

Noemí Angélica Vieira Roza

**“INGESTÃO MATERNA CRÔNICA DE DIETA HIPERLIPÍDICA:
EFEITO SOBRE A FUNÇÃO RENAL, O METABOLISMO GLICÍDICO
E A PRESSÃO ARTERIAL DA PROLE”**

Campinas
Unicamp
2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

**“INGESTÃO MATERNA CRÔNICA DE DIETA HIPERLIPÍDICA: EFEITO SOBRE
A FUNÇÃO RENAL, O METABOLISMO GLICÍDICO E A PRESSÃO ARTERIAL
DA PROLE”**

Noemí Angélica Vieira Roza

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade de Campinas -
UNICAMP para obtenção de título de Mestre
em Clínica Médica, área de concentração
em Ciências Básicas. Sob orientação do
Prof. Dr. José Antonio Rocha Gontijo

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

R817i Roza, Noemí Angélica Vieira, 1980-
Ingestão materna crônica de dieta hiperlipídica: efeito sobre a função renal, o metabolismo glicídico e a pressão arterial da prole. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : José Antonio Rocha Gontijo
Coorientador: Adrienne Christine Palanch
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Gorduras na Dieta. 2. Rim. 3. Desenvolvimento Fetal. 4. Hipertensão. 5. Inflamação. I. Gontijo, José Antonio Rocha. II. Palanch, Adrienne Christine. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês: Chronic maternal ingestion fat diet: effect on renal function, glucose metabolism and blood pressure of offspring

Palavras-chave em inglês:

Dietary Fats

Kidney

Fetal Development

Hypertension

Inflammation

Área de concentração: Ciências Básicas

Titulação: Mestre em Clínica Médica

Banca examinadora:

José Antonio Rocha Gontijo [Orientador]

Adrienne Christine Palanch [Coorientador]

Flávia Fernandes Mesquita

Terezila Machado Coimbra

Data da defesa: 30-08-2011

Programa de Pós-Graduação: Faculdade de Ciências Médicas

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Noemi Angélica Vieira Roza

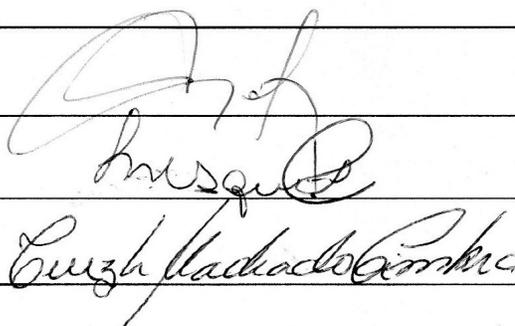
Orientador: Prof. Dr. José Antonio Rocha Gontijo

Membros:

1. Prof. Dr. José Antonio Rocha Gontijo

2. Prof^a. Dr^a. Flávia Fernandes Mesquita

3. Prof^a. Dr^a. Terezila Machado Coimbra



The image shows three handwritten signatures in black ink, corresponding to the names listed on the left. The first signature is for José Antonio Rocha Gontijo, the second for Flávia Fernandes Mesquita, and the third for Terezila Machado Coimbra.

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/08/2011

Dedico este trabalho ao meu marido “Nê”:

“Melhor é serem dois do que um, porque têm melhor paga do seu trabalho. Porque se caírem, um levanta o companheiro; ai, porém, do que estiver só; pois, caindo, não haverá quem o levante. Também, se dois dormirem juntos, eles se aquecerão; mas um só como se aquecerá? Se alguém quiser prevalecer contra um, os dois lhe resistirão; o cordão de três dobras não se rebenta com facilidade.”

Eclesiastes 4:9 ao 12

e à minha filha Julia:

*“Os filhos são herança do Senhor,
e o fruto do ventre o seu galardão.”*

Salmo 127 verso 3

“Quando te dei à luz, você trouxe luz para a minha vida!”

Agradecimentos

ao Professor Dr. José Antonio Rocha Gontijo pela confiança e por sua orientação sábia e consistente,

à Professora Dra. Adrienne Christine Palanch por ser exemplo de profissional fiel, além de seus limites e por conseguir ser pesquisadora brilhante e, ao mesmo tempo, ser humana,

ao Professor Dr. José Francisco Figueiredo por todas as ótimas contribuições tão ricas em experiência,

aos professores Laura Sterian Ward , Nelson Lutaif, Terezila Machado Coimbra e Flávia Fernandes Mesquita por acrescentarem mais qualidade com suas sugestões durante a Qualificação e a Defesa

às Biólogas Beth e Ize por seu apoio tão útil em momentos de pressão

aos colegas e agregados do Laboratório de Metabolismo Hidrossalino, primeiro as “Luluzinhas”: Flávia, Silmara, Amanda, Sônia, Lívia, Adriana Vinagre, Carmem e Michele, por serem ouvidos e mãos tão úteis nos bons e nos piores momentos e por seus bons conselhos, dados com muita alegria

aos colegas do Laboratório de Metabolismo Hidrossalino, agora os “Bolinhas”: Rafael Borges, Marcelo, Eduardo, Gustavo, Nelson, Luiz Fernando, Vinicius Rodrigues , Vinicius Canale, Rafael e Benito por toda ajuda e pelas risadas nos momentos em que seria pior chorar

às amáveis Dioze Guadagnini, Érika Anne e Ivone Bertels por tudo que fizeram por mim, não viveria (pelo menos a minha pesquisa) sem vocês...

aos funcionários do Núcleo de Medicina: Adriana Zapparolli, Sr. José, Sr. Antonio, Sr. Luiz, Luciana, Carol, Joyce, Willian, Miguel, Dito Ana, Roberto, Edilene, Jorge e Erasmo por toda grande colaboração

aos colegas de outros Laboratórios colaboração quanto aos protocolos e o uso dos aparelhos

às minhas ratas por tão grande significado na vida inclusive, às que não puderam ser utilizadas, e a todos os meus filhotes (quer dizer, das ratas) por tão grande benefício em prol da humanidade

à Capes por conceder a bolsa no primeiro período

à Fapesp por conceder a bolsa

à Faculdade de Ciências Médicas, por me receber e apoiar a pesquisa

Agradecimentos

aos meus pais Luiz e Creusa porque tudo o que sou e o que tenho deve-se a eles, e isso, é a maior e mais valiosa herança que poderia receber!

aos meus irmãos Luiz Júnior, Maressa e Luiz Henrique, por me ensinarem o quanto a diversidade entre os seres humanos é valiosa

ao meu marido “Nê” por toda paciência (e, às vezes, falta dela), que me ensinou tanto sobre como sobreviver pesquisando, mas amando, e por ser um pai muito presente quando a Julia estava com uma mãe um pouco ausente

à minha filha Julia , minha companheira fiel, alegre, desafiadora, carente de atenção e por causa de quem valeu apenas tudo isso...

à minha avó Helena e às minhas tias Janeide (in memoriam), Regina, Janete, Geralda, Márcia, Andrea e Grace, apesar da distância, vocês me incentivam muito,

à minha sogra D. Benedita pelo cuidado com a Julia quando precisei

ao CECI da Unicamp por receber a Julia e me aliviar bastante por saber que estava por perto e sendo bem cuidada

às amigas D. Maria, Edvania, Siméia, Thaís, Rosy, Rosi, Tânia, Naiana, Nalva, Fabiana, Luciane, Josmeri, Vera e Cleide, que compartilharam comigo muitas aflições, mas espero que compartilhem muitas vitórias

ao meu Pastor Humberto de Paiva Silva por tanto apoio e discernimento, com conselhos valiosos,

às amigas Rúbia, Déia, Renata, Lucineide, Rosilene, Zélia, Larissa, Marcia e Milagro porque contato é necessário a quem está vivo

às pessoas que tantas vezes me ajudaram dentro do ônibus com a Julia, por suas conversas, por suas perguntas e incentivo, espero que a minha pesquisa contribua, começando com o bem-estar de vocês

e finalmente, a quem originou tudo : Deus! Obrigada por ser o Doador da Vida (a minha, a dos animais, a da pesquisa e a do Universo)!!!

“Porque dele, e por meio dele, e para ele são todas coisas. A ele, pois, a glória eternamente. Amém”

Carta aos Romanos 11:36



RESUMO

RESUMO

A prevalência de doenças cardiovasculares e obesidade está associada ao aumento da ingestão de alimentos hipercalóricos em decorrência de modificações no padrão alimentar ocorrido nas últimas décadas. A relação entre uma dieta rica em ácidos graxos saturados e resistência à insulina, *Diabetes Mellitus* e hipertensão é amplamente aceita. A ingestão de dieta hiperlipídica durante o período gestacional pode induzir na prole, na idade adulta, hipertensão, resistência à insulina, dislipidemia e obesidade, sintomas clássicos da Síndrome Metabólica, cada vez mais presentes também em crianças e adolescentes. Adicionalmente, a exposição à dieta hiperlipídica pode aumentar a expressão de proteínas da via inflamatória tais como JNK, IKK β , I κ B, NF- κ B. Este trabalho estudou a repercussão do tratamento pré-natal sobre a função renal, a inflamação no rim e o metabolismo glicídico como componentes importantes na elevação pressórica na prole de fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica. Ratas Wistar receberam dieta com 60% de lipídios desde o desmame, durante a prenhez e a lactação, sendo este modelo experimental comprovado por meio do perfil metabólico. As fêmeas apresentaram menor ganho de peso em todo o período, mesmo tendo um maior consumo calórico. Após oito semanas de dieta, as ratas apresentaram alterações na função renal, queda da excreção de potássio e resistência periférica à insulina, associadas à elevação da pressão arterial. A prole de machos dessas fêmeas foi estudada em idades distintas. Os animais nasceram com menor massa corporal e, mesmo após o desmame, continuaram ganhando menos peso até a 16ª semana de vida. A filtração glomerular aumentou e a reabsorção de sódio no rim aumentou significativamente na 16ª semana de vida. Além disto, nesta idade, a prole de machos apresentou resistência à insulina e aumento na expressão de proteínas da via inflamatória do NF- κ B. Em consequência destas alterações verificou-se aumento da pressão arterial a partir da 8ª semana de vida. O presente estudo demonstrou que a ingestão crônica materna de dieta hiperlipídica leva a modificações em mecanismos de controle da pressão arterial sistêmica na prole adulta.

Palavras-chave: Lipídios na dieta, rim, programação fetal, hipertensão, inflamação.



ABSTRACT

ABSTRACT

Prevalence of cardiovascular disease and obesity is associated with increased calorie intake of food due to changes in dietary patterns in recent decades. The relationship between a diet rich in saturated fatty acids and insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension is widely accepted. Eating high-fat diet during pregnancy can induce in the offspring in adulthood, hypertension, insulin resistance, dyslipidemia and obesity, classic symptoms of Metabolic Syndrome, also increasingly present in children and adolescents. Additionally, exposure to high-fat diet can increase the protein expression of inflammatory pathway such as JNK, IKK β , I κ B, NF- κ B. This study examined the impact of prenatal treatment on renal function, inflammation and glucose metabolism in the kidney as an important component in blood pressure elevation in the offspring of females fed high-fat diet. Female rats were fed a diet with 60% fat from weaning, during pregnancy and lactation, and this is evidenced by the experimental model of the metabolic profile. Females had lower weight gain during the entire period, despite having a higher caloric intake. After eight weeks of diet, rats showed changes in renal function, decreased excretion of potassium and insulin resistance, associated with elevated blood pressure. The male offspring of these females were studied at different ages. The animals were born with lower body mass, and even after weaning, less weight gain continued until the 16th week of life. The glomerular filtration and increased sodium reabsorption in the kidney increased significantly at week 16 of life. Moreover, at this age, the offspring of males showed insulin resistance and increased protein expression of inflammatory pathway of NF- κ B. In consequence of these changes there was an increase in blood pressure from 8 weeks of age. This study showed that chronic ingestion of maternal high-fat diet leads to changes in control mechanisms of blood pressure in adult offspring.

Key Words: Dietary fats, kidney, fetal development, hypertension, inflammation

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADH	Hormônio Antidiurético
AKT(PKB)	Proteína quinase B
ATP	Adenosina trifosfato
C_{Cr}	<i>Clearance</i> de Creatinina
C_k	<i>Clearance</i> de Potássio
C_{Li}	<i>Clearance</i> de Lítio
C_{Na}	<i>Clearance</i> de Sódio
Cr	Creatinina
CE_{K^+}	Carga Excretada de Potássio
CF_{K^+}	Carga Filtrada de Potássio
CF_{Na^+}	Carga Filtrada de Sódio
DC	Débito Cardíaco
FC	Frequência Cardíaca
FE_{Na^+}	Fração de excreção de Sódio
FE_{K^+}	Fração de excreção de Potássio
FEP_{Na^+}	Fração de excreção Proximal de Sódio
$FEPP_{Na^+}$	Fração de excreção Pós Proximal de Sódio
FG	Filtração Glomerular
GTT	Teste de Tolerância à Glicose
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HDL	Lipoproteína de alta densidade (High-density-lipoproteins)
IKK	IkappaB quinase
I κ B	Inibidor de kappa-B
IR	Receptor de Insulina Inositol Trifosfato

IRS-1, IRS-2	Substratos 1 e 2 do Receptor de Insulina
ITT	Teste de Tolerância à Insulina
JNK	c-Jun N-terminal quinases
KDa	Quilo Dalton
K ⁺	Potássio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (Low-density-lipoproteins)
LPS	Lipo polissacarídeos
LiCl	Cloreto de Lítio
Li ⁺	Lítio
NF-κB	Fator nuclear kappa-B
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial Diastólica
PAS	Pressão arterial Sistólica
RNAm	RNA mensageiro
SHR	Spontaneously Hypertensive Rats
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VLDL	Very low density lipoproteins
VS	Volume Sistólico

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1- Vias de sinalização dos fatores de transcrição NF κ B e AP-1....	51
Figura 2- Massa corporal das fêmeas.....	75
Figura 3- Consumo de ração, calorias e água pelas fêmeas.....	76
Figura 4- GTT nas fêmeas na 8ª semana.....	77
Figura 5- Volume urinário.....	78
Figura 6- Clearance de creatinina (C_{cr}).....	78
Figura 7- FENa, FEK, FEPNa e FEPPNa das fêmeas na 8ª semana.....	79
Figura 8- Medida da pressão arterial sistólica nas fêmeas.....	80
Figura 9- Massa corporal das mães durante a prenhez.....	83
Figura 10- Número de filhotes e de filhotes machos por fêmea.....	83
Figura 11- Massa corporal da prole no dia do nascimento.....	85
Figura 12- Massa corporal da prole de machos no 1º dia de vida pós-natal.....	86
Figura 13- Massa corporal dos filhotes machos no 12º dia de vida pós natal.....	86
Figura 14- Acompanhamento da massa corporal (g) na prole de machos desde o desmame até a 16ª semana de vida.....	87
Figura 15- Curva da glicose plasmática de GTT na 8ª semana.....	87
Figura 16- Área sobre a curva (ASC)- 8ª semana.	88
Figura 17- Curva da glicose plasmática de GTT na 16ª semana.....	88
Figura 18- Área sobre a curva (ASC)- 16ª semana.....	89
Figura 19 - Curva da glicose plasmática de ITT na 8ª semana.	90
Figura 20- K_{itt} da curva glicêmica dos animais na 8ª semana de vida.....	90
Figura 21 - Curva da glicose plasmática de ITT na 16ª semana.	91
Figura 22- K_{itt} da curva glicêmica dos animais na 16ª semana de vida....	91
Figura 23- Volume urinário (VU) na 8ª semana.	92
Figura 24- Clearance de creatinina (C_{cr}) na 8ª semana.....	93
Figura 25- Fração de excreção de sódio - $FE_{Na}(\%)$ na prole com 8 semanas de vida.....	93

Figura 26- Fração de excreção proximal de sódio -FEP _{Na} (%) na prole com 8 semanas de vida.....	94
Figura 27- Fração de excreção pós-proximal de sódio -FEPP _{Na} (%) na prole com 8 semanas de vida.....	94
Figura 28- Fração de excreção de potássio- FE _K (%) na prole com 8 semanas de vida.....	95
Figura 29- Volume urinário (VU) na 16 ^a semana.....	95
Figura 30- Clearance de creatinina (C _{Cr}) na 16 ^a semana.	96
Figura 31- Fração de excreção de sódio- FE _{Na} (%) na prole com 16 semanas de vida.	97
Figura 32- Fração de excreção proximal de sódio- FEP _{Na} (%) na prole com 16 semanas de vida.....	97
Figura 33- Fração de excreção pós-proximal de sódio- FEPP _{Na} (%) na prole com 16 semanas de vida.	98
Figura 34- Fração de excreção de potássio- FE _K (%) na prole com 16 semanas de vida.....	98
Figura 35- Medida da pressão arterial sistólica (mmHg) na prole da 8 ^a à 16 ^a semana de vida.	99
Figura 36- Nível de proteína de IKK (%) em Rim para todas as idades da prole de machos.....	102
Figura 37- Nível de proteína de IKK (%) em Rim animais com 1 dia de vida pós-natal.....	102
Figura 38- Nível de proteína de IKK (%) em Rim animais com 12 dias de vida pós-natal.....	103
Figura 39- Nível de proteína de IKK (%) em Rim animais com 8 semanas de vida pós-natal.....	103
Figura 40- Nível de proteína de IKK (%) em Rim animais com 16 semanas de vida pós-natal.....	104
Figura 41- Nível de proteína de IκB fosforilado (%) em Rim para todas as idades da prole de machos.....	105
Figura 42- Nível de proteína de IκB fosforilado (%) em Rim animais com 1 dia de vida pós-natal.....	105

Figura 43- Nível de proteína de I κ B fosforilado (%) em Rim animais com 12 dias de vida pós-natal.....	106
Figura 44- Nível de proteína de I κ B fosforilado (%) em Rim animais com 8 semanas de vida pós-natal.....	107
Figura 45- Nível de proteína de I κ B fosforilado (%) em Rim animais com 16 semanas de vida pós-natal.....	107
Figura 46- Nível de proteína de NF κ B (%) em Rim para as idades:12 dias, 8 e 16 semanas na prole de machos.	108
Figura 47- Nível de proteína de NF κ B (%) em Rim animais com 12 dias de vida pós-natal.	109
Figura 48- Nível de proteína de NF κ B (%) em Rim animais 8 semanas de vida pós-natal.....	109
Figura 49- Nível de proteína de NF κ B (%) em Rim animais 16 semanas de vida pós-natal.	110
Figura 50- Imagens de Imunoistoquímica em rins para p-IKK.....	111

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1. Comparação da composição e do total de calorias da dieta AIN 93G modificada para hiperlipídica com a dieta convencional Nuvilab CR-1.....	62
Tabela 2- Análise bioquímica do plasma das fêmeas na 8 ^a semana.....	81
Tabela 3- Análise bioquímica da urina das fêmeas na 8 ^a semana.....	82
Tabela 4- Análise bioquímica do plasma das mães.....	84
Tabela 5- Análise bioquímica do plasma coletado na 8 ^a e 16 ^a semanas..	100
Tabela 6- Análise bioquímica da urina coletada na 8 ^a e 16 ^a semanas.....	101

LISTA DE QUADROS

	Pág.
Quadro 1- Proporção de Óbitos por Doença Cardiovascular no Brasil em 2007.....	53
Quadro 2: Classificação da Pressão Arterial pelas Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Hipertensão e Sociedade Brasileira de Nefrologia.....	54
Quadro 3: Classificação da Pressão Arterial pela American Heart Association.....	54

	SUMÁRIO
	Pág.
RESUMO	13
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO	35
2. OBJETIVOS	39
3. REVISÃO DA LITERATURA	43
3.1 – A dieta hiperlipídica e a Síndrome Metabólica.....	45
3.2 - A dieta hiperlipídica e a Programação Fetal.....	48
3.3 – A Via Inflamatória.....	50
3.4 – Hipertensão Arterial.....	52
3.4.1- Prevalência da hipertensão arterial.....	52
3.4.2 - Fatores contribuintes para hipertensão arterial.....	55
4. MATERIAL E MÉTODOS	59
4.1. Material.....	61
4.1.1. Animais.....	61
4.1.2. Equipamentos.....	62
4.2 Métodos.....	63
4.2.1. Análise das Variáveis.....	63
4.2.1.1. Massa Corporal Total.....	63
4.2.1.2. Ingestão de Ração e de Água.....	63
4.2.1.3. Teste de Tolerância à Glicose (GTT) e Análise da Insulina Plasmática.....	63
4.2.1.4. Teste de Tolerância à Insulina (ITT).....	64
4.2.1.5. Função Tubular Renal pelo <i>Clearance</i> de Lítio.....	65
4.2.1.6. Determinação das Concentrações de Sódio, Lítio, Potássio e Creatinina Plasmáticas e Urinárias.....	65
4.2.1.7. Fórmulas para Cálculo do Clearance e de Fração de Excreção... ..	66
4.2.1.8. Pressão Arterial.....	67
4.2.1.9 Análise Bioquímica.....	67
4.2.2. Western blot.....	68
4.2.2.1. Anticorpos utilizados para caracterização da via inflamatória do NfkB.....	69

4.2.3. Análise Estatística dos Resultados.....	70
4.2.4. Imunoistoquímica.....	70
5 – RESULTADOS	73
5.1 – Resultados obtidos com fêmeas adultas	75
5.1.1. Massa corporal e ingestão de ração e água.....	75
5.1.2. Teste de Tolerância à Glicose (GTT).....	77
5.1.3. Função Renal.....	78
5.1.3.1. Volume Urinário.....	78
5.1.3.2. <i>Clearance</i> de Creatinina.....	78
5.1.3.3. Manipulação tubular renal de sódio e potássio.....	79
5.1.4. Pressão Arterial.....	79
5.1.5. Análise Bioquímica.....	80
5.1.5.1. Análise Bioquímica do plasma na 8ª semana experimental.....	80
5.1.5.2. Análise Bioquímica da urina na 8ª semana experimental.....	81
5.2 –Resultados obtidos durante a prenhez e lactação	82
5.2.1. Massa corporal durante o período gestacional.....	82
5.2.2. Número de filhotes e número de filhotes machos por fêmea.....	83
5.2.3. Análise Bioquímica no plasma das mães.....	84
5.3 –Resultados obtidos com a prole de machos	85
5.3.1 Massa corporal total da prole de machos.....	85
5.3.1.1 Massa corporal dos filhotes no dia do nascimento.....	85
5.3.1.2 Massa corporal dos filhotes no 1º e no 12º dia de vida.....	85
5.3.1.3 Massa corporal dos filhotes machos adultos.....	86
5.3.2 Teste de Tolerância à Glicose- GTT.....	87
5.3.2.1 Curva da glicemia dos animais na 8ª semana.....	87
5.3.2.2 Curva da glicemia dos animais na 16ª semana.....	88
5.3.3 Teste de Tolerância à Insulina- ITT.....	89
5.3.3.1 Curva da glicemia dos animais na 8ª semana.....	89
5.3.3.2 Curva da glicemia dos animais na 16ª semana.....	90
5.3.4 Função Renal.....	91
5.3.4.1 Função Renal na 8ª semana de vida.....	92
5.3.4.1.1 Volume Urinário.....	92

5.3.4.1.2 Clearance de Creatinina.....	92
5.3.4.1.3 Fração de excreção de sódio (FE_{Na}).....	93
5.3.4.1.4 Fração de excreção proximal de sódio (FEP_{Na}).....	94
5.3.4.1.5 Fração de excreção pós-proximal de sódio ($FEPP_{Na}$).....	94
5.3.4.1.6 Fração de excreção de potássio (FE_K).....	95
5.3.4.2 Função Renal na 16ª semana de vida.....	95
5.3.4.2.1 Volume Urinário.....	95
5.3.4.2.2 Clearance de Creatinina.....	96
5.3.4.2.3 Fração de excreção de sódio (FE_{Na}).....	96
5.3.4.2.4 Fração de excreção proximal de sódio (FEP_{Na}).....	97
5.3.4.2.5 Fração de excreção pós-proximal de sódio ($FEPP_{Na}$).....	98
5.3.4.2.6 Fração de excreção de potássio (FE_K).....	98
5.3.5 Pressão arterial.....	99
5.3.5.1 Medida da pressão arterial da prole de machos.....	99
5.3.6 Análise bioquímica.....	99
5.3.6.1 Análise do plasma dos filhotes com 8 e 16 semanas de vida.....	99
5.3.6.2 Análise da urina dos filhotes com 8 e 16 semanas de vida.....	100
5.3.7 Western blot.....	101
5.3.7.1. Expressão de IKK em Rins.....	101
5.3.7.1.1 Expressão de IKK em Rins prole com 1 dia de vida pós-natal...	102
5.3.7.1.2 Expressão de IKK em Rins prole com 12 dias de vida pós-natal.....	103
5.3.7.1.3 Expressão de IKK em Rins prole com 8 semanas de vida pós-natal.....	103
5.3.7.1.4 Expressão de IKK em Rins prole com 16 semanas de vida pós-natal.....	104
5.3.7.2. Expressão de I κ B fosforilado em Rins.....	104
5.3.7.2.1 Expressão de I κ B fosforilado em Rins prole com 1 dia de vida pós-natal.....	105
5.3.7.2.2 Expressão de I κ B fosforilado em Rins prole com 12 dias de vida pós-natal.....	106

5.3.7.2.3. Expressão de I κ B fosforilado em Rins prole com 8 semanas de vida pós-natal.....	106
5.3.7.2.4 Expressão de I κ B fosforilado em Rins prole com 16 semanas de vida pós-natal.....	107
5.3.7.3. Expressão de NF κ B em Rins.....	108
5.3.7.3.1 Expressão de NF κ B em Rins prole com 12 dias de vida pós-natal.....	108
5.3.7.3.2 Expressão de NF κ B em Rins prole com 8 semanas de vida pós-natal.....	109
5.3.7.3.3 Expressão de NF κ B em Rins prole com 16 semanas de vida pós-natal.....	110
5.3.8. Imunoistoquímica.....	110
6- DISCUSSÃO	113
6.1. Repercussão, a longo prazo, da dieta hiperlipídica sobre a função renal, sensibilidade insulínica e a pressão arterial em fêmeas Wistar.....	115
6.2. Repercussão, a longo prazo, da dieta hiperlipídica materna sobre a função renal, sensibilidade insulínica, vias inflamatórias NF κ B renais e a pressão arterial em diferentes fases do desenvolvimento da prole de ratos Wistar.....	120
7- CONCLUSÃO	129
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
9 – APÊNDICE	157



1. INTRODUÇÃO

A prevalência de doenças cardiovasculares e obesidade está associada ao aumento da ingestão de alimentos hipercalóricos como decorrência de modificações no padrão alimentar ocidental ocorridas nas últimas décadas. A abundância e acessibilidade aos alimentos ricos em gordura e carboidratos, com o aprimoramento dos processos de preparo e do sabor, têm induzido consideráveis mudanças nos hábitos alimentares da população. Os benefícios trazidos pela industrialização, massificação do trabalho, liberalismo econômico, alto consumo de alimentos industrializados causaram uma profunda mudança no estilo de vida do homem moderno (Trigo *et al*, 2000). Todas essas mudanças estão estritamente ligadas ao crescimento populacional, ao aumento acentuado dos níveis de estresse, sedentarismo, aumento da competitividade profissional, e diminuição brusca do tempo disponível para alimentar-se bem e para o lazer, além do aumento do tabagismo e etilismo. E essa relação é diretamente proporcional à alta incidência de doenças cardíacas, obesidade, dislipidemia, *diabetes mellitus* tipo 2 e hipertensão arterial (Ciampone, 2009). No Brasil verifica-se um aumento na prevalência de doenças cardiovasculares e obesidade na população (IBGE, 2004), enquanto que nos Estados Unidos, um em cada três americanos apresenta um ou mais problemas cardiovasculares (American Heart Association, 2008). É importante ressaltar também que a manutenção dos níveis pressóricos elevados está relacionada ao surgimento assintomático de lesões em diversos órgãos alvo (Laterza *et al*, 2007).

Quanto ao metabolismo da glicose sabe-se que a resistência à insulina está associada com dislipidemia, hipertensão e *Diabetes Mellitus* do tipo 2 (Kannappan & Anuradha, 2009). Vários estudos mostram que as mudanças no metabolismo de glicose e na ação da insulina podem ter uma relação muito próxima com a elevação da pressão arterial sanguínea (Reaven, 1990; Defronzo & Ferrannini, 1991 e Muscelli *et al*, 1991). Além de estar associada com o aumento da ativação do Sistema Renina Angiotensina, maior reabsorção de sódio e retenção de líquido no organismo (Carvalho-Filho *et al*, 2007; Wang & Giebisch, 1996). Em humanos, o *Diabetes Mellitus* tipo 2 está associado a inúmeros fatores que são referidos como Síndrome Metabólica e Síndrome da Resistência à Insulina (Ford *et al*, 2008; Reaven, 2004).

A dieta hiperlipídica provoca alterações na função renal, sendo que estas se iniciam após disfunção endotelial, tanto em animais normotensos como em SHR (Spontaneously Hypertensive Rats), progredindo para um quadro de hipertensão e obesidade, que induz a uma resposta inflamatória com rompimento da barreira de filtração renal (Knight *et al*, 2008). Além disto, esta dieta altera o balanço entre a lipogênese e a lipólise renal levando ao acúmulo lipídico e falência renal (Kume *et al*, 2008). O consumo de dieta hiperlipídica também leva ao aumento da expressão de proteínas da via inflamatória tais como IKK β , I κ B e NF κ B, pois o NF κ B também pode ser ativado por aumento de ácidos graxos saturados, ácidos graxos trans e LPS (Bastos *et al*, 2009).

Em longo prazo, essas alterações podem trazer consequências não somente para o próprio indivíduo que faz o consumo desses alimentos, como também para as gerações subsequentes (Srinivasan *et al*, 2006). Estudos epidemiológicos em humanos têm mostrado que alterações ocorridas durante o crescimento intra-uterino estão associadas ao aumento da incidência de doenças cardiovasculares e metabólicas na vida adulta (Barker, 1994). Outro importante fator, o baixo peso ao nascer, tem sido relacionado à hipertensão, isquemia, intolerância à glicose, resistência à insulina, diabetes tipo 2, hiperlipidemia, hipercortisolemia, obesidade, obstrução pulmonária e desordens reprodutivas quando o indivíduo chega à idade adulta (Fowdem *et al*, 2006), sendo estas associações amplamente descritas em populações de diferentes idades, sexos e etnias (Barker, 1994; Gluckman & Hanson, 2005).



2.OBJETIVOS

Tendo em vista a fundamentação acima descrita e considerando que há uma relação da dieta materna hipercalórica e hiperlipídica e o aparecimento de doenças crônicas na prole adulta, o presente estudo teve como objetivo averiguar o efeito da ingestão crônica de dieta hiperlipídica sobre as mães e a prole de machos, avaliando alterações metabólicas, no manuseio tubular renal de sódio, na pressão arterial, assim como analisar a via inflamatória NFκB nos rins.

Para tanto buscou-se:

1. Estudar a repercussão progressiva da ingestão hiperlipídica materna durante 8 semanas, sobre a função renal, a pressão arterial e o metabolismo glicídico;
2. Estudar também a repercussão da ingestão hiperlipídica materna durante 8 semanas, no período gestacional e na lactação, sobre a função renal, a pressão arterial e o metabolismo glicídico da prole de ratos machos;
3. Avaliar modificações que ocorreram em vias renais por meio de imuno-marcação e expressão de proteínas vinculadas a vias inflamatórias na prole de ratos machos obtidos de mães submetidas à dieta hiperlipídica.



3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. A Dieta Hiperlipídica e a Síndrome Metabólica

O perfil atual de consumo alimentar da população brasileira mostra a tradicional dieta à base de arroz e feijão combinada com alimentos com poucos nutrientes e muitas calorias. Mais de 90% da população têm uma ingestão diária de frutas, legumes e verduras abaixo dos níveis recomendados, além disso, as bebidas com adição de açúcar (sucos, refrescos e refrigerantes) têm consumo elevado, bem como alta frequência de consumo de alimentos calóricos e uma menor ingestão de grãos e hortaliças (POF 2008-2009). Dados anteriores já indicavam que as mudanças na alimentação da população brasileira revelam aumento do consumo de açúcares simples, em detrimento do consumo de carboidratos complexos, e de gorduras saturadas e trans, além de redução no consumo de hortaliças, frutas e fibras (IBGE, 2004; Mondini & Monteiro, 1997; Monteiro *et al*, 2000). As pesquisas mais recentes também mostram que a ingestão de alguns componentes de uma dieta saudável diminuiu na população urbana acompanhado pelo aumento do rendimento familiar per capita. Adicionalmente foi constatado que é baixo o consumo de cálcio e alta a ingestão de sódio em todos os grupos etários da população brasileira (IBGE, 2011). Os dados relacionados ao consumo energético médio diário mostram uma variação grande (1.490kcal a 2.289kcal) nas diferentes regiões do país. Para os diferentes tipos de gordura (ácidos graxos, saturadas, monoinsaturados e trans) destacaram-se as regiões Sul e Sudeste como aquelas regiões que apresentaram as maiores médias de ingestão. As médias diárias de ingestão de colesterol foram menores para as mulheres (de 186,3 mg a 237,9 mg) do que os homens (de 231,1mg a 282,1mg) em todos os grupos etários. O consumo de lipídios representou 28% da energia da dieta dos adolescentes e 27% da dos adultos e idosos. O percentual das proteínas variou de 15% a 16% para adolescentes e de 16% a 17% nos adultos e idosos. A contribuição dos carboidratos entre os homens variou de 54,8% a 57,0% e, para as mulheres, de 56,2% a 57,6%, sem grandes variações entre os grupos etários. Já o consumo médio diário de açúcar total entre os adolescentes foi cerca de 30% maior do que o dos idosos e entre 15% e 18% maior que dos adultos. Em todas as regiões brasileiras foi adequada a

recomendação da participação dos carboidratos, de 55% a 75% do consumo calórico diário total. No que se refere à participação dos açúcares no total das calorias diárias, todas as regiões excederam o limite máximo de 10%. Essas alterações levaram ainda aos excessos no consumo de gorduras saturadas e açúcar (82% e 61% da população, respectivamente). Um total de 68% da população tem escassez na ingestão de fibras (POF 2008-2009).

Os dados do IBGE informam que no Brasil há 17 milhões de obesos, sendo a incidência de 9,6% na população brasileira. De acordo com a Classificação Internacional das Doenças (dados do DataSUS), as principais causas de mortes maternas registradas no Brasil em 2007 foram as doenças hipertensivas (23% das mortes maternas). Em relação à prevalência de baixo-peso, houve redução de 5,6% em 1989 para 2,2% em 2006–07 (Levy *et al*, 2009). Em 2007, cerca de 72% das mortes no Brasil foram atribuídas às DCNT (doenças cardiovasculares, doenças respiratórias crônicas, diabetes, câncer e outras, inclusive doenças renais), 10% às doenças infecciosas e parasitárias e 5% aos distúrbios de saúde materno-infantis (Silva-Junior, 2008).

Em virtude deste quadro nacional e mundial de mudança de hábitos alimentares com aumento expressivo da ingestão de carboidratos e lipídios, nota-se a prevalência de doenças cardiovasculares e metabólicas.

Havendo grande abundância de energia proveniente dos alimentos, especialmente quantidades excessivas de carboidratos, a secreção de insulina aumenta. Poucos segundos após ligação da insulina aos receptores, 80% das células do corpo aumentam a captação de glicose, especialmente as células dos tecidos musculares, adiposo e hepáticas. E essa glicose, que é imediatamente fosforilada, se torna substrato para todas as funções usuais do metabolismo de carboidratos. Quando os níveis de glicose sanguínea começam a diminuir nos intervalos das refeições, uma série de eventos ocorre fazendo com que o fígado libere glicose para a circulação sanguínea (Guyton & Hall, 2006; Moon *et al*, 2010).

