG4001). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (22º e 25º), ciclo claro-escuro (12 horas) e com livre acesso à água e alimentação no Biotério da Universidade Presbiteriana Mackenzie.

Os procedimentos experimentais adotados para o estudo obedeceu às normas estabelecidas pela comissão de Pesquisa e Ética da Universidade Presbiteriana Mackenzie (Processo: .

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais de acordo com o tratamento recebido:

Controle (C): foram alimentados com ração industrial para ratos e água por um período de 21 dias.

Frutose (F): foram alimentados com ração industrial para ratos e água com frutose (D-frutose, 10%), por um período de 21 dias.

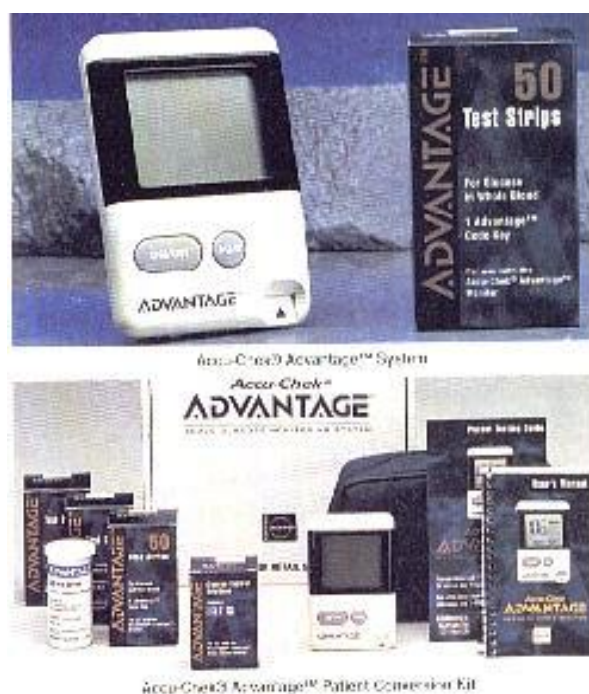
Controle e sal (CS): foram alimentados com ração industrial para ratos e água por um período de 21 dias e água acrescido de cloreto de sódio (1%) nos últimos 10 dias.

Frutose e sal (FS): foram alimentados com ração industrial para ratos e água contendo frutose (10%) por um período de 21 dias e acrescido de cloreto de sódio (1%) nos últimos 10 dias.

### 3.2 Determinação da Glicemia e Tolerância à Glicose

Ao final do protocolo experimental, após um período de jejum de 4 horas, foi coletado sangue da cauda do animal para análise das concentrações de glicose sanguínea usando método de química seca no equipamento “Accu-Check Advantage Blood Glucose Monitor” (Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN). (Figura 1)

Para a realização do teste de tolerancia a glicose (TTG), após a realização destes procedimentos os animais receberam uma injeção intraperitoneal (*ip*) de glicose (1.5g/kg) e amostras de sangue foram coletadas na cauda do animal após 15, 30, 60 e 90 min.

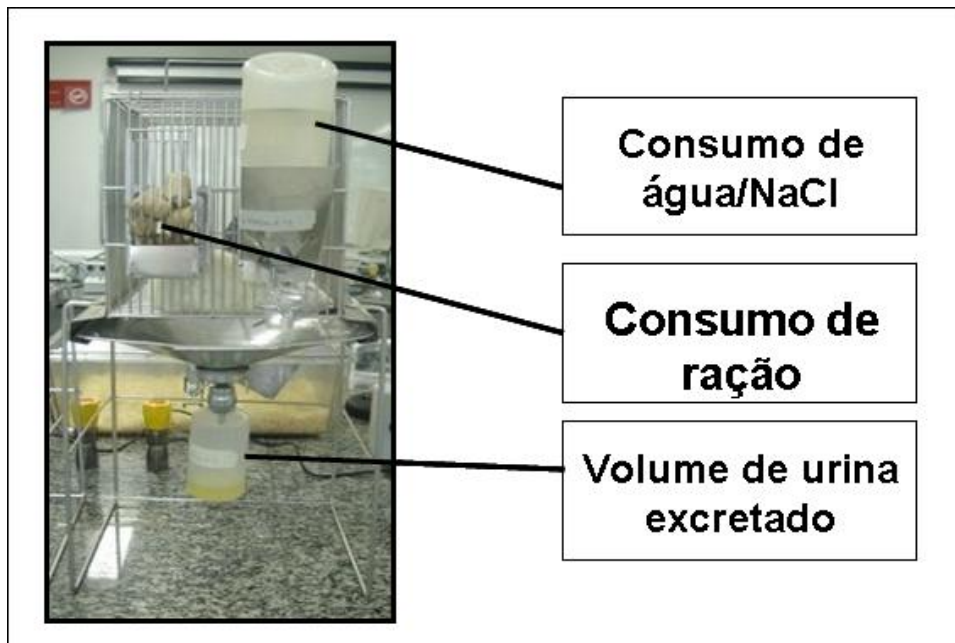


**Figura 1:** Accu-Check Advantage Blood Glucose Monitor (Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN).

### 3.3 Avaliação em Gaiola Metabólica

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas (Andrade's) durante um período de adaptação de 48 horas, e posteriormente por mais 24 horas para a coleta da urina, para avaliação do volume urinário e coleta da urina para realização das análises bioquímicas. (Figura 2)

O consumo de água também foi quantificado, verificando-se o volume antes e após o período de 24 horas na gaiola metabólica e calculando-se a diferença. O consumo de ração foi realizado da mesma forma, pesando-se a ração antes e após 24 horas da permanência dos ratos na gaiola metabólica.



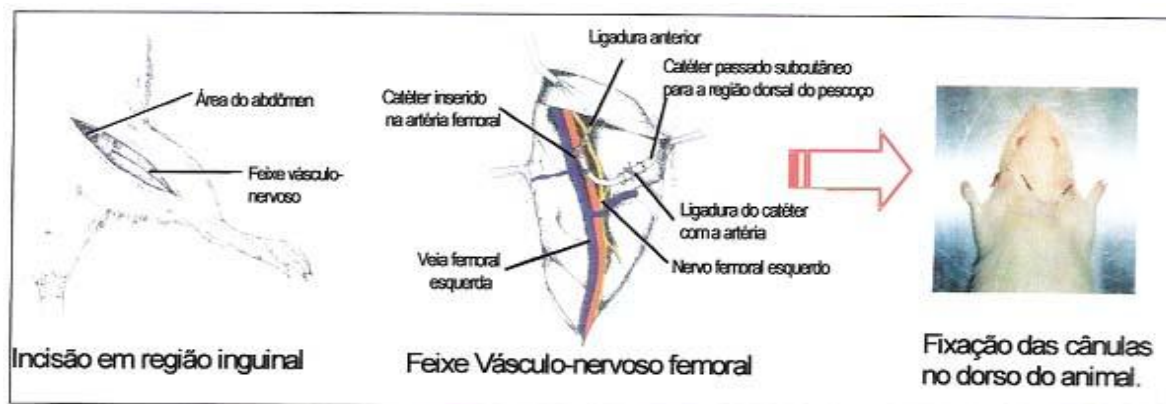
**Figura 2:** Fotografia mostrando o animal na gaiola metabólica no laboratório de fisiologia renal e cardiovascular da UPM.

### **3.4 Análises Bioquímicas**

Amostras de sangue foram coletadas ao final do protocolo para dosagem de glicemia, colesterol, triglicérides, creatinina, LDL/HDL. A urina de 24 horas coletada na gaiola metabólica foi analisada para creatinina, proteínas totais, sódio, potássio, glicose, osmolaridade e pH. A determinação de colesterol, triglicérides, creatinina, LDL/HDL, proteínas totais e glicose serão realizadas por métodos calorimétricos enzimáticos comerciais (Labtest, BR). As amostras serão analisadas para  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  por fotometria de chama. A osmolalidade das amostras será avaliada em osmômetro de pressão de vapor da Advanced Instruments (Needham Heights, MA).

### **3.5 Cateterização da Artéria e Veia Femorais**

Para registro direto da pressão arterial, assim como, a administração de anestésico ou outras drogas utilizadas durante os protocolos, a artéria e veia femorais foram cateterizadas. Para isso, os ratos foram anestesiados com uma solução de cloridrato de ketamina (80 mg/kg) e xylazina (12 mg/kg) por via intraperitoneal. Os catéteres consistuem de uma parte mais fina (PE-10), introduzida pela femoral acessando a aorta ou veia cava inferior, e uma parte mais grossa (PE-50), passada subcutaneamente até o dorso do animal, entre as escápulas, e então fixada através de pontos cirúrgicos na pele. (Figura 3)

