

**Vander José das Neves**

**EFEITOS ATEROGÊNICOS DO ESTRESSE CRÔNICO EM  
AORTA TORÁCICA DE RATOS**

*Dissertação apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba, Universidade  
Estadual de Campinas, para obtenção do  
Título de Mestre em Odontologia, área de  
concentração Fisiologia Oral.*

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Fernanda Klein Marcondes**

**PIRACICABA  
2008**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

N414e	<p>Neves, Vander José das. Efeitos aterogênicos do estresse crônico em aorta torácica de ratos. / Vander José das Neves. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2008.</p> <p>Orientador: Fernanda Klein Marcondes. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Sistema cardiovascular. 2. Aterosclerose. 3. Endotélio. 4. Lipoproteínas. I. Marcondes, Fernanda Klein. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p>(mg/fop)</p>
-------	---

Título em Inglês: Atherogenic effects of chronic stress on thoracic aorta rats

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Cardiovascular system. 2. Atherosclerosis. 3. Endothelium. 4. Lipoproteins

Área de Concentração: Fisiologia Oral

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca Examinadora: Fernanda Klein Marcondes, Tatiana de Souza da Cunha, Caroline Morini Calil

Data da Defesa: 29-02-2008

Programa de Pós-Graduação em Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 29 de Fevereiro de 2008, considerou o candidato VANDER JOSÉ DAS NEVES aprovado.

*Fernanda Kle Marcondes*

---

PROFa. DRa. FERNANDA KLEIN MARCONDES

*Tatiana de Sousa da Cunha*

---

PROFa. DRa. TATIANA DE SOUSA DA CUNHA

*Caroline Morini Calil*

---

PROFa. DRa. CAROLINE MORINI CALIL

## DEDICO

Aos meus Pais, **Geralda e Vicente**, por terem me ensinado o caminho da coragem, da dedicação e da luta incondicional rumo aos objetivos. Por terem me ensinado a crer na educação como princípio fundamental de vida e na humildade como porta-voz do conhecimento. À minha Mãe, por ter dado sentido às minhas palavras e me mostrado o caminho das letras! Ao meu Pai, pela filosofia de vida e pelo grande ensinamento moral. *“O conhecimento facilita ganhar o mundo!”* – Sábias palavras, Meus Pais!

Ao meu Irmão **Edmilson**, por ter me ensinado que a vida não é exata e que a batalha na busca do caminho certo pode ser sempre vencida. Por ter me encorajado a agarrar os ideais e buscar explicações para o desconhecido. Você me deu a força que nunca economizei para vencer...

Ao meu Irmão **Edson**, por ter me mostrado que a perseverança é o caminho mais curto para a obtenção do sucesso. Por toda orientação filosófica em tempos de tempestades e por ter me mostrado, tantas vezes, que a vida transcende a nossa minúscula existência. Por ter acreditado sempre no meu futuro científico. Sem suas palavras, esta dissertação provavelmente não existiria...

Aos meus lindos sobrinhos **Jaciara, Luís Fernando e Samuel**, por terem ensinado à nossa família que a felicidade pode ser um estado constante, que o recomeço é possível e que o amor entre nós é o combustível básico da nossa luta. Vocês transmitem uma lição incontestável: *Todo cientista deveria ter a curiosidade e a vontade das crianças!*

Aos meus grandes amigos fisiologistas **Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes** (minha orientadora), **Gustavo Gameiro e Andres Marlo**, por todas as atitudes que vocês praticaram e que culminaram na minha vitória. Muitas de suas atitudes valeram mais que milhões de palavras...

## AGRADECIMENTOS

Algumas pessoas passam por nossa vida para facilitá-la. Estas sabem bem o sentido da existência, são singulares e merecem meus verdadeiros agradecimentos...

Há uma força incrível que me move!... A Ela, eu chamo de **Deus**, a quem agradeço e peço tanto perdão pelos meus erros...

Aos meus familiares, que deram a mim a opção da escolha profissional e que lutaram tanto para eu atingir este patamar. Agradeço especialmente aos meus Pais, que trabalharam muito para que minha educação fosse a melhor possível.

Agradeço à minha Orientadora, **Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes**, por ter me ensinado os primeiros passos no caminho da ciência. Agradeço pela coerência, paciência, amizade, confiança, pelo incentivo e, sobretudo, pelas oportunidades que me concedeu. Obrigado por ter me ajudado em momentos tão difíceis.