Quando a quantidade de glicose que entra nas células do fígado é maior do que a quantidade que pode ser armazenada como glicogênio ou utilizada no metabolismo local dos hepatócitos, a insulina promove a conversão de todo o

excesso de glicose em ácidos graxos. Com o aumento da utilização de glicose pelos tecidos do corpo, diminui a utilização da gordura. Ácidos graxos são subsequentemente transportados através do sangue na forma de triglicérides e como very-low-density lipoproteins (VLDL), para o tecido adiposo e depositados como gordura. Insulina também inibe a gliconeogênese, principalmente pela diminuição de quantidade e das atividades das enzimas no fígado necessárias a esse processo. Entretanto, parte do efeito é causada por uma ação da insulina que diminui a liberação de aminoácidos do músculo e outros tecidos extra-hepáticos (Guyton & Hall, 2006). O consumo de ácidos graxos livres está associado ao aumento da resistência à insulina, à reabsorção de sódio, hipertensão e ativação do sistema renina angiotensina, causando vasoconstricção (Haynes *et al*, 1997; Smith *et al*, 2006; Marchesi *et al*, 2009).

A Síndrome Metabólica é um transtorno complexo, um conjunto de fatores de risco para doenças cardiovasculares, que tem relação direta à deposição central de gordura e à resistência à insulina (I Diretriz Brasileira Diagnóstica e Tratamento da Síndrome Metabólica, 2004). A associação entre uma dieta rica em ácidos graxos saturados e resistência à insulina, síndrome metabólica e *Diabetes Mellitus* já foi amplamente comprovada (Maron *et al*, 1991; Parker *et al*, 1993; Chávez & Summers, 2003; Montell *et al*, 2001). A relação desta com a doença renal associada à diminuição da taxa de filtração glomerular, aumento da pressão arterial, das concentrações de creatinina plasmática e da maior reabsorção de sódio também foi descrita (Wang *et al*, 1996).

Os riscos de problemas cardiovasculares, morte prematura e doenças renais crônicas estão associados à obesidade (Kume *et al*, 2008). A resistência à insulina é a principal causa do *Diabetes Mellitus* tipo 2, e a sensibilidade ou resistência à insulina é determinada pela disponibilidade à célula de glicose plasmática (Moon *et al*, 2010). O aumento da concentração de metabólitos lipídicos e as disfunções mitocondriais são reportados como possíveis mecanismos pelos quais os ácidos graxos saturados induzem a resistência à insulina (Montell *et al*, 2001; Lee *et al*, 2006; Hirabara *et al*, 2010; Abdul-Guani *et al*, 2008).

3.2. A Dieta Hiperlipídica e a Programação Fetal

O termo “Programação Fetal” foi utilizado por Hales e Barker (Hales & Barker, 2001) para demonstrar que doenças metabólicas têm sua origem já nas primeiras experiências nutricionais durante a gestação e a lactação. Um estresse ou estímulo nutricional durante o período de desenvolvimento fetal resultam em respostas adaptativas do feto (programação metabólica) que são vantajosas para sua sobrevivência em um ambiente com condições abaixo do ideal. Em longo prazo, essas adaptações resultam em respostas desfavoráveis de má programação em muitos aspectos anatômicos, fisiológicos e metabólicos, predispondo o feto ao quadro de Síndrome Metabólica na vida adulta (Barker, 1995).

As mudanças nos hábitos alimentares trazem consequências não apenas para os indivíduos que as consomem (mesma geração), mas também para as gerações subsequentes, em virtude das alterações no ambiente intra-uterino encontradas pelos fetos de fêmeas com sobrepeso ou obesas (Srinivasan et al, 2006).

Em animais verificou-se que a dieta hiperlipídica materna está associada nos filhotes a um fenótipo semelhante à Síndrome Metabólica humana. Em humanos, estudos mostram que, pelo menos em parte, a Síndrome Metabólica em adultos pode ter suas origens no período fetal ou na infância (Gluckman & Hanson, 2004). A partir da terceira semana do desenvolvimento fetal, a sensibilidade embrionária é maior aos efeitos ambientais, por causa dos hormônios embrionários. Sendo um período crítico para a ação de teratogênicos (Sulik & Johnston, 1982).

Estudos em humanos e animais sugerem que a nutrição materna pode induzir o desenvolvimento programado de hipertensão na prole adulta (Armitage *et al*, 2005). A administração de dieta hiperlipídica às mães, causa na prole adulta: aumento da pressão sanguínea, resistência à insulina, dislipidemia e obesidade (Liu *et al*, 2007). Estudos mostram que filhotes adultos de fêmeas que consumiram a dieta hiperlipídica, durante a gestação e lactação, apresentam desarranjos no metabolismo de glicose, disfunções cardíacas, alterações no hipotálamo e no

metabolismo de lipídios no fígado (Cerf *et al*, 2005; Ghebremeskel *et al*, 1999; Khan *et al*, 2005).

O consumo prolongado de dieta hiperlipídica por ratas desde o período de desmame pode resultar em aumento no peso corporal e nos níveis plasmáticos de insulina, glicose e triglicérides durante a prenhez quando comparadas a ratas que consomem ração padrão. Filhotes machos provenientes de fêmeas que ingeriram essa dieta apresentaram maior peso corporal, aumento nos níveis plasmáticos de insulina, glicose, ácidos graxos livres, triglicérides e intolerância à glicose (Srinivasani *et al*. 2006).

Baixas concentrações de colesterol plasmático em gestantes não alteram o processo de desenvolvimento fetal (Woollett, 2005), isto ocorre, provavelmente, devido a mecanismos compensatórios relativos à síntese, ao metabolismo e ao transporte de colesterol no feto e na placenta (McConihay *et al*, 2000). Entretanto, em gestantes com hipocolesterolemia verifica-se uma correlação direta com a formação de placas de gordura na aorta fetal (Napoli *et al*, 1997) e aumento de lesões na aorta que se iniciam na fase fetal e persistem na infância e na idade adulta (Napoli *et al*, 2002)

A dieta hiperlipídica também é conhecida por comprometer a sensibilidade à glicose e à sinalização da insulina, levando à redução da resposta insulínica pelas ilhotas pancreáticas, indicando que a programação com dieta hiperlipídica durante a gestação causa alterações na função das células β . A compensação pelas células β à resistência à insulina pode ocorrer temporariamente pelo aumento da secreção insulínica, quando a massa dessas células é reduzida. Entretanto, esse aumento na secreção de insulina fortalece a replicação de células β defeituosas e acelera a falência das mesmas. Uma hiperglicemia materna, induzida por ingestão de dieta hiperlipídica durante a gestação, pode programar o organismo dos neonatos para a hiperglicemia, porém, sem alterações importantes na insulinemia em ambos. Essa prole também pode ser exposta a elevadas concentrações de ácidos graxos livres circulantes derivados do metabolismo de dietas hiperlipídicas. A potencial exposição a ambos: elevada glicose circulante e concentração de ácidos graxos livres, pode implicar em glicolipototoxicidade e desarranjos na função das células β (Cerf *et al*, 2009).

3.3. A Via Inflamatória

Quando há quantidades exageradas de lipídios no organismo, o tecido adiposo passa a sintetizar proteínas de defesa que ativam vias de sinalização inflamatórias. Inflamação e apoptose aumentam por meio do estresse oxidativo, do estresse do retículo endoplasmático, da síntese de ceramidas e de espécies reativas de oxigênio e pela ativação da via de sinalização da PKC quando há excesso de palmitato (Bastos *et al*, 2009). O palmitato também aumenta a fosforilação da JNK, ao mesmo tempo em que ativa a PKC, o NFκB e a via de sinalização da MAPK, o que induz a síntese de citocinas pró-inflamatórias em adipócitos. O LPS promove a ativação de macrófagos por meio da sua ligação a algumas proteínas que estão presentes na membrana plasmática. Conseqüentemente, há a ativação de moléculas envolvidas na transdução de sinal, a quinase do receptor de IL-1, a quinase associada ao receptor do TNF, a quinase indutora do NFκB e a IKK (Bullo *et al*, 2007; Shah *et al*, 2008). Com o aumento da quantidade de LPS e o conseqüente aumento do número de macrófagos, há uma elevação na produção de TNF-α levando a alterações na insulina, incidência de mortalidade cardiovascular e inflamação nos rins (Hunley *et al*, 2010). Quanto mais TNF-α, menor é a produção de adiponectina, que é uma proteína ligada à proteção e reparação de vasos. Além disso, quando o TNF-α está baixo, a incidência de tumores é menor. A produção de IL-6 também está relacionada a atividades pró-inflamatórias e hiperinsulinemia. A via de sinalização do NFκB também pode ser ativada por ácidos graxos saturados o que aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF-α) e, conseqüentemente, a resistência periférica à insulina (Shah *et al*, 2009; Cave *et al*, 2008).

As proteínas NFκB são reguladores gênicos envolvidos na maioria das respostas inflamatórias. Estas respostas fazem parte das reações à infecção ou à lesão tecidual e, quando excessivas ou não apropriadas, podem danificar os tecidos. Os fatores de transcrição NFκB/Rel estão presentes no citosol em um estado inativo, complexados à proteína inibitória IκB. A maioria dos agentes que ativam NFκB seguem um caminho comum baseado na fosforilação induzida e degradação mediada por proteossomo do IκB (Prager *et al*, 2008; Henkel *et al*, 1992). A ativação do NFκB ocorre via fosforilação de IκBα em serina 32 e serina

36 seguida por degradação resultando na liberação e translocação para o núcleo do NFκB ativado. A etapa chave que regula essa via envolve a ativação de um complexo IκB quinase de alto peso molecular (IKK), cuja catalisação promove a fosforilação do inibidor do fator de transcrição NFκB (IκB-α), o que favorece a poliubiquitinação e a subsequente degradação do IκB-α no proteossomo 26S, que está localizado no citosol. Em seguida, ocorre a liberação e a translocação do NFκB do citosol para o núcleo, onde o NFκB (fator de transcrição ubíquo, uma vez que regula a transcrição de diversos genes envolvidos nas respostas imunes e inflamatórias) promove a ativação de genes que codificam proteínas envolvidas na resposta inflamatória (Baud & Karin, 2009). A fosforilação e a transcrição Rel dependente do IκBα são ativadas por um grupo altamente diversificado de sinais extracelulares para liberar o NFκB ativado, sendo um excelente marcador da ativação do NFκB (Baeuerle, 1992; Ruben *et al*, 1991). A **Figura 1** sintetiza os mecanismos de ativação do NFκB:

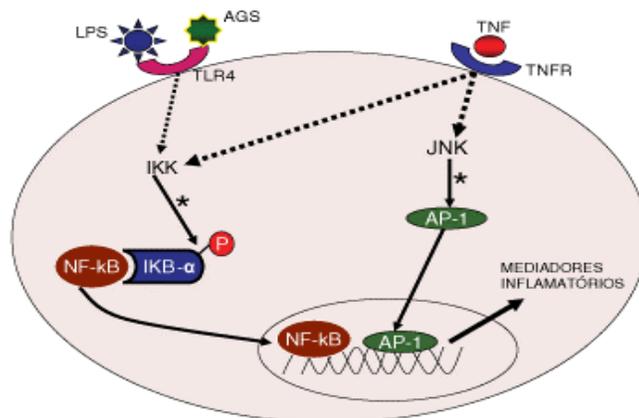


Figura 1: Vias de sinalização dos fatores de transcrição NFκB e AP-1 (Fonte: Bastos *et al*, 2009)

O consumo crônico de dieta hiperlipídica pode levar a alterações na estrutura da membrana, na composição e na quantidade do percentual lipídico destas membranas, modificando a transdução do receptor e sinais pós-receptores. Como exemplo, a dieta hiperlipídica modifica (diminui) a expressão de IR, IRS-1 (Moon *et al*, 2010) e AKT. Também promove a expansão e proliferação mesangial. Além disso, aumenta a incidência de proliferação celular neoplásica, pois a expansão do tecido adiposo tem consequente diminuição da proporção do número

de mitocôndrias. O aumento da gordura branca leva a um déficit na produção de ATP, diminuindo assim, a capacidade para apoptose, que é um mecanismo desencadeado pela função mitocondrial. Sendo que a função mitocondrial parece ter um importante papel no desenvolvimento de alterações metabólicas como resistência a insulina e obesidade (De Pauw *et al*, 2009). Ácidos graxos saturados podem causar diretamente inflamação e resistência à insulina no tecido muscular e também por promover a expressão de genes mitocondriais envolvidos com a fosforilação oxidativa e com a captação de glicose mediada pela insulina (Kennedy *et al*, 2009; Shah *et al*, 2008; Ferrante, 2007).

Existem evidências da ligação entre obesidade, hipertensão, e o aumento dos níveis circulantes de citocinas pro- inflamatórias, que podem estar associadas com o desenvolvimento de disfunção endotelial e falência renal (Cindik *et al*, 2005; Eardley *et al*, 2006). Em modelos animais de obesidade, também se observa a ativação de uma resposta inflamatória em adição ao aumento do estresse oxidativo e de mediadores lipídicos que podem contribuir também para a falência renal (Chow *et al*, 2007; Sarafidis & Ruilope, 2006).

3.4. Hipertensão arterial

3.4.1 Prevalência da hipertensão arterial

A hipertensão arterial é responsável por metade dos óbitos por doença cardiovascular, sendo uma das mais importantes causas de morte prematura em todo mundo. A prevalência mundial é estimada em 1 bilhão de indivíduos com 7,1 milhões de mortes a cada ano (VII JNC, 2004). Aproximadamente, 20% da população mundial é hipertensa (Barros *et al*, 2009). Estima-se que 37,4% da população americana apresenta um quadro de pré-hipertensão, sendo 41,9 milhões de homens e 27,8 milhões de mulheres (American Heart Association, 2008; VII JNC, 2004). Pesquisa do Ministério da Saúde Brasileiro mostra que a proporção da população diagnosticada com hipertensão arterial aumentou nos últimos cinco anos, passando de 21,6%, em 2006, para 23,3%, em 2010, sendo o mais importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças

cardiovasculares (DCV), com destaque para o acidente vascular cerebral (AVC) e o infarto do miocárdio, as duas maiores causas isoladas de mortes no país. Os dados mostram ainda que o diagnóstico de hipertensão é maior em mulheres (25,5%) do que em homens (20,7%). Sendo o diagnóstico de hipertensão arterial cada vez mais comum com a idade, alcançando cerca de 8% dos indivíduos entre os 18 e os 24 anos de idade e mais de 50% na faixa etária de 55 anos ou mais de idade. O acesso da população ao diagnóstico na atenção primária de saúde tem aumentado, com maior procura sendo feita pelas mulheres. Além disso, a associação entre nível de escolaridade e diagnóstico é mais marcada na população feminina: enquanto 34,8% das mulheres com até oito anos de escolaridade referem diagnóstico de hipertensão arterial, a mesma condição é observada em apenas 13,5% das mulheres com doze ou mais anos de escolaridade (Ministério da Saúde, 2011). Já com relação à população acima de 40 anos, a prevalência estimada de hipertensão atualmente é de 35%. Em números absolutos, representa um total de 17 milhões de portadores da doença (IBGE, 2004). Os dados de prevalência de hipertensão arterial ($\geq 140/90$ mmHg) na população urbana brasileira mostram uma variação de 22,3 a 43,9% (Ministério da Saúde, 2006; V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2006). Dados do próprio DATASUS (Sistema de Informática do Sistema Único de Saúde) informam que no Brasil, em 2007, a proporção de óbitos por doença cardiovascular, foi de 29,4%. Dentro deste grupo, a distribuição por doença foi como mostra o **Quadro 1**, a seguir:

Quadro 1- Proporção de Óbitos por Doença Cardiovascular no Brasil em 2007

Óbitos por Doenças Cardiovasculares (29,4% do total)	Percentual
Acidente vascular cerebral	31,4%
Doença isquêmica do coração	30,0%
Hipertensão arterial	12,8%
Outras	25,1%

Fonte: VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2010

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma síndrome multifatorial frequentemente observada na população adulta que apresenta níveis tensionais

elevados, levando o indivíduo a desenvolver distúrbios metabólicos, hormonais, morfológicos e funcionais. De acordo com a definição do Ministério da Saúde Brasileiro (2011) a HAS ocorre quando a medida da pressão arterial sistólica se mantém frequentemente acima de 140 mmHg e a pressão arterial diastólica acima de 90 mmHg. O **Quadro 2** informa a classificação da Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Hipertensão e Sociedade Brasileira de Nefrologia:

Quadro 2: Classificação da Pressão Arterial pela Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Hipertensão e Sociedade Brasileira de Nefrologia

Categoria	PA diastólica (mmHg)	PA sistólica (mmHg)
Pressão ótima	< 80	<120
Pressão normal	< 85	<130
Pressão limítrofe	85-89	130-139
Hipertensão estágio 1	90-99	140-159
Hipertensão estágio 2	100-109	160-179
Hipertensão estágio 3	≥110	≥180
Hipertensão sistólica isolada	< 90	≥140

Fonte: VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2010

Já a Organização Mundial de Saúde (OMS) admite valores que alteram um pouco a classificação, pois a pressão arterial é considerada ótima em 120x80mmHg, sendo considerada limítrofe em 130x85mmHg. Com isso, valores pressóricos superiores a 140x90mmHg denotam Hipertensão. A classificação da American Heart Association é indicada no **Quadro 3** a seguir:

Quadro 3: Classificação da Pressão Arterial pela American Heart Association

Categoria	PA diastólica (mmHg)	PA sistólica (mmHg)
Pressão normal	< 80	<120
Pré-hipertensão	80-89	120-139
Hipertensão estágio 1	90-99	140-159
Hipertensão estágio 2	≥100	≥160

Fonte: VII JNC, 2004

3.4.2 Fatores contribuintes para hipertensão arterial

A hipertensão arterial pode ser classificada em hipertensão primária (ou essencial) e hipertensão secundária (Pessuto & Carvalho, 1998). Cerca de 90 a 95% dos casos são atribuídos à hipertensão essencial e não apresentam uma causa facilmente identificável. Dentre os possíveis fatores estão idade, sexo (mais prevalente em homens), etnia, hereditariedade, dieta rica em sal, fatores socioeconômicos, etilismo, tabagismo, obesidade, estresse e inatividade física (VII JNC, 2004). Anormalidades no débito cardíaco, ou em suas variáveis como o volume sistólico e frequência cardíaca, além de fatores que alterem a resistência periférica, podem causar um quadro de hipertensão arterial (Irigoyen *et al*, 2005). Essas alterações fisiológicas podem ocorrer por mudanças no estilo de vida, obesidade, dieta, sedentarismo e alta ingestão de álcool (Fuchs *et al*, 2005 e Irigoyen *et al*, 2005). Porém, nos pacientes com esse tipo de hipertensão verifica-se uma forte influência genética (Guyton, 2006) sendo considerada herdada em quase 90% dos casos (Ministério da Saúde, 2011). Assim, esse tipo de hipertensão considerada complexa, pois seu desenvolvimento ocorre pela sinergia entre fatores genéticos e ambientais, sendo as influências ambientais, fatores desencadeadores desse fenótipo. Com isso, é descrita como uma síndrome poligênica (Barreto-Filho & Krieger, 2003; Irigoyen, *et al*, 2005).

Mesmo com valores de pressão arterial considerados previamente normais, há maior risco de complicações cardiovasculares. Essa classificação determina que em indivíduos no estágio pré-hipertensivo sem co-morbidades associadas é fundamental modificar o estilo de vida com o objetivo de reduzir o risco de hipertensão arterial no futuro. Nos indivíduos com quadro de hipertensão arterial já estabelecida (estágios 1 e 2) o uso de medicamentos e mudanças no estilo de vida é imprescindível no tratamento. Aproximadamente 20% a 30% dos casos de hipertensão arterial têm como fator predisponente o excesso de peso: 75% dos homens e 65% das mulheres apresentam hipertensão diretamente atribuível a sobrepeso e obesidade. Indivíduos sedentários apresentam risco aproximado 30% maior de desenvolver hipertensão que os ativos (Ministério da Saúde, 2011). Homens com até 50 anos são os maiores portadores da doença quando comparados às mulheres

da mesma faixa etária. A partir dos 50 anos a prevalência é maior no sexo feminino. Nos indivíduos com idade entre 60-69 anos, o número de casos de HAS aumentou 50%. Para a faixa etária de 70 anos ou mais, esta incidência é de 75%. A etnia também é de grande importância no que se refere ao desenvolvimento de HAS. Indivíduos negros são acometidos precocemente pela doença em relação aos brancos. A prevalência de hipertensão dos negros americanos está entre as maiores do mundo. Esse índice é potencializado por idade avançada, sobrepeso, inatividade física, baixa escolaridade, obesidade e *Diabetes Mellitus* tipo 2 (American Heart Association, 2008; VII JCN, 2004). O consumo excessivo de sal (cerca de 40% do sal é composto de sódio) também está associado a uma série de doenças crônicas, como hipertensão arterial, doenças cardiovasculares, problemas renais e cânceres. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda um consumo máximo de menos de 5 gramas de sal diários por pessoa. Segundo dados da Pesquisas de Orçamentos Familiares (POF) 2002/03, o consumo individual de sal, apenas nos domicílios brasileiros, foi de 9,6 gramas diários, o que representa quase o dobro do recomendado pela OMS. Já existem acordos com a indústria brasileira que estabelecem um plano de redução gradual na quantidade de sódio presente em várias categorias de alimentos (Ministério da Saúde, 2011).

Elevados níveis pressóricos adicionados ao risco de doenças cardiovasculares e às lesões em órgãos-alvo são fatores relevantes no desenvolvimento da HAS. São inúmeras as consequências deletérias da pressão arterial elevada, como o surgimento assintomático de lesões em diversos órgãos-alvo (Laterza *et al*, 2007). Dentre elas, as doenças cérebro-vascular e arterial coronariana, insuficiência cardíaca e renal crônica, além de várias complicações vasculares (V diretrizes brasileiras de hipertensão arterial, 2006, Fuchs *et al*, 2005). Esse aumento expressivo da pressão arterial prejudica os mecanismos reflexos de controle do sistema cardiovascular, resultando em menor eficiência nos ajustes de flutuações da pressão. A incapacidade de tamponamento leva a um aumento de sua variabilidade ao longo do dia, prejudicando a perfusão de tecidos importantes para o organismo (Gomes *et al*, 2007).

Outros fatores apresentados pelos portadores de HAS essencial incluem maior ativação do sistema nervoso simpático (SNS), alteração no metabolismo de

glicose, resistência à insulina, hiperinsulinemia, níveis elevados de noradrenalina plasmática, aumento da sensibilidade dos receptores adrenérgicos, redução da sensibilidade dos receptores aórticos e carotídeos como causa da elevada atividade simpática e diminuição da sensibilidade barorreflexa (Consolim-Colombo & Fiorino, 2005).



4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1. Animais

Foram utilizadas 60 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, variação *albinus*), recém desmamadas, com 21 dias de vida, pesando aproximadamente $60,7 \pm 1,3$ g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na área de Ciência em Animais de Laboratório- CEMIB da UNICAMP, Campinas, SP. Os animais foram divididos em dois grupos: 1) controle (Controle): que recebeu dieta sólida padronizada para roedores (NUVILAB, Brasil), e 2) experimental (DHL): que foram alimentados a partir do 21º dia de vida com uma dieta hiperlipídica contendo 60% de calorias na forma de lipídios (**Tabela 1**) durante oito semanas; acompanhando-se o ganho de peso e a ingestão de ração e água.

Após oito semanas de dieta os experimentos foram realizados com as fêmeas que, em seguida foram acasaladas com machos que receberam ração padrão. Durante todo o período de acasalamento, gestação e lactação, as fêmeas do grupo experimental continuaram recebendo a dieta hiperlipídica. Na prole de machos os experimentos foram realizados nas idades de um dia, 12 dias, oito semanas e 16 semanas de vida pós-natal. Estas idades foram escolhidas em virtude do desenvolvimento do rim no rato, que se completa aos 12 dias de vida pós-natal e pode apresentar alterações na fase adulta.

Os animais foram mantidos em sala fechada com temperatura controlada, iluminação artificial, com fotoperíodo de 12 horas. Todos os procedimentos experimentais com os animais foram realizados em consonância com os princípios éticos na experimentação animal, sendo a pesquisa submetida e aprovada pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal CEEA/UNICAMP, protocolo nº 1697-1.

Tabela 1. Comparação da composição e do total de calorias da dieta AIN 93G modificada para hiperlipídica com a dieta convencional Nuvilab CR-1.

INGREDIENTES	Dieta Controle	Dieta 60%
	g / Kg	g / Kg
AMIDO	397,5	52
AMIDO DE MILHO DEXTRINIZADO	132	143
SACAROSE	100	66
CARBOIDRATOS	629,5	261
CASEÍNA	200	271
L-CISTINA	3	3
BITARTARATO DE COLINA	2,5	2,5
PROTEÍNAS	205,5	276,5
ÓLEO DE SOJA	70	34
BANHA (gordura saturada)	---	333
GORDURAS TOTAIS	70	367
CELULOSE MICROFINA (FIBRA)	50	50
FIBRAS TOTAIS	50	50
MIX MINERAIS	35	35
MIX VITAMINAS	10	10
CALORIAS	2,93 calorias/g	5,44 calorias/g

4.1.2. Equipamentos

Para aferição da massa corporal total foi usada balança digital semi-analítica (AL 500 Denver Instruments- USA).

As medidas glicêmicas foram feitas utilizando-se glicosímetro MediSense/Optium, Abbott Laboratories Diabetes Care e tiras-teste para glicose no sangue.

As concentrações plasmáticas de sódio, lítio e potássio foram determinados por fotometria de chama (Micronal, B262, São Paulo, Brasil), A creatinina plasmática e urinária foi determinada pelo método calorimétrico por espectrofotometria utilizando-se um espectrofotômetro Micronal (Modelo 383, São Paulo).

Para análise de pressão arterial foi empregado um monitor computadorizado IITC MODEL 31, com esfigmomanômetro adaptado para a realização via caudal, além de uma caixa de contenção para aquecimento dos animais.

4.2 Métodos

4.2.1. Análise das Variáveis

As variáveis analisadas no presente trabalho foram: 1) acompanhamento da evolução da massa corporal durante os períodos experimentais; 2) medidas do consumo de ração e de água pelas fêmeas, 3) o metabolismo da glicose e resposta da insulina através do GTT (Teste de Tolerância à Glicose) e do ITT (Teste de Tolerância à Insulina); 4) função tubular renal através da técnica do *clearance* de lítio; 5) determinação das concentrações de sódio, lítio, potássio e creatinina plasmáticas para análise da excreção de creatinina, sódio e potássio; 6) medidas da pressão arterial sistólica e 7) análise da expressão das proteínas da via inflamatória do NFkB no rim da prole de machos pela técnica de Western Blot.

4.2.1.1. Massa Corporal Total

Todos os animais (mães e prole de machos) foram pesados semanalmente desde o desmame para acompanhamento da evolução da massa corporal ao longo do experimento. Foi feita aferição da massa corporal da prole no dia do nascimento, no 1º e no 12º dia de vida.

4.2.1.2. Ingestão de Ração e de Água

A ingestão de ração e de água das fêmeas foi acompanhada diariamente. A ração ou a dieta 60% eram pesadas em balança digital semi-analítica (AL 500 Denver Instruments- USA). A quantidade de água colocada e, posteriormente ingerida, era medida em proveta de plástico.

4.2.1.3. Teste de Tolerância à Glicose (GTT) e Análise da Insulina Plasmática

O GTT é um teste no qual a glicose é administrada e posteriormente são recolhidas amostras de sangue para se avaliar quão rapidamente a glicose passa

pelo sangue. É um teste comumente utilizado para detectar diabetes, resistência à insulina, e algumas vezes hipoglicemia reativa ou desordens raras no metabolismo de carboidratos.

Este teste foi realizado nas mães na 8ª semana experimental e na prole de machos adultos na 8ª e na 16ª semanas de vida.

Os animais foram deixados em jejum para ração sólida, ingerindo água *ad libitum* 12 horas antes do início do experimento. Utilizando-se uma amostra de sangue caudal, fez-se a medida da glicemia basal de jejum e o teste é iniciado com a injeção intraperitoneal de uma solução de glicose 50% (1g/quilo de peso do animal). A partir desse momento, os animais foram submetidos a um período experimental de 120 minutos, com medidas da glicemia e coletas de sangue caudal nos tempos: 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. O plasma aliqotado foi armazenado sob refrigeração (-20°C) para posteriores dosagens de insulina. A dosagem de insulina foi feita utilizando-se o Kit Elisa Rat/Mouse Insulin (Linco Research, Millipore, Billerica, MA, Cat. # EZRMI-13K).

4.2.1.4. Teste de Tolerância à Insulina (ITT)

A prole de machos adultos com 8 e 16 semanas de vida foi deixada em jejum para ração sólida, ingerindo somente água *ad libitum* seis horas antes do início do experimento. As seringas, preparadas com as doses (0,67 Us/g de peso do animal) de insulina (Humulin-R, Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN, USA), foram mantidas imersas em gelo até o momento da injeção intraperitoneal. A glicemia basal de jejum foi medida utilizando-se uma amostra de sangue caudal em um glicosímetro (MediSense/ Optium, Abbott Laboratories Diabetes Care). Após a injeção de insulina, a glicemia foi verificada nos tempos: 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para determinação da curva glicêmica plasmática.

O K_{itt} foi calculado usando os valores do ITT convertidos em logaritmo neperiano e apresentados em uma curva de regressão linear. A partir da regressão obtém-se o valor do *slope* (valor de b na curva $y=a + bx$), que multiplicado por 100 corresponde ao K_{itt} .

4.2.1.5. Função Tubular Renal pelo Clearance de Lítio

A avaliação da função tubular renal foi feita nas fêmeas na 8ª semana experimental e na prole de machos, na 8ª e na 16ª semanas de vida. Os estudos foram realizados em gaiolas metabólicas individuais com início dos ensaios às 17h00. Os animais receberam LiCl 0.06 mEq/100 g de peso corporal, administrados por gavagem 15 horas antes do início dos experimentos. A partir deste momento cada rato foi colocado em gaiolas metabólicas individuais, sem restrição de movimentos, em jejum para ração sólida, ingerindo água *ad libitum*. Os animais foram submetidos a um período experimental de 120 minutos em estado vigil. Para a obtenção de um fluxo urinário regular e estável, neste intervalo de tempo, os animais receberam uma sobrecarga hídrica por gavagem de 5% do peso corporal 90 e 30 minutos antes do início experimental. Em seguida, foi feita a coleta de urina destes animais através de funis adequadamente adaptados sob as gaiolas metabólicas, em tubos cônicos graduados com divisões de 0.2 mL. As alíquotas de urina foram congeladas (-20°C) para posteriores dosagens. Posteriormente, os animais foram anestesiados com 75mg/kg de ketamina e 10mg/kg de xilasina e submetidos à coleta de sangue através de vasos da cauda. Foram coletados 1,5 mL de sangue em micro-tubos com 20µL de heparina. As amostras foram centrifugadas a 3500 RPM por 10 minutos. O plasma alíquotado e as amostras de urina foram armazenados sob refrigeração (-20°C) para posteriores dosagens.

As variáveis da função renal avaliadas foram volume urinário, clearance de creatinina, fração de excreção de sódio, fração de excreção proximal e pós-proximal de sódio e fração de excreção de potássio.

4.2.1.6. Determinação das Concentrações de Sódio, Lítio, Potássio e Creatinina Plasmáticas e Urinárias

As concentrações plasmáticas de sódio, lítio e potássio foram determinadas por fotometria de chama (Micronal, B262, São Paulo, Brasil). A creatinina plasmática e urinária foi determinada pelo método calorimétrico por espectrofotometria utilizando-se um espectrofotômetro Micronal (Modelo 383, São Paulo). Os metais al-

calinos quando elevados a uma temperatura alta, absorvem energia da fonte de calor e passam ao estado de excitação em sua forma atômica. Quando estes átomos resfriam, voltam ao estado normal não excitado e re-emitem sua energia absorvida por radiação com comprimentos de onda específicos, alguns dos quais na região visível da luz (Na^+ :589 nm, Li^+ : 670 nm, K^+ : 768 nm). Um metal alcalino aspirado através de uma chama de baixa temperatura, na forma nebulizada emite, depois de excitado pelo calor da chama, uma onda de frequência discreta a qual pode ser isolada por um filtro ótico. A emissão é proporcional ao número de átomos excitados e, portanto, a concentração do íon na amostra.

4.2.1.7. Fórmulas para Cálculo do Clearance e de Fração de Excreção

-Clearance de Creatinina (C_{Cr})

Representa a depuração plasmática da creatinina por unidade de tempo pela totalidade dos glomérulos renais funcionantes, calculada pela fórmula $(U \times V^1 / P)$, sendo U a concentração urinária de creatinina, V^1 o fluxo urinário minuto e P a concentração plasmática de creatinina. Os resultados foram expressos em $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$ peso corporal.

-Fração de Excreção de Sódio (FE_{Na}):

Representa a fração de carga filtrada de sódio excretada pela urina num determinado período de tempo, calculada pela fórmula $(C_{Na} / C_{Cr} \times 100)$, sendo C_{Na} o *clearance* de sódio e o C_{Cr} , o *clearance* de creatinina. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

-Fração de excreção de Potássio (FE_K):

Representa a fração de carga filtrada de potássio excretada pela urina num determinado período de tempo, calculada pela fórmula $(C_K / C_{Cr} \times 100)$, sendo C_K o *clearance* de potássio e o C_{Cr} , o *clearance* de creatinina. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

-Fração de excreção proximal de sódio (FEP_{Na}):

Representa a fração de carga filtrada de sódio excretada ao longo do túbulo proximal do nefro, calculada pela fórmula $(C_{Li}/C_{Cr} \times 100)$, sendo C_{Li} o *clearance* de lítio e o C_{Cr} , o *clearance* de creatinina. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

-Fração de excreção pós-proximal de sódio ($FEPP_{Na}$):

Representa a fração de carga filtrada de sódio excretada ao longo dos segmentos distais do túbulo proximal do nefro, calculada pela fórmula $(C_{Na}/C_{Li} \times 100)$, sendo C_{Na} o *clearance* de sódio e o C_{Li} , o *clearance* de lítio. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

4.2.1.8. Pressão Arterial

Nas ratas a medida de pressão arterial foi feita na 5ª e na 8ª semana experimentais. Os filhotes machos foram submetidos à análise de pressão arterial, quinzenalmente, ao longo de 10 semanas, sendo a primeira medida de pressão arterial dos animais a partir da 6ª semana de vida, através do monitor de pressão arterial.

Para isto, o animal foi colocado dentro da caixa de contenção aquecida suficientemente para causar vasodilatação da artéria caudal. Um esfigmomanômetro (adaptado para ratos) foi colocado na cauda do animal e insuflado até que o fluxo sanguíneo fosse ocluído, para que ao ser desobstruído, os primeiros picos de pressão arterial sistólica fossem captados.

Foram realizadas três aferições de cada animal sendo considerada a média dos três valores mais próximos. O aparelho teve calibração máxima de 250 mmHg para os animais.

4.2.1.9 Análise Bioquímica

Foram analisados plasma e urina das ratas coletados durante a realização do *clearance* de lítio e o plasma coletado após o desmame. Na prole de machos

com 8 e 16 semanas de vida também foram analisados plasma e urina coletados durante a realização do *clearance* de lítio. Para a coleta de sangue, os animais foram anestesiados com 75mg/kg de ketamina e 10mg/kg de xilasina e o sangue coletado da artéria aorta com seringas heparinizadas. As amostras foram centrifugadas a 3500 RPM por 10 minutos. O plasma e a urina foram armazenados sob refrigeração (-20°C) para posteriores dosagens. As dosagens foram feitas utilizando-se kits para reação enzimática em Analisador Bioquímico Modular Analytic P (Roche®), com sistemas comerciais do mesmo fabricante.