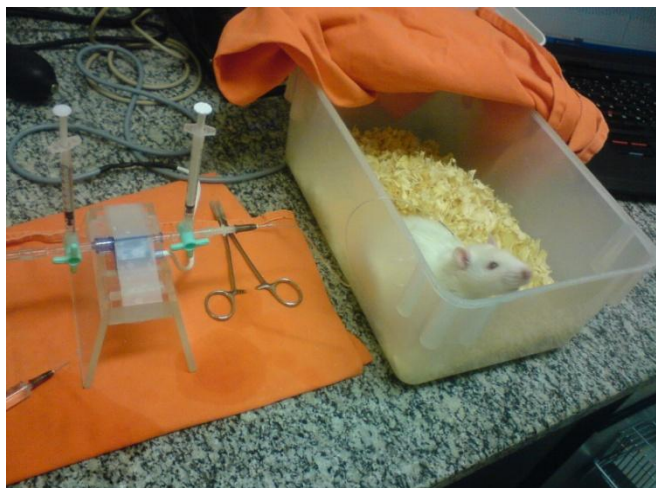


**Figura 3:** Representação esquemática do procedimento de canulação da artéria e veias femorais

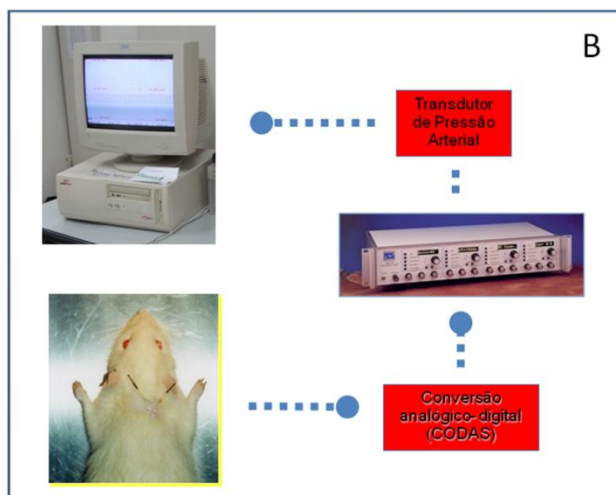
### 3.6 Registro da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca

Os registros de PA e da FC serão realizados com os ratos acordados e em livre movimentação, durante 30 minutos. O registro terá início apenas após a estabilização de atividade exploratória do animal (15-20 minutos). (Figura 4)

A medida direta da PA será obtida do catéter da artéria femoral conectada a um transdutor de pressão (Hewlett-Packard 1280, EUA) acoplado a um amplificador (General Purpose Amplifier, Stemtech, Inc.). O sinal amplificado será digitalizado através de uma placa de conversão analógico digital (CODAS), com frequência de amostragem de 2000 Hz, instalada em um computador PC586. Os dados digitalizados serão processados através do programa WinDaq (DataQ Instruments, Inc.; USA) e posteriormente analisados (Excel, Microsoft Co.; USA). (Figura 5)



**Figura 4:** Procedimento de registro após canulação do animal.



**Figura 5:** **A.** Fotografia mostrando o animal conectado ao sistema de registro no laboratório de fisiologia renal e cardiovascular da UPM; **B.** Esquema geral do sistema computadorizado para registro direto de PA.

### **3.7 Controle Autônomico Cardiovascular**

Os registros originais de pressão arterial pulsátil em repouso foram submetidos para análise do controle autonômico cardiovascular, através de ferramenta de análise tempo-freqüência da variabilidade da FC e da pressão arterial sistólica (PAS). As variabilidades da PAS e intervalo de pulso (variabilidade da FC) no domínio da freqüência foram estimadas através do método auto-regressivo de análise espectral, conforme método previamente descrito (MALLIANI *et al.*, 1991; DIAS *et al.*, 2002; JOAQUIM *et al.*, 2004, FARAH *et al.*, 2007). Os componentes oscilatórios foram quantificados em duas faixas de freqüência de interesse: freqüências altas (HF) entre 0,8 e 4 HZ e freqüências baixas (LF) entre 0,2 e 0,8Hz. Segmentos que apre

sentem oscilações em muito baixa freqüência (< 0.1 Hz) que contribuam para mais de 70% de toda a variabilidade serão considerados segmentos não estacionários e serão descartados do estudo. As potências de LF, HF e da razão LF/HF serão consideradas como marcadores simpático e parassimpático, e do balanço simpato-vagal, respectivamente (TASK FORCE, 1996).

### **3.8 Avaliação Morfo-Funcional do Coração: Ecocardiografia**

O exame para avaliação morfo-funcional do coração foi realizado no Laboratório de Hipertensão Experimental da Unidade de Hipertensão do Instituto do Coração da FMUSP, em colaboração e sob a supervisão da Profa. Dra. Maria Claudia Irigoyen.

As medidas ecocardiográficas estão de acordo com as recomendações do Comitê de Padronização do Modo M da Sociedade Americana de Ecocardiografia (60). Os exames foram realizados por um único observador, e em cada exame foi coletado um total de cinco medidas para cada variável, sendo calculados posteriormente, a média, o desvio padrão da média e o erro padrão da média



dessas medidas. O exame ecocardiográfico foi realizado com os animais anestesiados com uma solução de Ketamina (50mg/Kg) e Xilazina (12 mg/Kg), através de injeção intra-peritoneal. Foi utilizado o equipamento SEQUOIA 512 (ACUSON Corporation, Mountain View, CA), com transdutor de 15 MHz. As imagens foram obtidas a uma frequência de 13 MHz, para otimização da resolução e penetração no tecido, e foram armazenadas para posterior análise.

O ventrículo esquerdo foi visualizado em corte transversal na altura dos músculos papilares para a medida de variáveis funcionais e da área da acinesia.

As variáveis funcionais sistólicas avaliadas foram fração de ejeção e fração de encurtamento, ambas as medidas através do uso de cálculos em software específico. As variáveis funcionais diastólicas avaliadas foram o tamanho do átrio esquerdo, medido no modo M, e desaceleração do pico E corrigido (obtida através de cálculos apropriados).

O índice cardíaco será obtido pela divisão do débito cardíaco (ml/min) pelo peso corporal (Kg) do animal, sendo expresso em ml/min/Kg e a resistência vascular sistêmica total será determinada pela divisão da pressão arterial média pelo débito cardíaco, sendo expresso em mmHg/ml/min.

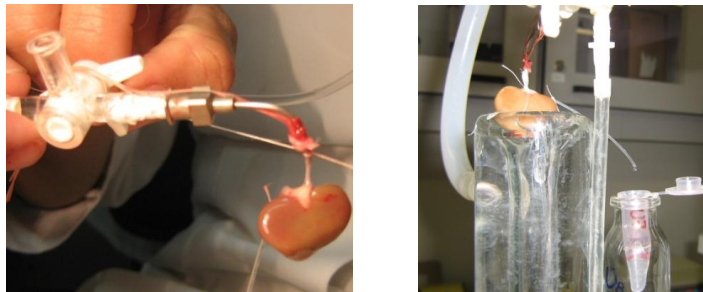
### **3.9 Bloqueio do Sistema Renina-Angiotensina**

O bloqueio do sistema renina-angiotensina (SRA) foi realizado utilizando o antagonista específico do receptor AT-1, losartan (Merck Research Laboratory), na dose de 10 mg/kg em bolus, iv, administrado em volume não superior a 0.2 ml. Esta dose é amplamente utilizada (SANTAJULIANA *et al.*, 1996) e confere bloqueio substancial evidenciado pela ausência de resposta pressora a administração de angiotensina II (Ang II).

### **3.10 Protocolo Experimental do Rim Isolado**

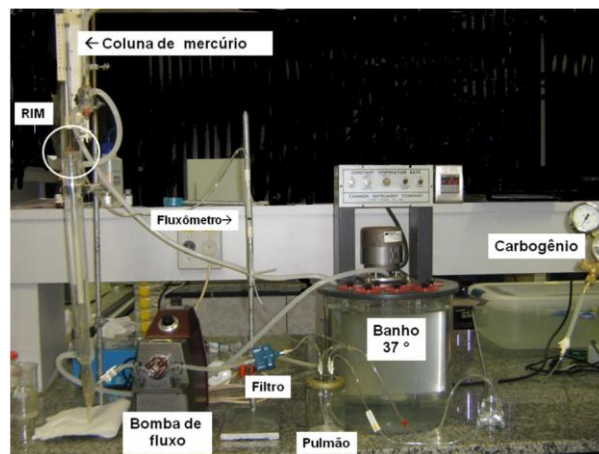
No presente estudo, foi utilizado o sistema de perfusão renal fechado baseado nos estudos desenvolvidos por Bowman & Maack (1974) e Ross (1978) e modificado por Pegg (1971), Hamilton e cols. (1974), Fonteles e cols. (1983) e Lima e cols. (1992).

Para o procedimento de retirada do rim, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 40 mg/kg por via endovenosa. Posteriormente, os animais foram acomodados, em decúbito ventral, em cama cirúrgica para administração de 3,0 ml de manitol a 20%, por via intravenosa. Ao término do procedimento de dissecação e isolamento renal, o rim foi cuidadosamente removido e introduzido ao sistema de perfusão (Figura 6).



**Figura 6:** Rim após ser retirado do animal e colocado no sistema de perfusão renal.

O sistema de perfusão de rim isolado consiste de um conjunto de equipamentos que possibilita o estudo da fisiologia renal, pois o órgão é mantido funcional (urinando metabólitos processados ou não, a partir do perfusato fornecido), em ambiente extracorpóreo, por algumas horas (Figura 7).



**Figura 7:** Fotografia mostrando o sistema de perfusão renal extra-corpóreo localizado no laboratório de fisiologia renal e cardiovascular da UPM.

**Protocolo Experimental:** A duração dos experimentos foi de 120 minutos. Durante a perfusão renal, a cada 10 minutos amostras de perfusato e urina foram coletadas para medidas das funções renais através de análises e cálculos bioquímicos que incluem Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, inulina, creatinina e osmolaridade, após o que os cálculos fisiológicos mencionados adiante foram aplicados.