Ao **Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes**, que abriu portas e me concedeu oportunidades fundamentais para a realização deste trabalho. Obrigado pela confiança.

À **Eliene Aparecida Orsini Narvaes Romani**, que tanto contribuiu com seu trabalho para a solidez desta obra. Obrigado pela compreensão e pelas palavras de incentivo que tanto me fortaleceram.

À **Profa. Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga**, pelo exemplo e pela amizade.

Ao Professor **Oslei e Dona Sílvia**, pela grande amizade.

À Família do **Doutor Sant'Ana e Bete (Gabriela, Paula, Adriano, Eneida)**, por tudo que fizeram por mim. Vocês são uma grande família!...

Aos meus colegas e amigos de Pós Graduação **Rosemary, Rafaela Costa, Mariana Tamascia, Vinícius, Eduardo Kurihara, Júlia, Luana, Karla e Gustavo, Marcelo (histo), Cris Salmon, Rafael, Mariana Arturi, Nádia, Tatiana Cunha, Ana Paula Tanno, Maria Cláudia, Taís Barbosa, Anniceli, Rogério, Samuel, Sakai, Sandal, Aline, Milena, Fernanda Mariano, Marinho e**, especialmente, ao **Jorge Esquiche León**, pela grande amizade concretizada nos últimos dois anos.

Agradeço à **Eliane Grisoto** por ter me mostrado, em tão pouco tempo, o encanto da possibilidade. Você é especial para mim!

Ao técnico do laboratório de Fisiologia, **Feliciano**, pelo grande apoio funcional, pela amizade e pela dedicação.

Aos colegas do Departamento de Ciências Fisiológicas, **Eliane, José Carlos, Waldomiro, Alfredo**, obrigado pelo apoio funcional.

À **Eliete, Elisa, Raquel, Eliane e Érica**, secretárias da FOP, pelos exímio trabalho que realizam e pela atenção.

Aos funcionários da Biblioteca da FOP/UNICAMP, **Sueli, Marilene, Cidinha e Eliseo**.

Agradecimento especial aos **Animais**, que dão o sangue pela Ciência, que perdem a vida para salvar o homem...

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas**, pelas condições oferecidas para a realização deste trabalho e por tamanha dedicação à Ciência.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP**, e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq**, pelo apoio financeiro.

***“És Grande na Ciência!”***

**“És grande na Ciência  
Tanto quanto és na Vida,  
Se semeias as questões  
E garimpas as respostas!  
És grande na Vida  
Tanto quanto és na Ciência,  
Se colhes com a alma  
Os frutos das sementes!”**

***Vander José das Neves***

## RESUMO

Complicações metabólicas e vasculares podem resultar em aterosclerose, que constitui um grave problema de saúde pública, sendo responsável por cerca da metade da mortalidade relacionada a doenças cardiovasculares no mundo ocidental. Portanto, estudar os fatores de risco associados a esta patologia é fundamental para que se possa estabelecer diretrizes de tratamento e prevenção de distúrbios cardiovasculares. O estresse crônico e a ingestão de dietas hipercalóricas têm sido reconhecidos como fatores de risco para doenças cardiovasculares e para a aterosclerose, por seus efeitos potencialmente deletérios sobre o sistema cardiovascular. O objetivo deste estudo foi avaliar, em ratos, os efeitos aterogênicos do estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI), associado ou não à ingestão de dieta hipercalórica, sobre a sensibilidade às catecolaminas em átrio direito e aorta torácica, sobre a morfologia vascular e a influência de lipídios nas alterações funcionais e morfológicas observadas. Buscando avaliar os mecanismos relacionados aos efeitos do estresse crônico, associado ou não, ao consumo de dieta hipercalórica, apresentamos nos capítulos 1 e 2, resultados de estudos *in vitro*. No capítulo 1, foi mostrado que o ECMI promove supersensibilidade à fenilefrina em aorta torácica isolada de ratos, aumento da espessura do endotélio e da camada média vascular, dislipidemia aterogênica, e elevado índice aterogênico, em relação ao grupo controle, sem alteração da sensibilidade atrial à noradrenalina. Tais alterações parecem estar relacionadas à diminuição da síntese de óxido nítrico endotelial e aumento das concentrações séricas de lipoproteína de baixa densidade (LDL) em ratos submetidos ao ECMI. No capítulo 2 foi mostrado que, em animais não submetidos a estresse, a dieta hipercalórica promoveu aumento da adiposidade e das concentrações séricas de LDL, sem alterações nas concentrações de colesterol total e triglicérides, e sem alterações funcionais ou estruturais na aorta torácica. O ECMI promoveu supersensibilidade vascular à fenilefrina, aumento da espessura do endotélio e da camada média vascular e elevação da concentração sérica de LDL em ratos tratados com dieta hipercalórica e em animais tratados com dieta controle, em relação aos respectivos grupos não submetidos a estresse. Além disso, o ECMI promoveu alterações contrárias sobre a adiposidade nos grupos tratados com dieta controle e dieta hipercalórica,