4.2.2. Western blot

Os filhotes machos com idades de 1 e 12 dias de vida foram sacrificados por decapitação. Os filhotes na 8ª e na 16ª semanas de vida foram sacrificados por deslocamento cervical ou guilhotinamento. Os rins foram rapidamente removidos e colocados em tubo falcon contendo solução tampão (10 mM de EDTA, 100 mM de Trisma base, 10 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de ortovanato de sódio, 2mM de PMSF, 0,1mg/mL de aprotinina) e homogeneizados em um Polytron (modelo PT 10/35, *Brinkmann Instruments*) operando em velocidade máxima por 15 segundos. Terminada a extração, foi aplicado a cada amostra 10% do volume total de Triton 10% por 40 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4°C durante 40 minutos a 12000 RPM e o sobrenadante foi congelado em freezer -80°C para posterior processamento.

A quantificação protéica foi realizada com método de biureto, com adição de 20µL do extrato, a 1 mL de biureto. As amostras foram lidas por espectrofotometria após a adição de 100µL de Laemmili e 0,015 mg de DTT.

O extrato total foi fervido por 5 minutos em banho-maria e alíquotas, com 250 µg de proteína total, foram aplicadas no gel (SDS-PAGE) de 2 mm de espessura. No mesmo gel foi aplicada uma amostra padrão de proteínas para a marcação do peso molecular. Este padrão era composto por proteínas com pesos moleculares conhecidos: miosina (205 kDa), beta galactosidase (116 kDa), albumina sérica bovina (80 kDa) e ovalbumina (49 kDa). As proteínas apareceram sob coloração azul no gel de eletroforese e na membrana de nitrocelulose, permitindo a

orientação quanto ao peso molecular das bandas a serem observadas.

A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da *BioRad* (Mini-Protean), com solução tampão para eletroforese, previamente diluída. O SDS-PAGE foi submetido a 40 volts, inicialmente, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento (*stacking*) e 120 volts até o final do gel de resolução (*resolving*). As proteínas separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência de minigel da *BioRad*, e a solução tampão para transferência mantida em voltagem constante de 120 volts por 2 horas, sob refrigeração contínua com gelo.

Posteriormente à transferência das proteínas, acrescentou-se solução bloqueadora (10 ml de solução basal + 0,5 g de leite em pó desnatado Molico®) em agitação constante por 2 horas, seguida de lavagem com solução basal (3 vezes em agitação durante 10 minutos) e incubação a 4°C overnight com os anticorpos a serem utilizados diluídos em solução tampão. Após incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas 3 vezes com solução basal em agitação por 10 minutos, e incubadas com anticorpo secundário ligado a peroxidase (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA) por 2 horas. Por último, as amostras foram lavadas com solução basal por 3 vezes durante 10 minutos.

Para a revelação das membranas foi empregado um kit de quimiluminescência Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate da marca Thermo Scientific. Sendo o filme revelado em solução reveladora e fixadora (revelador manual marca Brafox).

4.2.2.1. Anticorpos utilizados para caracterização da via inflamatória NFκB

Foram utilizados os seguintes anticorpos: α-Tubulina, 52kDa (#2144, Cell Signalling), β-Actina, 45kDa (#4967, Cell Signalling), IKKε (D61F9) XP™ Rabbit mAb, 80kDa (#3416, Cell Signalling), phospho-IKKα/β (Ser176/180) (16A6) Rabbit mAb, 85/87kDa (#2697S, Cell Signalling), IκBα L35A5 Mouse mAb, 39kDa (#4814, Cell Signalling), IκBβ (phospho S23), 35kDa (ab 51142, AbCAM) e NFκB-p50 (sc 8414, Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA).

4.2.3. Análise Estatística dos Resultados

Para a análise estatística foi empregado o Teste t de Student e a Análise de Variância (ANOVA) com *post-hoc* pelo Teste de Bonferroni. Resultados foram expressos como média \pm Erro Padrão da Média (EPM). Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5% ($P < 0.05$). Os softwares utilizados em todos os testes estatísticos foram GraphPad InStat version 3.05, GraphPad Software, San Diego California USA e GraphPad Prism 3, Copyright 1992-1998 GraphPad Software Inc.

4.2.4 Imunoistoquímica

Para retirada dos rins, os animais com 12 dias, foram anestesiados e perfundidos por 5 minutos em uma solução de salina heparinizada, enquanto que os animais com 8 e 16 semanas de vida foram perfundidos com salina por 15 minutos. E em seguida, a solução salina foi substituída por paraformaldeído 4% por 30 minutos para os animais com 8 e 16 semanas e 10 minutos para os animais com 12 dias. Após a coleta, os rins foram mantidos por 12 horas no paraformaldeído, lavados em água corrente por 5 horas e armazenados em álcool 70%. O material foi desidratado em concentrações crescentes de álcool e embebido em parafina (SYNTH). Os blocos foram seccionados na espessura de 5 μ m e aderidos a uma lâmina de vidro silanizada secos em estufa à 37° C por 12 horas. As lâminas, contendo os cortes, foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em soluções crescentes de álcool. Fez-se a recuperação antigênica em tampão citrato 0,01M pH 6,0 em panela de pressão por 25 minutos. Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com 90 ml de Metanol e 10 ml de peróxido de hidrogênio por 10 minutos em câmara escura. O bloqueio deu-se pela incubação com leite em pó a 5% por 1 hora em temperatura ambiente. Incubou-se com anticorpo primário p-IKK (IKK α (phospho T23) 85kDa (ab38515 - AbCAM) diluído 1:50, em BSA 1% overnight em câmara úmida a 4° C. Os cortes foram lavados com PBS 0,1 M pH 7,4 e incubados com a anticorpo secundário (SIGMA anti-rabbit 1:200) diluído em BSA 1% por 2 horas. Após lavagens com PBS 0,1 M pH 7,4 para a remoção do excesso de anticorpo, as amostras foram incubadas com o kit ABC (VECTOR Peroxidase Standart PK-4000) por 40 minutos. A revelação foi desenvolvida com dia-

minobezidina (SIGMA) na concentração de 37,5mg/mL de água destilada mais 2,5 µL de peróxido de hidrogênio 30% à temperatura ambiente por 3 minutos. Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris, novamente desidratados em soluções alcoólicas, diafanizados em xilol e montados com permount para adesão das lamínulas.



5. RESULTADOS

5.1. Resultados obtidos com fêmeas adultas

5.1.1. Massa corporal e ingestão de ração e água

A **Figura 2** mostra os resultados referentes ao ganho de massa corporal durante as primeiras 8 semanas experimentais. O grupo DHL apresentou ganho de massa corporal significativamente menor do que o observado no grupo Controle.

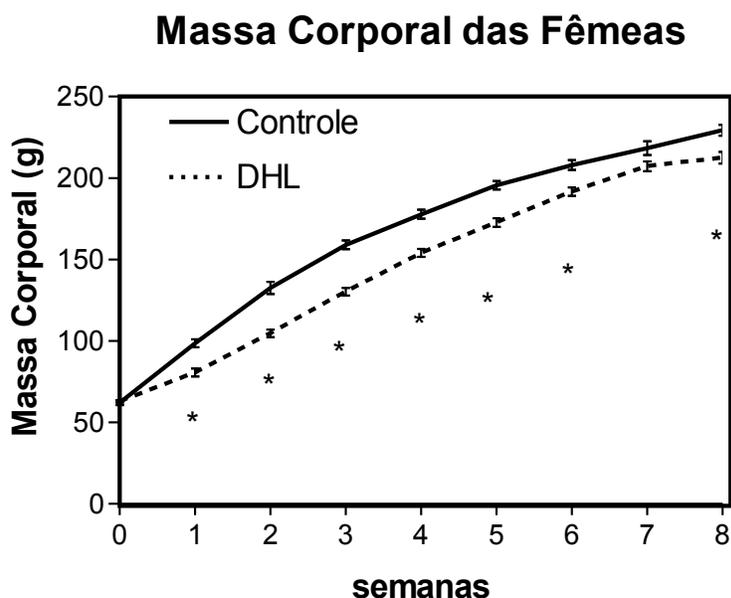


Figura 2- Massa corporal das fêmeas durante o período experimental. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. N= 20-23 para grupo Controle, N= 19-23 grupo DHL *P<0.05.

A ingestão de ração em gramas foi 71,8% maior no grupo Controle (**Figura 3A**), entretanto o consumo calórico foi similar nos dois grupos na maior parte dos períodos, apesar de apresentar uma tendência ao consumo mais elevado de calorias no grupo DHL, sendo que na 1a, 5a e 6a semana este consumo em calorias foi significativamente maior no grupo DHL (**Figura 3B**). Em concordância com a maior ingestão de ração em gramas, o consumo de água foi 31,8% maior no grupo Controle (**Figura 3C**).

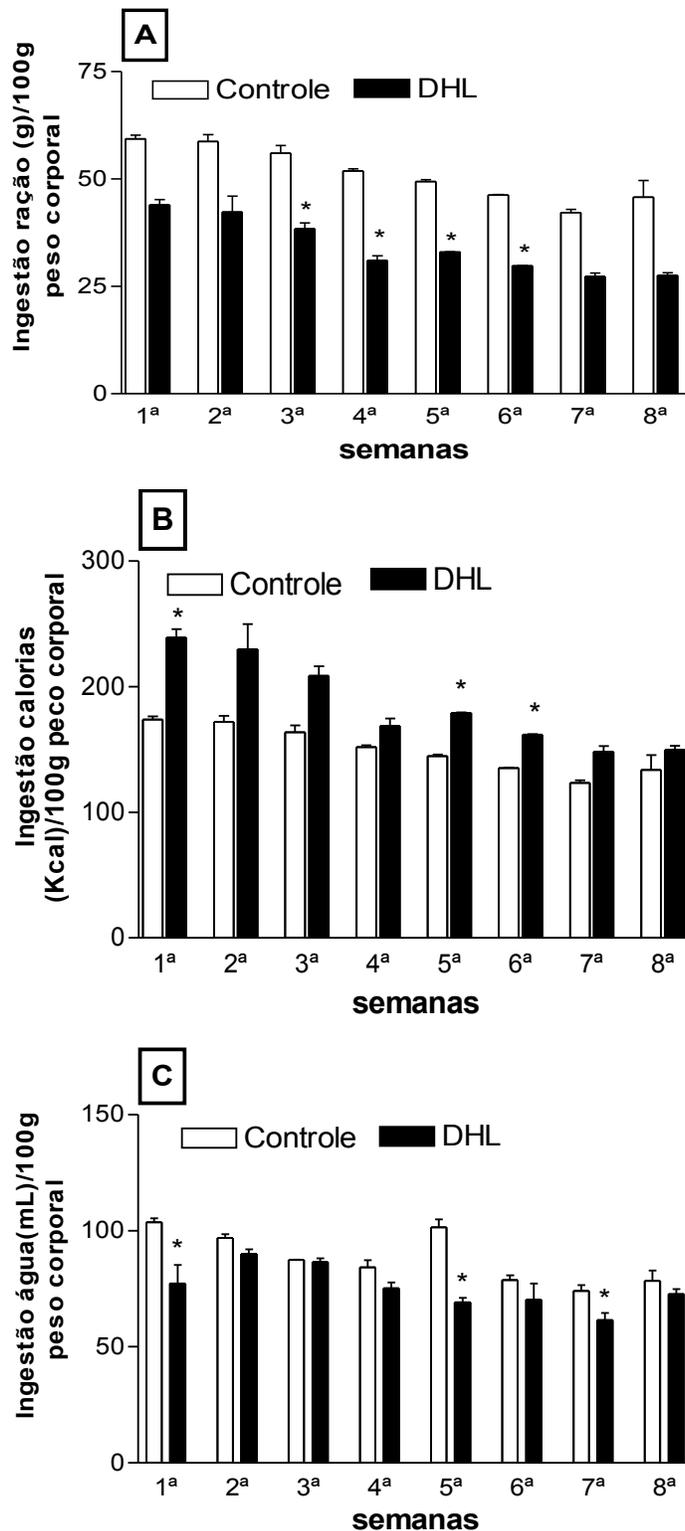


Figura 3- A) Consumo de ração ; **B)** Consumo de ração em calorias (grupo Controle consumo em gramas x 2,93 e grupo DHL ração em gramas x 5,44 cal) e **C)** Consumo de água durante 8 semanas xperimentais. Os resultados estão expressos como média ± EPM. N= 7 *P<0.05.

5.1.2. Teste de Tolerância à Glicose (GTT)

O GTT foi analisado nos tempos: basal, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos (**Figura 4A**), apresentando elevação significativa na glicemia das fêmeas DHL, dado confirmado pela diferença estatística na área sobre a curva-ASC (**Figura 4B**). A análise do soro coletado durante o GTT identificou uma diminuição nos níveis de insulina nas fêmeas que ingeriram a dieta hiperlípica no intervalo de 30 minutos (**Figura 4C**).

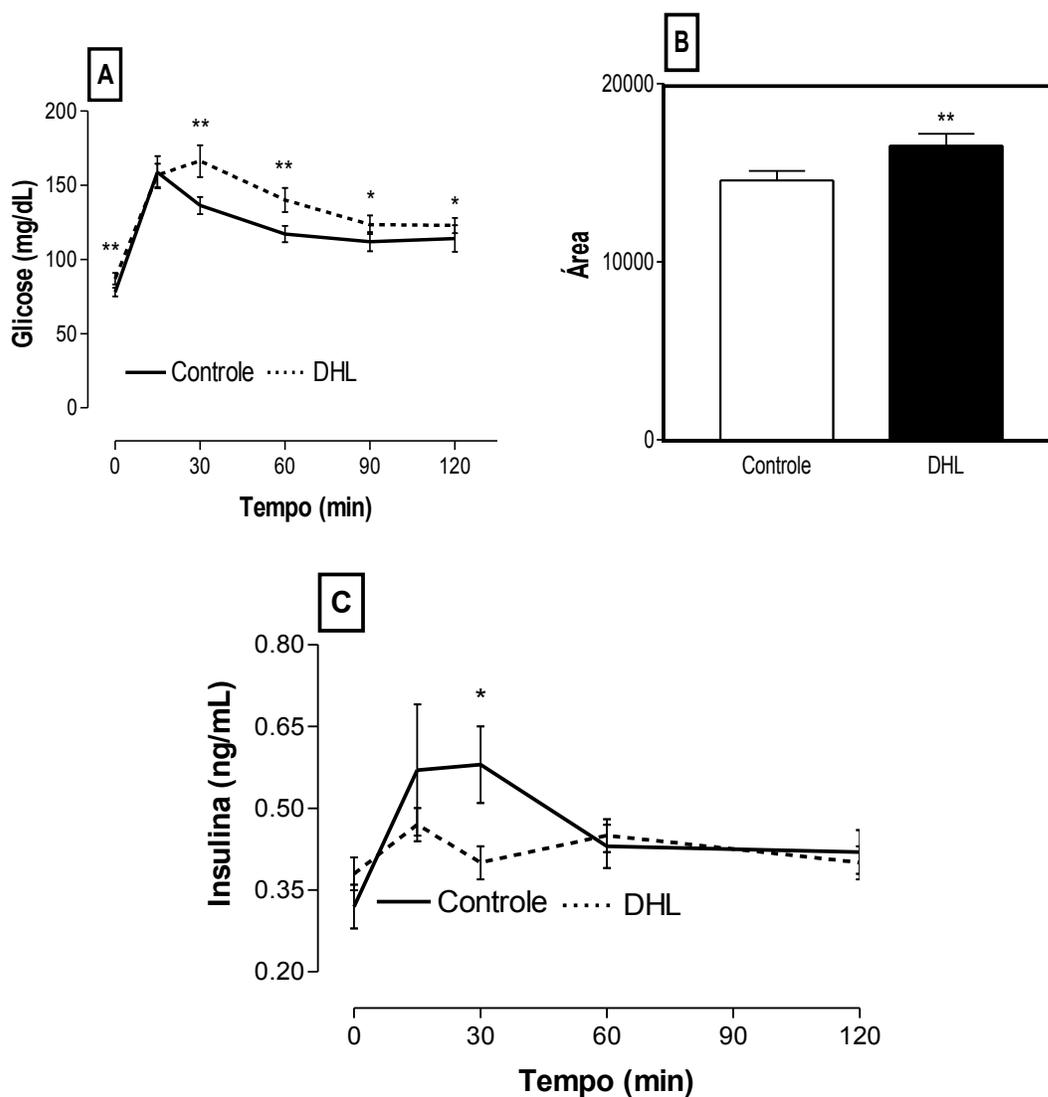


Figura 4- **A)** Curva da glicose plasmática durante GTT; **B)** Área sobre a curva-ASC **C)** Curva da insulina plasmática (ng/mL). Análise realizada em ratas após 8 semanas de tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. N=9-11 *P<0.05 **P<0.0001.

5.1.3. Função Renal

5.1.3.1. Volume Urinário

A **Figura 5** mostra uma queda significativa no volume urinário das fêmeas DHL ao fim das primeiras oito semanas experimentais.

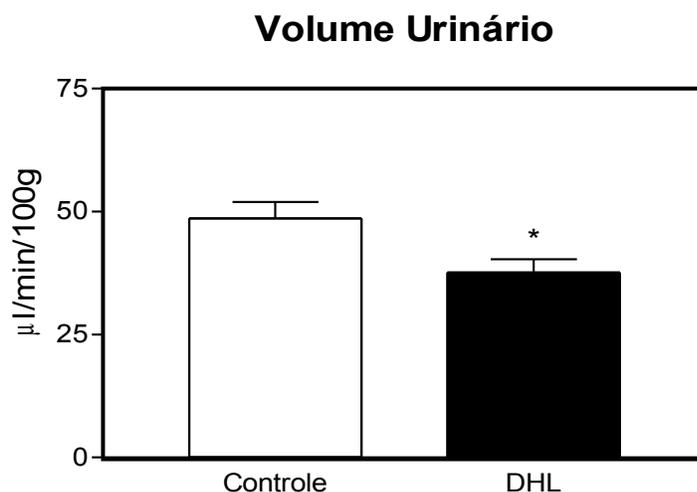


Figura 5- Volume urinário (VU) em μL por minuto por 100 gramas de peso do animal ($\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g}$ de peso animal) ratas na 8ª semana de tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. N=10 *P<0.05.

5.1.3.2. Clearance de Creatinina

A filtração glomerular foi estimada pelo *clearance* de creatinina, houve uma diminuição no grupo DHL (**Figura 6**), mas sem diferenças significativas.

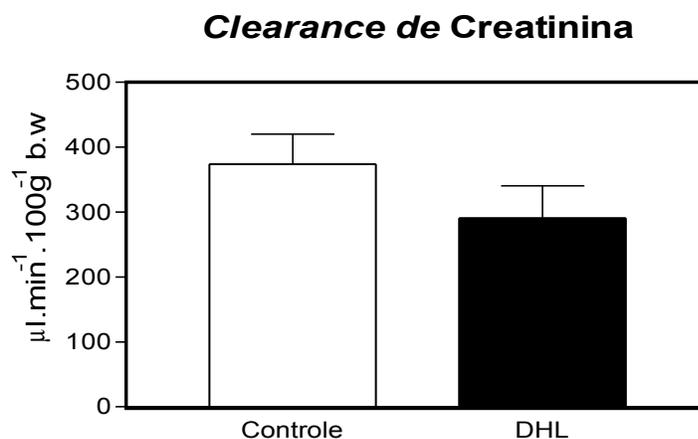


Figura 6- Clearance de creatinina (C_{Cr}) calculado pela fórmula: $(U \times V / P)$ em fêmeas após 8 semanas de tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. N=10.

5.1.3.3. Manipulação tubular renal de sódio e potássio

Com relação à manipulação tubular renal de sódio e potássio, os resultados apresentam uma queda significativa apenas na excreção de potássio (**Figura 7**).

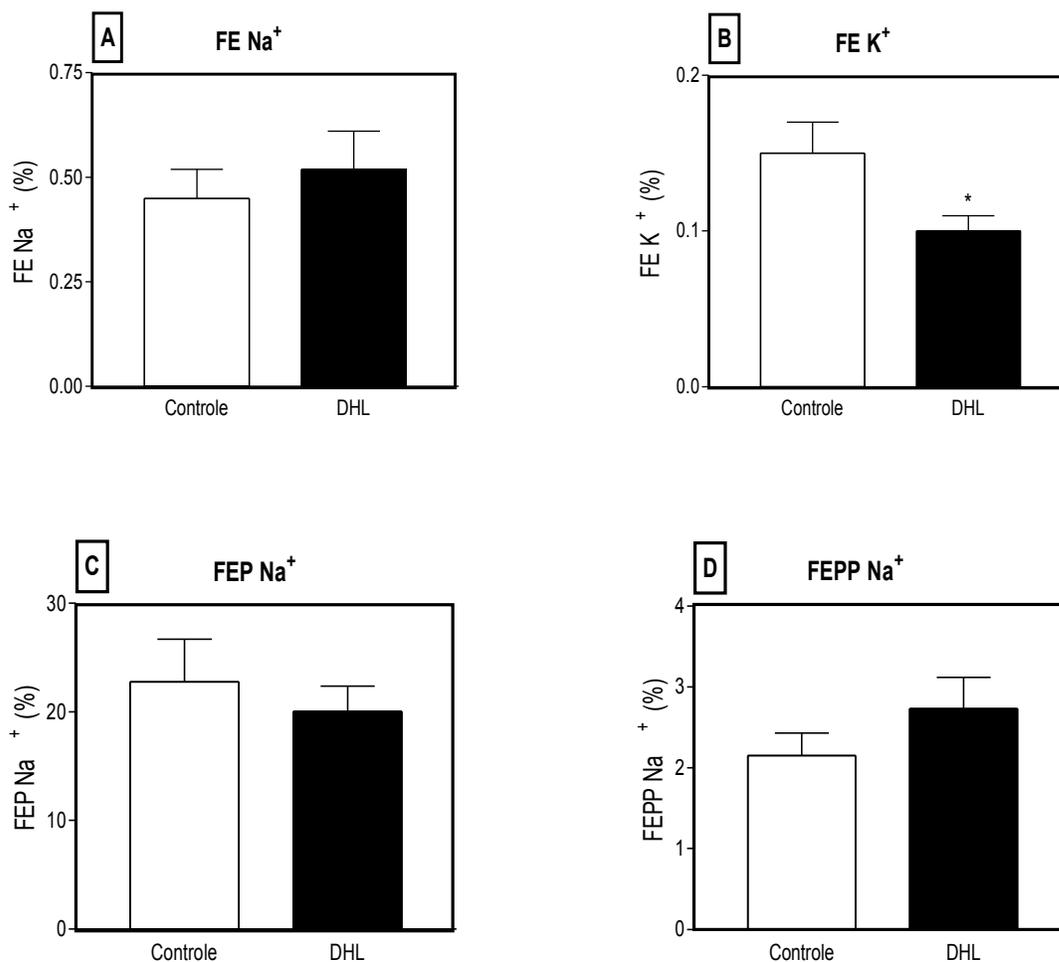


Figura 7- A) FENa(%), B) FEK(%), C) FEPNa(%), e D) FEPPNa(%) de ratas após 8 semanas de tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. N=10 *P<0.05.

5.1.4. Pressão Arterial

As medidas de pressão arterial foram significativamente mais elevadas no grupo de ratas que ingeriram a dieta hiperlipídica como visto na **Figura 8**.

Medida da Pressão Arterial

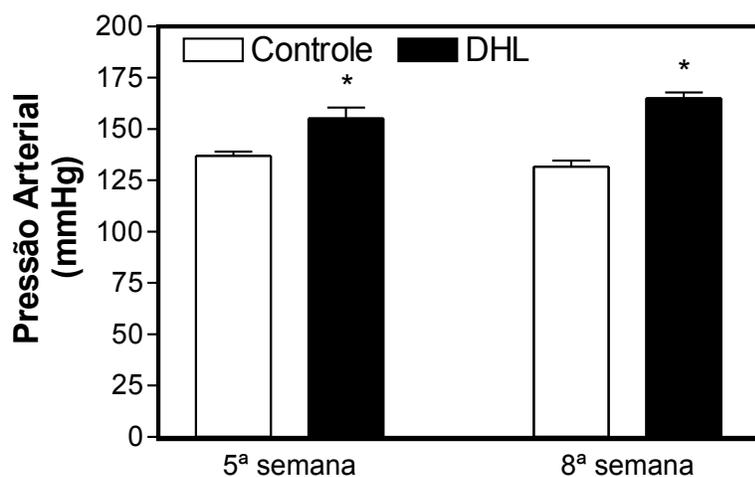


Figura 8 - Medida da pressão arterial sistólica nas fêmeas na 5ª e na 8ª semanas experimentais. Os resultados estão expressos como média \pm SEM. N=4 *P<0.05.

5.1.5. Análise Bioquímica

5.1.5.1. Análise Bioquímica do plasma na 8ª semana experimental

Foram coletadas amostras de sangue para análise dos seguintes parâmetros bioquímicos: íons (sódio, potássio, cloro, cálcio, magnésio e fósforo); colesterol, triglicérides e frações (HDL-COL, LDL-COL e VLDL), glicemia, e os níveis séricos de creatinina, uréia, albumina, proteína total e globulina (**Tabela 2**).

Tabela 2- Análise bioquímica do plasma coletado durante realização de *clearance* de lítio em ratas com 8 semanas de tratamento.

	Controle	DHL
Sódio (mmol/L)	141,7 ± 0,9	141,7 ± 1,0
Potássio (mmol/L)	4,3 ± 0,2	4,3 ± 0,3
Cloro (mmol/L)	104,3 ± 0,4	106,0 ± 1,2
Magnésio (mEq/L)	1,9 ± 0,044	1,7 ± 0,044 **
Cálcio (mg/dL)	9,3 ± 0,2	9,4 ± 0,2
Fósforo (mg/dL)	6,8 ± 0,4	6,7 ± 0,3
Colesterol (mg/dL)	50,6 ± 3,5	49,3 ± 5,1
Triglicérides (mg/dL)	37,4 ± 3,5	40,0 ± 1,6
HDL-COL (mg/dL)	47,0 ± 3,1	46,3 ± 4,6
LDL-COL (mg/dL)	6,3 ± 0,5	4,8 ± 0,5
VLDL (mg/dL)	8,8 ± 1,3	6,8 ± 1,2
Glicose(mg/dL)	123,9 ± 12,0	115,0 ± 8,6
Uréia (mg/dL)	39,0 ± 2,0	40,8 ± 2,3
Creatinina (mg/dL)	0,4 ± 0,005	0,4 ± 0,1
Albumina (g/dL)	4,0 ± 0,1	4,1 ± 0,1
Globulina	2,7 ± 0,6	2,0 ± 0,0
Ptn.Total (g/dL)	6,0 ± 0,1	5,8 ± 0,1

Os resultados estão expressos como média ± EPM. **P<0.0001. N=7 grupo Controle e N= 6 grupo DHL.

5.1.5.2. Análise Bioquímica da urina na 8ª semana experimental

Também foram analisados os íons (sódio, potássio, cloro, cálcio, magnésio e fósforo) e os níveis de creatinina, uréia, amilase e ácido úrico na urina coletada durante a realização do *clearance* de lítio (**Tabela 3**).

Tabela 3- Análise bioquímica da urina coletada durante realização de *clearance* de lítio em ratas com 8 semanas de tratamento.

	Controle	DHL
Sódio (mmol/L)	4,7 ± 0,4	6,2 ± 0,4 *
Potássio (mmol/L)	3,6 ± 0,4	3,1 ± 0,4
Cloro (mmol/L)	7,1 ± 0,3	9,0 ± 0,4 *
Magnésio (mEq/L)	1,9 ± 0,1	1,3 ± 0,1 *
Cálcio (mg/dL)	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Fósforo (mg/dL)	1,7 ± 0,6	1,8 ± 0,5
Ácido Úrico (mg/dL)	0,2 ± 0,046	0,1 ± 0,048
Amilase (U/L)	1,0 ± 0,7	2,2 ± 1,6
Uréia (mg/dL)	276,7 ± 21,7	211,8 ± 11,4 *
Creatinina (mg/dL)	3,4 ± 0,4	3,7 ± 0,5

Os resultados estão expressos como média ± EPM. *P<0.05. N=7 grupo Controle e N=6 grupo DHL.

5.2. Resultados obtidos com fêmeas durante a prenhez e a lactação

5.2.1. Massa corporal das fêmeas durante o período gestacional

Após o acasalamento, foi feito o acompanhamento da massa corporal das fêmeas prenhes. A **Figura 9A** mostra os resultados referentes à massa corporal das fêmeas nas 3 semanas de prenhez. Nesse período, não houve diferenças na massa corporal de ambos os grupos. O ganho de peso foi semelhante durante as 2 primeiras semanas gestacionais mas apresentou aumento com diferença significativa (P=0.041) para o grupo Controle na 3ª semana como pode ser visto na **Figura 9B**.

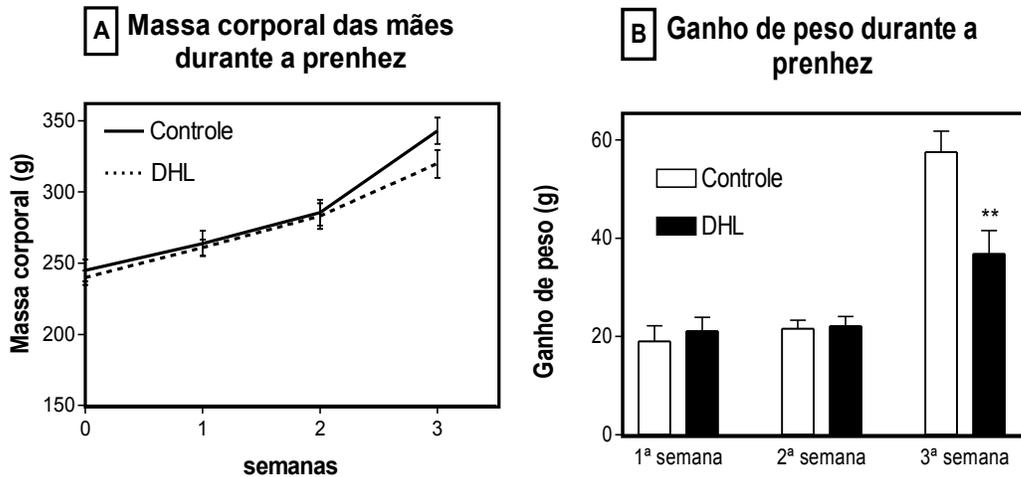


Figura 9 – A) Massa corporal das mães durante a prenhez; **B)** Ganho de peso durante a prenhez. N=11 grupo Controle e N=13 grupo DHL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. **P<0.05.

5.2.2. Número de filhotes e número de filhotes machos por fêmea

A contagem do número de filhotes por rata não mostrou diferenças entre os grupos (**Figura 10A**). O mesmo ocorreu quanto ao número de filhotes machos (**Figura 10B**).

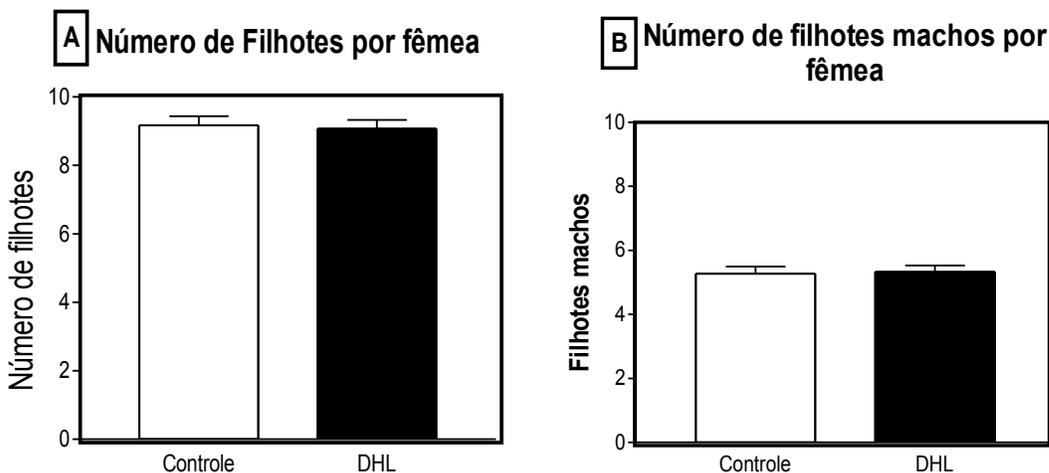


Figura 10 – A) Número de filhotes por fêmea. N=11 grupo Controle e N=13 grupo DHL; e **B)** Número de filhotes machos por fêmea. N=11 grupo Controle e N=12 grupo DHL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

5.2.3. Análise Bioquímica no plasma das mães

As amostras de sangue coletadas após o desmame da prole foram utilizadas para análise bioquímica apresentada na **Tabela 4**. Estas fêmeas receberam dieta hiperlipídica por um período total médio de 14 semanas.

Tabela 4 - Análise bioquímica do plasma coletado após o período de desmame da prole.

	Controle	DHL
Sódio (mmol/L)	144,82 ± 0,97	144,50 ± 4,74
Potássio (mmol/L)	5,12 ± 0,47	5,78 ± 0,73
Magnésio (mEq/L)	1,69 ± 0,07	1,97 ± 0,16
Cálcio (mg/dL)	9,05 ± 0,22	9,84 ± 0,65
Fósforo (mg/dL)	5,86 ± 0,53	5,07 ± 1,28
Colesterol (mg/dL)	67,00 ± 3,97	61,00 ± 7,01
Triglicérides (mg/dL)	43,91 ± 5,62	66,71 ± 17,60
HDL-COL (mg/dL)	51,91 ± 3,61	48,75 ± 4,87
VLDL (mg/dL)	9,09 ± 1,07	12,00 ± 3,34
Glicose(mg/dL)	183,33 ± 19,55	158,33 ± 5,94
Uréia (mg/dL)	64,45 ± 4,16	128,29 ± 22,68*
Creatinina (mg/dL)	0,27 ± 0,01	0,73 ± 0,12**
Albumina (g/dL)	3,39 ± 0,19	2,93 ± 0,28
Globulina	2,30 ± 0,15	2,13 ± 0,23

Os resultados estão expressos como média ± EPM.*P<0.05 e **P=0.0003. N=11 grupo Controle e N=8 grupo DHL.

5.3. Resultados obtidos com a prole de machos

5.3.1. Massa corporal total da prole de machos

5.3.1.1 Massa corporal dos filhotes no dia do nascimento

Os filhotes foram pesados no dia do nascimento (**Figura 11**), e aqueles que eram filhos de mães do grupo DHL, tiveram menor peso com diferença estatística significativa.

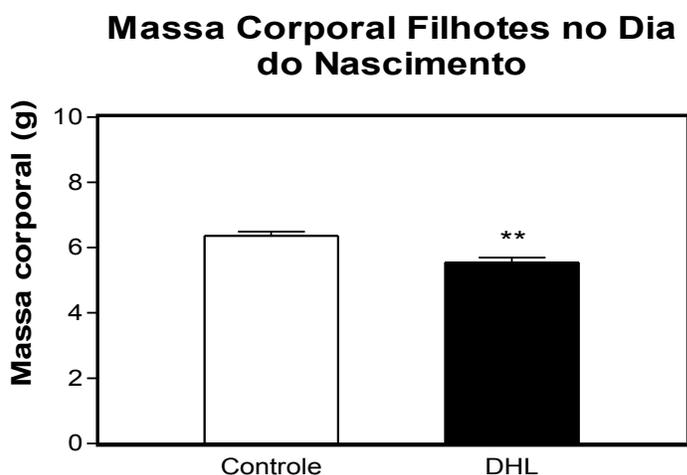


Figura 11- Massa corporal da prole no dia do nascimento. N=26 grupo Controle, e N=44 grupo DHL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. **P<0.01.

5.3.1.2 Massa corporal dos filhotes no 1º e no 12º dia de vida

No primeiro (**Figura 12**) e no 12º dia (**Figura 13**) de vida pós-natal, apenas os filhotes machos foram pesados. Os resultados mostraram diferenças significativas no primeiro dia de vida pós-natal. Já no 12º dia, encontramos a massa corporal semelhante nos filhotes dos dois grupos.