Após um período basal de 30 minutos de duração (3 períodos de dez minutos), a uroguanilina (1.0 g/ml) será administrada no perfusato. Novas amostras de perfusato e urina serão coletadas a cada 10 minutos durante 90 minutos. Estudos anteriores determinados por Fonteles e cols. (1998), mostraram que a concentração de 1.0 µg/ml de uroguanilina é eficaz em promover natriurese e caliurese.

**Análise dos parâmetros renais:** Os percentuais de transporte tubular de sódio, potássio e cloreto, e o ritmo de filtração glomerular, foram determinados através das fórmulas de *clearance*, de acordo com as descrições de Pitts, em 1971 e Martinez-Maldonado & Opava-Stitzer, em 1978. Também foram determinados o fluxo urinário e o clearance osmolar. O sódio e o potássio foram determinados por fotometria de chama. A inulina será determinada de acordo com Wasler e cols. (1955) e modificada por Fonteles e cols. (1983). A osmolalidade das amostras será medida em osmômetro de pressão de vapor da Advanced Instruments (Needham Heights, MA). A função distal de água será avaliada através do clearance de água livre (Pitts, 1971 e Martinez-Maldonado & Opava-Stitzer, 1978).

**Cálculo dos parâmetros renais:** Para a determinação dos parâmetros renais foram utilizadas as fórmulas abaixo. Todos os cálculos realizados para sódio foram repetidos para potássio e cloreto.

**Pressão de perfusão (PP, mmHg):** dado obtido do manômetro de mercúrio

**Fluxo Urinário (mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>):** peso do volume urinário/peso do rim esquerdo x 10

**Fluxo plasmático renal (FPR, mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>):** fluxo registrado a cada 10 min/intervalo de tempo x peso do rim.

**Resistência vascular renal (mmHg.mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>):** PP/FPR

**Ritmo de filtração glomerular (RFG, mL.g-1.min-1):**  $DOU_{cr}/DOP_{cr} \times FU$ , onde:  $DOU_{cr}$ =densidade ótica da creatinina na urina;  $DOP_{cr}$ =densidade ótica da creatinina no perfusato

**Sódio filtrado ( $FNa^+$ , Eq.g-1.min-1):**  $RFG \times PNa^+$  onde:  $PNa^+$ =concentração de sódio no perfusato

**Sódio excretado ( $ENa^+$ , Eq.g-1.min-1):**  $FU \times UNa^+$  onde:  $UNa^+$ =concentração de sódio na urina

**Sódio transportado ( $TNa^+$ , Eq.g-1.min-1):**  $FNa^+ - ENa^+$

**Percentual de sódio transportado (Eq.g-1.min-1):**  $TNa^+ \times 100 / FNa^+$

**Clearance osmótico (mL.g-1.min-1):**  $(U_{osm}/P_{osm}) \times FU$ , onde :  $U_{osm}$  = osmolaridade Urinária e  $P_{osm}$  = osmolaridade do perfusato

### 3.11 Análise Estatística

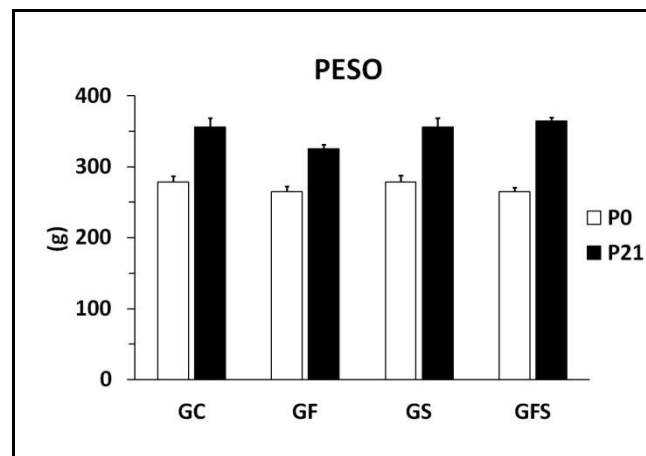
A análise estatística foi realizada utilizando o software STATISTIC 6.0. Os resultados serão analisados por ANOVA de 2 caminhos e apresentados como média  $\pm$  EPM. Consideramos significativamente diferente somente quando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Avaliação do Peso Corporal

Os valores de peso corporal apresentados na figura 8 representam a média  $\pm$  erro de 6 animais do grupo controle, 6 animais do grupo tratado com sal 1% durante os 10 últimos dias do protocolo experimental (21 dias), 6 animais tratados com frutose 10% na água de beber durante 21 dias e 6 animais tratados com frutose 10% durante 21 dias e acrescentados na água de beber sal 1% nos últimos 10 dias de tratamento.

O peso corporal dos animais foi mensurado antes do início dos tratamentos (dia 0) e no último dia do protocolo (21 dias). Como podemos observar na figura 06, não houve diferenças no peso inicial dos grupos (dia 0), assim como o perfil de peso dos animais tratados não diferiu dos animais controle após 21 dias do início do protocolo experimental. Observamos que o GC e o GS aumentaram cerca de 28% seu peso corporal, enquanto que o GF aumentou cerca de 23% e o GFS cerca de 35%, não havendo diferença significativa no ganho do peso entre os grupos avaliados.



**Figura 8:** Peso corporal avaliado nos tempos 0, antes do protocolo experimental (P0) e após 21 dias de tratamento (P21) no grupo controle (GC), tratados durante 21 dias com frutose (GF), tratados durante 10 dias com NaCl (GS) e no grupo tratado com frutose e NaCl (GFS).

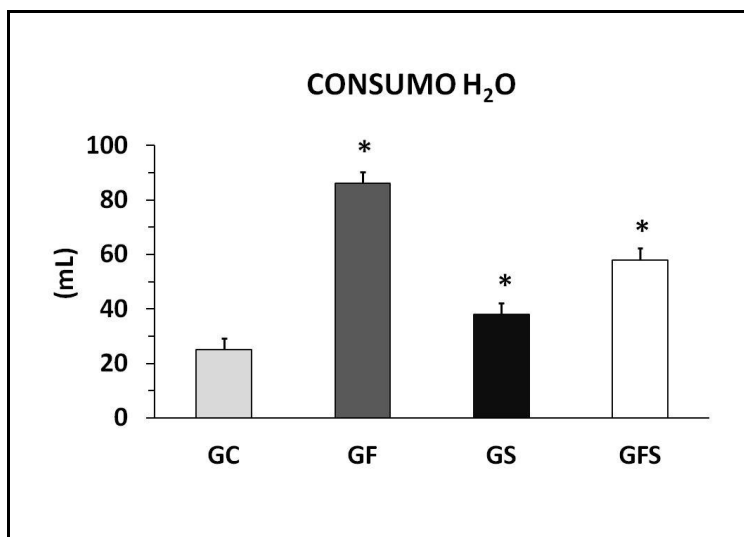
A importância de acompanhar o peso corporal dos animais está na possibilidade de que o tratamento na água de beber de sal e/ou frutose poderia refletir no ganho de peso dos animais. Entretanto, como podemos verificar no nosso estudo, que o acréscimo de frutose e/ou sal na água de beber, não foi capaz de alterar o ganho corpóreo esperado ao final do protocolo, apesar de ter sido observado em países industrializados a presença de uma correlação positiva entre o aumento do consumo de frutose e a prevalência de obesidade na população (HALLFRISH, 1990).

## 4.2 Avaliação em Gaiola Metabólica

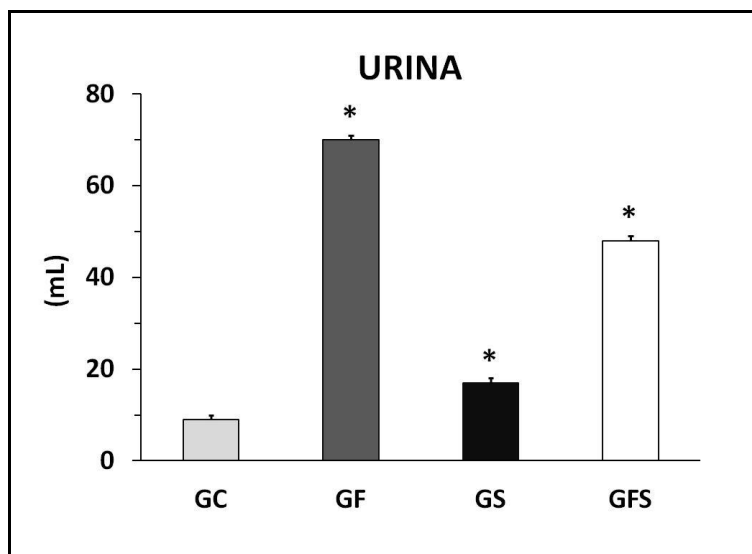
Todos os animais foram colocados na gaiola metabólica a fim de avaliarmos o consumo hídrico, o consumo de ração e o volume urinário coletados continuamente durante 24 horas.

Como apresentado na figura 9, houve um aumento significativo e marcante no consumo hídrico tanto nos animais tratados com frutose (mais de 3 vezes) como nos tratados com frutose e sal (mais de 2 vezes) quando comparados com o grupo controle. Já o GS aumentou discretamente seu consumo hídrico (cerca de 50%) em relação ao GC.

Em relação a excreção urinária, observamos um aumento significativo nos 3 grupos tratados em relação ao grupo controle, sendo que os animais GF e GFS apresentaram um aumento mais marcante do que os animais GS quando comparados com o grupo controle. (figura 10). A urina coletada está armazenada em freezer comercial -20°C para posterior análise de proteínas totais, creatinina, sódio e potássio.