diminuindo a adiposidade no primeiro grupo e elevando-a no segundo, em relação aos grupos tratados com a mesma dieta e não submetidos a estresse. Considerando que, apesar de elevadas concentrações de LDL, não houve alterações funcionais ou estruturais na aorta torácica de ratos alimentados com dieta hipercalórica, não submetidos ao ECMI, e que, embora tenha ocorrido maior elevação nas concentrações de LDL em ratos estressados tratados com dieta hipercalórica, as alterações funcionais e morfológicas observadas na aorta torácica e as concentrações de corticosterona deste grupo não diferiram em relação aos animais estressados alimentados com dieta controle. Os resultados apresentados nos capítulos 1 e 2 indicam que o estresse crônico parece potencializar os efeitos aterogênicos das LDL.

Palavras-chave: Aorta, estresse, endotélio, aterosclerose, lipoproteínas, óxido nítrico, ratos.

## ABSTRACT

Metabolic and vascular complications can result in atherosclerosis, which constitutes a great problem of public health, associated to approximately half of the deaths related to the cardiovascular illnesses in the occidental world. Therefore to the establishment of guidelines for treatment and prevention of cardiovascular diseases, it is important to study risk factors associated to this pathology. Chronic stress and hypercaloric diet ingestion have been recognized as risk factors for cardiovascular diseases because of its potential deleterious effect on the cardiovascular system. The aim of this work was to evaluate, in rats, the atherogenic effects of chronic mild unpredictable stress (CMS) associated or not to the ingestion of hypercaloric diet on the sensitivity of right atria and thoracic aorta to catecholamines, on the vascular morphology and the influence of lipids in the possible functional and morphological vascular alterations. In order to evaluate the mechanisms related to the effects of chronic stress, associated or not to the consumption of hypercaloric diet, we present in the chapters 1 and 2, results of *in vitro* studies. In the chapter 1, it was shown that CMS promotes supersensitivity to phenylephrine in thoracic aorta isolated from rats, increases the endothelium and tunica media thickness, atherogenic dyslipidemia, and higher atherogenic index, in comparison with the control group, without alteration in the atrial sensitivity to noradrenaline. These alterations seem to be related to the inhibition of endothelial nitric oxide production and to the increase in the seric levels of low-density lipoprotein (LDL) in rats submitted to the CMS. In chapter 2, it was shown that in non-stressed-animals, hypercaloric diet promoted an increase in the adiposity and seric levels of LDL, without alterations in the levels of total cholesterol, triglicerides and without functional or structural changes in the thoracic aorta. The CMS promoted vascular supersensitivity to phenylephrine, increased the endothelium and tunica media thickness and increased the seric levels of LDL in rats treated with hypercaloric diet and control diet, in comparison with the groups that were not submitted to stress. Furthermore, the CMS promoted contrary alterations on the adiposity in the groups treated with control and hypercaloric diet, decreasing the adiposity in the first one and increasing it in the second group, in comparison with the respective groups treated with the same diet, but not submitted to the CMS. Considering that in spite of high levels of LDL, there were no

functional or morphological changes in the thoracic aorta from rats treated with hypercaloric diet and not submitted to the CMS, and that despite the biggest rise in the LDL levels in stressed rats treated with hypercaloric diet, there was no difference between this group and stressed rats treated with control diet in the functional and morphological changes observed in the thoracic aorta as well in the corticosterone levels, the results presented in the chapter 1 and 2, indicate that chronic stress seems to increase the atherogenic effects of the LDL.