Massa corporal dos Filhotes machos com 1 dia de vida

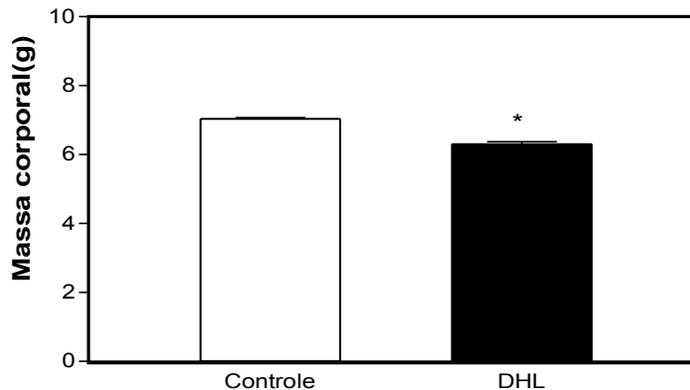


Figura 12- Massa corporal da prole de machos no 1º dia de vida pós-natal. N=13 grupo Controle, e N=9 grupo DHL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. *P<0.05.

Massa corporal dos Filhotes machos com 12 dias de vida

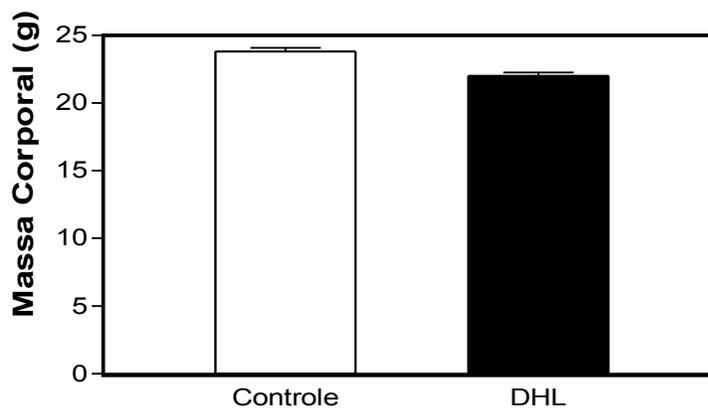


Figura 13- Massa corporal dos filhotes machos no 12º dia de vida pós-natal. N=19 grupo Controle, e N=14 grupo DHL pós-natal. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

5.3.1.3 Massa corporal dos filhotes machos adultos

Com relação à prole de machos adultos, os resultados mostraram a massa corporal do grupo Controle maior que aquela observado no grupo cujas mães receberam dieta hiperlipídica (DHL), durante as primeiras semanas após o desmame. Porém, ao longo das semanas, a diferença no ganho de peso teve variações e, ao fim das 16 semanas experimentais, novamente o grupo Controle apresentou massa corporal significativamente maior (**Figura 14**).

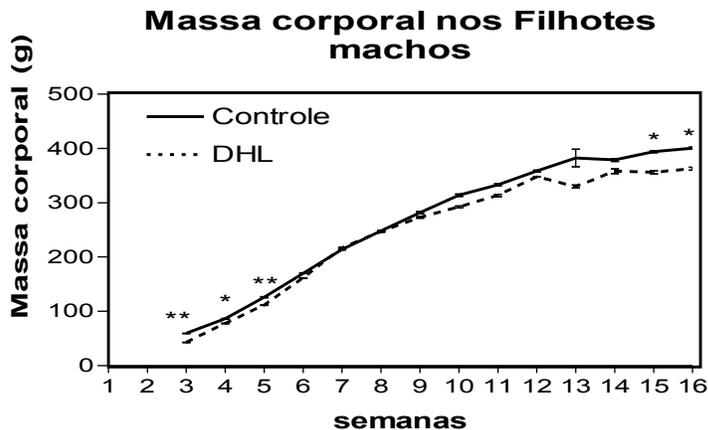


Figura 14- Acompanhamento da massa corporal (g) na prole de machos desde o desmame até a 16ª semana de vida. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. N= 16-26 para grupo Controle, N= 13-19 grupo DHL *P<0.05 e **P<0.0001.

5.3.2 Teste de Tolerância à Glicose- GTT

5.3.2.1 Curva da glicemia dos animais na 8ª semana

O Teste de Tolerância à Glicose (GTT) foi analisado nos tempos: basal, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. A **Figura 15** mostra a curva da glicemia durante o GTT realizado na prole na 8ª semana de vida. A área sobre a curva- ASC (**Figura 16**) não mostrou diferença entre os grupos.

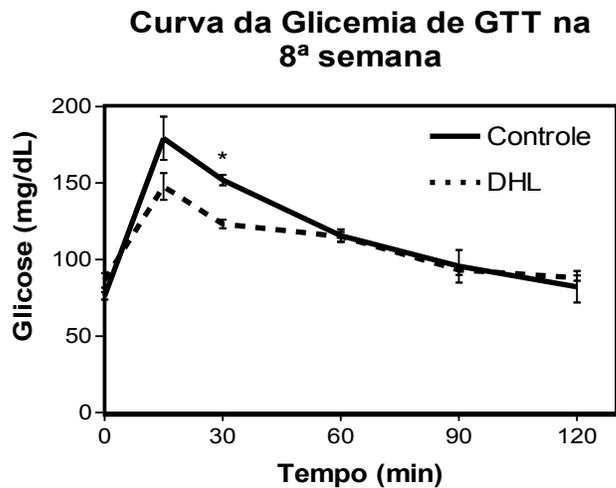


Figura 15 - Curva da glicose plasmática de GTT na 8ª semana. Glicemia (mg/dL) nos tempos 0,15,30,60,90 e 120 minutos na prole com 8 semanas de vida N= 3 grupo Controle e N=6 grupo DHL. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. *P<0.05.

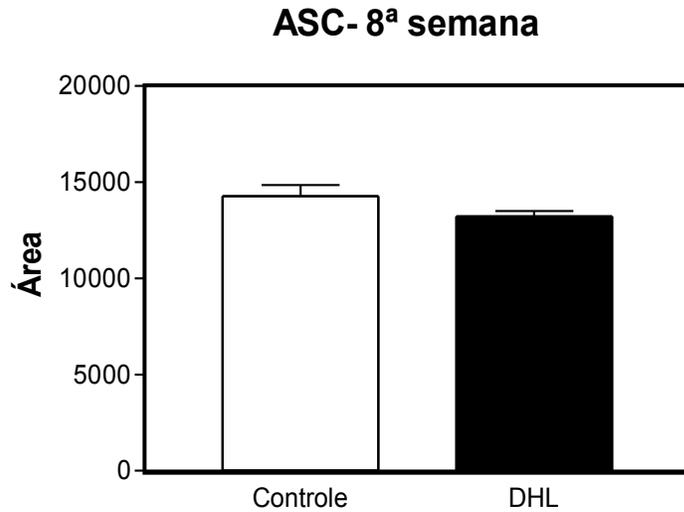


Figura 16- Área sobre a curva (ASC) - 8ª semana. Referente à curva da glicose plasmática durante GTT na prole com 8 semanas de vida. N= 3 grupo Controle e N=6 grupo DHL. Os resultados estão expressos como média ± EPM.

5.3.2.2 Curva da glicemia dos animais na 16ª semana

A **Figura 17** mostra a curva da glicemia durante o GTT realizado nos machos na 16ª semana de vida. Assim como na 8ª semana, a área sobre a curva-ASC (**Figura 18**) não mostrou diferença entre os grupos, mas com uma pequena queda nos filhotes DHL.

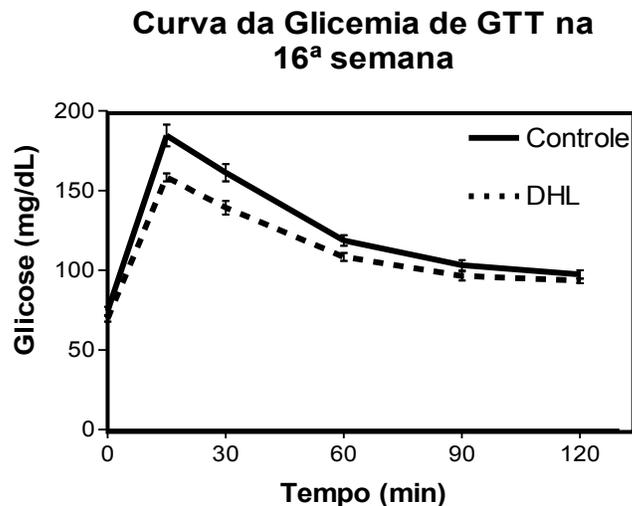


Figura 17 - Curva da glicose plasmática de GTT na 16ª semana. Glicemia (mg/dL) nos tempos 0,15,30,60,90 e 120 minutos na prole com 16 semanas de vida. N=5. Os resultados estão expressos como média ± EPM.

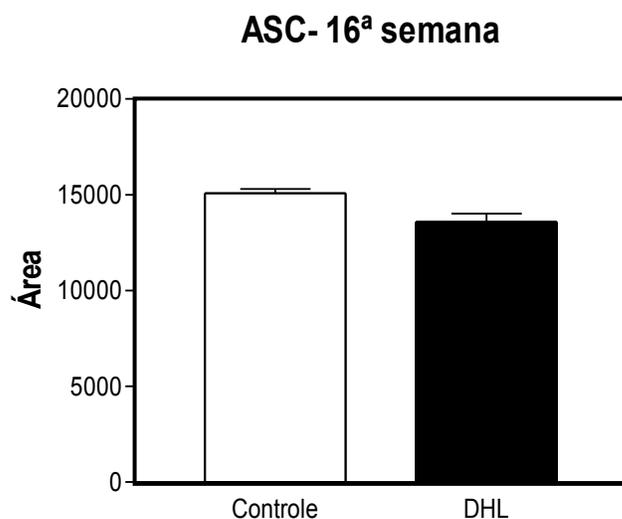


Figura 18- Área sobre a curva (ASC)- 16ª semana. Referente à curva da glicose plasmática durante GTT na prole com 16 semanas de vida. N=5. Os resultados estão expressos como média ± EPM.

5.3.3. Teste de Tolerância à Insulina- ITT

5.3.3.1 Curva da glicemia dos animais na 8ª semana

O ITT foi realizado na prole de animais com 8 semanas de vida (**Figura 19**) verificando-se a glicemia basal e a curva glicêmica nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após administração de insulina. O K_{itt} da curva glicêmica dos animais na 8ª semana (**Figura 20**) não teve diferenças significativas.

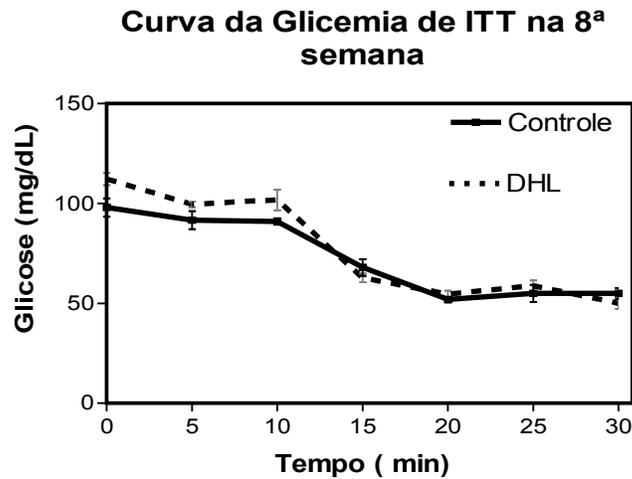


Figura 19 - Curva da glicose plasmática de ITT na 8ª semana. Glicemia (mg/dL) nos tempos 0,5,10,15,20,25 e 30 minutos realizado na prole com 8 semanas de vida N=3 grupo Controle e N=4 grupo DHL. Os resultados estão expressos como média ± EPM.

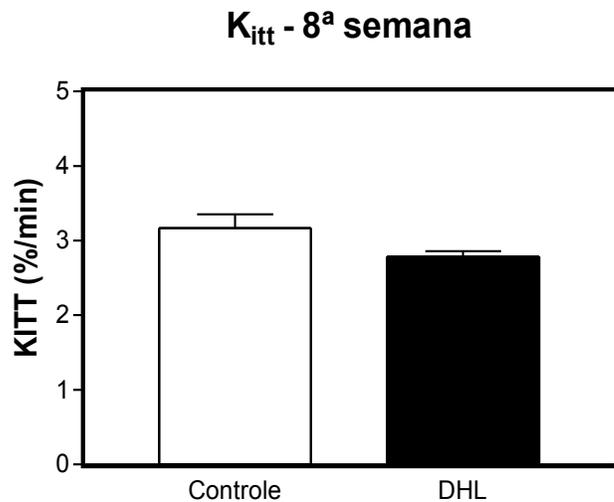


Figura 20- K_{itt} da curva glicêmica dos animais na 8ª semana de vida. O K_{itt} foi calculado usando os valores do ITT convertidos em logaritmo neperiano e apresentados em uma curva de regressão linear. A partir da regressão obtém-se o valor do *slope* (valor de b na curva $y=a + bx$), que multiplicado por 100 corresponde ao K_{itt}. N= 3 grupo Controle e N=4 grupo DHL. Os resultados estão expressos como média ± EPM.

5.3.3.2 Curva da glicemia dos animais na 16ª semana

Na 16ª semana de vida, a curva da glicemia do ITT (**Figura 21**) também não apresentou diferenças significativas, mas o resultado do K_{itt} desses animais (**Figura 22**) mostrou uma queda significativa ($P < 0.02$) no grupo de filhotes DHL.

Curva da Glicemia de ITT na 16ª semana

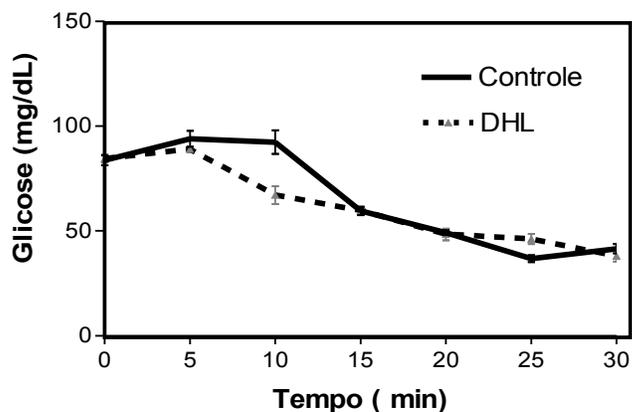


Figura 21 - Curva da glicose plasmática de ITT na 16ª semana. Glicemia (mg/dL) nos tempos 0,5,10,15,20,25 e 30 minutos realizado na prole com 16 semanas de vida, N=5. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

K_{itt} - 16ª semana

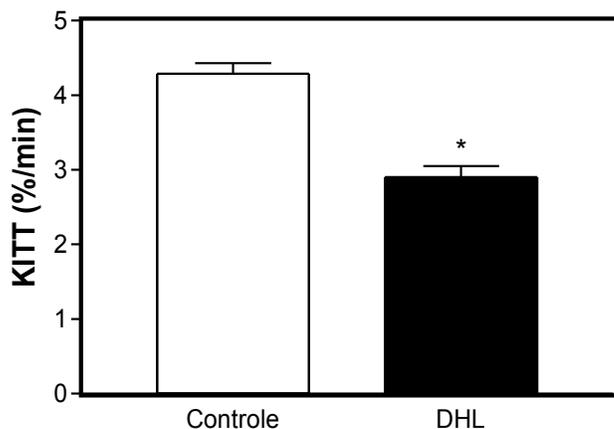


Figura 22- K_{itt} da curva glicêmica na prole na 16ª semana de vida. N=4. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. *P<0.05

5.3.4. Função Renal

As variáveis da função renal avaliadas foram volume urinário, clearance de creatinina, fração de excreção de sódio, fração de excreção proximal e pós-proximal de sódio e fração de excreção de potássio. As análises foram realizadas nas 8ª e 16ª semanas de vida da prole de machos.

5.3.4.1 Função Renal na 8ª semana de vida

5.3.4.1.1 Volume Urinário

O volume urinário (**Figura 23**) foi semelhante nos dois grupos nos animais com 8 semanas de vida.

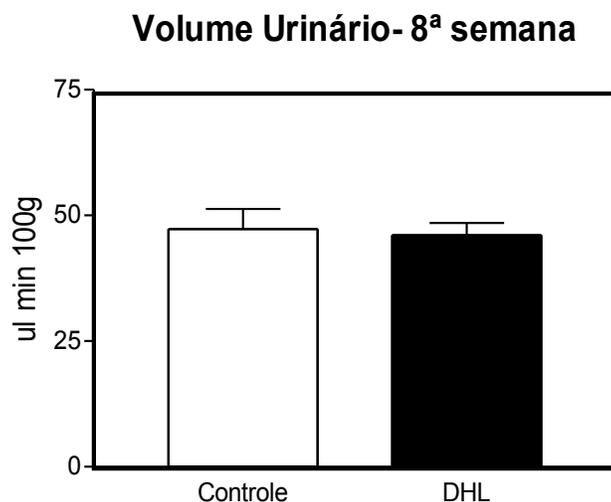


Figura 23- Volume urinário (VU) na 8ª semana. VU em μL por minuto por 100 gramas de peso do animal ($\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g}$ de peso animal) na 8ª semana de vida. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. N=6 grupo Controle e N=7 grupo DHL.

5.3.4.1.2 Clearance de Creatinina

O Clearance de creatinina foi empregado para estimar a taxa de filtração glomerular dos filhotes machos de ambos os grupos (Controle e DHL). Os filhotes DHL apresentaram um aumento significativo ($P < 0.04$) no *clearance* de creatinina (**Figura 24**) na 8ª semana de vida.

Clearance de Creatinina- 8^a semana

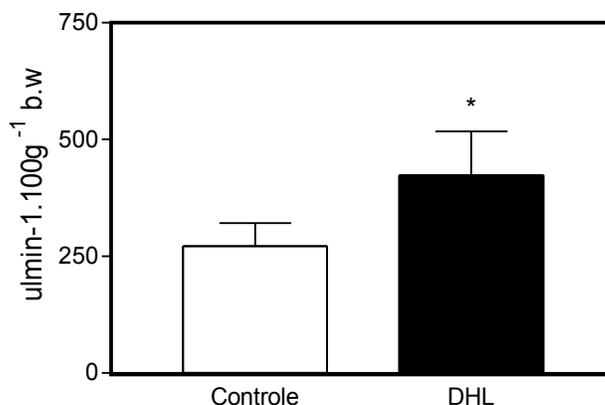


Figura 24- Clearance de creatinina (C_{Cr}) na 8^a semana. Calculado pela fórmula: $(U \times V^1/P)$ na prole de machos com 8 semanas de vida. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. N=3 grupo Controle e N=7 grupo DHL *P<0.05.

5.3.4.1.3 Fração de excreção de sódio (FE_{Na})

A fração de excreção de sódio (FE_{Na}) apresentou uma pequena diminuição nos filhotes DHL (**Figura 25**), mas sem diferenças significativas na 8^a semana de vida.

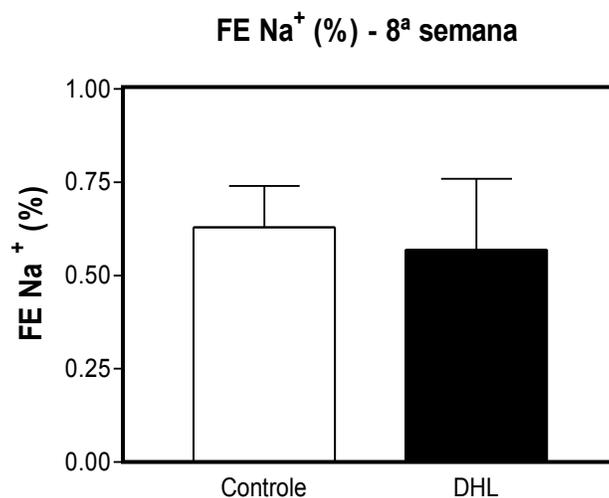


Figura 25- Fração de excreção de sódio - FE_{Na} (%) na prole com 8 semanas de vida. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. N=3 grupo Controle e N=7 grupo DHL.

5.3.4.1.4 Fração de excreção proximal de sódio (FEP_{Na})

Os filhotes de ambos os grupos não apresentaram diferenças na fração de excreção proximal de sódio (FEP_{Na}) na 8ª semana de vida (**Figura 26**).

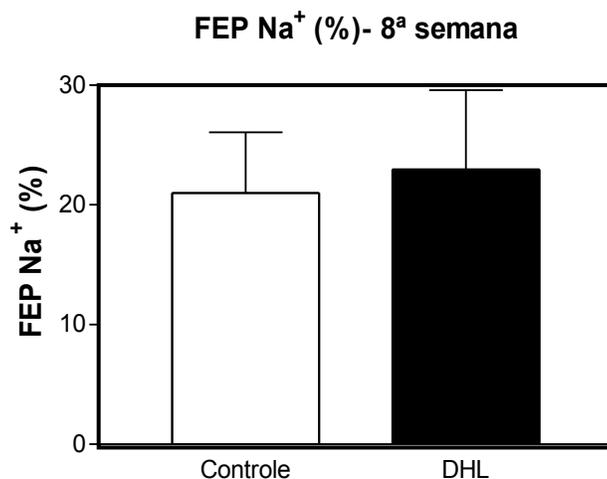


Figura 26- Fração de excreção proximal de sódio - FEP_{Na} (%) na prole com 8 semanas de vida. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. N=3 grupo Controle e N=7 grupo DHL.

5.3.4.1.5 Fração de excreção pós-proximal de sódio ($FEPP_{Na}$)

A **Figura 27** mostra os resultados na 8ª semana de vida, com queda significativa ($P < 0.006$) na excreção pós-proximal de sódio- $FEPP_{Na}$ nos filhotes DHL.

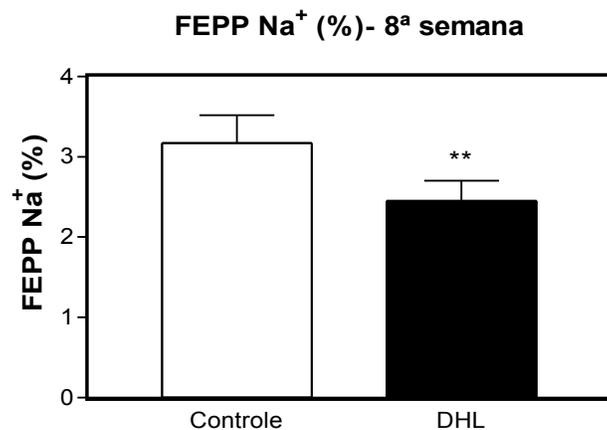


Figura 27- Fração de excreção pós-proximal de sódio - $FEPP_{Na}$ (%) na prole com 8 semanas de vida. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. N=3 grupo Controle e N=7 grupo DHL. ** $P < 0.006$.

5.3.4.1.6 Fração de excreção de potássio (FE_K)

Na 8ª semana de vida, os filhotes DHL também apresentaram diminuição significativa ($P < 0.02$) na excreção de potássio- FE_K (**Figura 28**).

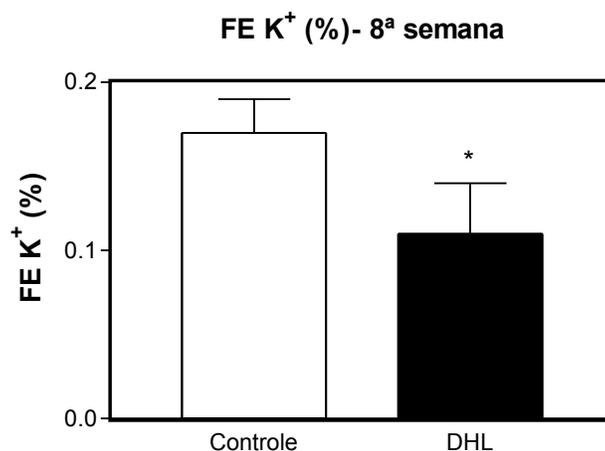


Figura 28- Fração de excreção de potássio- FE_K (%) na prole com 8 semanas de vida. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. N=3 grupo Controle e N=7 grupo DHL. * $P < 0.02$.

5.3.4.2 Função Renal na 16ª semana de vida

5.3.4.2.1 Volume Urinário

Na 16ª semana, o volume urinário (**Figura 29**) apresentou uma pequena elevação nos filhotes DHL em relação à 8ª semana de vida, mas não houve diferença estatística.

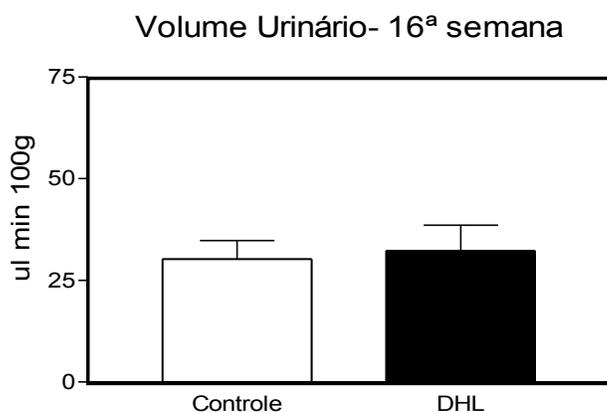


Figura 29- Volume urinário (VU) na 16ª semana. VU em μL por minuto por 100 gramas de peso do animal ($\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g}$ de peso animal) na 16ª semana de vida. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. N= 5 grupo Controle e N=3 grupo DHL.

5.3.4.2.2 Clearance de Creatinina

No clearance de creatinina realizado na 16ª semana não houve diferença estatística entre os grupos, apesar do pequeno aumento nos filhotes DHL (**Figura 30**).

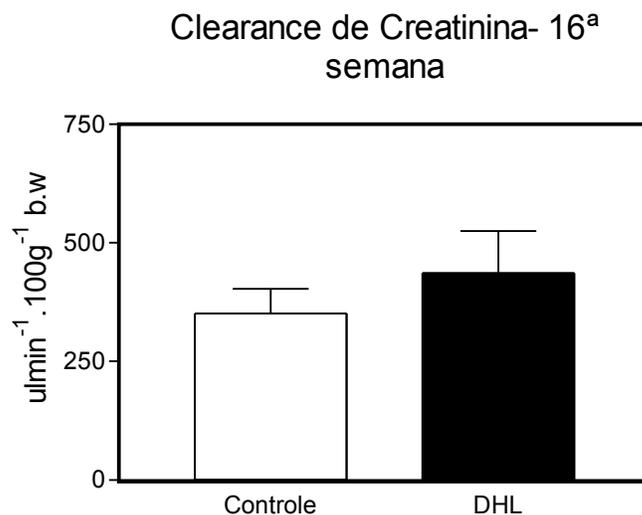


Figura 30- Clearance de creatinina (C_{Cr}) na 16ª semana. Calculado pela fórmula: $(U \times V^1/P)$ na prole de machos com 16 semanas de vida. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. N=5 grupo Controle e N=3 grupo DHL.

5.3.4.2.3 Fração de excreção de sódio (FE_{Na})

A fração de excreção de sódio (FE_{Na}) apresentou queda significativa ($P < 0.03$) nos filhotes DHL (**Figura 31**) na 16ª semana de vida.

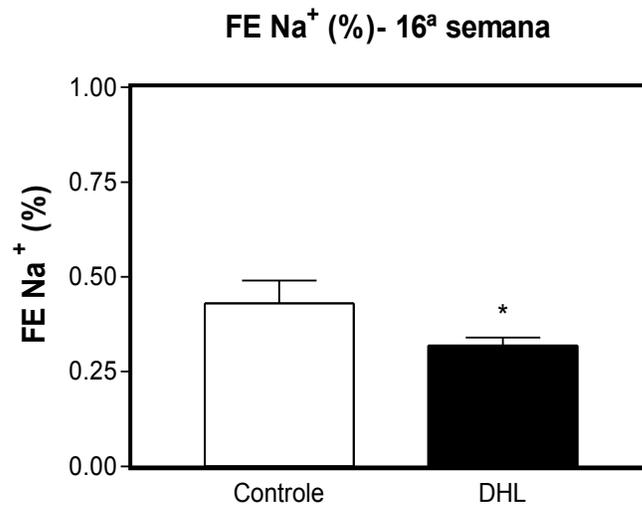


Figura 31- Fração de excreção de sódio- FE_{Na} (%) na prole com 16 semanas de vida. Os resultados estão expressos como média ± EPM. N=5 grupo Controle e N=3 grupo DHL. *P<0.05

5.3.4.2.4 Fração de excreção proximal de sódio (FEP_{Na})

Em relação à 16^a semana de vida, os filhotes DHL mostraram importante diminuição (P<0.007) na excreção proximal de sódio (FEP_{Na}) como mostra a **Figura 32**.

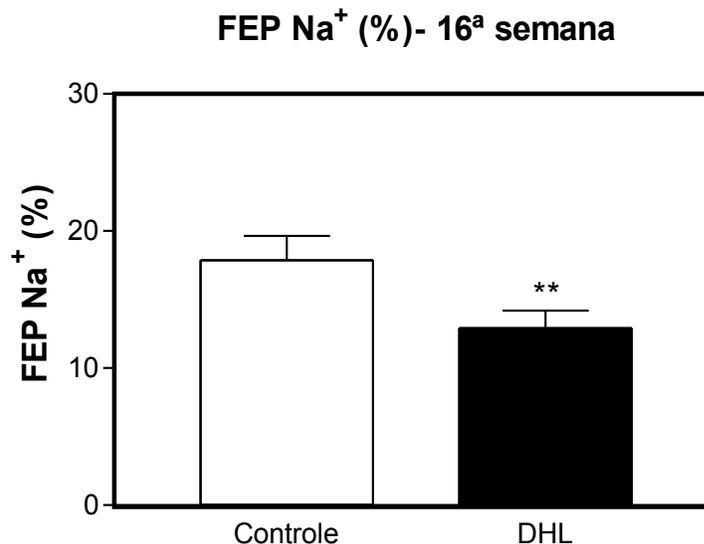


Figura 32- Fração de excreção proximal de sódio- FEP_{Na} (%) na prole com 16 semanas de vida. Os resultados estão expressos como média ± EPM. N=5 grupo Controle e N=3 grupo DHL. **P<0.007.

5.3.4.2.5 Fração de excreção pós-proximal de sódio (FEPP_{Na})

A excreção pós-proximal de sódio (**Figura 33**) foi semelhante nos dois grupos nos animais com 16 semanas de vida.

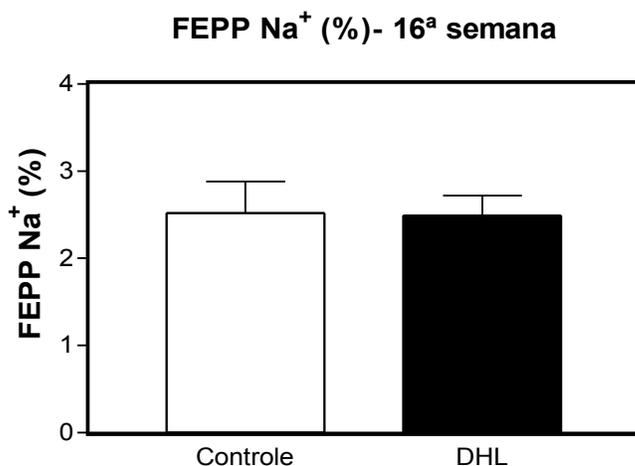


Figura 33- Fração de excreção pós-proximal de sódio- FEPP_{Na} (%) na prole com 16 semanas de vida. Os resultados estão expressos como média ± EPM. N=5 grupo Controle e N=3 grupo DHL.

5.3.4.2.6 Fração de excreção de potássio (FE_K)

Na 16ª semana, os filhotes DHL tiveram diminuição significativa ($P < 0.006$) na excreção de potássio- FE_K (**Figura 34**), como ocorreu na 8ª semana de vida.

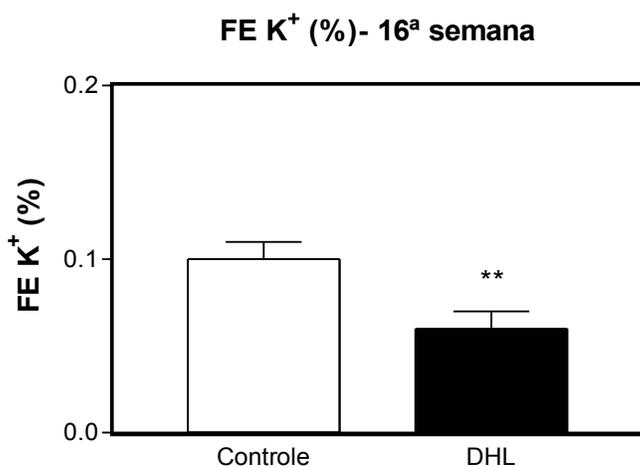


Figura 34- Fração de excreção de potássio- FE_K (%) na prole com 16 semanas de vida. Os resultados estão expressos como média ± EPM. N=5 grupo Controle e N=3 grupo DHL. ** $P < 0.006$.

5.3.5. Pressão arterial

5.3.5.1 Medida da pressão arterial da prole de machos

Os filhotes DHL apresentaram a pressão arterial significativamente mais elevada a partir da 8ª semana de vida ($P < 0.05$), e houve manutenção desta alteração até a medida da 16ª semana ($P < 0.05$) como mostra a **Figura 35**.

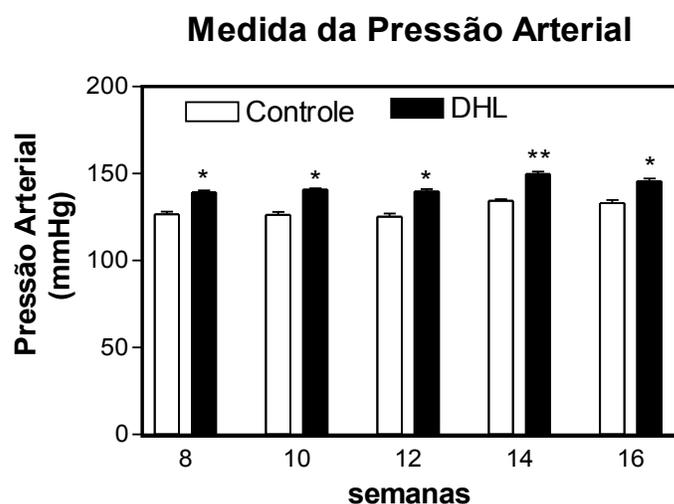


Figura 35- Medida da pressão arterial sistólica (mmHg) na prole da 8ª à 16ª semanas de vida. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. N= 5-6 grupo Controle e N=5-7 grupo DHL * $P < 0.05$ ** $P < 0.0001$.

5.3.6. Análise bioquímica

5.3.6.1 Análise de plasma dos filhotes com 8 e 16 semanas de vida

Foram analisadas amostras de sangue coletadas na 8ª e na 16ª semana da prole de machos para medidas dos seguintes parâmetros bioquímicos: íons (sódio, potássio, cloro, cálcio, magnésio e fósforo); colesterol, triglicérides e frações (HDL-COL, LDL-COL e VLDL), glicemia, e os níveis plasmáticos de creatinina, uréia, albumina, proteína total e globulina (**Tabela 5**).