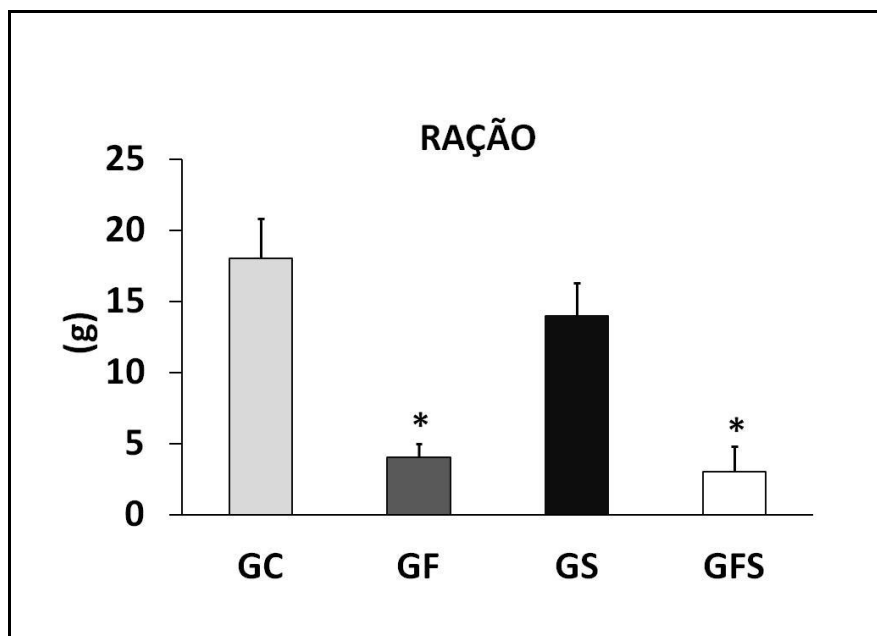
**Figura 9:** Consumo hídrico avaliado no grupo controle (GC), tratados durante 21 dias com frutose (GF), tratados durante 10 dias com NaCl (GS) e no grupo tratado com frutose e NaCl (GFS) em gaiola metabólica ao final do protocolo experimental. \* $p < 0.05$  comparado ao grupo controle.



**Figura 10:** Volume urinário coletado durante 24 horas no grupo controle (GC), tratados durante 21 dias com frutose (GF), tratados durante 10 dias com NaCl (GS) e no grupo tratado com frutose e NaCl (GFS) ao final do protocolo experimental. \* $p < 0.05$  comparado ao grupo controle.

O aumento do consumo hídrico e da excreção urinária nos animais com ingesta de frutose e/ou sal está de acordo com estudos anteriores onde associam o volume hídrico e urinário com o aumento da osmolaridade plasmática e conseqüente aumento da secreção de hormônio antidiurético a partir de estímulos neuro-humorais (OKAMOTO, et al, 2004). Deve-se ressaltar que as associações do metabolismo corpóreo com o sal estão relacionadas ao tempo de tratamento, a concentração, assim como, a via de administração do sal.

Em relação a ingesta de ração, como mostra a figura 11, é interessante notar que a ingesta de frutose diminuiu significativamente a ingesta de ração, enquanto que o GS não apresentou diferença significativa com o grupo controle. Esses dados sugerem que o consumo de frutose na água de beber é capaz de diminuir a ingesta de ração

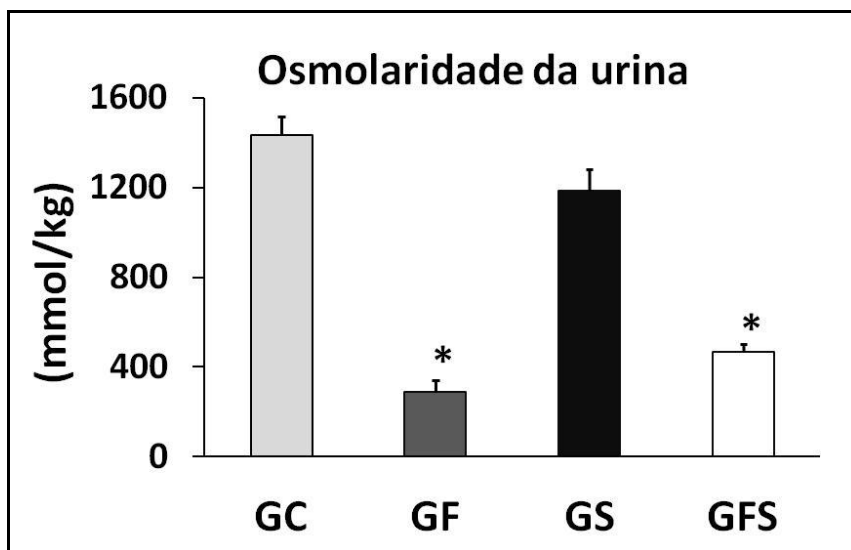


**Figura 11:** Quantidade de ração ingerida durante 24 horas no grupo controle (GC), tratados durante 21 dias com frutose (GF), tratados durante 10 dias com NaCl (GS) e no grupo tratado com frutose e NaCl (GFS) ao final do protocolo experimental.

### 4.3 Osmolaridade Urinária

A urina coletada na gaiola metabólica foi imediatamente centrifugada para a realização da verificação da osmolaridade urinária. Nos animais tratados com NaCl 1% 10 dias não houve diferenças significativas na osmolaridade urinária em relação ao grupo controle, entretanto os grupos tratados com frutose (GF e GFS) apresentaram uma diminuição significativa na sua osmolaridade (Figura 12), refletindo o aumento expressivo na excreção urinária desses animais.



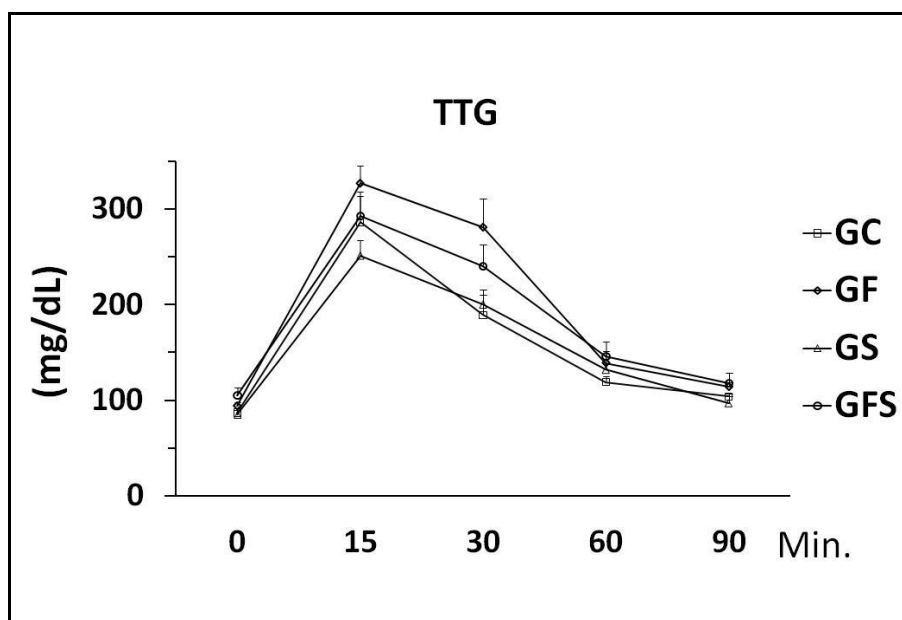


**Figura 12:** Osmolaridade da urina coletada durante 24 horas na gaiola metabólica nos animais controle (GC), tratados durante 21 dias com frutose (GF), tratados durante 10 dias com NaCl (GS) e no grupo tratado com frutose e NaCl (GFS). \* $p < 0.05$  em relação ao grupo controle.

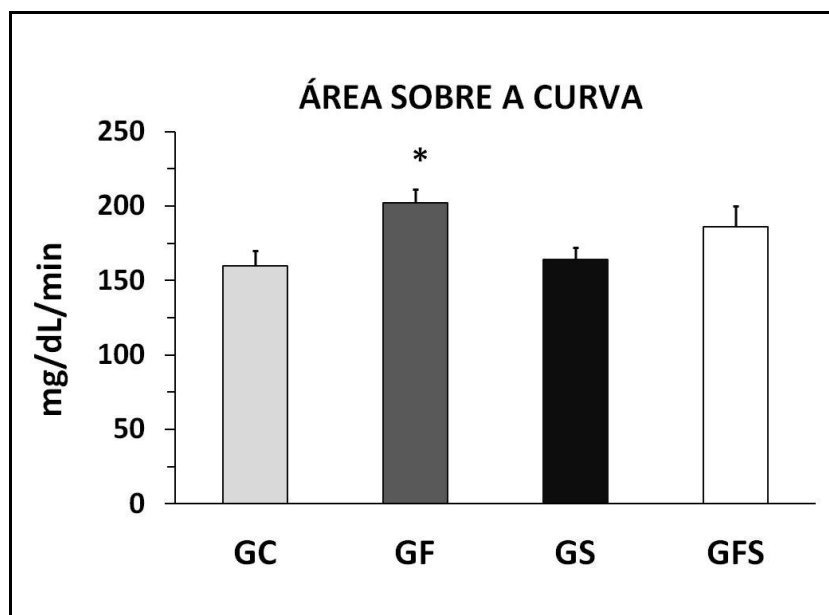
#### 4.4 Teste de Tolerância a Glicose – TTG

A figura 13 apresenta o comportamento dos grupos experimentais durante o TTG e a figura 14, os valores médios do cálculo da área sobre a curva do TTG. Podemos observar que a glicemia basal em jejum mostrou um discreto aumento nos animais tratados com frutose ( $94 \pm 3,9$  e  $105 \pm 8,0$  mg/dL para GF e GFS, respectivamente) quando comparados ao grupo controle ( $86 \pm 2,5$  mg/dL) e ao grupo sal ( $85 \pm 2$  mg/dL).