Keywords: aorta, stress, endothelium, atherosclerosis, lipoproteins, nitric oxide, rats.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	01
CAPÍTULO 1: Effects of chronic stress on thoracic aorta and right atria isolated from rats.....	04
CAPÍTULO 2: Efeitos vasculares da associação entre estresse crônico e dieta hipercalórica em ratos.....	26
CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
ANEXOS.....	63

## INTRODUÇÃO

O estresse da vida moderna, o sedentarismo e o consumo de dietas hipercalóricas têm importante papel no desenvolvimento de disfunções metabólicas, distúrbios alimentares (Dallman et al., 2003), doenças cardiovasculares e síndrome metabólica (Dandona et al., 2005). Quanto à síndrome metabólica, ela é responsável por altos índices de morbidade e mortalidade de pacientes que a portam, de modo que deva ser vista, hoje, como uma das principais metas do ponto de vista terapêutico em termos de prevenção de distúrbios cardiovasculares (Lopes, 2004). Neste sentido, inúmeros estudos sobre os fatores desencadeantes e os mecanismos envolvidos no surgimento das alterações metabólicas e cardiovasculares envolvidos na síndrome metabólica têm sido realizados. E o estresse da vida moderna, por seu importante papel no desenvolvimento de disfunções metabólicas, desordens emocionais, distúrbios alimentares e doenças cardiovasculares, tem sido relacionado à ocorrência desta síndrome (Raikonen *et al.*, 1994; Epel *et al.*, 1999), que é caracterizada pela presença de pelo menos três fatores de risco em um indivíduo, tais como: resistência à insulina, obesidade abdominal, dislipidemia aterogênica (elevados níveis de triglicérides, aumento da fração de lipoproteínas de baixa densidade e baixos níveis de lipoproteínas de alta densidade), estados pró-trombóticos e pró-ateroscleróticos (ATP III, 2001), bem como hipertensão arterial (Rosmond, 2005), diabetes tipo II (Grundey *et al.*, 2004) e microalbuminúria (Lopes, 2004).

Com relação aos efeitos vasculares do estresse, a exposição crônica ou repetida a estímulos estressores pode resultar em aterosclerose (Black, 2002). Em aproximadamente 40% dos casos, nos quais não são identificados outros fatores causais conhecidos, o estresse parece ser o único fator de risco para o seu desenvolvimento (Leon *et al.*, 1993; Matthews *et al.*, 1998; Rozanski *et al.*, 1999; Ross, 1999; Black & Garbutt, 2002). A aterosclerose é uma lesão complexa da parede vascular, que afeta, essencialmente, a camada íntima da artéria (Duque, 1998). Acredita-se que a primeira lesão estrutural na aterogênese seja a “estria gordurosa”, que consiste no acúmulo, sob o endotélio, de células de ésteres de colesterol (células espumosas), cercadas de depósitos de lipídios. Estas células espumosas derivam de macrófagos subendoteliais, que ingerem avidamente lipoproteínas, em grande parte lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (Schoen, 2005). As estrias gordurosas não produzem alteração na circulação sanguínea, mas

localizam-se nos mesmos sítios em que mais tarde se localizarão as placas ateromatosas (Duque, 1998). Há evidências de que a aterosclerose resulta de processos inflamatórios crônicos e que a maioria dos hormônios do estresse (catecolaminas, corticosteróides, renina, hormônio de crescimento e glucagon) podem induzir a fase aguda da resposta inflamatória, que é similar à resposta do organismo frente a invasões de microorganismos ou traumas substanciais (Black, 2003).

O desenvolvimento da síndrome metabólica é favorecido pela associação entre a ingestão abusiva de dietas hipercalóricas, o sedentarismo e o estresse da vida moderna, propiciando o surgimento de alterações relacionadas ao metabolismo de carboidratos e lipídeos e disfunções cardiovasculares (Brandão *et al.*, 2005). Neste contexto, a associação entre esses fatores tem despertado o interesse de pesquisadores na tentativa de se entender as complexas relações entre o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e alterações do metabolismo lipídico (Pecoraro *et al.*, 2004; Dallman *et al.*, 2003; Cuevas & Germain, 2004).