Tabela 5- Análise bioquímica do plasma coletado na 8^a e 16^a semanas. Animais com 8 semanas de vida N=4 grupo Controle e N=7 grupo DHL. Para os animais com 16 semanas de vida N=9 grupo Controle e N=7 grupo DHL N=9

	8 ^a semana		16 ^a semana	
	Controle	DHL	Controle	DHL
Sódio (mmol/L)	154.25± 4,77	142.57± 2,56*	147.11± 0,65	141.29± 3,72
Potássio (mmol/L)	6.45 ± 0,69	5.34± 0,8	5.08 ± 0,52	4.97 ± 0,52
Cloro (mmol/L)	104.75 ± 2,32	96.14 ± 1,99*	103.13 ± 0,49	96.6 ± 2,81*
Magnésio (mEq/L)	1.67 ± 0,11	1.52 ± 0,02	1.59 ± 0,02	1.47± 0,05 *
Cálcio (mg/dL)	10.38 ± 0,39	9.67 ± 0,35	9.79± 0,12	8.59 ± 0,36*
Fósforo (mg/dL)	8.53 ± 0,77	7.89 ± 0,33	5.58± 0,30	5.49 ± 0,2
Uréia (mg/dL)	47.00± 3,72	48.57± 5,34	52.89± 2,21	48.57± 2,53
Creatinina (mg/dL)	0.23± 0,01	0.23± 0,01	0.29± 0,02	0.24± 0,03
Colesterol (mg/dL)	64.25± 5,88	55.57± 6,73	47.67± 3,61	51.71± 4
Triglicérides (mg/dL)	136.75 ± 17,54	93.71 ± 17,9	61.56 ± 6,98	113 ± 30,82
VLDL (mg/dL)	27.50 ± 3,52	18.71 ± 3,58	12.22 ± 1,38	22.71± 6,08
Glicose (mg/dL)	209.25 ± 32,43	194.29± 21,94	239.56± 19,82	197.71 ± 21,52
Albumina (g/dL)	2.78± 0,73	3.48 ± 0,22	3.50 ± 0,10	3.21 ± 0,13
Globulina	3.25 ± 0,63	2.67± 0,2	2.56± 0,18	2.5 ± 0,21

Os resultados estão expressos como média ± EPM. *P<0.05 .

5.3.6.2 Análise da urina dos filhotes com 8 e 16 semanas de vida

Também foram analisados os íons (sódio, potássio, cloro, cálcio, magnésio e fósforo) e os níveis de creatinina, uréia, amilase e ácido úrico na urina coletada durante a realização do *clearance* de lítio nos animais com 8 e 16 semanas de vida (**Tabela 6**).

Tabela 6- Análise bioquímica da urina coletada na 8ª e 16ª semanas. N=10 grupo Controle e N= 8 grupo DHL (8 semanas) e N=5 (16 semanas).

	8ª semana		16ª semana	
	Controle	DHL	Controle	DHL
Sódio (mmol/L)	5.4± 0,31	4.5± 0,5	7.0± 0,84	6.2± 0,58
Potássio (mmol/L)	4.76 ± 0,41	3.49 ± 0,34 *	5.0 ± 0,59	3.84 ± 0,23
Cloro (mmol/L)	7.8 ± 0,36	6.8 ± 0,3	_____	_____
Magnésio (mEq/L)	1.2 ± 0,18	1.25 ± 0,12	1.48 ± 0,22	0.45 ± 0,08 *
Cálcio (mg/dL)	0.13 ± 0,08	0.19 ± 0,05	0.35 ± 0,06	0.10 ± 0,04*
Fósforo (mg/dL)	5.29 ± 0,69	4.75 ± 1,03	4.2± 0,66	2.46 ± 0,39
Glicose-LCR (mg/dL)	0.4 ± 0,22	0.88 ± 0,4	2.6 ± 0,4	2.4 ± 0,4
Ácido Úrico (mg/dL)	0.46 ± 0,20	0.86 ± 0,08	0.88± 0,13	0.1± 0,04*
Uréia (mg/dL)	312.9 ± 32,3	247.38 ± 34,31	310.4± 23,91	270.4 ± 20,35
Creatinina (mg/dL)	3.71 ± 0,68	2.25 ± 0,36	4.18 ± 0,08	4.03 ± 0,54

Os resultados estão expressos como média ± EPM. P<0.05.

5.3.7. Western blot

5.3.7.1. Expressão de IKK em Rins

Foi feita à análise de proteínas da via inflamatória no rim da prole de machos com idades de 1 dia, 12 dias, 8 e 16 semanas de vida. A **Figura 36** mostra os resultados da variação (%) de proteína IKK em todas as idades comparando-se os grupos Controle e grupo DHL.

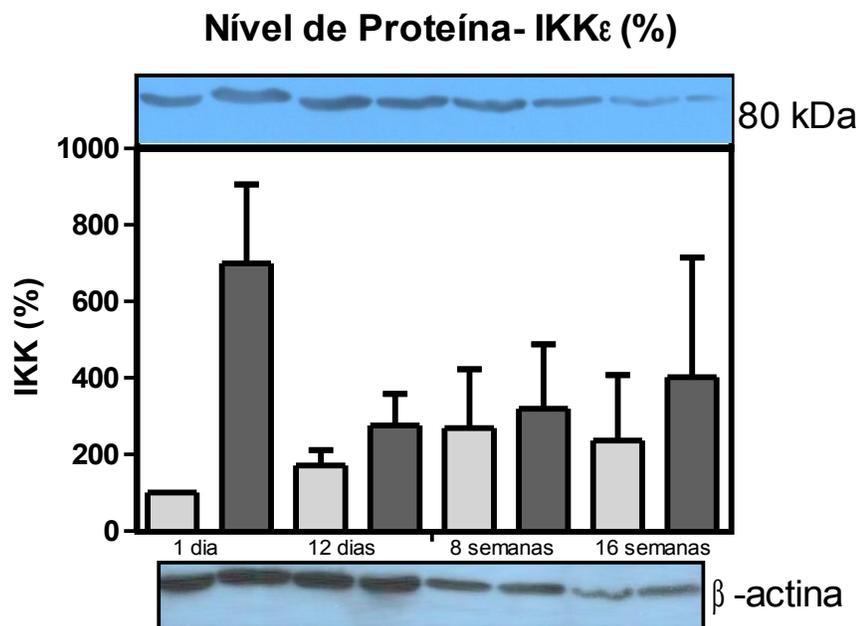


Figura 36- Nível de proteína de IKK (%) em Rim para todas as idades da prole de machos. N=3.

5.3.7.1.1 Expressão de IKK em Rins prole com 1 dia de vida pós-natal

A **Figura 37** mostra os resultados da variação (%) de proteína IKK em nos animais com 1 dia de vida. Houve aumento significativo na expressão para os filhotes DHL (P<0.0001).

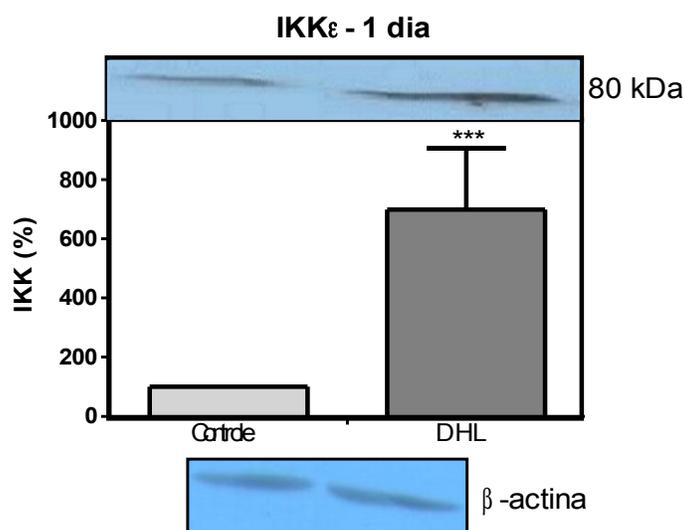


Figura 37- Nível de proteína de IKK (%) em Rim animais com 1 dia de vida pós-natal. N=3. *** P<0.0001.

5.3.7.1.2 Expressão de IKK em Rins prole com 12 dias de vida pós-natal

Nos animais com 12 dias de vida pós-natal, a expressão de IKK (%), não mostrou diferenças significativas, apesar do aumento como mostra a **Figura 38**.

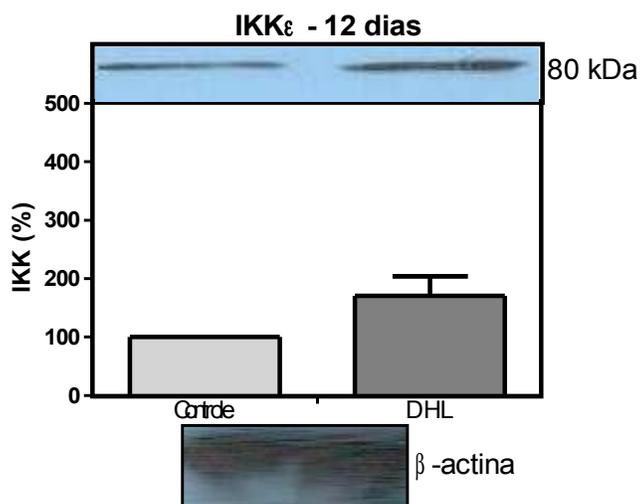


Figura 38- Nível de proteína de IKK (%) em Rim animais com 12 dias de vida pós-natal. N=3.

5.3.7.1.3 Expressão de IKK em Rins prole com 8 semanas de vida pós-natal

Para os animais com 8 semanas houve diminuição estatisticamente significativa ($P=0.0016$) na expressão de IKK (%), como visto na **Figura 39**.

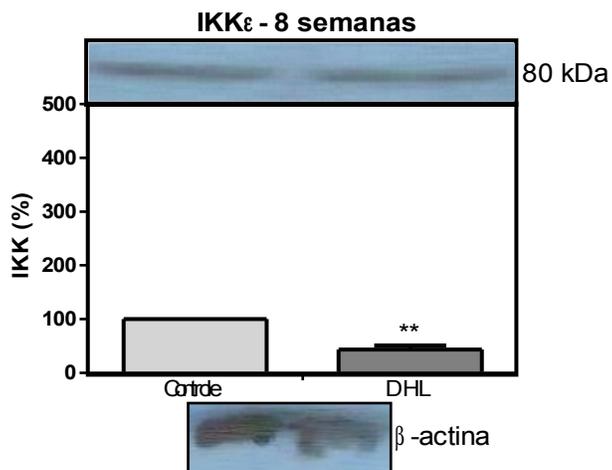


Figura 39- Nível de proteína de IKK (%) em Rim animais com 8 semanas de vida pós-natal. N=3. ** $P=0.0016$.

5.3.7.1.4 Expressão de IKK em Rins prole com 16 semanas de vida pós-natal

A **Figura 40** mostra os resultados para os animais com 16 semanas. Também houve diminuição estatisticamente significativa ($P=0.0018$) na expressão de IKK (%) para os filhotes DHL.

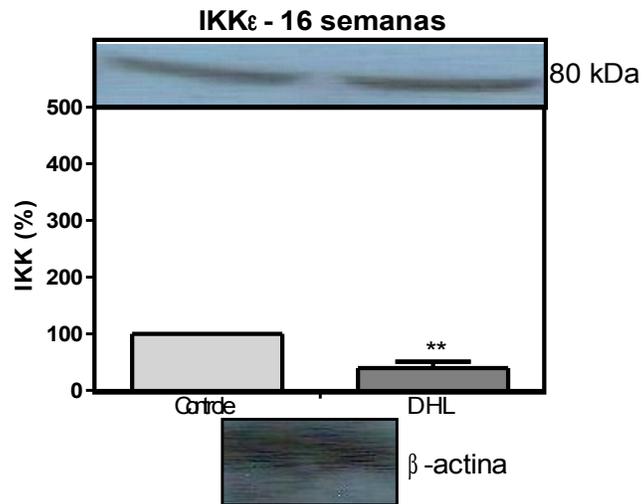


Figura 40- Nível de proteína de IKK (%) em Rim animais com 16 semanas de vida pós-natal. N=4. ** $P=0.0018$.

5.3.7.2. Expressão de I κ B fosforilado em Rins

Na análise das proteínas da via inflamatória no rim para I κ B fosforilado nas idades de 1 dia, 12 dias, 8 e 16 semanas de vida. Não houve diferença na variação (%) de proteína com mostra a **Figura 41**.

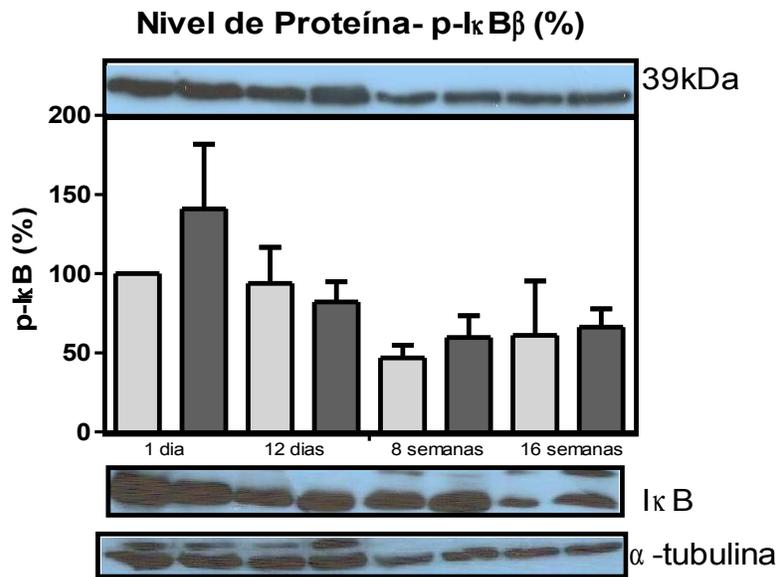


Figura 41- Nível de proteína de I κ B fosforilado (%) em Rim para todas as idades da prole de machos. N=5.

5.3.7.2.1 Expressão de I κ B fosforilado em Rins prole com 1 dia de vida pós-natal

A **Figura 42** mostra os resultados para os animais com 1 dia de vida. Há aumento na expressão de I κ B fosforilado (%) para os filhotes DHL, mas sem diferenças significativas.

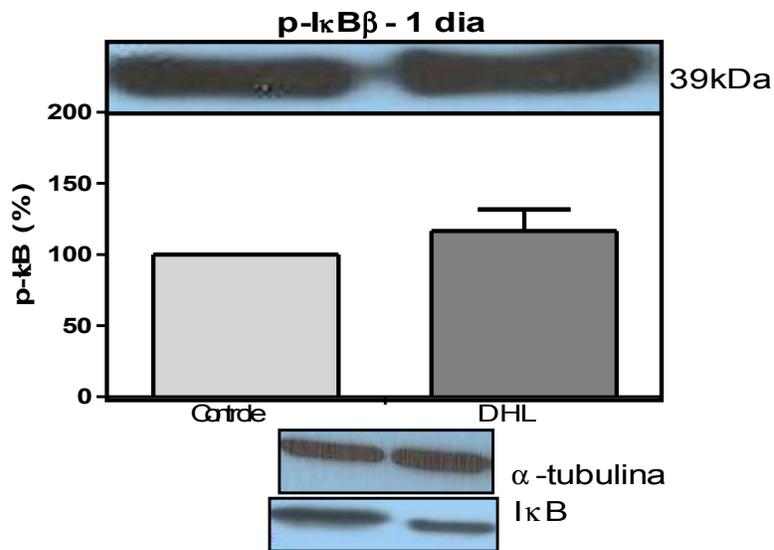


Figura 42- Nível de proteína de I κ B fosforilado (%) em Rim animais com 1 dia de vida pós-natal. N=3.

5.3.7.2.2 Expressão de I κ B fosforilado em Rins prole com 12 dias de vida pós-natal

A expressão de I κ B fosforilado (%) para os filhotes com 12 dias de vida foi semelhante entre os grupos (**Figura 43**).

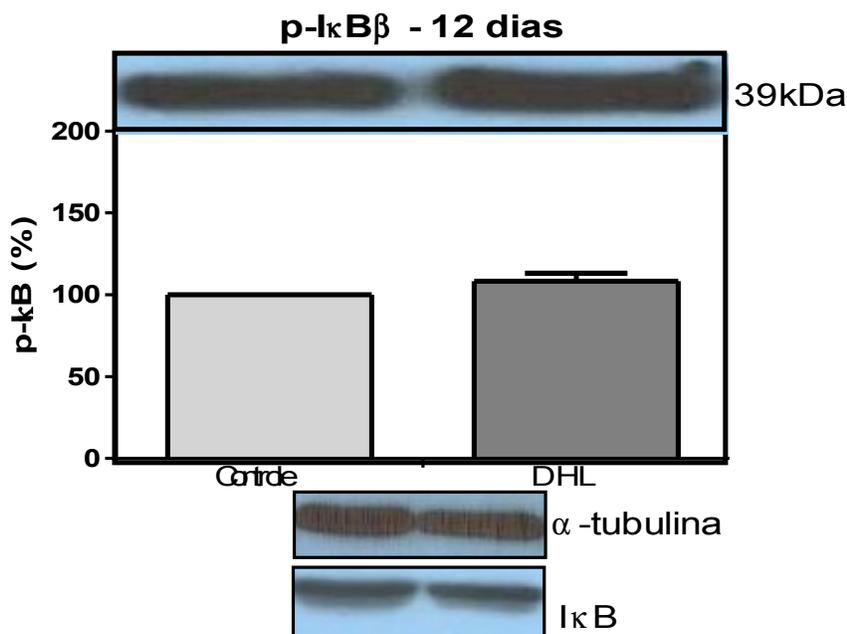


Figura 43- Nível de proteína de I κ B fosforilado (%) em Rim animais com 12 dias de vida pós-natal. N=5.

5.3.7.2.3. Expressão de I κ B fosforilado em Rins prole com 8 semanas de vida pós-natal

Nos animais com 8 semanas de vida, a expressão de I κ B fosforilado (%) foi maior ($P < 0.05$) para os filhotes DHL (**Figura 44**).

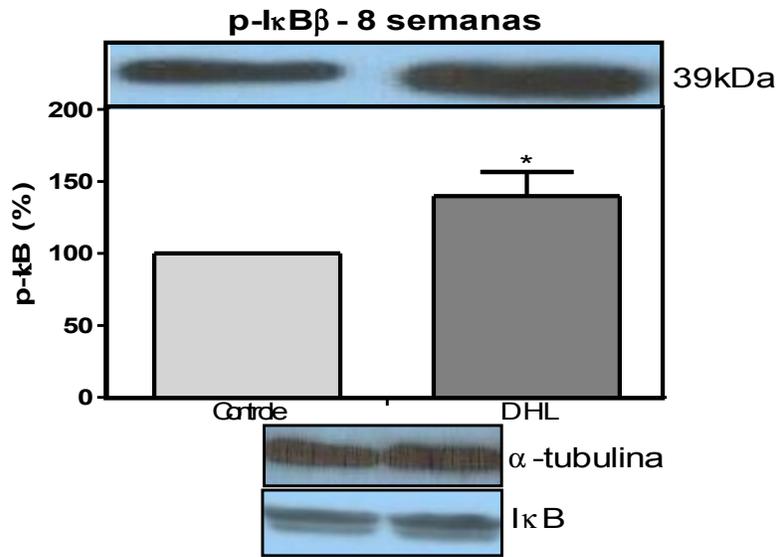


Figura 44- Nível de proteína de IκB fosforilado (%) em Rim animais com 8 semanas de vida pós-natal. N=5. * P<0.05.

5.3.7.2.4 Expressão de IκB fosforilado em Rins prole com 16 semanas de vida pós-natal

Nos animais com 16 semanas de vida, não houve diferenças na expressão de IκB fosforilado (%) como mostra a **Figura 45**.

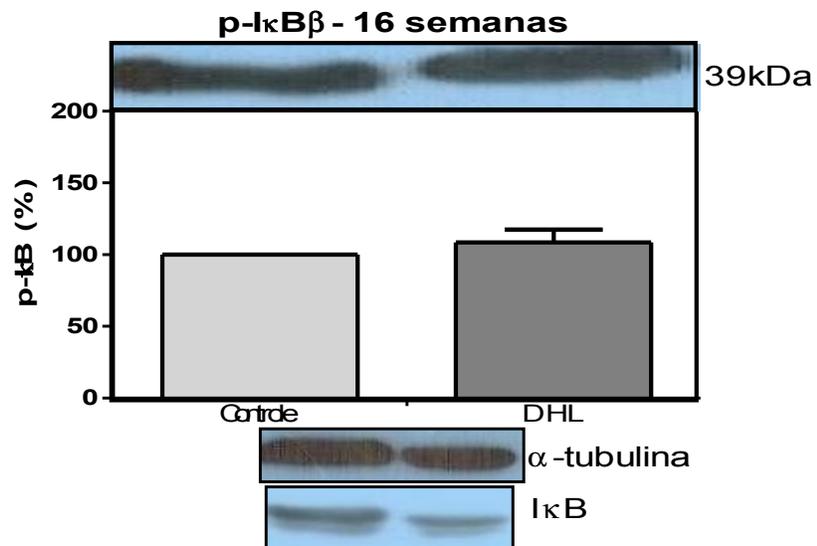


Figura 45- Nível de proteína de IκB fosforilado (%) em Rim animais com 16 semanas de vida pós-natal. N=5.

5.3.7.3. Expressão de NFκB em Rins

Na análise das proteínas da via inflamatória no rim para NFκB nas idades de 1 dia, 12 dias, 8 e 16 semanas de vida, não foi observada expressão nos animais com 1 dia de vida. Para as outras idades a variação (%) na expressão de proteína ocorreu como mostra a **Figura 46**.

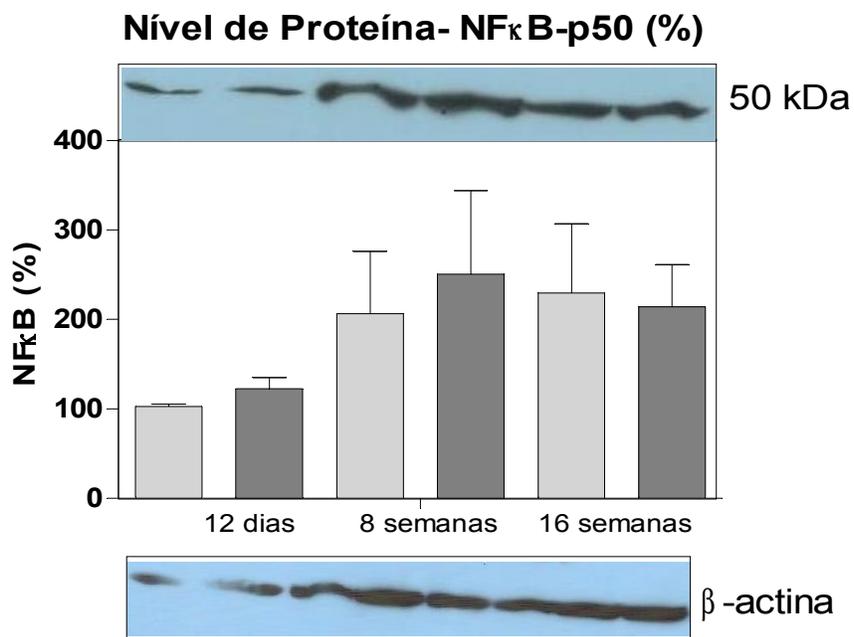


Figura 46- Nível de proteína de NFκB (%) em Rim para as idades: 12 dias, 8 e 16 semanas na prole de machos. N=3 grupo Controle e N=4 grupo DHL.

5.3.7.3.1 Expressão de NFκB em Rins prole com 12 dias de vida pós-natal

Na expressão de NFκB (%) para os filhotes com 12 dias de vida, mesmo com um aumento nos filhotes DHL, não houve diferença entre os grupos (**Figura 47**).

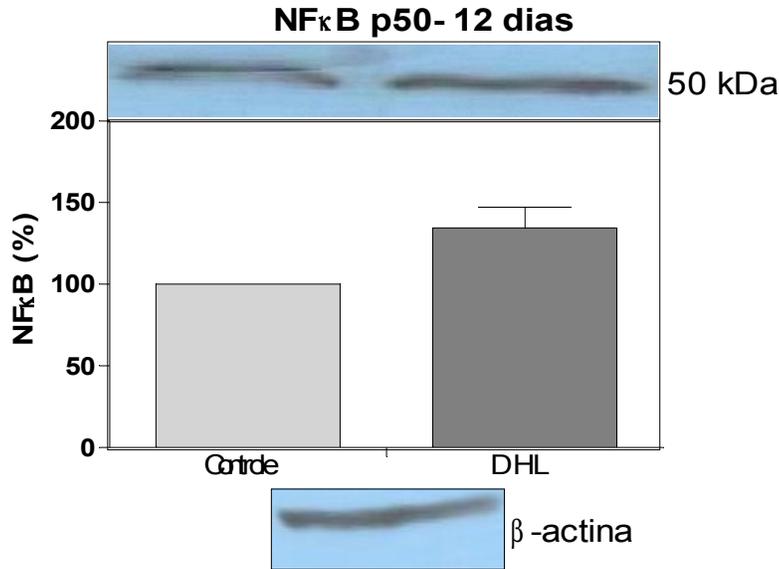


Figura 47- Nível de proteína de NFκB (%) em Rim animais com 12 dias de vida pós-natal. N=3.

5.3.7.3.2 Expressão de NFκB em Rins prole com 8 semanas de vida pós-natal

Na expressão de NFκB (%) para os filhotes com 8 semanas de vida, a elevação na expressão de proteína foi significativa ($P < 0.0001$) para os filhotes DHL (Figura 48).

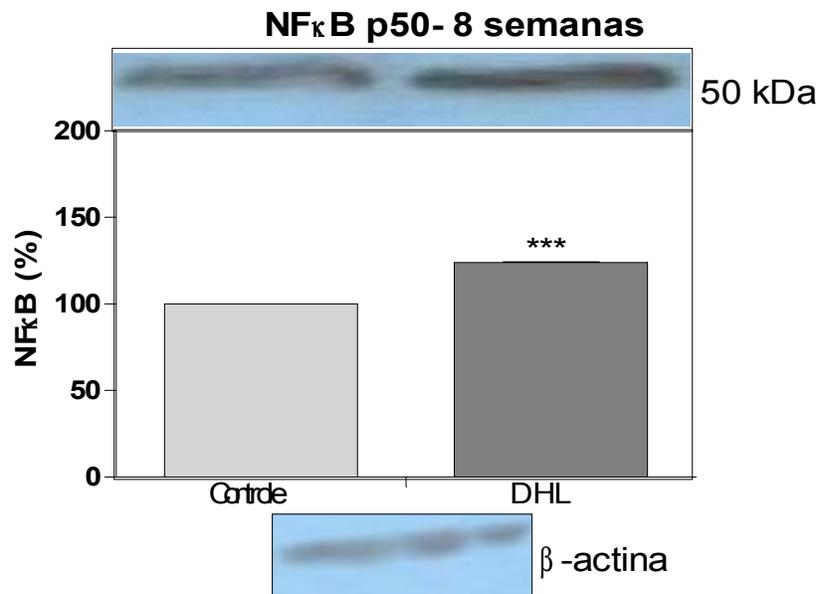


Figura 48- Nível de proteína de NFκB (%) em Rim animais 8 semanas de vida pós-natal. N=3. *** $P < 0.0001$.

5.3.7.3.3 Expressão de NFκB em Rins prole com 16 semanas de vida pós-natal

A elevação na expressão de NFκB (%) também foi estatisticamente significativa ($P < 0.02$) para os filhotes DHL com 16 semanas de vida (**Figura 49**).

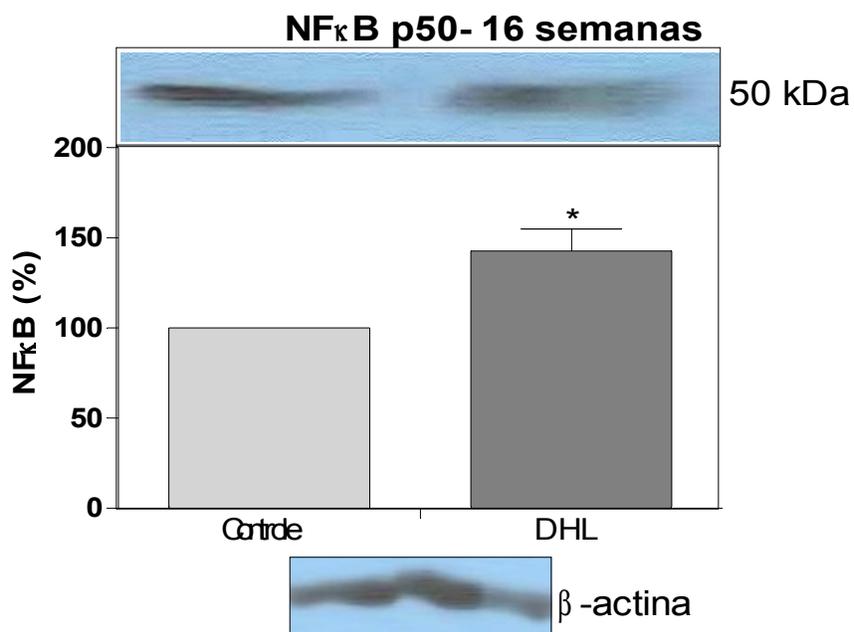


Figura 49- Nível de proteína de NFκB (%) em Rim animais 16 semanas de vida pós-natal. N=4. * $P < 0.02$.

5.3.8. Imunoistoquímica

Na **Figura 50** estão as imagens da imunoistoquímica realizada em rins da prole de machos com idades de 12 dias, 8 e 16 semanas para o anticorpo p-IKK (IKKα (phospho T23)).

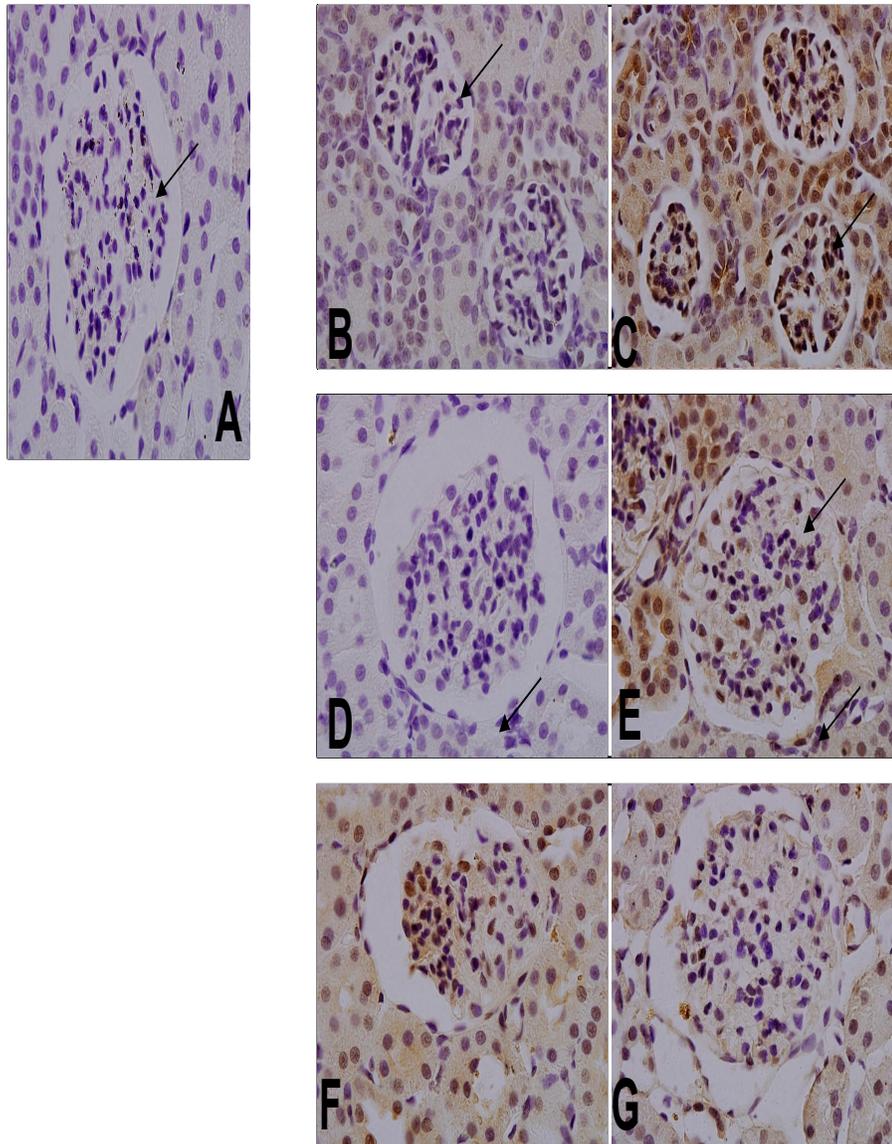


Figura 50- Imunolocalização para p-IKK na região cortical de rim da prole de machos dos grupos Controle (B, D e F) e DHL (C, E e G). Nas imagens observa-se glomérulos renais (setas). **A)** Controle negativo (100x); **B)** 12 dias Controle (40x); **C)** 12 dias DHL (40x); **D)** 8 semanas Controle (100x); **E)** 8 semanas DHL (100x); **F)** 16 semanas Controle (100x) e **G)** 16 semanas DHL (100x).



6. DISCUSSÃO

Considerando-se que atualmente, observa-se um aumento expressivo da ingestão de alimentos hipercalóricos, dentre os quais aqueles ricos em gorduras saturadas, principalmente em populações ocidentais, torna-se importante o estudo do efeito desta mudança de hábito alimentar sobre a incidência de doenças. Além disto, sabe-se que o efeito ambiental pode modificar de maneira epigenética ou não a expressão fenotípica durante a vida adulta em diferentes modelos experimentais associados à modificações dietéticas, estresse peri-natal e isquemia intra-uterina. Entretanto, ainda há poucos estudos que relacionam as repercussões da exposição materna a dietas com diferentes constituições lipídicas. Neste contexto, o presente estudo analisou o efeito da ingestão crônica de dieta hiperlipídica sobre as mães e a prole de ratos machos, estabelecendo a ocorrência de alterações metabólicas, do manuseio tubular renal de sódio, bem como, alterações na via inflamatória do NFκB nos rins.

6.1. Repercussão, a longo prazo, da dieta hiperlipídica sobre a função renal, sensibilidade insulínica e a pressão arterial em fêmeas Wistar

Para melhor compreensão do efeito da dieta hiperlipídica ingerida pela mãe sobre a prole, foi necessário descrever primeiramente os efeitos que esta dieta proporciona ao organismo materno. Dessa forma, avaliou-se na mãe o efeito da ingestão crônica de dieta hiperlipídica sobre a função renal, a pressão arterial e o metabolismo glicídico.

Os mecanismos relacionados aos distúrbios metabólicos e disfunção endócrina em animais alimentados com dieta hiperlipídica muitas vezes resultam em alterações na função e na morfologia do rim e no desenvolvimento da hipertensão (Buettner *et al*, 2007; Altunkaynak *et al*, 2008; Deji *et al*, 2009, Ebenezer *et al*, 2009; Fraulob *et al*, 2010; Noeman *et al*, 2011). Entretanto, os fatores que influenciam estas alterações ainda não foram totalmente elucidados, principalmente em fêmeas, pois a maior parte das pesquisas são realizadas em roedores machos (Deji *et al*, 2009; Ebenezer *et al*, 2009; Ebenezer *et al*, 2009a; Fraulob *et al*, 2010). O estudo com fêmeas é relevante para a compreensão do dimorfismo sexual já conhecido em resposta a diferentes tipos de dieta (Gilbert *et al*, 2008; Chaabo *et al*, 2010; Estrany *et al*, 2011).

Neste estudo avaliou-se a tolerância à glicose e seus dois principais determinantes, o controle da secreção e da sensibilidade à insulina em fêmeas Wistar tratadas por oito semanas com dieta hiperlipídica (contendo 60% das calorias em lipídios) e que iniciaram o tratamento após o desmame. As descobertas surpreendentes deste estudo mostram o comprometimento da tolerância à glicose comprovado pelo aumento de glicose plasmática em jejum e da concentração de glicose no sangue durante o teste (**Figura 4 A**) e aumento da área sob a curva glicêmica (**Figura 4B**). Estes resultados foram acompanhados pela redução na secreção de insulina (**Figura 4C**) durante o teste de tolerância à glicose, sendo observada uma diminuição de quase 50% na secreção de insulina nos primeiros 30 minutos após a administração de glicose. Assim, o presente estudo demonstrou que ratas fêmeas Wistar alimentadas com dieta hiperlipídica durante oito semanas exibiram características indicadoras da Síndrome Metabólica induzida por dieta, ou seja, hiperglicemia leve, redução na secreção de insulina e pressão arterial sistólica aumentada (Buettner *et al*, 2007; Armitage *et al*, 2008; Chaabo *et al*, 2010; Fraulob *et al*, 2010).