O cálculo da área sobre a curva mostrou um aumento nos animais tratados com frutose sugerindo uma alteração no metabolismo de glicose aos 21 dias de tratamento e que foi suficiente para modificar a ação da insulina e determinar uma intolerância à glicose nesses animais. Confirmando nossos achados, dados na literatura mostraram um aumento na resistência à insulina e intolerância à glicose em animais tratados cronicamente com uma dieta rica em frutose (FARAH *et al.*; 2007; BEZERRA *et al.* 2001)



**Figura 13:** Osmolaridade da urina coletada durante 24 hras nagaiola metabólica nos animais controle (GC), tratados durante 21 dias com frutose (GF), tratados durante 10 dias com NaCl (GS) e no grupo tratado com frutose e NaCl (GFS). \* $p < 0.05$  em relação ao grupo controle.



**Figura 14:** Osmolaridade da urina coletada durante 24 hras nagaiola metabólica nos animais controle (GC), tratados durante 21 dias com frutose (GF), tratados durante 10 dias com NaCl (GS) e no grupo tratado com frutose e NaCl (GFS). \* $p < 0.05$  em relação ao grupo controle.

#### 4.5 Análise do Perfil Bioquímico e Osmolaridade Sérica

Na tabela 01 são apresentados os resultados do perfil lipídico e da osmolaridade sérica dos animais ao final do protocolo experimental (21 dias). Ao final do protocolo, com os animais anestesiados, foram coletadas amostras do soro em 5 animais de cada grupo experimental para dosagem bioquímica do colesterol total, triglicérides, HDL e LDL séricos. O material coletado não utilizado está armazenado em freezer comercial à -20°C para posterior realização das análises bioquímicas de creatinina e glicose.

**Tabela 01:** Perfil lipídico e osmolaridade sérica nos grupos experimentais

<b>Grupos</b>	<b>Colesterol Total (mg/dL)</b>	<b>Triglicérides (mg/dL)</b>	<b>HDL (mg/dL)</b>	<b>LDL (mg/dL)</b>	<b>Osmolaridade Sérica (mmol/Kg)</b>
<b>Controle</b>	59±3,7	76±7,8	25±4,0	41±5,0	440±16
<b>Sal</b>	82±8,4	84±23	32±15	53±15	305±10
<b>Frutose</b>	91±4,7*	114±19*	40±10*	41±1,9	328±25
<b>Frutose e sal</b>	95±8,0*	69±13	32±2,8	52±6,7	369±70

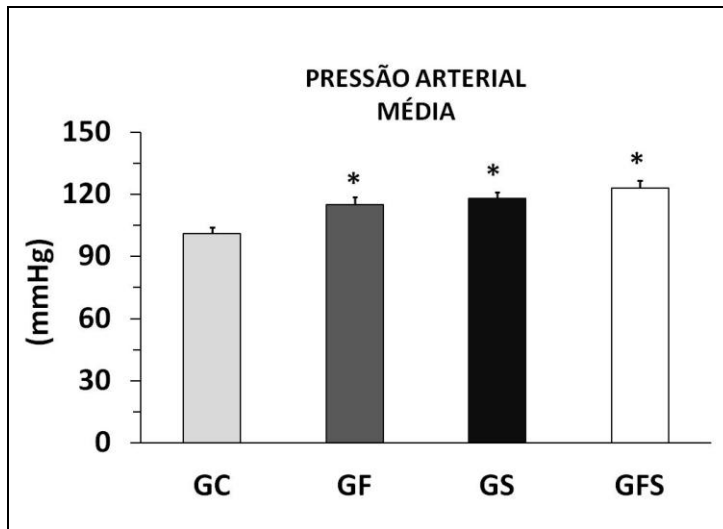
Os resultados apresentam média±erro padrão da média.

\*p<0.05 em relação ao grupo controle.

#### 4.6 Pressão Arterial e Frequência Cardíaca

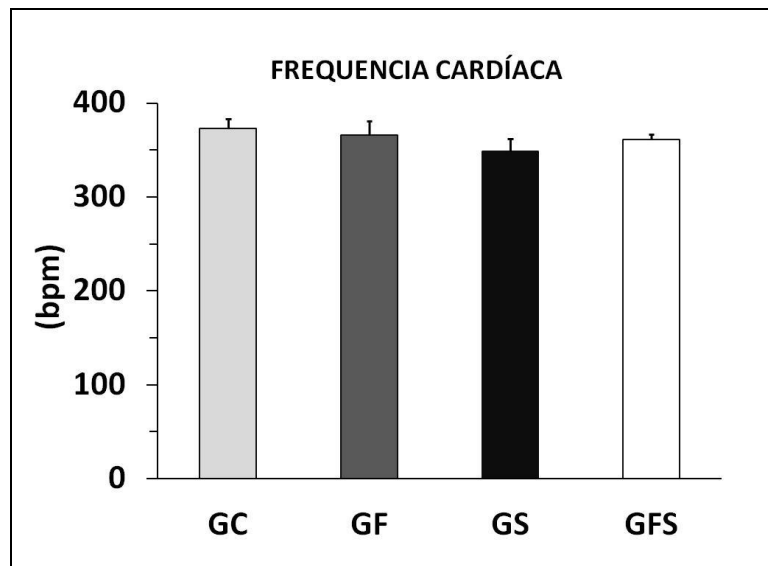
Ao término do protocolo experimental, foram realizados os registros de pressão arterial aferido diretamente com os animais acordados e com livre movimentação dentro de suas próprias gaiolas. Os valores basais de pressão arterial média (PAM) nos animais tratados com frutose e/ou sal 1% durante 10 dias

foram significativamente maiores quando comparados com os valores do grupo controle como mostra a figura 15.



**Figura 15:** Pressão arterial média nos animais controle (GC), tratados durante 21 dias com frutose (GF), tratados durante 10 dias com NaCl (GS) e no grupo tratado com frutose e NaCl (GFS). \* $p < 0.05$  em relação ao grupo controle.

Em relação à frequência cardíaca não houve diferenças significativas entre os grupos avaliados, como demonstrados na figura 16.

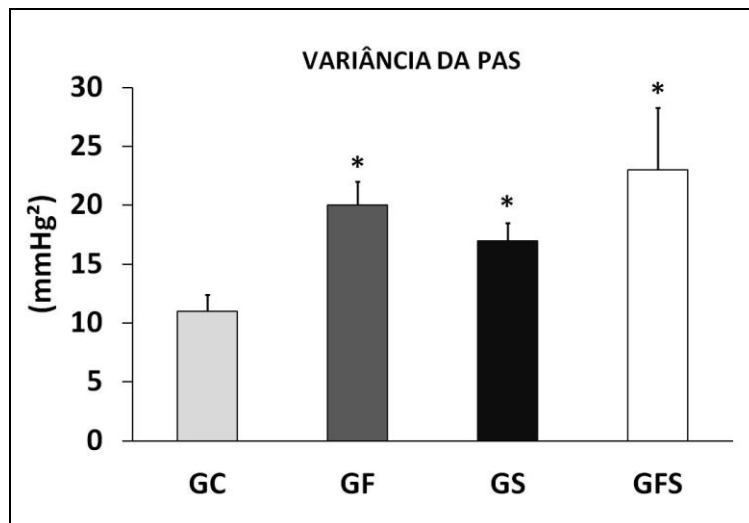


**Figura 16:** Frequência cardíaca animais controle (GC), tratados durante 21 dias com frutose (GF), tratados durante 10 dias com NaCl (GS) e no grupo tratado com frutose e NaCl (GFS).

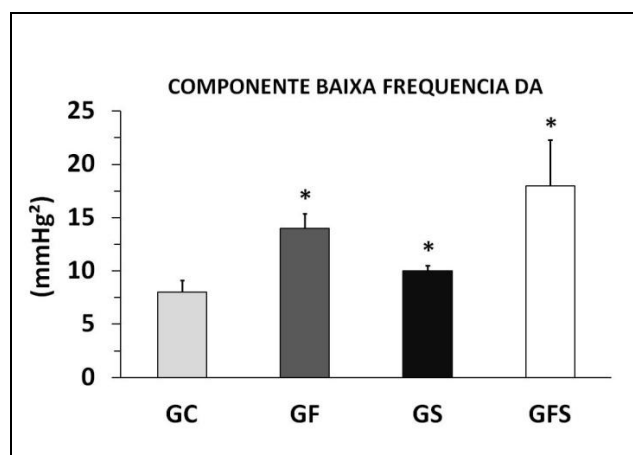
#### 4.7 Avaliação da Modulação Autonômica da Função Cardiovascular

A variabilidade da pressão arterial e da frequência cardíaca tanto no domínio do tempo (variância) como no domínio da frequência foi calculada pela análise espectral usando o método autoregressivo, nos grupos controle e após o tratamento com frutose e/ou sal 1% durante 10 dias.