Apesar disto, inesperadamente, durante o tratamento as fêmeas com dieta hiperlipídica tiveram diminuição do peso corporal (**Figura 2**), da ingestão de alimento (**Figura 3A**) e de água (**Figura 3C**). Em contrapartida, a ingestão de calorias (**Figura 3B**) foi maior no grupo que recebeu dieta hiperlipídica. Além disto, a dieta hiperlipídica não alterou a concentração de triglicérides e colesterol (**Tabela 2**) nestas ratas em jejum, concordando com os resultados também obtidos por Estrany *et al* (2011). Uma explicação para a diminuição do peso corporal e menor ingestão de alimento pode estar relacionada à diminuição da massa muscular e alteração na saciedade, provocada por um esvaziamento gástrico lento adaptado à ingestão crônica de dieta rica em gordura saturada. Outra possibilidade seria a de que a obesidade surgiria mais tardiamente ou até mesmo não iria ocorrer em virtude dos animais serem de uma linhagem mais resistente à dieta (linhagem Wistar), como relatado em modelos de subnutrição ou com dietas hiperlipídicas com diferentes composições (Armitage *et al*, 2004).

Porém, o objetivo de promover um quadro semelhante à Síndrome

Metabólica humana, comprovado pela intolerância à glicose, vinculada à hiperglicemia e também, associada à baixa insulinemia, foi alcançado com o presente modelo experimental de dieta hiperlipídica.

Buettner *et al* (2007) fizeram uma revisão que apresenta as principais considerações sobre o modelo de indução de desordens metabólicas em roedores que simula a Síndrome Metabólica Humana. Nesta revisão os autores indicam que estas alterações metabólicas podem ser provocadas pelo comprometimento da função das células beta pancreáticas (Ahren *et al*, 1999; Lingohr *et al*, 2002). Neste caso, podemos supor que, no nosso estudo, a função das células beta pancreáticas nas ratas está comprometida, mas ainda é suficiente para manter a glicemia de jejum e os níveis de insulina na maior parte do período experimental, sendo porém, insuficiente para preservar a glicemia e a secreção de insulina após estímulo com glicose. Recentemente, Gómez-Pérez *et al* (2011) observaram que este efeito da dieta hiperlipídica sobre a função pancreática é maior em ratos Wistar machos do que em fêmeas. Apesar de ambos apresentarem aumento do estresse oxidativo no pâncreas, os machos apresentaram um perfil de resistência à insulina mais acentuado que as fêmeas.

No nosso trabalho, a carga de glicose intraperitoneal não teve efeito sobre a filtração glomerular (**Figura 7**), o que confirma os resultados de Rocchini *et al* (1989), Gans *et al* (1991) e Gontijo & Muscelli (1996). Estes artigos sugerem que fatores presentes nos túbulos renais possam ter um efeito antinatriurético. Alterações na atividade do nervo renal, no sistema renina-angiotensina e a liberação do peptídeo natriurético após uma carga de glicose, podem também contribuir para este quadro. Também deve-se considerar a contribuição da carga de glicose filtrada para a reabsorção de sódio tubular por um sistema de co-transporte sódio/glicose. Assim, podemos supor que a hiperglicemia cause aumento na carga glomerular de glicose filtrada levando a um aumento na reabsorção de sódio-glicose, o que pode ter contribuído para a diminuição da excreção renal de sódio acarretando em aumento na pressão arterial (**Figura 8**). Nosso grupo (Gontijo & Muscelli, 1996) e outros autores (DeFronzo *et al*, 1975; Ferrannini *et al*, 1987; Muscelli *et al*, 1991) já haviam demonstrado que a carga oral

de glicose e a insulina estimulam a bomba sódio/potássio adenosina trifosfatase e o sódio/hidrogênio antiporter, dois importantes mecanismos para absorção tubular renal de sódio. Nossos resultados indicam que a retenção de sódio, facilitada pela hiperinsulinemia poderia ser um fator importante para a patogênese da hipertensão e da resistência à insulina (Zheng *et al*, 2006). Dessa forma, nossos resultados sugerem que a dieta hiperlipídica pode acentuar a resistência à insulina potencialmente já existente (Reaven *et al*, 1991), o que reforça a hipertensão arterial sal-dependente. Além disso, a hiperglicemia e/ou hiperinsulinemia podem causar excitação simpática (Huggett *et al*, 2006) e ativação da inervação autônoma (Ikeda *et al*, 2001) também contribuindo para o aumento da pressão arterial em animais alimentados com dieta hiperlipídica. Em contrapartida, a estimulação simpática pode aumentar a resistência à insulina (Chazova *et al*, 2006) alimentando o quadro de hiperglicemia. Assim, podemos supor que a intolerância à glicose e a hiperatividade simpática podem se auto estimular, sendo fatores importantes para o aumento da pressão arterial.

Além disso, fatores adicionais, como leptina (Rahmouni *et al*, 2005) e estresse oxidativo (Vincent & Taylor, 2006; Fujita *et al*, 2005) podem levar a estímulo simpático e hipertensão em animais tratados com dieta hiperlipídica. Em relação a nossos resultados, não se pode descartar a participação do estresse oxidativo e dos fatores inflamatórios associados a alterações metabólicas no rim de animais tratados com dieta hiperlipídica. A elevação nos níveis de glicose circulante aumenta o estresse oxidativo, induzindo a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROS) na mitocôndria. As EROS mitocondriais podem, por sua vez, ativar outras vias de estresse oxidativo (Nishikawa *et al*, 2000). Além disso, o sistema renina-angiotensina pode estar alterado em animais submetidos à dieta hiperlipídica. Assim, o aumento da angiotensina renal pode induzir a produção de EROS pela ação das NAD(P)H oxidases (Coughlan *et al*, 2007). O aumento na produção de radicais livres também pode ser causado pela maior disponibilidade de ácidos graxos livres que levam a maior produção de hidroperóxidos lipídicos em animais com dieta hiperlipídica (Inoguchi *et al*, 2000).

Citocinas pró-inflamatórias aumentam a produção de superóxido, que por

sua vez aumenta a ativação de NFκB, criando um ciclo que resulta no aumento de citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo, ampliando o sinal e causando danos ao organismo (Ebenezer *et al*, 2009). Embora os mecanismos moleculares pelos quais o NFκB leva ao aumento do estresse oxidativo, que por sua vez causa mudanças metabólicas, não tenham sido investigados nas fêmeas neste estudo, nossos resultados sugerem que alterações na expressão de citocinas pró-inflamatórias e mudanças metabólicas podem afetar a função renal nos animais alimentados com dieta hiperlipídica, pois foi observada uma tendência à diminuição na concentração de globulina plasmática de fêmeas tratadas com essa dieta. A associação entre fatores pró-inflamatórios endógenos, dislipidemia e Síndrome Metabólica já é bem conhecida (Mori *et al*, 1996; Ritz & Stefanski, 1996; Isomaa, 2003; Kidambi *et al*, 2007).

Surpreendentemente, nossos resultados não mostraram mudanças no perfil dos lipídios circulantes, tanto nas fêmeas após 8 semanas de dieta hiperlipídica como no período gestacional e de lactação. Entretanto, estes resultados também foram obtidos por outros autores (Estrany *et al*, 2011). Em relação aos períodos gestacional e de lactação, observamos um aumento de uréia e creatinina no sangue de mães com dieta hiperlipídica, indicando um comprometimento renal (**Tabela 4**). Desta forma, experimentos complementares devem ser realizados para responder a estas perguntas.

Embora a relação entre intolerância à glicose e hipertensão já tenha sido descrita, nossos resultados indicam possíveis mecanismos para justificar estas alterações. Além disto, há poucos trabalhos realizados com fêmeas, sendo isto relevante, já que ocorrem diferenças nas respostas fisiológicas entre o organismo masculino e feminino (Gilbert *et al*, 2008; Benthon *et al*, 2010; Chaabo *et al*, 2010; Estrany *et al*, 2011). Dessa forma, nossos resultados vêm contribuir para uma melhor compreensão do efeito da dieta hiperlipídica no organismo de fêmeas.

Em conclusão, o aumento da disponibilidade de gordura na dieta causa efeitos negativos para o organismo de fêmeas, tais como aumento da pressão arterial e possíveis alterações pancreáticas devido à resistência à insulina e hiperatividade simpática. Estes resultados indicam que alterações na dieta,

principalmente dietas hiperlipídicas, causam hipertensão e disfunção renal. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para melhor compreensão dos mecanismos que interferem com as funções cardiovasculares, metabólicas e renais em fêmeas.

6.2. Repercussão, a longo prazo, da dieta hiperlipídica materna sobre a função renal, sensibilidade insulínica, vias inflamatórias NFkB renais e a pressão arterial em diferentes fases do desenvolvimento da prole de ratos Wistar.

A hipótese da Programação Fetal induzida pela dieta materna, como sendo responsável por uma susceptibilidade programada no feto, provocada por um ambiente intrauterino inadequado que leva ao aparecimento tardio de doenças metabólicas e cardiovasculares, tem sido evidenciada por inúmeros trabalhos (Armitage *et al*, 2004, 2005, 2008; Gupta *et al*, 2009; Howie *et al*, 2009; Prior & Armitage, 2009; Ng *et al*, 2010; Srinivasan *et al*, 2010; Innis *et al*, 2011). Esta hipótese foi proposta por Barker e colaboradores, que verificaram a associação entre hipertensão, resistência a insulina e dislipidemias em adultos com um ambiente intra uterino inapropriado relacionado a um crescimento fetal desproporcional (Barker, 1995, 1997; Godfrey *et al*, 1997, Swanson *et al*, 2009, Wadhwa *et al*, 2009). Além disto, sabe-se que a obesidade paterna em humanos está associada com o baixo peso nos recém-nascidos (Power *et al*, 2003). Integrada à hipótese de Programação Fetal está a abordagem epigenética, ou seja, o estudo do efeito do ambiente sobre a modulação do DNA, por meio de processos de metilação DNA, de modificações nas histonas e que modificam a interação do DNA com as histonas; tem permitido a melhor compreensão do desenvolvimento humano normal e a etiologia de doenças crônicas (Callinan & Feinberg, 2006; Taylor & Poston, 2007; Gaikwad *et al*, 2010).

Este trabalho analisou o efeito de uma dieta hiperlipídica, com 60% de calorias proveniente de lipídios sobre o crescimento, o metabolismo glicídico, função renal, pressão sanguínea e a via inflamatória no rim da prole de machos em diferentes fases do desenvolvimento.

Os resultados obtidos referentes ao estudo do comportamento ponderal dos diferentes grupos mostraram que a massa corporal dos animais apresentou

diferenças significativas desde o primeiro dia após o nascimento, quando os animais filhos de mães do grupo DHL mostraram uma redução ponderal significativa comparada aos filhotes Controle de mesma idade (**Figuras 11 e 12**). E, ao longo das semanas de acompanhamento experimental, a diferença ponderal voltou a apresentar uma divergência sendo que, ao fim das 16 semanas de seguimento, o grupo Controle já apresentava parâmetros ponderais significativamente maiores (**Figura 14**) que os observados nos DHL. Resultados semelhantes a estes também foram observados em experimentos com ratos Wistar (Howie *et al*, 2009; Couvreur *et al*, 2011), mas não com outros animais que apresentaram aumento de peso quando descendiam de mães tratadas com DHL (Jones *et al*, 2009; Bentham *et al*, 2010). Isto sugere que há uma diferença de resposta ao tratamento dependendo da linhagem e do grupo animal que foi escolhido como modelo experimental, como evidenciado na revisão feita por Armitage *et al* (2004). Além disto, na linhagem Wistar pode-se supor que a dieta materna induza a programação de um fenótipo econômico que tende a minimizar o grau de obesidade induzida pela dieta materna na prole, como sendo uma resposta preditiva adaptativa à dieta obesogênica (Couvreur *et al*, 2011). No entanto, já no 12º dia pós-natal (**Figura 13**), o estudo mostrou que as massas corporais atingiram pesos indistintos entre ambos os grupos (Controle VS. DHL). Esta idade é marcada por muitas alterações metabólicas e hormonais relativas ao amadurecimento do organismo do rato e que, em relação a vários parâmetros fisiológicos, apresenta-se insensível aos tratamentos mais diversos (Palanch & Alvares, 1998).

Além disso, o consumo materno de dietas hiperlipídicas durante a gestação e /ou lactação leva ao desenvolvimento programado (Cerf *et al*, 2005; Gupta *et al*, 2009; Cerf *et al*, 2007; Srinivasan *et al*, 2006;). A fisiologia e o metabolismo da prole são programados precocemente pela ingestão materna de dietas ricas em gorduras saturadas durante períodos definidos da gestação e da lactação (Cerf & Louw, 2008). O baixo peso ao nascer, mais especificamente, tem sido relacionado à hipertensão arterial, a riscos cardiovasculares, a intolerância à glicose e resistência à insulina, diabetes tipo 2, hiperlipidemia e outras desordens maternas (Barker, 1994; Gluckman & Hanson, 2005). Mudanças fisiológicas encontradas no período pós-natal também são observadas após ingestão materna de dietas

calóricas e outras intervenções na dieta com alterações na composição protéico-calórica e, na quantidade de nutrientes tais como minerais (cálcio, ferro), co-fatores (ácido fólico, taurina), e vitaminas (A e D) (Armitage *et al*, 2004; Welham *et al*, 2005). Os resultados encontrados no presente estudo mostram uma programação diferenciada, já que os filhotes DHL tiveram menor ganho ponderal de massa corporal do que os filhotes Controle.

Os resultados do presente estudo referentes à avaliação da tolerância oral à glicose, estimando a sensibilidade tecidual a insulina e/ou a resposta pancreática à secreção insulínica mostrou uma menor amplitude da área sob a curva para os filhotes oriundos de mães submetidas a ingestão de ração hiperlipídica (DHL) (**Figuras 15 e 17**). Estes resultados sugerem uma tendência à captação tecidual maior de glicose ou maior secreção de insulina no grupo DHL, no entanto, a análise estatística dos resultados não mostrou diferença entre os grupos de animais estudados. Aparentemente, houve uma entrada mais rápida de glicose nas células, indicando maior sensibilidade, mas os cálculos da área sobre a curva- ASC, embora apresentassem uma tendência, não mostraram diferenças significativas entre os grupos estudados nos dois períodos. O estudo do decaimento dos níveis plasmáticos de glicose através do ITT (**Figuras 19 e 21**) demonstrou que a curva glicêmica dos filhotes DHL na 8ª semana não foi diferente daquela observada em animais Controle. A resposta tecidual à insulina e possivelmente o metabolismo glicídico parecem ter apresentado alterações expressivas apenas na 16ª semana de seguimento (**Figura 22**), com redução do K_{itt} nos filhotes DHL. Estas observações podem sugerir que os filhos de mães tratadas com dieta hiperlipídica apresentem na idade adulta uma redução na sensibilidade periférica à insulina. Fisiologicamente, a queda dos níveis glicêmicos é determinada por dois fatores: 1. supressão da produção hepática de glicose e, 2. pelo estímulo à captação de glicose pelos tecidos sensíveis à insulina. O K_{itt} é interpretado baseando-se em quanto mais rápida e intensa for a queda da glicose, mais sensível o indivíduo é à insulina. O índice corresponde à queda da glicose expressa em %/minuto, assim, quanto maior o K_{itt} , maior a sensibilidade à insulina. Portanto, a queda da glicose observada nos primeiros 15 minutos após o início do teste reflete a captação de

glicose pelos tecidos induzida pela insulina, bem como a inibição da liberação de glicose pelo fígado (Geloneze *et al*, 2000).

A dieta hiperlipídica é conhecida por comprometer a sensibilidade à glicose e à sinalização da insulina (Chavez & Summers, 2003; Montell *et al*, 2001) com efeitos como redução da resposta insulínica pelas ilhotas pancreáticas (Cerf *et al*, 2005; Ng *et al*, 2010; Srinivasan *et al*, 2010). No presente estudo, foi observado que o tratamento materno a longo prazo, com dieta rica em gorduras saturadas promoveu na prole adulta, através de possíveis modificações intra-uterinas, e, portanto, através de programação fetal, desarranjos endócrinos metabólicos identificados como menor sensibilidade tecidual insulínica e possível disfunção das células β pancreáticas. Temporariamente, a função pancreática endócrina compensa esta menor sensibilidade periférica à insulina através de um aumento, também transiente, da secreção insulínica, efeito este progressivamente atenuado pela redução do número de células β como decorrência do hiper-estímulo inicial (Ng *et al*, 2010). Estudos recentes tem demonstrado que esse aumento transitório na secreção de insulina está associado à replicação anormal de células β o que acelera a falência das mesmas (Cerf *et al*, 2009), assim como, o aumento da expressão de diversos genes nas ilhotas pancreáticas que podem alterar sua funcionalidade (Ng *et al*, 2010). A redução da ação insulínica pode estar relacionada a uma série de alterações metabólicas e cardiovasculares como hipertensão arterial, hipertrigliceridemia e redução do HDL - colesterol. Estas alterações da resistência à insulina são conhecidas como síndrome de resistência à insulina e compõem a síndrome metabólica (Reaven, 1988; DeFronzo *et al*, 1991 e Ferranini *et al*, 1991). Supomos que o tratamento materno com dieta hiperlipídica pode induzir em ratos, na idade adulta, alterações metabólicas que estão associadas ao desenvolvimento de doenças tais como, o *diabetes mellitus*.

Para avaliar as repercussões do tratamento materno com dieta hiperlipídica sobre a prole de ratos machos, ao completar oito e 16 semanas de vida submetemos os animais ao estudo da função renal através dos clearances de creatinina e lítio, observando, respectivamente, a filtração glomerular e o manuseio tubular renal de sódio. Os resultados obtidos mostraram que o volume urinário não

apresentou modificações significativas quando comparados os animais oriundos de mães sujeitas à dieta rica em gorduras saturadas (DHL) ao grupo Controle, na 8ª e 16ª semanas de vida pós-natal. No entanto, com relação à filtração glomerular, estimada pelo *clearance* de creatinina houve um aumento deste parâmetro nos dois períodos estudados sendo entretanto, significativa em relação ao grupo Controle apenas na 8ª semana (**Figura 24**). Foi observado neste mesmo período (8ª semana de acompanhamento) que a prole de ratos cuja mãe foi tratada com dieta hiperlipídica, apresentou uma maior retenção tubular de sódio nos seguimentos pós-proximais (**Figura 27**) do nefro, provavelmente nos seguimentos distais à alça de Henle, uma vez que uma menor reabsorção de sódio nestes seguimentos está associada a um decréscimo na excreção urinária de potássio (**Figura 28**). Entretanto, esta maior retenção de sódio neste momento não causou, aparentemente, uma diminuição significativa na excreção absoluta ou fracional de sódio (**Figura 25**). Na 16ª semana, persistiu o aumento na filtração glomerular, mas sem diferenças entre os grupos. Porém, a prole de animais provenientes de mães tratadas com DHL apresentou uma elevação ainda maior sobre a retenção tubular de sódio, agora também nos seguimentos proximais do nefro (**Figura 32**). Essa consistente alteração foi suficiente para repercutir sobre o balanço de sódio promovendo uma significativa e menor excreção renal total de sódio (**Figura 31**). Com um menor aporte distal de sódio, a reabsorção distal deste íon também é minimizada promovendo uma menor secreção distal de potássio, confirmada pela menor excreção urinária de potássio (**Figura 34**) nos animais com 16 semanas de vida cujas mães foram tratadas com DHL. Esta expressiva retenção de sódio nos animais adultos de 16 semanas, pode ter sido associada à expansão do volume extracelular e ao desenvolvimento hipertensivo observado nestes animais. Um mecanismo que pode ser considerado para explicar, mesmo que parcialmente os resultados acima, refere-se à atuação da Na^+K^+ -ATPase no rim estabelecendo gradientes osmóticos pelos quais todos os processos de troca de sódio e de pressão osmótica agem. Estudo prévio tem demonstrado que dieta materna rica em ácidos graxos saturados pode ter influências persistentes sobre a atividade Na^+K^+ -ATPase, que por sua vez pode estar associada a doenças cardiovasculares, em particular a hipertensão na idade adulta (Armitage *et al*,

2005; Armitage *et al*, 2008).

As análises bioquímicas do plasma (**Tabela 5**) apresentaram algumas alterações relevantes. Observa-se queda nas concentrações de cloro (mmol/L) nos dois períodos experimentais e também nos níveis plasmáticos de magnésio (mEq/L) e de cálcio (mg/dL) na 16ª semana nos filhotes DHL. Estas alterações plasmáticas foram acompanhadas por queda acentuada nas concentrações urinárias (**Tabela 6**) de magnésio (mEq/L) e de cálcio (mg/dL) na 16ª semana. Os níveis de uréia (mg/dL) também diminuíram nos dois períodos experimentais. Já os níveis urinários de ácido úrico (mg/dL) aumentaram nos filhotes DHL na 8ª e 16ª semanas experimentais. Estas alterações têm sido demonstradas previamente ligadas ao desenvolvimento e/ou manutenção dos elevados níveis pressóricos em diferentes modelos experimentais e no homem (Abdel-Halim, 2005; Yogi *et al*, 2003).

O presente estudo demonstrou que a prole das ratas que receberam dieta hiperlipídica, apresentou níveis de pressão arterial significativamente mais elevados a partir da 8ª semana de vida, e se mantiveram alterados até a 16ª semana (**Figura 35**) comparados a animais provenientes de mães expostas à dieta padrão. O baixo peso ao nascer está associado com hipertensão, intolerância à glicose e alterações nas ilhotas pancreáticas, no sistema renina-angiotensina e no eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (Fowden *et al*, 2005). Esses resultados suportam os dados do presente estudo demonstrando o desenvolvimento de hipertensão arterial, agora obtidos em prole de mães tratadas com DHL durante oito semanas experimentais, incluindo o período gestacional. Estudos em animais também demonstraram que o momento, a duração, e a natureza do insulto sofrido durante a gestação são importantes. Além disso, mostram que os insultos maternos com pequenos efeitos no peso do nascimento podem alterar subsequentemente a função cardiovascular e metabólica (Barker, 2001, Armitage *et al*, 2004). Entretanto, há poucos artigos que relatam a relação de dietas maternas como hipoproteica (Franco *et al*, 2003), com insuficiência de ferro (Gambling *et al*, 2003) e hiperlipídica (Langley-Evans *et al*, 1996) com o desenvolvimento de hipertensão na prole, de animais adultos.

Na análise downstream das proteínas que constituem a via inflamatória ligada à expressão NFκB no rim, revelou que não houve diferenças na expressão de IKK total para todas as idades experimentais (1 e 12 dias, 8 e 16 semanas de vida), quando comparadas em conjunto (**Figura 36**). Contudo, a análise estatística do efeito da dieta hiperlipídica sobre a expressão de IKK em cada idade isoladamente apresentou diferenças estatísticas com aumento da expressão na idade de 1 dia de vida (**Figura 37**) e diminuição da expressão de IKK com 8 e 16 semanas de vida nos animais DHL (**Figuras 39 e 40**) em comparação ao grupo controle.

A expressão de IκB fosforilado nas idades de 1 dia, 12 dias, 8 e 16 semanas de vida (**Figura 41**) não apresentou diferenças significativas entre os grupos nos diferentes tempos de desenvolvimento, quando comparados em conjunto. Analisando-se ainda em relação a diferença entre as idades nota-se uma diminuição da expressão de IκB com o aumento da idade. Quando comparadas a expressão desta proteína separada nas diferentes idades (**Figuras 42, 43, 44 e 45**), observa-se um aumento na expressão de IκB fosforilado no grupo DHL nos animais mais velhos, sendo esta somente significativa na idade de 8 semanas para o grupo DHL (**Figura 44**). Paralelamente à elevação de IκB fosforilado, ocorre um aumento da expressão de NFκB nas diferentes idades exceto nos animais com 1 dia de vida onde esta proteína não foi detectada (**Figura 46**). A análise de cada idade separada mostra aumento da expressão NFκB renal nos filhotes DHL, com diferenças significativas para 8 e 16 semanas (**Figuras 48 e 49**) confirmando o estado inflamatório neste grupo experimental.

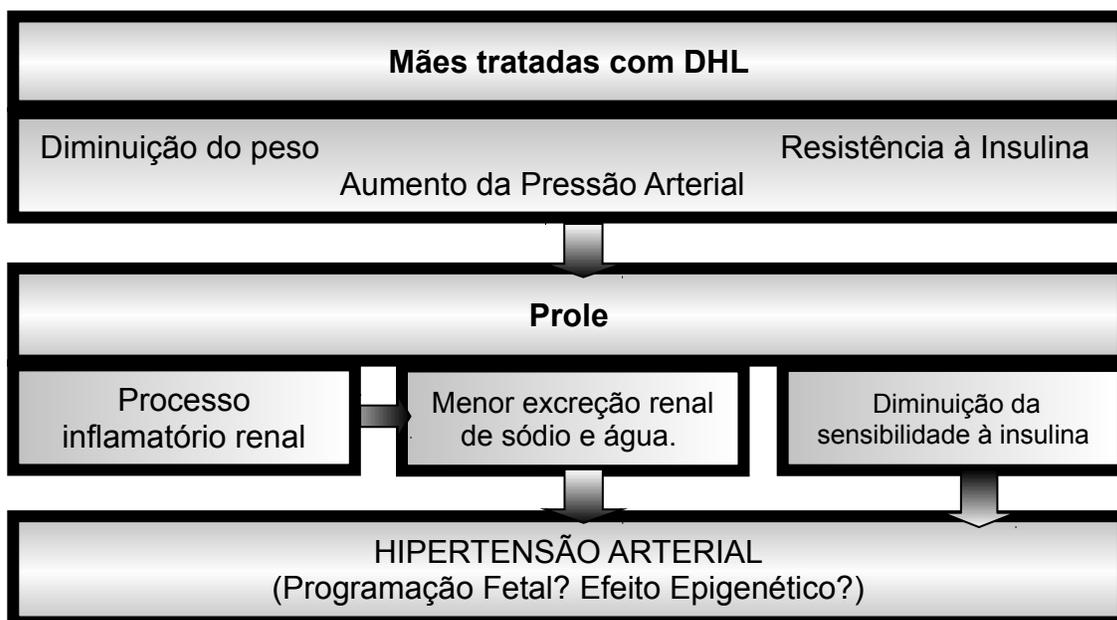
A enzima responsável pela ativação do NFκB é a IKK que fosforila IκB levando-o à degradação (Kim *et al*, 2007). O NFκB, quando ativado, promove a expressão de vários mediadores inflamatórios, dentre eles as citocinas pró-inflamatórias (Kopp & Ghosh, 1995). As citocinas inflamatórias, tais como TNFα, IL-1 e IL-6 desempenham um importante papel na modulação do processo inflamatório, pois aumentam a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais que promoverão a adesão de neutrófilos e monócitos circulantes ao endotélio inflamado (Smythies *et al*, 2005). Diversos tipos de células, inclusive

aquelas que migram para o tecido, são capazes de produzir e secretar IL-1. A síntese dessas citocinas é induzida pela ativação do NFκB e, após serem liberadas, são capazes de induzir a produção de moléculas de adesão e outros mediadores inflamatórios, como espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e mediadores lipídicos, como as prostaglandinas e leucotrienos. De modo geral, as citocinas participam da indução, amplificação, prolongamento e resolução do processo inflamatório (Aggarwal & Puri, 2004). Sendo assim, o NFκB promove a síntese e a ativação de uma série de citocinas que recrutam monócitos e macrófagos para a parede dos vasos, sendo este um mecanismo em potencial para a disfunção endotelial. Outros fatores contribuintes são o aumento do estresse oxidativo e também a ativação de TNF-α, que promovem a transcrição intracelular de NFκB, que transloca para o núcleo ativando a resposta de uma série de citocinas inflamatórias e alterando assim o ciclo inflamatório (Imig, 2008, Chandramohan *et al*, 2008).

Da mesma forma, os resultados de imunoistoquímica corroboram para indicar a ativação da via do NFκB na prole adulta de machos nascidos de fêmeas alimentadas com DHL (**Figura 50**).

Em relação ao rim, sabe-se do importante papel da via inflamatória do NFκB em doenças renais (Chen *et al*, 2009; Höcherl *et al*, 2010) e sepsis (Liu & Malik, 2006). Entretanto, a ativação desta via inflamatória na prole nascida de fêmeas tratadas com dieta hiperlipídica é um resultado inovador. Dessa forma, provavelmente, a ativação desta importante via inflamatória neste modelo experimental pode ser um dos principais fatores responsáveis pelas alterações na filtração glomerular, na função tubular renal e no desencadeamento do processo de hipertensão. Ressalta-se que estes animais, filhos de ratas que foram tratadas com dieta hiperlipídica desde o desmame, foram alimentados com ração padrão, ou seja, todas as alterações observadas nestes animais, foram exclusivamente causadas por estímulos recebidos durante o período de desenvolvimento intra-uterino e de lactação. Assim, sugerindo um processo epigenético que precisa ser melhor compreendido.

Dessa forma, pode-se resumir os resultados deste trabalho no quadro a seguir:



O estilo de vida moderno, a ingestão hipercalórica e a constituição de nossa dieta no dia-a-dia e no período gestacional influenciam as adaptações fisiológicas fazendo com que as modificações ontogênicas intra-uterinas promovam a expressão de um fenótipo em condições adaptativas favoráveis para as próximas gerações, efeito conhecido como programação fetal. No entanto, adicionalmente a fatores adaptativos determinados pelo desenho imposto intra-uterino, originam-se mecanismos decorrentes de circunstâncias ou fatores ambientais pós-natais, inesperados ou “não-programados”, que podem empreender na vida adulta o surgimento de mecanismos fisiopatológicos que originam as doenças. Neste sentido está a contribuição dos experimentos apresentados neste trabalho. Quando se sugere que a exposição de mães a dietas ricas em gordura saturada desencadeia nestas, elevação pressórica e desensibilidade à ação insulínica, e o que é mais grave, expõe a geração futura (sua prole) a um contexto inflamatório (renal) mas que pode ser generalizado e que se associa à retenção renal de sódio, à hiperinsulinemia e à hipertensão arterial.



7. CONCLUSÃO

O presente trabalho traz um acompanhamento do perfil de ratas que receberam a dieta hiperlipídica e de sua prole de machos. Os resultados apresentados mostram a clara relação entre a ingestão de uma dieta rica em ácidos graxos saturados e a prevalência de doenças como hipertensão, resistência à insulina e a ativação da via inflamatória em rim e coração de ratos. Também traz a indicação de alterações no perfil lipídico e na função renal. São mostrados também, resultados referentes ao estudo da via inflamatória por Western Blot, com diferenças significativas na prole de machos de mães que receberam a dieta hiperlipídica.

Repercussão a longo prazo, da dieta hiperlipídica sobre a função renal, sensibilidade insulínica e a pressão arterial em ratas Wistar

1. Os resultados da função renal na 8^a semana experimental mostraram uma queda expressiva na excreção de potássio nas fêmeas que ingeriram a dieta hiperlipídica.
2. Houve aumento nos níveis glicêmicos, com diminuição dos níveis plasmáticos de insulina após oito semanas experimentais.
3. O consumo crônico de dieta hiperlipídica levou ao aumento expressivo nas medidas de pressão arterial.

Repercussão, a longo prazo, da dieta hiperlipídica materna sobre a função renal, sensibilidade insulínica, vias inflamatórias NFkB renais e a pressão arterial em diferentes fases do desenvolvimento da prole de ratos Wistar

1. As alterações na função renal da prole já estavam se manifestando na 8^a semana de vida, pois houve retenção de sódio nos seguimentos pós-proximais e diminuição na excreção de potássio.
2. Na 16^a semana de vida a prole apresentou elevação expressiva na reabsorção de sódio e ainda diminuição na excreção de potássio.
3. Os filhotes apresentaram alterações no metabolismo glicêmico, com diminuição na sensibilidade periférica à insulina na 16^a semana.
3. Houve maior fosforilação de IκB e mais expressão de NFκB nos animais adultos, caracterizando ativação da via inflamatória.
4. A elevação da pressão arterial foi expressiva na prole, pois ocorreu desde a 8^a até a 16^a semana de vida.



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Halim RE. Urolithiasis in adults. Clinical and biochemical aspects. Saudi Med J. 2005 May; 26(5):705-13.

Abdul-Ghani MA, Muller FL, Liu Y, Chavez AO, Balas B, Zuo P, Chang Z, Tripathy D, Jani R, Molina-Carrion M, Monroy A, Folli F, Van Remmen H e DeFronzo RA. Deleterious action of FA metabolites on ATP synthesis: possible link between lipotoxicity, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008 295(3):E678–E685.

Aggarwal BB e Puri RK. Human Cytokines: Their Role in Disease and Therapy. Boston: Blackwell; 2004.

Ahren B, Gudbjartsson T, Al Amin AN, Mårtensson H, Myrsén-Axcrona U, Karlsson S, Mulder H e Sundler F. Islet perturbations in rats fed a high-fat diet. Pancreas. 1999; 18:75– 83.

Altunkaynak ME, Özbek E, Altunkaynak BZ, Can I, Unal D e Unal B. The effects of high-fat diet on the renal structure and morphometric parametric of kidneys in rats. J Anat. 2008: 212, 845–852.

American Heart Association. Heart Disease and Stroke statistics – Dallas, Texas: American Heart Association; p 43. 2008.

Armitage JA, Khan IY, Taylor PD, Nathaniels PW e Poston L. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? J Physiol. 2004 561:355–377.

Armitage JA, Lakasing L, Taylor PD, Balachandran AA, Jensen RI, Dekou V, Ashton N, Nyengaard JR e Poston L. Developmental programming of aortic and renal structure in offspring of rats fed fat-rich diets in pregnancy. *J Physiol*. 2005, 565-1, 171-184.

Armitage JA, Gupta S, Wood C, Jensen RI, Samuelsson AM, Fuller W, Shattock MJ, Poston L e Taylor PD. Maternal dietary supplementation with saturated, but not monounsaturated or polyunsaturated fatty acids, leads to tissue-specific inhibition of offspring Na⁺,K⁺-ATPase. *J Physiol* 586.20 (2008) pp 5013–5022 5013.

Baeuerle PA e Baltimore D. NF-kappaB: Ten years after. *Cell* 1996 87, 13-20.

Barker DJP. Mothers, babies and disease in later life. London: BMJ Publishing Group, 1994.

Barker DJP. Fetal origins of coronary heart disease. *Br Med J* 311: 171–174, 1995.

Barker DJP. The malnourished baby and infant. *Br Med Bull* 60: 69–88, 2001.

Barreto-Filho JAS e Krieger JE. Genética e hipertensão arterial: conhecimento aplicado à prática clínica? *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo*. 2003; 13 (1): 46-55.

Barros ALBL, Vieira FS, Assis CC e Zeitoun SS. Alterações do nível pressórico e fatores de risco em graduandos de enfermagem. *Acta paul. enferm*. São Paulo, v. 22, n. 6, Dec. 2009 .

Bastos DHM, Rogero MM e Arêas JAG. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. Effects of dietary bioactive compounds on obesity induced inflammation. Arq Bras Endocrinol Metab vol.53 no.5 São Paulo July 2009.

Baud V e Karin M. OPINION: is NF-kappa B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. Nat Rev Drug Discov. 2009; 8(1):33-40.

Buettner R, Schölmerich J e Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. Obesity (Silver Spring). 2007 Apr;15(4):798-808. Review.

Bullo M, Casas-Agustench P, Migo-Correig P, Aranceta J e Salas-Salvado J (2007). Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet. Public Health Nutr. 2007;(10A):1164-72.

Bentham J, Michell AC, Lockstone H, Andrew D, Schneider JE, Brown NA, Bhattacharya S. Maternal high-fat diet interacts with embryonic Cited2 genotype to reduce Pitx2c expression and enhance penetrance of left-right patterning defects. Hum Mol Genet 2010 Sep 1;19(17):3394-401.

Callinan PA e Feinberg AP. The emerging science of epigenomics. Hum Mol Genet. 2006 Apr 15; Spec No 1:R95-101. Review.

Carvalho-Filho MA, Carvalheira JBC, Velloso LA e Saad MJA (2007). Cross-talk das vias de insulina e angiotensina II: implicações com a associação entre diabetes mellitus e hipertensão arterial e doença cardiovascular. Arquivo brasileiro de endocrinologia e metabolismo. 2007; 51 (2): 195-203.

Cave MC, Hurt RT, Frazier TH, Matheson PJ, Garrison RN, McClain CJ, et al. Obesity, inflammation, and the potential application of pharmaconutrition. *Nutr Clin Pract.* 2008; 23(1):16-34.

Cerf ME, Williams K, Nkomo XI, Muller CJ, Du Toit DF, Louw J e Wolfe-Coote SA. Islet cell response in the neonatal rat after exposure to a high-fat diet during pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R1122–R1128, 2005.

Cerf ME, Chapman CS, Muller CJ e Louw J. Gestational high-fat programming impairs insulin release and reduces Pdx-1 and glucokinase immunoreactivity in neonatal Wistar rats *Metabolism Clinical and Experimental* . 2009 58: 1787–1792.

Chaabo F, Pronczuk A, Maslova E e KC Hayes. Nutritional correlates and dynamics of diabetes in the Nile rat (*Arvicanthis niloticus*): a novel model for diet-induced type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nutrition & Metabolism* 2010, 7:29

Chandramohan G, Bai Y, Norris K, Rodriguez-Iturbe B e Vaziri ND. Effects of dietary salt on intrarenal angiotensin system, NAD(P)H oxidase, COX-2, MCP-1 and PAI-1 expressions and NF-kappaB activity in salt-sensitive and -resistant rat kidneys. *Am. J. Nephrol* 2008; 28:158–167.

Chavez JA e Summers SA. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3–L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Arch Biochem Biophys.* 2003 419(2):101–109.

Chazova I, Almazov VA e Shlyakhto E . Moxonidine improves glycaemic control in mildly hypertensive, overweight patients: A comparison with metformin. *Diab Obes Metab* 2006; 8: 456–465.

Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ma FY, Ozols E, Rollins BJ e Tesch GH. Monocyte chemoattractant protein-1-induced tissue inflammation is critical for the development of renal injury but not type 2 diabetes in obese db/db mice. *Diabetologia*. 2007; 50:471– 480.

Ciampone S. Avaliação da pressão arterial e da e da excreção renal de sódio em animais espontaneamente hipertensos (SHR) submetidos à atividade física programada: Participação dos receptores AT1R e AT2R da angiotensina II em rins. [Dissertação de Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, 2009.

Cindik N, Baskin E, Agras PI, Kinik ST, Turan M e Saatci U. Effect of obesity on inflammatory markers and renal functions. *Acta Paediatr*. 2005; 94:1732–1737.

Cockcroft DW e Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*. 1976;16 (1):31-41.

Collins S. Overview of clinical perspectives and mechanisms of obesity. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005 73: 470–471.

Consolim-Colombo FM e Fiorino P. Sistema nervoso simpático e hipertensão arterial sistêmica – aspectos clínicos. *Revista brasileira de hipertensão*. 2005; 12 (4): 251-255.

Coughlan MT, Thallas-Bonke V, Pete J, Long DM, Gasser A, Tong DC, Arnstein M, Thorpe SR, Cooper ME e Forbes JM. Combination therapy with the advanced glycation end product cross-link breaker, alagebrium, and angiotensin converting enzyme inhibitors in diabetes: synergy or redundancy? *Endocrinology* 2007; 148 (2): 886–895.

Couvreur O, Ferezou J, Gripois D, Serougne C, Crépin D, Aubourg A, Gertler A, Vacher CM e Taouis M. Unexpected long-term protection of adult offspring born to high-fat fed dams against obesity induced by a sucrose-rich diet. *PLoS One*. 2011 Mar 25;6(3):e18043.

Datasus (Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde). Óbitos maternos. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/> [Acesso em 7 março de 2011].

De Pauw A, Tejerina S, Raes M, Keijer J e Arnould T. Mitochondrial (Dys)function in Adipocyte (De)differentiation and Systemic Metabolic Alterations. *The Am. J of Pathology*, Vol. 175, No. 3, September 2009.

DeFronzo RA, Cooke CR, Andres R, Faloona GR e Davis PJ. The effects of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium, and phosphate in man. *J Clin Invest*. 1975; 55: 845-855.

DeFronzo RA e Ferrannini E. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*. 1991 14:173-194.

Deji N, Kume S, Araki S, Soumura M, Sugimoto T, Isshiki K, Chin-Kanasaki M, Sakaguchi M, Koya D, Haneda M, Kashiwagi A e Takashi Uzu. Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 296:118-126, 2009.

Eardley KS, Zehnder D, Quinkler M, Lepenies J, Bates RL, Savage CO, Howie AJ, Adu D e Cockwell P. The relationship between albuminuria, MCP-1/CCL2, and interstitial macrophages in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2006; 69:1189 – 1197.

Ebenezer PJ, Mariappan N, Elks CM, Haque M e Francis J. Diet-induced Renal Changes in Zucker Rats Are Ameliorated by the Superoxide Dismutase Mimetic TEMPOL. *Obesity* 2009; 17: 1994–2002.

Ebenezer PJ, Mariappan N, Elks CM, Haque M, Zohreh Soltani , Efrain Reisin E e Francis J. Effects of pyrrolidine dithiocarbamate on high-fat diet-induced metabolic and renal alterations in rats. *Life Sci* 2009; 85: 357–364.

Estrany ME, Proenza AM, Lladó I, Gianotti M. Isocaloric intake of a high-fat diet modifies adiposity and lipid handling in a sex dependent manner in rats. *Lipids Health Dis.* 2011 Apr 12;10:52.

Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R, Giorico MA, Oleggini M, Graziadei L, Pedrinelli R, Brandi L e Bevilacqua S. Insulin resistance in essential hypertension. *N Engl J Med* 1987; 317:350-357.

Ferranini E, Haffner SM, Mitchell BD e Stern MP. Hyperinsulinemia: The key feature of cardiovascular and metabolic syndrome. *Diabetologia.* 1991 34:416-22.

Ferrante AW. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. *J Intern Med.* 2007;262(4):408-14.

Ford ES, Schulze MB, Pischon T, Bergmann MM, Joost HG e Boeing H. Metabolic syndrome and risk of incident diabetes: findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Potsdam Study. *Cardiovasc Diabetol.* 2008 7:35.

Fowden AL, Giussani DA e Forhead AJ. Endocrine and metabolic programming during intrauterine development. *Early Hum Dev.* 2005 81:723–734.

Fowden AL, Giussani DA e Forhead AJ. Intrauterine Programming of Physiological Systems: Causes and Consequences *Physiology* 21:29-37, 2006.

Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB e Mandarim-de-Lacerda CA. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J Clin Biochem Nutr.* 2010 May; 46(3):212-23.

Franco MCP, Akamine EH, Di Marco GS, Casarini DE, Fortes ZB , Tostes RCA, Carvalho MHC e Nigro D. NADPH oxidase and enhanced superoxide generation in intrauterine undernourished rats: involvement of the renin–angiotensin system. *Cardiovascular Research.* 2003 59: 767–775.

Fuchs FD, Moraes RS, Gus M, Rosito GA, Fuchs SC e Moreira LB. Hipertensão arterial sistêmica: prevalência e mecanismos fisiopatológicos. *Revista do hospital de clínicas de Porto Alegre e faculdade de medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.* 2005; 25 (3): 36-40.

Fujita M, Kuwaki T, Ando K e Fujita T. Sympatho-inhibitory action of endogenous adrenomedullin through inhibition of oxidative stress in the brain. *Hypertension*. 2005 45:1165–1172.

Gaikwad AB, Gupta J e Tikoo K. Epigenetic changes and alteration of Fbn1 and Col3A1 gene expression under hyperglycaemic and hyperinsulinaemic conditions. *Biochem J*. 2010 Dec 1; 432(2):333-41.

Gambling L, Dunford S, Wallace DI, Zuur G, Solanky N, Srai KS e Harry J. McArdle Iron deficiency during pregnancy affects postnatal blood pressure in the rat *J Physiol*. 2003 552.2, pp. 603–610.

Gans RO, vd Toorn L, Bilo HJ, Nauta JJ, Heine RJ e Donker AJ. Renal and cardiovascular effects of exogenous insulin in healthy volunteers. *Clin Sci* 1991; 80: 219-225.

Geloneze B, Rodovalho-Geloneze S, Parisi C, Pícolo M, Repetto EM e Tambascia MA. Standardization of insulin tolerance test (ITT) in Brazilian population. *Diabetes Res Clin Pract*. 2000 50(suppl. 1):S102.

Ghebremeskel K, Bitsanis D, Koukkou E, Lowy C, Poston L e Crawford MA. Maternal diet high in fat reduces docosahexaenoic acid in liver lipids of newborn and sucking rat pups. *Br J Nutr*. 1999 81: 395–404.

Gilbert JS & Nijland MJ. Sex differences in the developmental origins of hypertension and cardiorenal disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008 Dec; 295(6):R1941-52.

Gluckman PD e Hanson MA. The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab.* 2004 15:183-187.

Gluckman P e Hanson M. *The Fetal Matrix: Evolution, Development and Disease.* Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2005.

Godfrey KM, Barker DJ, Robinson S, Osmond C. Maternal birthweight and diet in pregnancy in relation to the infant's thinness at birth. *Br J Obstet Gynaecol.* 1997 Jun;104(6):663-7.

Gomes IO, Silva GJJ e Navarro AC. Efeito hipotensivo do exercício físico aeróbico agudo em idosos hipertensos entre 60 a 80 anos. *Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício.* 2007; 1(5): 76-84.

Gómez-Pérez Y, Gianotti M, Lladó I e Proenza AM. Sex-dependent effects of high-fat-diet feeding on rat pancreas oxidative stress. *Pancreas.* 2011 Jul; 40(5):682-8.

Gontijo JAR e Muscelli EOA. Reduced renal sodium excretion in primary hypertensive patients after an oral glucose load. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29: 1291-1299.

Guyton AC e Hall JE. *Textbook of Medical physiology.* 11th ed. Cap. 78. Insulin, Glucagon, and Diabetes Mellitus. Elsevier Saunders, 2006.

Hales CN e Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull.* 2001 60: 5–20.

Haynes WG, Sivitz WI, Morgan DA, Walsh SA e Mark AL. Sympathetic and cardiorenal actions of leptin. *Hypertension*. 1997 Sep; 30 (3 Pt 2):619-23.

Henkel T, Zabel U, van Zee K, Muller JM, Fanning E e Baeuerle PA. Intramolecular masking of the nuclear location signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF-kappa B subunit. *Cell* 1992 Mar 20;68 (6):1121-33.

Hirabara SM, Curi R e Maechler P. Saturated fatty acid-induced insulin resistance is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells. *J Cell Physiol*. 2010 222(1):187–194.

Höcherl K, Schmidt C, Kurt B e Bucher M. Inhibition of NF-kappaB ameliorates sepsis-induced downregulation of aquaporin-2/V2 receptor expression and acute renal failure in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Jan; 298(1):F196-204.

Howie GJ, Sloboda DM, Kamal T e Vickers MH. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol*. 2009 587.4 pp 905–915.

Huggett RJ, Hogarth AJ, Mackintosh AF e Mary DA. Sympathetic nerve hyperactivity in nondiabetic offspring of patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2006; 49:2741–2744.

Hunley TE, Li-Jun Ma e Kon V. Scope and Mechanisms of Obesity-Related Renal Disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2010 May ; 19(3): 227–234.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares, 2002-2003: Análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2004, 76p.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares, 2008-2009: Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2011, 150p.

Ikeda U, Shimpo M, Ikeda M, Minota S e Shimada K. Lipophilic statins augment inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated cardiac myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001; 38 (suppl 1):S69–S77.

Imig JD. Eicosanoids and renal damage in cardiometabolic syndrome. *Expert Opin. Drug. Metab. Toxicol* 2008;4:165–174.

Irigoyen MC, Krieger EM e Consolim-Colombo FM. Controle fisiológico da pressão arterial pelo sistema nervoso. *Hipertensão.* 2005; 8(1).

Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H e Nawata H. High glucose level and free fatty acid stimulate Reactive Oxygen species production through Protein Kinase C–Dependent activation of NAD(P)H Oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 2000; 49:1939–1945.

Ishigaki N, Yamamoto T, Shimizu Y, Kobayashi K, Yatoh S e Sone H. Involvement of glomerular SREBP-1c in diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 364:502–8.

Isomaa B. A major health hazard: the metabolic syndrome. *Life Sci* 2003; 73 (19):2395-411.

Jiang T, Wang Z, Proctor G, Moskowitz S, Liebman SE e Rogers T. Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway. *J Biol Chem* 2005; 280:32317–25.

Jones HN, Woollett LA, Barbour N, Prasad PD, Powell TL e Jansson T. High-fat diet before and during pregnancy causes marked up-regulation of placental nutrient transport and fetal overgrowth in C57/BL6 mice. *FASEB J*. 2009 Jan; 23(1):271-8.

Khan IY, Dekou V, Douglas G, Jensen R, Hanson MA, Poston L e Taylor PD. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005 288: R127–R133.

Kannappan S e Anuradha CV. Insulin sensitizing actions of fenugreek seed polyphenols, quercetin & metformin in a rat model. *Indian J Med Res*. 2009 129, April, pp 401-408.

Kennedy A, Martinez K, Chuang CC, LaPoint K e McIntosh M. Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *J Nutr*. 2009;139(1):1-4.

Kidambi S, Kotchen JM, Grim CE, Raff H , Mao J, Singh RJ e Kotchen TA. Association of Adrenal Steroids With Hypertension and the Metabolic Syndrome in Blacks. *Hypertension*. 2007; 49:704-711.

Kim YS, Ahn Y, Hong MH, Kim KH, Park HW, Hong YJ, Kim JH, Kim W, Jeong MH, Cho JG, Park JC e Kang JC. Rosuvastatin suppresses the inflammatory responses through inhibition of c-JunN-terminal kinase and Nuclear Factor-kappaB in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007; 49:376–383.

Kim HJ, Moradi H, Yuan J, Norris K e Vaziri ND. Renal mass reduction results in accumulation of lipids and deregulations of lipid regulatory proteins in the remnant kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296: F1297–306.

Knight SF, Quigley JE, Yuan J., Roy SS, Elmarakby A e Imig JD. Endothelial Dysfunction and the Development of Renal Injury in Spontaneously Hypertensive Rats Fed a High-Fat Diet. *Hypertension*. 2008;51:352-359.

Kopp EB & Ghosh S. NF-kappa B and rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol*. v.58, p.1-27. 1995.

Kume S, Uzu T, Araki S, Sugimoto T, Ishiki K, Chin-Kanasaki M, Sakaguchi M, Kubota N, Terauchi Y, Kadowaki T, Haneda M, Kashiwagi A e Koya D. Role of altered renal lipid metabolism in the development of renal injury induced by a high-fat diet. *J Am Soc Nephrol* 2008 18: 2715–2723.

Langley-Evans SC, Clamp AG, Grimble RF e Jackson AA. Influence of dietary fats upon systolic blood pressure in the rat. *Int J Food Sci Nutr*. 1996 Sep;47(5):417-25.

Laterza MC, Rondon MUPB e Negrão CE. Efeito anti-hipertensivo do exercício. *Revista brasileira de hipertensão*. 2007 14(2): 104-111.

Lee JS, Pinnamaneni SK, Eo SJ, Cho IH, Pyo JH, Kim CK, Sinclair AJ, Febbraio MA e Watt MJ. Saturated, but not n-6 polyunsaturated, fatty acids induce insulin resistance: role of intramuscular accumulation of lipid metabolites. *J Appl Physiol*. 2006 100(5):1467–1474.

Levy RB, Claro RM e Monteiro CA. Sugar and total energy content of household food purchases in Brazil. *Public Health Nutr* 2009; 12: 2084–91.

Lingohr MK, Buettner R e Rhodes CJ. Pancreatic beta-cell growth and survival: a role in obesity-linked type 2 diabetes. *Trends Mol Med*. 2002; 8:375– 84.

Liu Y, Wang Z e Yin W. Severe insulin resistance and moderate glomerulosclerosis in a minipig model induced by high-fat/high-sucrose/high-cholesterol diet. *Exp Anim*. 2007 56, 11–20.

Marchesi C, Ebrahimian T, Angulo O, Paradis P e Schiffrin EL. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome. *Hypertension*. 2009 Dec;54(6):1384-92.

Maron DJ, Fair JM e Haskell WL. Saturated fat intake and insulin resistance in men with coronary artery disease. The Stanford Coronary Risk Intervention Project Investigators and Staff. *Circulation*. 1991 84(5):2020–2027.

McConihay JA, Honkomp AM, Granholm NA e Woollett LA. Maternal high density lipoproteins affect fetal mass and extra-embryonic fetal tissue sterol metabolism in the mouse. *J Lipid Res*. 2000; 41:424 –32.

Michelotto JB, Carvalheira JB, Saad MJ e Gontijo JA. Effects of intracerebroventricular insulin microinjection on renal sodium handling in kidney-denervated rats. *Brain Res Bull.* 2002 Mar 15;57(5):613-8.

Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS e Marks JS . Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA* 2003 289: 76–79, 2003.

Mondini L e Monteiro CA. The stage nutrition transition in different Brazilian regions. *Arch . Latinoam Nutr.* v.47, suppl. 1 p.S17-S21, 1997.

Monteiro CA, Mondini L e Costa RBL . Mudanças na composição e adequação nutricional da dieta familiar nas áreas metropolitanas do Brasil (1988-1996). *Rev. Saúde Pública* v.34, p.251-258, 2000.

Montell E, Turini M, Marotta M, Roberts M, Noe V, Ciudad CJ, Mace K e Gomez-Foix AM. DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001 280(2):E229– E237.

Moon JH, Lee Ji Y, Kang SB, Park JS, Lee BW, Kang ES, Ahn CW, Lee HC e Cha BS. Dietary Monounsaturated Fatty Acids but not Saturated Fatty Acids Preserve the Insulin Signaling Pathway via IRS-1/PI3K in Rat Skeletal Muscle. *Lipids* 2010 45:1109–1116.

Mori S, Kawano K, Hirashima T e Natori T. Relationships between diet control and the development of spontaneous type II diabetes and diabetic nephropathy in OLETF rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 1996;33 (3): 145–152.

Muscelli EO, Saad MJ e Gontijo JAR. Insulinemia and blood pressure responses to oral glucose load in primary hypertensive patients. *Cardiology*. 1991 79: 14-19.

Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G e Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of LDL and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997;100:2680 –90.

Napoli C, deNigris F, Welch JS, Calara FB, Stuart RO, Glass CK e Palinski W. Maternal hypercholesterolemia during pregnancy promotes early atherogenesis in LDL receptordeficient mice and alters aortic gene expression determined by microarray. *Circulation* 2002;105:1360 –7.

Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I e Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000; 404: 787–790.

Noeman SA, Hamooda HE e AB Amal. Biochemical Study of Oxidative Stress Markers in the Liver, Kidney and Heart of High Fat Diet Induced Obesity in Rats. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 2011, 3:17

Palanch AC, Alvares EP. Feeding manipulation elicits different proliferative response in the gastrointestinal tract of suckling and weaning rats. *Braz J of Morphol Sci*. v.31, p.565 - 572, 1998.

Parker DR, Weiss ST, Troisi R, Cassano PA, Vokonas PS e Landsberg L. Relationship of dietary saturated fatty acids and body habitus to serum insulin concentrations: the Normative Aging Study. *Am J Clin Nutr.* 1993 58(2):129–136.

Pessuto J e Carvalho EC. Fatores de risco em indivíduos com hipertensão arterial. *Revista Latino-Americana de enfermagem-Ribeirão Preto.* 1998;6(1): 33.

Portal da Saúde- www.Saude.gov.br- acessado em 11 e 12 /07/2011.

Portal da Saúde- www.Saude.gov.br- Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel).

Power C, Li L, Manor O e Davey Smith G. Combination of low birth weight and high adult body mass index: at what age is it established and what are its determinants? *J. Epidemiol.* 2003 *Community Health* 57, 969–973.

Prager GW. Urokinase (uPA) mediates endothelial cell survival via induction of the X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *Blood:* (2008).

Prior LJ & Armitage JA. Neonatal overfeeding leads to developmental programming of adult obesity: you are what you ate. *J Physiol* 2009 587.11 p 2419.

Rahmouni K, Morgan DA, Morgan GM, Mark AL e Haynes WG. Role of selective leptin resistance in diet-induced obesity hypertension. *Diabetes* 2005; 54:2012–2018.

Reaven GM. Banting lecture 1988: Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37:1595-607.

Reaven GM. Role of abnormalities of carbohydrate and lipoprotein metabolism in the pathogenesis and clinical course of hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1990 15 (Suppl 5): S4-S7.

Reaven GM, Twersky J e Chang H. Abnormalities of carbohydrate and lipid metabolism in Dahl rats. *Hypertension* 1991; 18:630–635.

Reaven GM. The metabolic syndrome or the insulin resistance syndrome? Different names, different concepts, and different goals. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2004, 33:283-303.

Riccardi G, Giacco R e Rivellese AA. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr.* 2004; 23:447–456.

Ritz E e Stefanski A. Diabetic nephropathy in type II diabetes. *Am J Kidney Dis* 1996; 27(2):167-94.

Rocchini AP, Katch V, Kveselis D, Moorehead C, Martin M, Lampman R e Gregory M. Insulin and renal sodium retention in obese adolescents. *Hypertension* 1989; 14: 367-374.

Ruben SM, Dillon PJ, Schreck R, Henkel T, Chen CH, Maher M, Baeuerle PA e Rosen CA. Isolation of a rel-related human cDNA that potentially encodes the 65-kD subunit of NF-kappa B. *Science.* 1991 Oct 4;254(5028):11.

Sarafidis PA e Ruilope LM. Insulin resistance, hyperinsulinemia, and renal injury: mechanisms and implications. *Am J Nephrol.* 2006; 26:232–244.

Shah A, Mehta N e Reilly MP. Adipose inflammation, insulin resistance, and cardiovascular disease. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2008;32 (6):638-44.

Silva-Junior JB. As doenças transmissíveis no Brasil: tendências e novos desafios para o Sistema Único de Saúde. In: Ministério da Saúde, ed. *Saúde Brasil 2008: 20 anos de Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil.* Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

Smith AD, Brands MW, Wang MH e Dorrance AM. Obesity-induced hypertension develops in young rats independently of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Exp Biol Med (Maywood).* 2006 Mar;231(3):282-7.

Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, Orenstein JM e Smith PD. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest.* 2005 v.115, n.1, Jan, p.66-75.

Srinivasan M, Katewa SD, Palaniyappan A, Pandya JD e Patel MS. Maternal high-fat diet consumption results in fetal malprogramming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 291: E792–E799.

Sulik KK e Johnston MC. Embryonic origin of holoprosencephaly: interrelationship of the developing brain and face. *Scan Electron Microsc.* 1982; (Pt 1):309-22.

Sun L, Halaihel N, Zhang W, Rogers T e Levi M. Role of sterol regulatory element-binding protein 1 in regulation of renal lipid metabolism and glomerulosclerosis in diabetes mellitus. *J Biol Chem.* 2002; 277: 18919– 18927.

Swanson JM, Entringer S, Buss C e Wadhwa PD. Developmental origins of health and disease: environmental exposures. *Semin Reprod Med.* 2009 Sep;27(5):391-402 . Review.

Taylor PD & Poston L. Developmental programming of obesity in mammals. *Exp Physiol.* 2007 Mar; 92(2):287-98. Review

The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. The National heart, lung, and blood institute. 2004, p. 1-63.

Trigo M, Rocha EC e Coelho R. *Rev Portuguesa de psicossomática.* 2000; 2(2): 150.

VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Hipertensão e Sociedade Brasileira de Nefrologia / (2010). *Arq Bras Cardiol* 95 (supl.1): 1-51.

Vincent HK e Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30:400–418.

Wadhwa PD, Buss C, Entringer S e Swanson JM. Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. *Semin Reprod Med.* 2009 Sep; 27(5):358-68. Epub 2009 Aug 26. Review

Wang T e Giebisch G. Effects of angiotensin II on electrolyte transport in the early and late distal tubule in rat kidney. *Am J of Physiol Society.* 1996; 271: F143–F149.

Welham SJ, Riley PR, Wade A, Hubank M E Woolf AS. Maternal diet programs embryonic kidney gene expression. *Physiol Genomics.* 2005 Jun 16;22(1):48-56.

Whiting PH. The use of lithium clearance measurements as an estimate of glomerulo-tubular function. *Ren Fail.* 1999 May-Jul;21(3-4):421-6.

Woollett LA. Maternal cholesterol in fetal development: transport of cholesterol from the maternal to the fetal circulation. *Am J Clin Nutr.* 2005 Dec; 82(6):1155-61.

Yogi A, Callera GE, Antunes TT, Tostes RC e Touyz RM. Vascular biology of magnesium and its transporters in hypertension. *Magnes Res.* 2010 Dec;23(4):S207-15.

Zhang J, Zhang J, Liu J, Li L, Xia W. Dietary chitosan improves hypercholesterolemia in rats fed high fat diets. *Nutr Res.* v.28, p.383-390, 2008.

Zheng Y, Yamada H, Sakamoto K, Horita S, Kunimi M, Endo Y, Li Y, Tobe K, Terauchi Y, Kadowaki T, Seki G e Fujita T. Roles of insulin receptor substrates in insulin-induced stimulation of renal proximal bicarbonate absorption. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:2288–2295.



9. APÊNDICE

EFFECT OF long-term high-fat diet intake ON PERIPHERAL insulin sensibility, blood pressure and renal function in female rats

(submetido)

Running title: *High-fat diet repercussion in rats*

Roza, N.A.¹, Possignolo L.F.¹, Palanch, A.C.¹, Gontijo, J.A.R.¹

¹Laboratório de Metabolismo Hidrossalino, Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP (2009/13296-0; 2010/52696-0) and CAPES.

Abstract

There is a need for a more thorough understanding of the mechanisms underlying the metabolic disorders seen in high fat-diet (HFD) rats, as well these endocrine dysfunction often result in changes of the renal function and hypertension development. The purpose of the present study was to determine whether long-term HFD ingestion alters insulin sensitivity, kidney function and arterial blood pressure up to 11 week-old followed female rats. The striking findings of the present study shows glucose tolerance impairment demonstrate by increased fasting blood glucose (ND: 78 ± 2.8 mg/dL vs. HFD: 87 ± 3.8 mg/dL), increased blood glucose level (ND: 136.4 ± 5.8 mg/dL vs. HFD: 166.3 ± 10.6 mg/dL) and the area under the glucose curve (ND: 14558.0 ± 536.0 vs. HFD: 16507.8 ± 661.9) associated by reduced insulin secretion (ND: 0.58 ± 0.07 vs. HFD: 0.40 ± 0.03 ng/mL) during a glucose tolerance test at 8 weeks in HFD-treated rats. Thus, the current study demonstrates that Wistar rats fed on an HFD for 8 weeks exhibited some of the hallmark features of diet-induced metabolic syndrome model, such as characterized by mild hyperglycemia, reduced insulin secretion and moderately increased systolic blood pressure (ND: 131.8 ± 6.16 mmHg vs. HFD: 165.0 ± 5.8 mmHg) when compared with same parameters studied in standard rodent's fed-diet animals. In conclusion, fat loading stimulated harmful effects, such as BP rise and presumable pancreas damage, possibly through glucose tolerance impairment in female Wistar rats, suggesting that trivial disturbances of lifestyle may cause severe hypertension and/or later renal dysfunction. Further studies need to be carried out to better understand the alteration of cardiovascular and metabolic pathways involved in the pathogenesis of cardio-renal syndrome.

Keywords: High fat diet, blood pressure, renal function, glucose tolerance, insulin sensitivity.

Introduction

The high incidence of cardiovascular disease, obesity and hypertension are strongly associated with increased ingestion of caloric foods as characterize the Western dietary pattern. In last decades, changes in Brazilian people's diet revealed high consumption of simple sugars, saturated and *trans*-fats and reduction in ingestion of vegetables, fruits and

fibers [1,2]. In the United States, approximately 75 million people are hypertensive, which corresponds to 33.6% of population [3].

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in world, that could be avoided with a healthy and balanced diet [4]. Obesity increases 4-fold the risk of kidney disease and hypertension account on 25% of all chronic renal failure patients. Also, the risk of developing chronic renal disease is enhanced when obesity is combined with high blood pressure [5].

The high in saturated fat and/or cholesterol diet, which resembles the typical Western diet, is also known to exacerbate oxidative stress and inflammation and contributing to metabolic syndrome and nephropathy emergence as the most common cause of end-stage renal disease in diabetic patients [6, 7, 8]. Metabolic syndrome is characterized by obesity, dyslipidemia, hyperinsulinemia, hyperglycemia, and hypertension. That syndrome has increased its frequency mainly by the increased prevalence of obesity. Recently, the reports suggested that metabolic syndrome is related to increase of risk for developing chronic kidney diseases [5, 9, 10, 11, 12] and by renal lipid accumulation associated to lipotoxicity [13,14]. High-fat diet (HFD) induces changes of renal lipid metabolism by an imbalance between lipogenesis and lipolysis in the kidney, as well as systemic metabolic abnormalities and subsequent renal lipid accumulation and renal injury [10, 15].

The glomerular and tubulointerstitial lesions [16, 17] associated with chronic glomerulopathy [13,18], nephrotic syndrome [19], chronic renal failure [12], diabetic nephropathy [20], obesity-associated renal disease [10], and aging nephrosclerosis [21, 22] are related to renal tissue lipids accumulation. In rats, the HFD causes renal injury that was preceded by endothelial dysfunction and hypertension, both induced by increasing oxidative stress, powerful inflammatory response and disruption of the renal filtration barrier [11, 22].

The mechanisms related with renal lipid accumulation and dysfunction in HFD rats has not been fully determined. Taking into account the above findings, the purpose of the present study was to determine whether long-term HFD ingestion alters insulin sensitivity, kidney function and arterial blood pressure up to 11 week-old followed female rats. Since the long-term changes in renal sodium tubule handling are associated with hypertensive development, we also hypothesized that HFD intake may cause a decrease in urinary

sodium excretion in the experimental group. To test this hypothesis, we studied the tubular sodium handling, evaluated by lithium clearance, in conscious high-fat diet rats, compared with their appropriate standard diet controls.

Materials and Methods

Animals

The experiments were conducted on age-matched, female offspring of sibling-mated Wistar Hannover rats allowed free access to water and normal rat chow. The general guidelines established by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and approved by Institutional Ethics Committee (CEEa/UNICAMP 1697-1) were followed throughout the investigation. Our local colonies originated from a breeding stock supplied by CEMIB/Unicamp, Campinas, SP, Brazil. Immediately after weaning, at 3 weeks of age (60.7 ± 1.3 g body weight), 36 female Wistar rats were housed in individual cages and maintained under controlled temperature (22°C) and lighting conditions (07:00h-19:00h), with free access to tap water and were randomly distributed into two dietary groups: control group fed with pelleted standard rodent laboratory chow (normal diet, ND) (Nuvital, Curitiba, PR, Brazil) or high fat fed group (HFD, see table 1) for eight weeks up to 11 weeks of age. The standard chow diet contains 11.9% kcal as fat and a total of 2.9 kcal/g and the high fat diet contains 58.3% kcal as fat and a total of 5.44 kcal/g. All females were weighed weekly and had food and water intakes measured daily throughout experiment.

Blood pressure measurement

The systolic blood pressure (SBP) was measured in conscious rats at 5 and 8 weeks of treatment (ND or HFD), employing an indirect tail-cuff method using an electrospygmanometer combined with a pneumatic pulse transducer/amplifier (IITC Life Science – BpMonWin Monitor Version 1.33). This indirect approach allowed repeated measurements with a close correlation (correlation coefficient = 0.975), compared to direct intra-arterial recording [23, 24]. The mean of three consecutive readings represented the blood pressure.

Renal function test

The renal function tests were performed at 8 weeks of treatment with ND or HFD in conscious, unrestrained rats. Fourteen hours before the renal test, 60 $\mu\text{mol LiCl} / 100\text{g}^{-1}$ body weight was given by gavage. The rats were subsequently housed individually in metabolic cages with free access to tap water but no food. After an overnight fast, each animal received a load of tap water by gavage (5% of the body weight), followed by a second water load of the same volume 1-hour later [23, 24, 25]. At the end of the all renal function test experiments, blood samples were drawn by cardiac puncture in anesthetized rats, and urine and plasma samples were collected for analysis.

Glucose Test Tolerance (GTT)

Glucose tolerance tests were performed at 8-wk of treatment after 12 hours fasting in order to determine changes in insulin sensitivity. Eleven rats from independent litters were tested. To establish basal values of glucose and insulin, blood samples were taken by lancing the tail vein before glucose challenge (time 0). They then received a single bolus of 1 g/kg glucose i.p. Blood samples were taken at 0, 15, 30, 60, 90 and 120 minutes from the tail vein. Glucose from whole blood was measured with a glucometer MediSense/ Optium, Abbott. Serum was separated (50 μl) and kept at -20°C for measurement of insulin levels by radioimmunoassay. The incremental area under the glucose tolerance curve (iAUC) was calculated as the integrated area under the curve above the basal value (time 0) over the 120-minute sampling period using Prism 4 for Windows.

Biochemical analysis

Plasma and urine sodium, potassium and lithium concentration were obtained at 8 weeks of treatment and measured by flame photometry (Micronal, B262, São Paulo, Brazil), while creatinine concentrations were determined spectrophotometrically (Instruments Laboratory, Genesys V, USA). The parameters Glucose, Urea, Creatinine, Albumin, Globulin, Total protein, Sodium, Potassium, Chloride, Magnesium, Calcium, Phosphorus, HDL, LDL cholesterol, Triglycerides levels, were also collected at 8th week post-treatment (ND and HFD) and measured by using enzyme immunoassay kits on Biochemistry Analyzer Modular Analytic P (Roche®). Insulin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Insulin (ELISA) Plasma insulin was determined with an enzyme-

linked immunosorbent assay (ELISA) kit for rat/mouse insulin (Linco Research, Millipore, Billerica, MA, EZRMI- 13K), according to the manufacturers' protocols.

Data presentation and statistical analysis

All numerical results are expressed as the mean \pm S.E.M of the indicated number of experiments. Creatinine clearance was used to estimate glomerular filtration rate (GFR) and lithium clearance (C_{Li}) was used to assess proximal tubule output [23, 26, 27]. Fractional sodium excretion (FE_{Na}) was calculated as $C_{Na}/C_{Cr} \times 100$, where C_{Na} is sodium clearance and C_{Cr} is creatinine clearance. The fractional proximal (FEP_{Na}) and post-proximal ($FEPP_{Na}$) sodium excretion were calculated as $C_{Li}/C_{Cr} \times 100$ and $C_{Na}/C_{Li} \times 100$, respectively. Data obtained over time were analyzed using appropriate ANOVA. *Post hoc* comparisons between selected means were performed with Bonferroni's contrast test when initial ANOVA indicated statistical differences between experimental groups. Comparisons involving only two means within or between groups were carried out using a Student's t test. The level of significance was set at $P \leq 0.05$.