Conforme demonstrado nas figuras 17 e 18, o tratamento com frutose e/ou sal aumentou a variabilidade da pressão arterial no domínio do tempo e no domínio da frequência no componente de baixa frequência. Esses dados em conjunto, sugerem que o tratamento crônico de frutose e/ou sal é capaz de aumentar a modulação simpática para a vasculatura, podendo contribuir para o aumento da pressão arterial observado nesses animais. De fato, existem evidências na literatura sugerindo um importante papel do simpático nas alterações cardiovasculares induzidas pelo tratamento com frutose (VERMA et al. 1996). Corroborando esses dados, foi demonstrado que o tratamento com frutose aumenta a excreção urinária de catecolaminas e a expressão gênica de receptores adrenérgicos (KAMIDE et al. 2002).



**Figura 17:** Variabilidade da pressão arterial sistólica no domínio do tempo (variância) nos animais controle (GC), tratados durante 21 dias com frutose (GF), tratados durante 10 dias com NaCl (GS) e no grupo tratado com frutose e NaCl (GFS). \* $p < 0.05$  em relação ao grupo controle.



**Figura 18:** Variabilidade da pressão arterial sistólica no domínio da frequência (componente da baixa frequência) nos animais controle (GC), tratados durante 21 dias com frutose (GF), tratados durante 10 dias com NaCl (GS) e no grupo tratado com frutose e NaCl (GFS). \* $p < 0.05$  em relação ao grupo controle.

Os valores de variabilidade da frequência cardíaca (intervalo de pulso) no domínio do tempo e no domínio da frequência (componente oscilatório de baixa frequência e o de alta frequência) foram significativamente maiores no grupo tratado com sal em relação ao grupo controle (Tabela 2). Esses dados sugerem que o tratamento crônico durante 10 dias com NaCl 1% determinou uma desautonomia no coração.

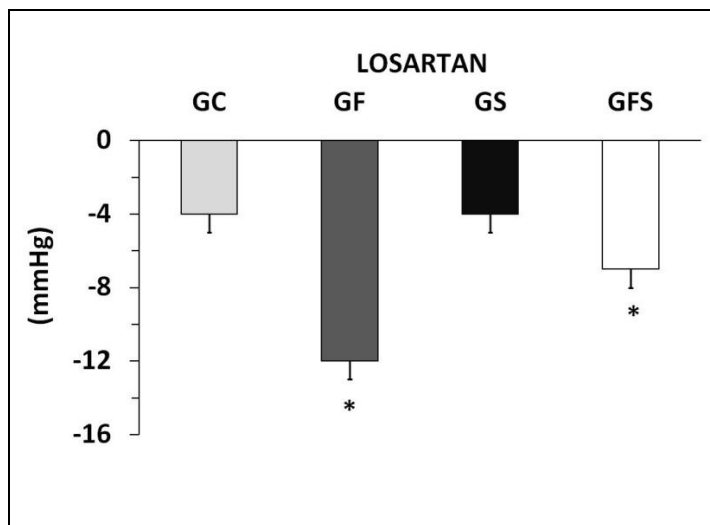
**Tabela 02:** Variabilidade de Frequência cardíaca avaliada no domínio do tempo (variância) e no domínio da frequência nos animais controle e nos animais tratados durante com frutose (21 dias), com NaCl 1% durante 10 dias e com a associação de frutose e sal.

Grupo	Variância ( $\text{mms}^2$ )	Baixa	Alta
		Frequência ( $\text{mms}^2$ )	Frequência ( $\text{mms}^2$ )
Controle	10±4.9	1.1±0.4	5.9±3.5
Frutose	11± 3.7	0.7±0.5	7.3±2.0
Sal 1% 10 dias	24±1.8*	1.6±0.3	15±1.3*
Frutose e sal	14±3.7	1.7±0.7	8.9±2.3

Os resultados apresentam média±erro padrão da média. \* $p < 0.05$  para comparação com o grupo controle.

#### 4.8 Bloqueio farmacológico do Sistema Renina-Angiotensina

Como observado na figura 19, a administração aguda de Losartan determinou maior queda da pressão arterial média nos animais tratados com frutose e no grupo onde houve a associação de frutose e sal, sugerindo que a administração crônica de frutose é capaz de ativar o sistema renina-angiotensina que por sua vez contribui para o aumento da pressão arterial verificado nesses animais. Vale destacar que há evidências na literatura mostrando uma participação importante do sistema renina-angiotensina nas alterações cardiovasculares induzidas pelo consumo de frutose pois estudos anteriores demonstraram aumento na expressão gênica de receptores de Angiotensina na vasculatura e no efeito depressor de antagonistas do receptor de Angiotensina em ratos (KATOVICH et al. 2001; HSIEH, 2005) e ativação do sistema em camundongos (SHINOZAKI et al., 2004) tratados com frutose. Além disso, dados anteriores do nosso grupo mostraram aumento nos níveis circulantes de angiotensina em camundongos tratados cronicamente com dieta rica em frutose (FARAH et al., 2004).



**Figura 19:** Variabilidade da pressão arterial sistólica no domínio da frequência (componente da baixa frequência) nos animais controle (GC), tratados durante 21 dias com frutose (GF), tratados durante 10 dias com NaCl (GS) e no grupo tratado com frutose e NaCl (GFS). \* $p < 0.05$  em relação ao grupo controle

#### 4.9 Avaliação Morfo-Funcional do Coração: Ecocardiografia

A avaliação ecocardiográfica foi realizada em 4 animais de cada grupo experimental. A Tabela 3 apresenta os resultados do grupo controle com o índice global de desempenho do miocárdio (IDM), a função sistólica representada pela variável de fração de ejeção do ventrículo esquerdo (LVEF), a função diastólica representada pelo tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e a morfometria representada pelo valor do diâmetro da cavidade do ventrículo esquerdo em diástole (LVDIA) e a massa do ventrículo esquerdo (MVE). Os dados dos outros grupos experimentais estão armazenados para a realização da análise.

**Tabela 03:** Valores da avaliação morfo-funcional do grupo controle.

<b>Animal</b>	<b>IDM</b>	<b>LVEF</b>	<b>TRIV</b>	<b>LVDIA</b>	<b>MVE</b>
<b>R1</b>	0,44	0,76	2,24	2,23	1,92
<b>R2</b>	0,53	0,80	2,18	2,51	2,65
<b>R3</b>	0,40	0,81	2,22	2,28	2,54
<b>R4</b>	0,43	0,79	2,57	2,08	1,88
<b>R5</b>	0,48	0,87	2,15	1,87	1,58
<b>Média</b>	<b>0,46</b>	<b>0,81</b>	<b>2,27</b>	<b>2,19</b>	<b>2,11</b>
<b>D.P.</b>	0,051	0,04	0,17	0,24	0,46
<b>Erro</b>	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>	<b>0,08</b>	<b>0,11</b>	<b>0,21</b>

#### 4.10 Protocolo Experimental do Rim Isolado

Foram realizadas ao todo 13 perfusões renais com sucesso, sendo 5 em animais do grupo controle, 4 animais tratados com sal 1% durante 10 dias, 3 animais tratados com frutose durante 21 dias e 1 animal tratado com frutose e sal. Durante o estudo, os rins foram perfundidos por 2 horas após um período de equilíbrio de 15-20 minutos para ajuste desta preparação às novas condições. Os valores obtidos e calculados de pressão de perfusão, fluxo urinário e resistência vascular renal estão descritos abaixo. A urina e o perfusato coletados a cada 10



minutos estão armazenadas em freezer -20°C para posterior análise de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> , e osmolaridade. O ritmo de filtração glomerular será avaliado posteriormente pela dosagem de creatinina no perfusato e na urina coletada.

#### 4.10. 1 Pressão de Perfusão

Como pode ser observada na tabela 04, a pressão de perfusão se manteve estável durante todo o protocolo experimental nos animais do grupo controle, grupo frutose e grupo sal. Apenas no animal do grupo frutose/sal houve um aumento na pressão de perfusão nos últimos minutos do protocolo experimental precisando interromper o protocolo aos 90 min. No tempo de 30 min. os animais do grupo sal e o animal do grupo frutose e sal apresentou um aumento na pressão de perfusão em relação ao grupo controle.

**Tabela 04:** Pressão de perfusão (mmHg) observada durante o procedimento de perfusão extracorpórea nos animais controle, tratados durante 21 dias com frutose (frutose), tratados durante 10 dias com NaCl e no grupo tratado com frutose e NaCl (frutose e sal).

<b>Grupo</b>	<b>30 min.</b>	<b>60 min.</b>	<b>90 min.</b>	<b>120 min.</b>
<b>Controle</b>	102±5,5	101±7,5	102±6,5	104±3,3
<b>Frutose</b>	115±8,0	107±3,5	103±2,5	112±10
<b>Sal 1% 10 dias</b>	121±4,0*	126±4,8	127±6,0	126±5,3
<b>Frutose e sal</b>	156±0,0*	188±0,0	213±0,0	-----

Os resultados apresentam média±erro padrão da média. \*p<0.05 em relação ao grupo controle

#### 4.10. 2 Resistência Vascular Renal

Como pode ser observado na tabela 05, existiu um aumento na resistência vascular renal no animal do grupo tratado com frutose e sal durante o protocolo

experimental quando comparados com os outros grupos experimentais. No tempo de 30 min. o animal do grupo frutose e sal apresentou um aumento na resistência vascular renal em relação ao grupo controle.

**Tabela 05:** Resistência vascular renal (mmHg.mL/g/min.) observada durante o procedimento de perfusão extracorpórea nos animais controle, tratados durante 21 dias com frutose (frutose), tratados durante 10 dias com NaCl e no grupo tratado com frutose e NaCl (frutose e sal).

<b>Grupo</b>	<b>30 min.</b>	<b>60 min.</b>	<b>90 min.</b>	<b>120 min.</b>
<b>Controle</b>	4,5±0,4	4,6±0,4	4,9±0,5	5,0±0,2
<b>Frutose</b>	4,5±0,3	4,1±0,1	3,9±0,1	4,3±0,9
<b>Sal 1% 10 dias</b>	5,3±0,5	5,3±0,4	4,9±0,6	5,1±0,5
<b>Frutose/sal</b>	8,1±0,0*	13±0,0	15±0,0	-----

Os resultados apresentam média±erro padrão da média. \*p<0.05 em relação ao grupo controle

#### 4.10.3 Fluxo Urinário

Como pode ser observado na tabela 06, existiu um aumento no fluxo urinário no animal do grupo tratado com frutose e sal durante o protocolo experimental.

**Tabela 06:** Resistência vascular renal (mL/g/min.) observada durante o procedimento de perfusão extracorpórea nos animais controle, tratados durante 21 dias com frutose (frutose), tratados durante 10 dias com NaCl e no grupo tratado com frutose e NaCl (frutose e sal).

<b>Grupo</b>	<b>30 min.</b>	<b>60 min.</b>	<b>90 min.</b>	<b>120 min.</b>
<b>Controle</b>	0,12±0,01	0,13±0,01	0,12±0,01	0,12±0,01
<b>Frutose</b>	0,12±0,02	0,14±0,02	0,11±0,02	0,10±0,01
<b>Sal 1% 10 dias</b>	0,07±0,02	0,09±0,02	0,09±0,01	0,08±0,02
<b>Frutose/Sal</b>	0,14±0,0	0,20±0,0	0,41±0,0	-----

Os resultados apresentam média±erro padrão da média.

## 5. CONCLUSÃO

Nossos principais resultados mostraram que a sobrecarga salina de 1% na água de beber durante 10 dias e/ou frutose durante 21 dias foram capazes de modificar a função cardiovascular determinando aumento na pressão arterial sem alteração na frequência cardíaca e que esse aumento na pressão arterial foi acompanhado pelo aumento na variabilidade da pressão arterial sugerindo um aumento na modulação simpática para a vasculatura. Entretanto, é importante salientar que as alterações verificadas na função cardiovascular não foram diferentes quando comparados os tratamentos individuais, sal ou frutose, com a associação dos dois fatores de risco. Os dados obtidos na gaiola metabólica e na osmolaridade sugerem que tal aumento da pressão arterial não se deve a retenção de volume. Entretanto, os dados obtidos com o bloqueio farmacológico do sistema renina-angiotensina mostram um aumento na atividade desse sistema o que poderia pelo menos em parte justificar as alterações hemodinâmicas observadas nos grupos experimentais.

Os estudos preliminares de perfusão renal extracorpórea realizados no presente estudo mostraram a eficácia do método para a avaliação da função renal em diferentes modelos experimentais e sugerem que a associação de frutose e sal modifica a função renal diferentemente do tratamento individual.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALBINOTT A.W.; IRIGOYEN M.C.; BRASILEIRO-SANTOS M.D.O. S.; ZOTTIS B.; DE LIMA N.G.; PASSAGLIA J.; SCHAAN B.D. (1988). Dose-dependent autonomic dysfunction in chronic L-NAME-hypertensive diabetic rats. *J Cardiovasc. Pharmacol.* 46(5):563-9.

BOWMAN R.H. & MAACK T. (1974). Effect of albumin concentration and ADH on H<sub>2</sub>O and electrolyte in perfused rat kidney. *Am J Physiol.* 226(2): 426-430.

BEZERRA R.M.N.; BUENO M.; SILVA M.S.; TAVARES D.Q.; CARVALHO C.R.O.; SAAD M.J.A.; GONTIJO J.A.R. A high-fructose diet induces insulin resistance but not blood pressure changes in normotensive rats. *Braz. J. of Med. and Biol. Res.*; 34: 1155-1160, 2001.

BRAND P.H.; METTING P.J.; BRITTON S.L. (1988). Support of arterial blood pressure by major pressor systems in conscious dogs. *Am J Physiol.*; 255(3 Pt 2): H483-91.

CHEN Y.; JOAQUIM L.F.; FARAH V.M.; WICHI R.B.; FAZAN R. JR.; SALGADO H.C.; MORRIS M. (2005). Cardiovascular Autonomic Control in Mice Lacking Angiotensin AT1a Receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 288: R1071-R1077.

CHOBANIAN A.V. & HILL M. (2000). National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop on Sodium and Blood Pressure: a critical review of current scientific evidence. *Hypertension*, 35, 858-63.

COWLEY A.W. JR. & ROMAN R.J. (1996). "The role of the kidney in hypertension". *JAMA.* 275(20):1581-9.

DAI S. & MCNEILL J.H. (1995). Fructose-induced hypertension in rats is concentration- and duration-dependent. *J Pharmacol Toxicol Methods* 33, 101-107.

DE ANGELIS K.; GAMA V.M.; FARAH V.A.; IRIGOYEN M.C. (2005). Blood flow measurements in rats using four color microspheres during blockade of different vasopressor systems. *Braz J Med Biol Res.* 38(1):119-25.

DIAS D.S.; GNECCHI-RUSCONE T.; LAVELLI B.; BELLINA V.; MANZELLA D.; PORTA A.; MALLIANI A.; MONTANO N. (2002). Opposite Effects of Iv Amiodarone on Cardiovascular Vagal and Sympathetic Efferent Activities in Rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 283: R543-R548.

ECKEL R.H.; GRUNDY S.M.; ZIMMET P.Z. (2005). The metabolic syndrome. *Lancet.* 365 (9468):1415-28.

FARAH V.; ELASED K.M.; CHEN Y.; KEY M.P.; CUNHA T.S.; IRIGOYEN M.C.; MORRIS M. (2006). Nocturnal hypertension in mice consuming a high fructose diet. *Auton Neurosci.* 130 (1-2):41-50.

FARAH V.; ELASED K.M.; CHEN Y.; KEY M.P.; CUNHA T.S.; IRIGOYEN M.C.; MORRIS M. (2006). Nocturnal hypertension in mice consuming a high fructose diet. *Auton Neurosci.* 130(1-2):41-50.

FARAH V.M.; JOAQUIM L.F.; MORRIS M. (2006). Stress cardiovascular/autonomic interactions in mice. *Physiol Behav*; 30; 89 (4):569-75.

FARAH V.; ELASED K.M.; MORRIS M. (2007). Genetic and Dietary Interactions: Angiotensin AT1a Receptors and the Cardiovascular and Metabolic Responses to a Fructose Diet. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 293 (2):H1083-9.

FARAH V.M.; FIORINO P.; ROQUE A.P.; MARTINS A.A.; FONTELES M.C. (2008). High salt intake enhances sympathetic modulation in the rat. *FASEB J.* 2008 22:953.

FAZAN JR R.; BALLEJO G.; SALGADO M.C.; MORAES M.F.; SALGADO H.C. (1997). Heart rate variability and baroreceptor function in chronic diabetic rats. *Hypertension*, 30, 632-5.

FONTELES M.C.; COHEN J.J.; BLACK A.J.; WERTHEIM S.J. (1983). Support of kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. *Am. J. Physiol.* 244: F235-246.

FONTELES M.C. & DE LIMA E FORTI C.A. (1993). The effect of indomethacin and reserpine on renal vascular escape. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 81(1):103-12.

FONTELES M.C.; GREENBERG R.N.; MONTEIRO H.S.; CURRIE M.G.; FORTE L.R. (1998). Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol.* 275 (2 Pt 2):F191-7.

FORD E.S.; GILES W.H.; DIETZ W.H. (2002). Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA.* Jan 16; 287(3):356-9.

FRATTOLA A.; PARATI G.; CUSPIDI C.; ALBINI F.; MANCIA G. (1993). Prognostic value of 24-hour blood pressure variability. *J Hypertens* 11, 1133-1137.

GAVRAS H.; HATZINIKOLAOU P.; NORTH W.G.; BRESNAHAN M.; GAVRAS I. (1982). Interaction of the sympathetic nervous system with vasopressin and renin in the maintenance of blood pressure. *Hypertension*, 4, 400-5.

GUO M.; RICARDO S.D.; DEANE J.A.; SHI M.; CULLEN-MCEWEN L.; BERTRAM J.F. (2005). A stereological study of the renal glomerular vasculature in the db/db mouse model of diabetic nephropathy. *J Anat.* 207(6):813-21.

HAKKINEN J.P.; MILLER M.W.; SMITH A.H.; KNIGHT D.R. (1995). Measurement of organ blood flow with coloured microspheres in the rat. *Cardiovasc Res.* 29(1):74-9.

HÄKKINEN V.; ESKOLA H.; YLI-HANKALA A.; NURMIKKO T.; KOLEHMAINEN S. (1995). Which structures are sensitive to painful transcranial electric stimulation? *Electromyogr Clin Neurophysiol.* 35(6):377-83.

HALLFRISCH J. (1990). Metabolic effects of dietary fructose. *FASEB J* 4, 2652-2660.