Results

Experimental Model Data

The table 2 shows the serum parameters analysis of female animals from the ND and HFD groups. There were no significant differences between serum sodium, potassium and lithium plasma levels in ND rats, compared with the HFD group, except to magnesium plasma levels that were significantly lower in HFD compared to ND rats ($P=0.0086$). On the other side, the table 3 shows the parameters from urine biochemical analysis in the same groups. Urine potassium, calcium, phosphorus, uric acid, amylase and creatinine levels were not different between ND and HFD groups. However, the urine levels of sodium ($4,7 \pm 0,4$ mEq/L vs. $6,2 \pm 0,4$ mEq/L) and chloride ($7,1 \pm 0,3$ mmol/L vs. $9,0 \pm 0,4$ mmol/L) urine levels were increased in HFD group while the magnesium ($1,9 \pm 0,1$ mEq/L vs. $1,3 \pm 0,1$ mEq/L) and urea ($276,7 \pm 21,7$ mg/dL vs. $211,8 \pm 11,4$ mg/dL) levels were significantly decreased when compared both groups.

As shown in Figure 1, the initial body weight was not different between all groups. However, HFD grew less rapidly over the experimental period, and significant differences were observed after the age of 11weeks, when compared with ND group. Data on calorie

energy, food and water intake are presented also in Fig. 2. The food and water intakes were, respectively, expressed in gram and mL per 100 grams of body weight (Fig. 2A). In general, food intake and therefore sodium intakes reduced significantly in HFD female rats between 3th and 6th week of treatment ($P < 0.04$) during follow-up, when normalized by body weight, however, the energy consumption was increased in HFD when compared with ND animals. The water ingestion was lower in HFD compared to ND throughout the 8-wk of follow-up (Fig. 2C). The Figure 3 shows that systolic blood pressure (in mmHg) measured in HFD was significantly higher than in ND from 5 to 8 weeks post-treatment. During the study, HFD pressure increased from 155.25 ± 10.54 mmHg to 165 ± 5.8 mmHg ($P = 0.0002$), as compared with a slower rise from 137 ± 4.24 mmHg to 131.75 ± 5.8 mmHg in ND (Fig 3). The present study shows that HFD excreted less potassium than ND at 11-wk during renal test study. Of particular interest is the observation that the reduced excretion of this ion by HFD occurred while potassium ingestion did not appreciably differ between 6th and 8th week in control and experimental groups. This is further highlighted by the significant differences in fractional potassium excretion at the same time period (Fig 4).

Renal Function Test

The data for renal function in the 11-wk-old control (ND) and experimental (HFD) groups are summarized in Figure 4. The urinary flow rate (data not included) was significantly smaller in HFD when compared to ND group during the renal tubule sodium handling study. Also, the glomerular filtration rate, estimated by C_{Cr} , was unchanged in HFD, when compared to ND group. In HFD, the long-term high-fat intake did not significantly modify FE_{Na} , FEP_{Na} and $FEPP_{Na}$ although a consistent decrease of these parameters was observed when compared to ND. The significant decrease in kaliuresis effect, observed in HFD ($0.10 \pm 0.01\%$), was unaltered in control group of rats ($0.15 \pm 0.02\%$).

Glucose Tolerance Test

The Glucose Tolerance Test was performed to verify the effect of high fed-diet on glucose tolerance comparing with normal-diet group. The study shows at 8th week, that HFD group showed higher basal glycemia after overnight fasting when compared to ND group. Otherwise, after glucose intraperitoneal loading, HFD group reached significantly

higher plasma glucose concentrations than ND group at 30, 60, 90 and 120 minutes (Fig. 5A). Thus, the incremental area under the curve (iAUC) in HFD was significantly higher ($P<0.0001$) compared to ND group (Fig. 5B). The measures of plasma insulin levels in the same period, expressed in ng/mL (Fig. 5C) were significantly decreased in HFD animals ($P<0.03$).

Discussion

There is a need for a more thorough understanding of the mechanisms underlying the metabolic disorders seen in HFD rats, as well these endocrine dysfunction often result in changes of the renal function and hypertension development. In this study, we assessed glucose tolerance and its two key determinants, insulin secretion and sensitivity, in female control and experimental rats. The striking findings of the present study shows glucose tolerance impairment demonstrated by increased fasting blood glucose level, increased blood glucose level also expressed by incremental area under the glucose curve accompanied by reduced insulin secretion during a glucose tolerance test at 8 weeks in HFD-treated rats. The study also shows that the insulin secretion during the first 30 min after glucose was near to halved in HFD rats. Thus, the current study demonstrates that female Wistar rats fed on an HFD for 8 weeks exhibited some of the hallmark features of diet-induced metabolic syndrome model, such as characterized by mild hyperglycemia, reduced insulin secretion and moderately increased systolic blood pressure (SBP) when compared with same parameters studied in standard rodent's fed-diet animals. Unexpectedly, during the follow-up period of time, HFD female animals have decreased body weight, food and water intake but, enhanced calorie ingestion when compared to control group. Also, HFD group did not alter adiposity and fasting plasma triglyceride or cholesterol concentrations in adult female rats. In this study the smallest body weight and intake of food could be related to known decreased muscle mass, satiety as well a slow gastric emptying induced by long-term high-fat saturate diet ingestion.

We may also suppose that either obesity may emerge later or it may not progress through the Wistar lineage in rodents, as reported for those with undernourished [28] and HFD-fed [29] animals.

The present experimental model of the female HFD-fed rats promotes glucose intolerance as suggested by hyperglycemia associated with normal insulinemia levels.

Supporting the present findings, study of Ng et al [30] has examined pancreatic islets and β -cell abundance, and performed genome-wide microarray analysis of isolated islets to explore the mechanisms of impaired insulin secretion. In that study, the HFD animals showed a reduced relative islet area, mainly owing to reduced large islets and tended to reduce β -cell area, implying impaired β -cell replication. Take in account the present and previous study, we may propose that limited β -cell reserve in the female HFD rats is sufficient to maintain fasting glucose and insulin levels close to normal, but is inadequate to preserve glucose stimulated insulin secretion and glucose tolerance. In the present study, taking in account the enhanced fasting plasma glucose level we may assume that the higher levels of glucose in the inter-feedings periods would not alter the sodium glomerular filtered load, confirming previous studies of Gontijo & Muscelli, Gans et al and Rocchini et al [31,32,33], and suggesting that a supposed antinatriuretic effect may be mediated by direct tubular mechanisms. Changes in the renal nerve activity, renin-angiotensin system and natriuretic peptide release after a glucose load were not tested in the present experiments. The contribution of the glucose filtered load to tubule sodium reabsorption via a sodium/glucose cotransport should be considered. We may hypothesize that inter-feeding hyperglycemia with increased glucose glomerular filtered load and sodium-glucose reabsorption may contribute to decreased renal sodium excretion and by association to enhanced arterial blood pressure as observed in this study. We and others [31, 34, 35, 36] have previously shown that oral glucose load and insulin stimulated the sodium potassium adenosine triphosphatase pump and the sodium-hydrogen antiporter, two major renal tubular transports for sodium absorption. Reports indicated that sodium retention, facilitated by hyperinsulinemia could be an important factor in pathogenesis of hypertension in insulin resistance [31,37]. Thus, our data suggest that HFD diet may accentuates potentially existing insulin resistance [38], which strengthens a salt-induced rise in BP. In addition, hyperglycemia and/or hyperinsulinemia is believed to cause sympatho-excitation [39], which may also contribute to increased BP in HFD fed rats. Actually, increased calorie intake restriction enhances blood pressure in obese hypertensive animals by the improvement of autonomic nerve activation [40]. Reversely, sympathetic stimulation may enhance insulin resistance [41]. Thus, we may suppose that sympathetic overactivity and glucose intolerance may stimulate each other, both of which may importantly contribute to a rise in blood pressure.

Moreover, additional factors, such as leptin [42] and oxidative stress [43,44], may contribute to sympathetic drive and hypertension in high fat diet intake animals. Our results may not rule out the participation of increasing oxidative stress and inflammation associated to metabolic and renal alterations in HFD-induced rats. Increased circulating glucose levels are known to increase oxidative stress by inducing excess production of mitochondrial ROS; these mitochondrial ROS can in turn activate other ROS pathways [45]. Further, the tissue renin–angiotensin system may be upregulated in HFD-rats; thus, increased renal angiotensin may induce ROS production by NAD(P)H oxidases [46]. It is also likely that the overproduction of free radicals triggered excess free fatty acids in the animals of current study to lead to enhanced production of lipid hydroperoxides [47].

It is well-known that proinflammatory cytokines increase superoxide production, which in turn increases activation of NF κ B, thereby leading to another cycle of increased proinflammatory cytokines and oxidative stress, thus amplifying the signal and resulting in end organ damage [48]. Although the molecular mechanisms whereby NF κ B increases oxidative stress and take worse metabolic abnormalities were not investigated in the present study, our results suggest that alterations in proinflammatory cytokine expression and in metabolic parameters may affect renal function in high fat diet rats. Although the association between proinflammatory endogenous products, dyslipidemia and metabolic syndrome is well established [49,50,51,52] surprisingly, our data did not show any change in serum lipids. In this way, confirmatory experiments are needed before this conclusion can be wholly made.

Although, the link between glucose intolerance and hypertension described in the present model does not prove the presence of causal relationships, experimental findings have shown possible mechanisms which may account for a putative relationship.

In conclusion, fat loading stimulate harmful effects, such as BP rise and presumable pancreas damage. The increased blood pressure may occur through insulin resistance and sympathetic overactivity in female HFD Wistar rats, suggesting that trivial disturbances of lifestyle (high fat diet) may cause severe hypertension and/or later renal dysfunction. Further studies need to be carried out to better understand the alteration of cardiovascular and metabolic pathways involved in the pathogenesis of cardio–renal syndrome.

References

1. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares, 2008-2009: Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE 201; 150p.
2. Monteiro CA, Mondini L, Costa RBL: Mudanças na composição e adequação nutricional da dieta familiar nas áreas metropolitanas do Brasil (1988-1996). Rev Saúde Pública 2000; v.34: 251-258.
3. American Heart Association. Heart Disease and Stroke statistics – Dallas, Texas: American Heart Association; 2008. p 43.
4. Zhang J, Zhang J, Liu J, Li L, Xia W: Dietary chitosan improves hypercholesterolemia in rats fed high fat diets. Nutr Res 2008; 28: 383-390.
5. Kramer H, Luke A, Bidani A, Cao G, Cooper R, McGee D: Obesity and prevalent and incident CKD: the Hypertension Detection and Follow-Up Program. Am J Kidney Dis 2005; 46: 587–594.
6. Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA: Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. Clin Nutr 2004; 23:447–456.
7. Schena FP, Gesualdo L: Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol 2005; 16 (Suppl 1): S30–S33.
8. Friedman EA, Friedman AL: Is there really good news about pandemic diabetic nephropathy? Nephrol Dial Transplant 2007;22:681–683. 5.
9. Chen J, Muntner P, Hamm LL, Jones DW, Batuman V, Fonseca V, Whelton PK, He J: The metabolic syndrome and chronic kidney disease in US adults. Ann Intern Med 2004; 140: 167–174.
10. Jiang T, Wang Z, Proctor G, Moskowitz S, Liebman SE, Rogers T: Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway. J Biol Chem 2005; 280:32317–25.

11. Knight SF, Quigley JE, Yuan J, Roy SS, Elmarakby A, Imig JD: Endothelial dysfunction and the development of renal injury in Spontaneously Hypertensive rats fed a high-fat diet. *Hypertension* 2008; 51:352-359.
12. Kim HJ, Moradi H, Yuan J, Norris K, Vaziri ND: Renal mass reduction results in accumulation of lipids and deregulations of lipid regulatory proteins in the remnant kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296: F1297–306.
13. Sun L, Halaihel N, Zhang W, Rogers T, Levi M: Role of sterol regulatory element-binding protein 1 in regulation of renal lipid metabolism and glomerulosclerosis in diabetes mellitus. *J Biol Chem* 2002; 277: 18919– 18927.
14. Spencer MW, Muhlfeld AS, Segerer S, Hudkins KL, Kirk E, LeBoeuf RC, Alpers CE: Hyperglycemia and hyperlipidemia act synergistically to induce renal disease in LDL receptor-deficient BALB mice. *Am J Nephrol* 2004; 24: 20–31.
15. Kume S, Uzu T, Shin-ichi A, Toshiro S, Keiji I, Masami CK, Masayoshi S, Naoto K, Yasuo T, Takashi K, Masakazu H, Atsunori K, Daisuke K: Role of altered renal lipid metabolism in the development of renal injury induced by a high-fat diet. *J Am Soc Nephrol* 2008; 18: 2715–2723.
16. Abrass CK: Cellular lipid metabolism and the role of lipids in progressive renal disease. *Am J Nephrol* 2004; 24:46–53.
17. Moorhead JF, Chan MK, El-Nahas M, Varghese Z: Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulo-interstitial disease. *Lancet* 1982; 2: 1309–11.
18. Johnson ACM, Yabu JM, Hanson S, Shah VO, Zager RA: Experimental glomerulopathy alters renal cortical cholesterol, SR-B1, ABCA1, and HMG CoA reductase expression. *Am J Pathol* 2003; 163:313–20.
19. Kim HJ, Vaziri ND: Sterol regulatory element-binding proteins, liver X receptor, ABCA1 transporter, CD36, scavenger receptors A1 and B1 in nephrotic kidney. *Am J Nephrol* 2009; 29:607–14.
20. Ishigaki N, Yamamoto T, Shimizu Y, Kobayashi K, Yatoh S, Sone H: Involvement of glomerular SREBP-1c in diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 364:502–8.

21. Jiang T, Liebman SE, Lucia S, Li J, Levi M: Role of altered lipid metabolism and the sterol regulatory element binding proteins in the pathogenesis of age-related renal disease. *Kidney Int* 2005; 68:2608–20.
22. Ebenezer PJ, Mariappan N, Elks CM, Haque M, Francis J: Diet-induced Renal Changes in Zucker Rats Are Ameliorated by the Superoxide Dismutase Mimetic TEMPOL. *Obesity* 2009; 17: 1994–2002.
23. Michelotto JB, Carvalheira JB, Saad MJ, Gontijo JAR: Effects of intracerebroventricular insulin microinjection on renal sodium handling in kidney denervated rats. *Brain Res Bull* 2002; 57(5):613-8.
24. Menegon LF, Zapparoli A, Boer PA, Almeida AR, Gontijo JAR: Long-term effects of intracerebroventricular insulin microinjection on renal sodium handling and arterial blood pressure in rats. *Brain Research Bulletin* 2008; 76: 344–348.
25. Furlan FC, Marshall PS, Macedo RF, Carvalheira JB, Michelotto JB, Gontijo JAR: Acute intracerebroventricular insulin microinjection after nitric oxide synthase inhibition of renal sodium handling in rats. *Life Sci* 2003; 72: 2561–2569.
26. Boer PA, Morelli JM, Figueiredo JF, Gontijo JA: Early altered renal sodium handling determined by lithium clearance in spontaneously hypertensive rats (SHR): role of renal nerves. *Life Sci* 2005; 76 (16):1805-15.
27. Guadagnini D, Gontijo JA: Altered renal sodium handling in spontaneously hypertensive rats (SHR) after hypertonic saline intracerebroventricular injection: role of renal nerves. *Life Sci* 2006; 79(17):1666-73.
28. Jimenez-Chillaron JC, Isganaitis E, Charalambous M, Gesta S, Pentinat-Pelegrin T, Faucette RR, Otis JP, Chow A, Diaz R, Ferguson-Smith A, Patti ME: Intergenerational transmission of glucose intolerance and obesity by in utero undernutrition in mice. *Diabetes* 2009; 58: 460–468.
29. Dunn GA, Bale TL: Maternal high-fat diet promotes body length increases and insulin insensitivity in second-generation mice. *Endocrinology* 2009; 150: 4999–5009.

30. Ng SF, Lin RC, Laybutt DR, Barres R, Owens JA, Morris MJ: Chronic high-fat diet in fathers programs β -cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* 2010; 467:963-967.
31. Gontijo JAR, Muscelli EOA: Reduced renal sodium excretion in primary hypertensive patients after an oral glucose load. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29: 1291-1299.
32. Gans RO, vd Toorn L, Bilo HJ, Nauta JJ, Heine RJ, Donker AJ: Renal and cardiovascular effects of exogenous insulin in healthy volunteers. *Clin Sci* 1991; 80:219-225.
33. Rocchini AP, Katch V, Kveselis D, Moorehead C, Martin M, Lampman R, Gregory M: Insulin and renal sodium retention in obese adolescents. *Hypertension* 1989; 14: 367-374.
34. Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R, Giorico MA, Oleggini M, Graziadei L, Pedrinelli R, Brandi L, Bevilacqua S: Insulin resistance in essential hypertension. *N Engl J Med* 1987; 317:350-357.
35. DeFronzo RA, Cooke CR, Andres R, Faloona GR, Davis PJ: The effects of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium, and phosphate in man. *J Clin Invest* 1975; 55: 845-855.
36. Muscelli EO, Saad MJA, Gontijo JAR: Insulinemia and blood pressure responses to oral glucose load in primary hypertensive patients. *Cardiology* 1991; 79(1):14-9.
37. Zheng Y, Yamada H, Sakamoto K, Horita S, Kunimi M, Endo Y, Li Y, Tobe K, Terauchi Y, Kadowaki T, Seki G, Fujita T: Roles of insulin receptor substrates in insulin-induced stimulation of renal proximal bicarbonate absorption. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:2288–2295.
38. Reaven GM, Twersky J, Chang H: Abnormalities of carbohydrate and lipid metabolism in Dahl rats. *Hypertension* 1991; 18:630–635.
39. Huggett RJ, Hogarth AJ, Mackintosh AF, Mary DA: Sympathetic nerve hyperactivity in nondiabetic offspring of patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2006; 49:2741–2744.

40. Ikeda U, Shimpo M, Ikeda M, Minota S, Shimada K: Lipophilic statins augment inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated cardiac myocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38 (suppl 1):S69–S77.
41. Chazova I, Almazov VA, Shlyakhto E: Moxonidine improves glycaemic control in mildly hypertensive, overweight patients: A comparison with metformin. *Diab Obes Metab* 2006; 8: 456–465.
42. Rahmouni K, Morgan DA, Morgan GM, Mark AL, Haynes WG: Role of selective leptin resistance in diet-induced obesity hypertension. *Diabetes* 2005; 54:2012–2018
43. Vincent HK, Taylor AG: Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30:400–418.
44. Fujita M, Kuwaki T, Ando K, Fujita T: Sympatho-inhibitory action of endogenous adrenomedullin through inhibition of oxidative stress in the brain. *Hypertension* 2005; 45:1165–1172.
45. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M: Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000; 404: 787–790.
46. Coughlan MT, Thallas-Bonke V, Pete J, Long DM, Gasser A, Tong DC, Arnstein M, Thorpe SR, Cooper ME, Forbes JM: Combination therapy with the advanced glycation end product cross-link breaker, alagebrium, and angiotensin converting enzyme inhibitors in diabetes: synergy or redundancy? *Endocrinology* 2007; 148 (2): 886–895.
47. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H: High glucose level and free fatty acid stimulate Reactive Oxygen species production through Protein Kinase C–Dependent activation of NAD(P)H Oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 2000; 49:1939–1945.

48. Ebenezer PJ, Mariappan N, Elks CM, Haque M, Zohreh Soltani , Efrain Reisin E, Francis J: Effects of pyrrolidine dithiocarbamate on high-fat diet-induced metabolic and renal alterations in rats. *Life Sci* 2009; 85: 357–364.
49. Mori S, Kawano K, Hirashima T, Natori T: Relationships between diet control and the development of spontaneous type II diabetes and diabetic nephropathy in OLETF rats. *Diabetes Res Clin Pract* 1996; 33 (3): 145–152.
50. Ritz E, Stefanski A: Diabetic nephropathy in type II diabetes. *Am J Kidney Dis* 1996; 27(2):167-94.
51. Isomaa B: A major health hazard: the metabolic syndrome. *Life Sci* 2003; 73 (19):2395-411.
52. Kidambi S, Kotchen JM, Grim CE, Raff H , Mao J, Singh RJ, Kotchen TA: Association of Adrenal Steroids With Hypertension and the Metabolic Syndrome in Blacks. *Hypertension* 2007; 49:704-711.

Table 1. Composition of Control (Nuvilab) and Experimental (AIN 93G modified to High-fat diet).

INGREDIENTS	Standard	HF Diet 60%
	g / Kg	g / Kg
AMIDO	397,5	52
CORN STARCH DEXTRINIZADE	132	143
SUCROSE	100	66
CARBOHYDRATE	629,5	261
CASEIN	200	271
L-CYSTINE	3	3
CHOLIN BITARTRATE	2,5	2,5
PROTEIN	205,5	276,5
SOYBEAN OIL	70	34
LARD (saturated fat)	---	333
TOTAL FATS	70	367
CELLULOSE MICROFINE (FIBER)	50	50
FIBER	50	50
MINERAL MIX	35	35
VITAMIN MIX	10	10
ENERGY CONTENT	2,93 calories/g	5,44 calories/g

Table 2- Serum biochemistry analysis after Lithium *clearance* on 8th week. N=7 ND and N=6 HFD. Values are means \pm SEM. *P<0.05.

	ND	HFD
Sodium (mmol/L)	141,7 \pm 0,9	141,7 \pm 1,0
Potassium (mmol/L)	4,3 \pm 0,2	4,3 \pm 0,3
Chloride (mmol/L)	104,3 \pm 0,4	106,0 \pm 1,2
Magnesium (mEq/L)	1,9 \pm 0,044	1,7 \pm 0,044 **
Calcium (mg/dL)	9,3 \pm 0,2	9,4 \pm 0,2
Phosphorus (mg/dL)	6,8 \pm 0,4	6,7 \pm 0,3
Cholesterol (mg/dL)	50,6 \pm 3,5	49,3 \pm 5,1
Triglycerides (mg/dL)	37,4 \pm 3,5	40,0 \pm 1,6
HDL-Cholesterol (mg/dL)	47,0 \pm 3,1	46,3 \pm 4,6
LDL-Cholesterol (mg/dL)	6,3 \pm 0,5	4,8 \pm 0,5
VLDL (mg/dL)	8,8 \pm 1,3	6,8 \pm 1,2
Glucose (mg/dL)	123,9 \pm 12,0	115,0 \pm 8,6
Urea (mg/dL)	39,0 \pm 2,0	40,8 \pm 2,3
Creatinine (mg/dL)	0,4 \pm 0,005	0,4 \pm 0,1
Albumin(g/dL)	4,0 \pm 0,1	4,1 \pm 0,1
Globulin	2,7 \pm 0,6	2,0 \pm 0,0
Total Protein.(g/dL)	6,0 \pm 0,1	5,8 \pm 0,1

Table 3- Urine biochemistry analysis after Lithium *clearance* on 8th week. N=7 ND group and N=6 HFD group. Values are means \pm SEM. *P<0.05.

	ND	HFD
Sodium (mmol/L)	4,7 \pm 0,4	6,2 \pm 0,4 *
Potassium (mmol/L)	3,6 \pm 0,4	3,1 \pm 0,4
Chloride (mmol/L)	7,1 \pm 0,3	9,0 \pm 0,4 **
Magnesium (mEq/L)	1,9 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1 **
Calcium (mg/dL)	0,5 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1
Phosphorus (mg/dL)	1,7 \pm 0,6	1,8 \pm 0,5
Uric Acid (mg/dL)	0,2 \pm 0,046	0,1 \pm 0,048
Amylase (U/L)	1,0 \pm 0,7	2,2 \pm 1,6
Urea (mg/dL)	276,7 \pm 21,7	211,8 \pm 11,4 *
Creatinine (mg/dL)	3,4 \pm 0,4	3,7 \pm 0,5

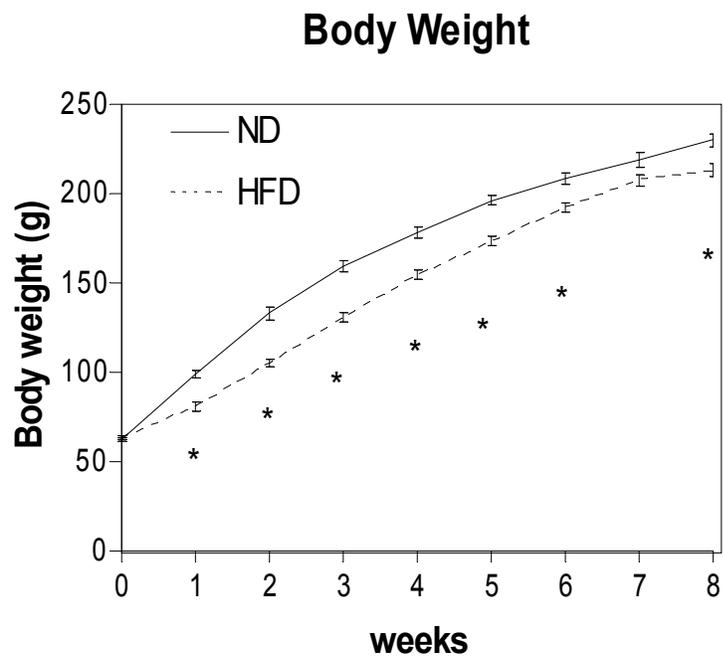


Figure 1- Body weight of females throughout 8-week study. Values are means \pm SEM. N=20-23 ND group, N=19-23 HFD group. *P<0.05.

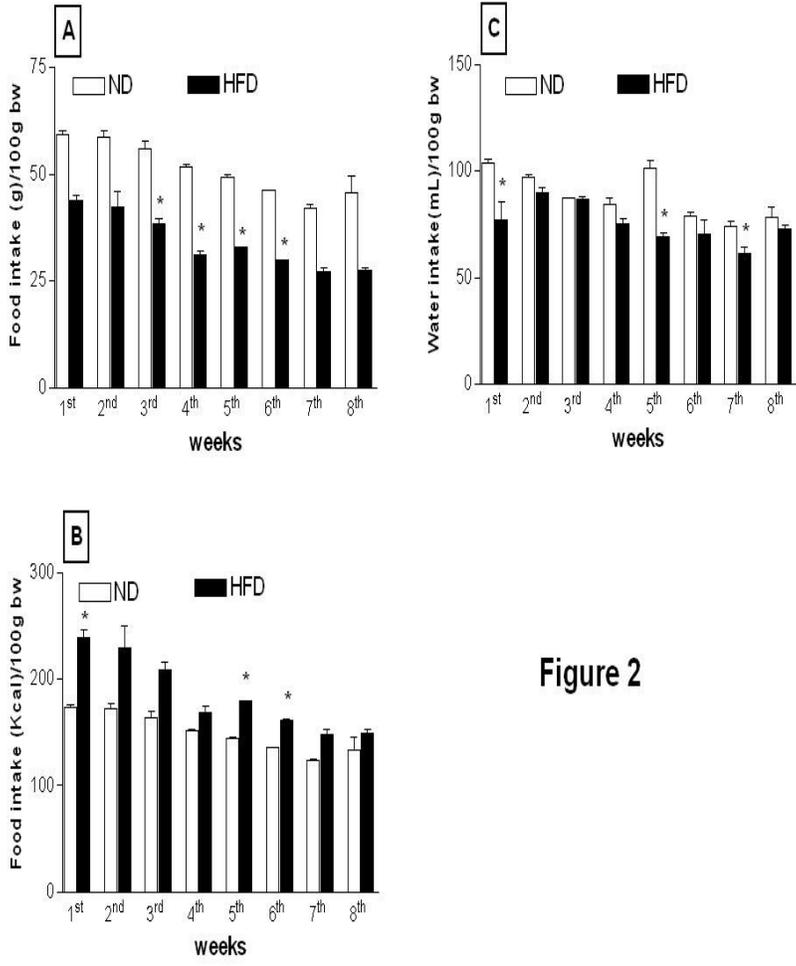


Figure 2

Figure 2- A) Food intake (g/100g b.w.); B) Caloric intake (cal/100g b.w.) and C) Water intake (mL/100g b.w.) throughout 8-week study. Values are means ± SEM. N=8 *P<0.05.

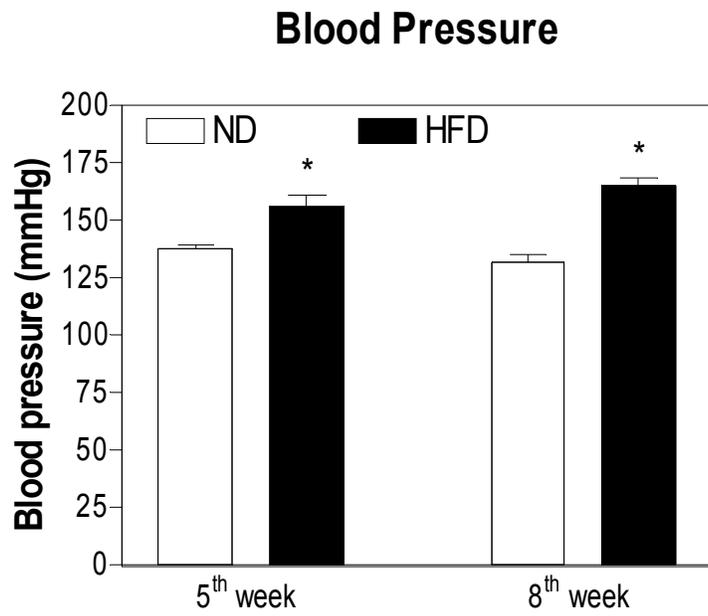


Figure 3- Systolic blood pressure (mmHg) on 5th and 8th weeks. Values are means \pm SEM. N= 4 *P<0.05.

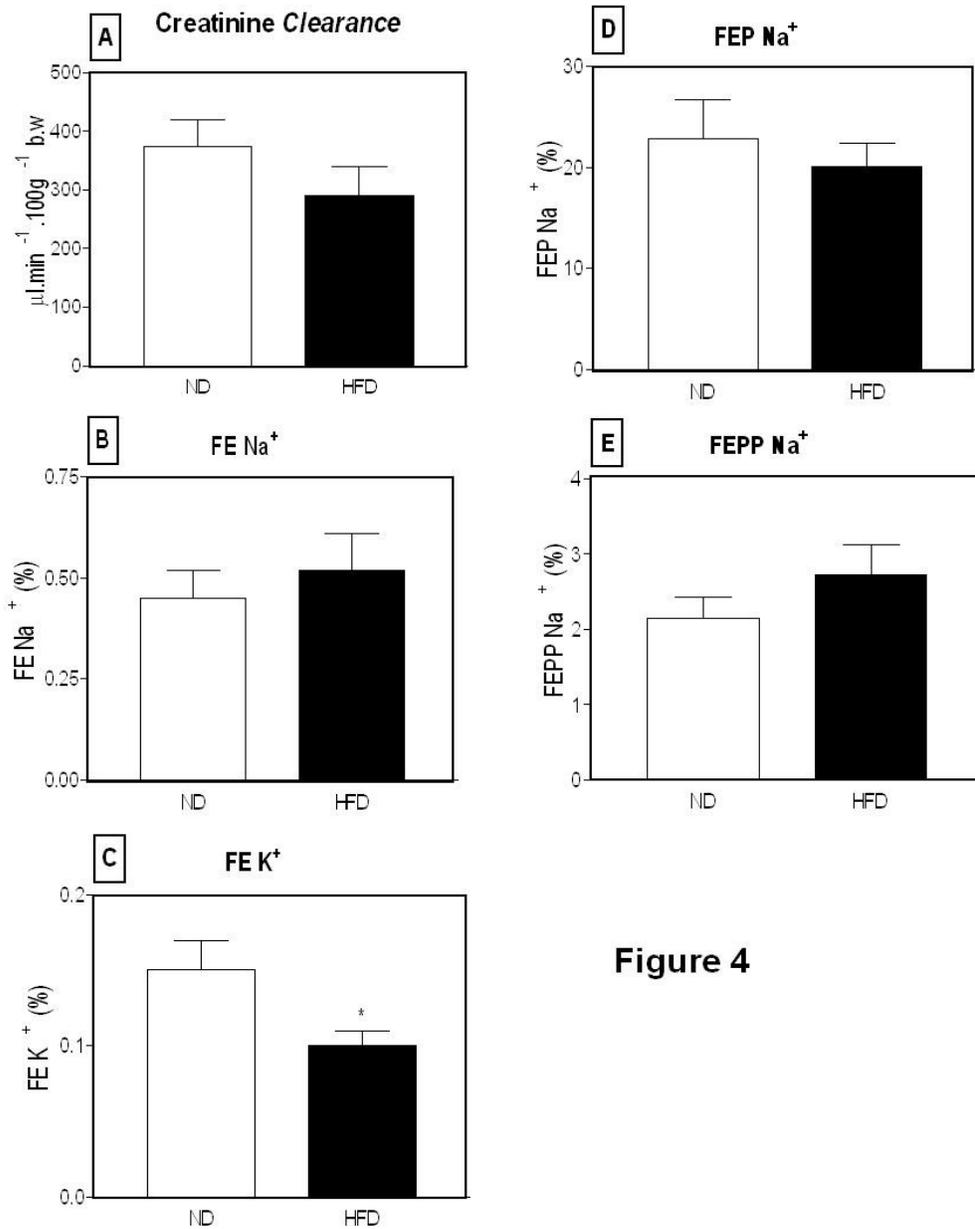


Figure 4

Figure 4- Creatinine Clearance (C_{cr}), **A**) Fractional sodium excretion (FE_{Na}), **B**) Fractional potassium excretion (FE_K), **C**) Proximal (FEP_{Na}) and **D**) Post-Proximal ($FEPP_{Na}$) fractional sodium excretion in females after 8 weeks treatment. Values are means \pm SEM. N= 10 * $P < 0.05$ (Student' test).

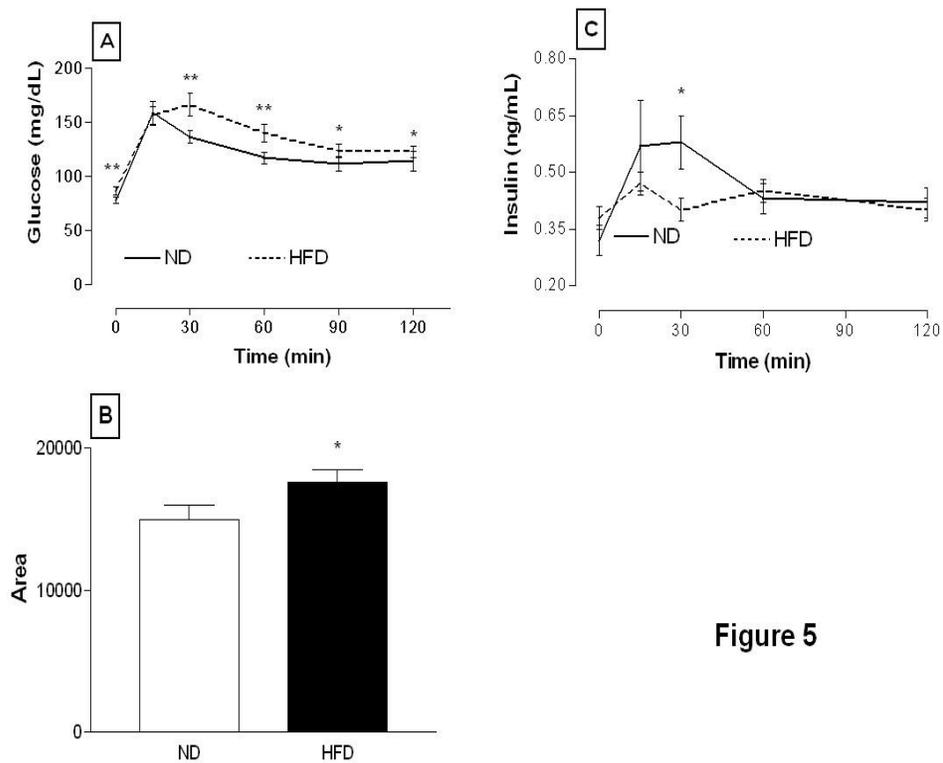


Figure 5

Figure 5- **A)** Glucose curve (mg/dL) after overnight fasting; **B)** Area under curve- AUC and **C)** Insulin levels (ng/mL) at different time points (0,15,30,60,90 and 120 min) during GTT after 8 weeks treatment. Values are means \pm SEM. N= 9-11 *P<0.05.