HAMILTON R.L.; BENNY N.M.; WILLIAMS M.C.; SEVERINGHAUS E.M.A. (1974). Simple and inexpressive membrane "lung" for animal organ perfusion. *J Lipid Res*, 9; 667-668.

HEYMANN M.A.; PAYNE B.D.; HOFFMAN J.I.; RUDOLPH A.M. (1977). Blood flow measurements with radionuclide-labeled particles. *Prog Cardiovasc Dis.* 20(1):55-79.

HSIEH P.S. (2005). Reversal of fructose-induced hypertension and insulin resistance by chronic losartan treatment is independent of AT2 receptor activation in rats. *J Hypertens* 23, 2209-2217.

HUMMEL K.P.; DICKIE M.M.; COLEMAN D.L. (1966). Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science* 153 (740): 1127-8.

ISOMAA B.; HENRICSSON M.; ALMGREN P.; TUOMI T.; TASKINEN M.R.; GROOP L. (2001). The metabolic syndrome influences the risk of chronic complications in patients with type II diabetes. *Diabetologia.* 44(9):1148-54.

JANDELEIT-DAHM K. & COOPER M.E. (2002). Hypertension and diabetes. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 11, 221-8.

JOAQUIM L.F.; FARAH V.M.; BERNATOVA I.; FAZAN JR. R.; GRUBBS R.; MORRIS M. (2004). "Enhanced heart rate variability and baroreflex index after stress and cholinesterase inhibition in mice". *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 287(1):H251-7.

JOHNSON R.J.; HERRERA-ACOSTA J.; SCHREINER G.F.; RODRIGUEZ-ITURBE B. (2002). Subtle acquired renal injury as a mechanism of salt-sensitive hypertension. *N Engl J Med*, 346, 913-23.

KAMIDE K.; RAKUGI H.; HIGAKI J.; OKAMURA A.; NAGAI M.; MORIGUSHI K. et al. The rennin-angiotensin and adrenergic nervous system in cardiac hypertrophy in fructose-fed rats. *Am J Hypertens.*, 15: 66-71, 2002.

KATOVICH M.J.; REAVES P.Y.; FRANCIS S.C. et al. Gene therapy attenuates the elevated blood pressure and glucose intolerance in an insulin-resistant model of hypertension. *J. Hypertens*. 19: 1553-1558, 2001.

KIKUYA M.; HOZAWA A.; OHOKUBO T.; TSUJI I.; MICHIMATA M.; MATSUBARA M.; OTA M.; NAGAI K.; ARAKI T.; SATOH H.; ITO S.; HISAMICHI S.; IMAI Y. (2000). Prognostic significance of blood pressure and heart rate variabilities: the Ohasama study. *Hypertension* 36, 901-906.

KRIEGER N. (1999). Sticky webs, hungry spiders, buzzing flies, and fractal metaphors: on the misleading juxtaposition of "risk factor" versus "social" epidemiology. *J Epidemiol Community Health*. 53(11):678-80.

LACCHINI S.; FERLIM E.L.; MORAES R.S.; RIBEIRO J.P.; IRIGOYEN MC. (2001). Contribution of nitric oxide to arterial pressure and heart rate variability in rats submitted to high-sodium intake. *Hypertension* 38:326-331.

LIFTON R.P. (1996). Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science*, 272, 676-80.

LIMA A.A.; MONTEIRO H.S.; FONTELES M.C. (1992). The effects of Escherichia coli heat-stable enterotoxin in renal sodium tubular transport. *Pharmacol Toxicol*; 70(3):163-7.

LOPES H.F.; BORTOLOTTO L.A.; SZLEJF C.; KAMITSUJI C.S.; KRIEGER E.M. (2001). Hemodynamic and metabolic profile in offspring of malignant hypertensive parents. *Hypertension* 38, 616-620.

MALLIANI A.; PAGANI M.; LOMBARDI F.; CERUTTI S. (1991). "Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain". *Circulation* 84: 482-492.

MANCIA G.; FRATTOLA A.; GROPELLI A.; OMBONI S.; PARATI G.; ULIAN L.; VILLANI A. (1994). Blood pressure reduction and end-organ damage in hypertension. *J Hypertens Suppl* 12, S35-S41.

MARTINEZ-MALDONADO M. & OPAVA-STITZER S. (1978). Free water clearance curves during saline, mannitol, glucose and urea. *J Physiol*. 280: 487-497.

NAKAGAWA T.; TUTTLE K.R.; SHORT R.A.; JOHNSON R.J. (2005). Hypothesis: fructose-induced hyperuricemia as a causal mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome. *Nat Clin Pract Nephrol*. 80-6.

PALLER M.S. & LINAS S.L. (1984). Role of angiotensin II, alpha-adrenergic system, and arginine vasopressin on arterial pressure in rat. *Am J Physiol*, 246, H25-30.

PANZRAM G. (1987). Mortality and survival in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 30(3):123-31.

PARATI G.; POMIDOSSI G.; ALBINI F.; MALASPINA D.; MANCIA G. (1987). "Relationship of 24-hour blood pressure mean and variability to severity of target-organ damage in hypertension". *J Hypertens* 5: 93-98.

PEGG E.D. (1971). Vascular resistance of the isolated rabbit kidney. *Cryobiology*, 8: 431-440.

PITTS R.F. (1971). *Physiology of the kidney and body fluids*. Year Book Medical Publishers Inc., Chicago 2<sup>nd</sup>. Edition.



RITZ E.; RYCHLIK I.; LOCATELLI F.; HALIMI S. (1999). End-stage renal failure in type 2 diabetes: A medical catastrophe of worldwide dimensions. *Am J Kidney Dis.* 34(5):795-808.

ROSS B.D. (1978). The isolated perfused rat kidney. *Clin Sci Mol Med*; 55: 13-21.

SANTAJULIANA D.; HORNFELDT B.J.; OSBORN J.W. (1996). Use of ganglionic blockers to assess neurogenic pressor activity in conscious rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 35, 45-54.

SANTOS-NETO M.S.; CARVALHO A.F.; MONTEIRO H.S.; FORTE L.R.; FONTELES M.C. (2006). Interaction of atrial natriuretic peptide, urodilatin, guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. *Regul Pept.* 136(1-3):14-22.

SCHAAN B.D.; DALL'AGO P.; MAEDA C.Y.; FERLIN E.; FERNANDES T.G.; SCHMID H.; IRIGOYEN M.C. (2004). Relationship between cardiovascular dysfunction and hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Braz J Med Biol Res.*; 37(12):1895-902.

SHINOZAKI K.; AYAJIKI K.; NISHIO Y.; SUGAYA T.; KASHIWAGI A.; OKAMURA T. (2004). Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in vascular dysfunction associated with insulin resistance. *Hypertension*; 43(2):255-62.

STUBBS M.; GUBERSKI D.L.; LIKE A.A. (1994). Preservation of GLUT 2 expression in islet beta cells of Kilham rat virus (KRV)-infected diabetes-resistant BB/Wor rats. *Diabetologia*,37(12):1186-94.

SURWIT R.S.; KUHN C.M.; COCHRANE C.; MCCUBBIN J.A.; FEINGLOS M.N. (1988). Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes.* 37(9):1163-7.

SUZUKI M.; NOMURA C.; ODAKA H.; IKEDA H. (1997). Effect of an insulin sensitizer, pioglitazone, on hypertension in fructose-drinking rats. *Jpn J Pharmacol* 74, 297-302.

TASK Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology (Membership of the Task Force listed in the Appendix). Heart Rate Variability. *European Heart Journal* 1996;17; 354-381.

TEFF K.L.; ELLIOTT S.S.; TSCHOP M.; KIEFFER T.J.; RADER D.; HEIMAN M.; TOWNSEND R.R.; KEIM N.L.; D'ALESSIO D.; HAVEL P.J. (2004). Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2963-2972.

TREVISAN M.; LIU J.; BAHASAS F.B.; MENOTTI A. (1998). Syndrome X and mortality: a population-based study. Risk Factor and Life Expectancy Research Group. *Am J Epidemiol.* 15; 148(10): 958-66.

VALMADRID C.T.; KLEIN R.; MOSS S.E.; KLEIN B.E. (2000). The risk of cardiovascular disease mortality associated with microalbuminuria and gross proteinuria in persons with older-onset diabetes mellitus. *Arch Intern Med.*24; 160(8):1093-100.

VASDEV S.; LONGERICH L.; GILL V. (2004). Prevention of fructose-induced hypertension by dietary vitamins. *Clin Biochem.* 37(1):1-9.

VERMA S.; BHANOT S.; YAO L.; McNEILL J.H. Defective endothelium-dependent relaxation in fructose-hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 9: 370-376, 1996.

WEINBERGER M.H. (1996). Salt Sensitivity of Blood Pressure in Humans. *Hypertension*, 27, 481-490.

WEIR M.R. (1998). Impact of salt intake on blood pressure and proteinuria in diabetes: importance of the renin-angiotensin system. *Miner Electrolyte Metab.* 24, 438-45.

WYSS J.M. (1993). The role of sympathetic nervous system in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2: 265-73.

YUSUF S.; SLEIGHT P.; POGUE J.; BOSCH J.; DAVIES R.; DAGENAIS G. (2000). Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* Jan 20; 342(3):145-53.

ZANELLA M.T.; KOHLMANN O. J.R.; RIBEIRO A.B. (2001). Treatment of obesity hypertension and diabetes syndrome. *Hypertension.* 38(3 Pt 2):705-8.

ZIMMET P.; ALBERTI K.G.; SHAW J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 414(6865):782-7.