Para ampliar informações obtidas de estudos em humanos, diferentes modelos animais têm sido utilizados, tais como coelhos (Heras *et al.*, 2003), ratos Sprague-Dawley (Pecoraro *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2007), camundongos (Kumari *et al.*, 2003) e macacos Rhesus espontaneamente obesos (Bodkin *et al.*, 1993). E diferentes tipos de protocolos para indução de estresse em animais de laboratório estão disponíveis, tais como imobilização (Kurihara & Marcondes, 2002), natação (Tanno *et al.*, 2002) e aplicação de choques nas patas (Vanderlei *et al.*, 1996).

Com relação ao estudo dos efeitos do estresse crônico em animais, ratos de laboratório podem adaptar-se à aplicação repetida de estímulos estressores, todavia, esta adaptação não ocorre quando os animais são submetidos ao modelo de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI), que consiste na exposição repetida a diferentes estímulos (Moreau *et al.*, 1993; Moreau 1997). A ausência de adaptação aos estímulos estressores foi confirmada pela elevação mantida dos níveis séricos de prolactina e corticosterona em resposta ao ECMI (Rodriguez, 1988). Além disso, o ECMI induziu aumento de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos (Grippo *et al.*, 2002).

Com relação aos efeitos do estresse sobre o sistema cardiovascular, foi

demonstrado que a ação dos glicocorticóides, via receptores para mineralocorticóides, favorece a ocorrência de hipertensão (Lloyd-mac *et al.*, 1999). E foi também evidenciado que alterações de sensibilidade do tecido cardíaco e vascular às catecolaminas estão relacionadas ao aumento na secreção de glicocorticóides e variações nos níveis de esteróides sexuais, induzidos pelo estresse (Spadari *et al.*, 1988; Nourani *et al.*, 1992; Santos *et al.*, 2003). Neste sentido, foi descrita a ocorrência de subsensibilidade aos efeitos das catecolaminas no marcapasso cardíaco (Marcondes *et al.*, 1996; Vanderlei *et al.*, 1996) e na aorta torácica (Moura *et al.*, 2003) isolados de ratos submetidos a estresse repetido, e supersensibilidade aos efeitos cronotrópicos da noradrenalina (Tanno *et al.*, 2002), após estresse agudo por sessão única de natação. Tais alterações na resposta à estimulação adrenérgica são decorrentes de alteração no número ou subtipo de adrenoceptores, na liberação ou metabolização das catecolaminas, ou são decorrentes de mudanças no acoplamento entre o receptor adrenérgico e o sistema de segundos-mensageiros.

Com base nas considerações apresentadas e considerando-se que o estresse crônico e dietas hipercalóricas constituem fatores de risco para o desenvolvimento de síndrome metabólica e de doenças cardiovasculares e que animais representam importante ferramenta experimental, complementar aos estudos em humanos, nossa proposta foi estudar, em ratos, os efeitos do ECMI, associado ou não à ingestão de dieta hipercalórica, sobre o metabolismo de lipídeos, a sensibilidade cardiovascular às catecolaminas *in vitro* e a morfologia da aorta torácica.

## **CAPÍTULO 1**

**Effects of chronic stress on thoracic aorta and right atria isolated from rats. Neves VJ, Moura MJCS, Tamascia ML, Ferreira R, Costa R, Montemor PL, Romani EAON, Bernardes CF, Novaes PD, Marcondes FK.**

Neste capítulo são apresentados dados referentes aos efeitos do estresse crônico moderado e imprevisível sobre o cronotropismo cardíaco, a função e estrutura vasculares e o metabolismo lipídico, em ratos.

Este artigo refere-se a dados parciais obtidos no presente estudo e foi submetido para publicação no periódico *Stress*, em 29/01/2008, conforme comprovante apresentado nos anexos.

Editor: John Russell

Effects of chronic stress on thoracic aorta and right atria isolated from rats.

Neves VJ<sup>1</sup>, Moura MJCS<sup>2</sup>, Tamascia ML<sup>1</sup>, Ferreira R<sup>1</sup>, Costa R<sup>1</sup>, Montemor PL<sup>2</sup>, Romani EAON<sup>1</sup>, Bernardes CF<sup>2</sup>, Novaes PD<sup>1</sup>, Marcondes FK<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Piracicaba Dental School, State University of Campinas, Piracicaba - SP, Brazil.

<sup>2</sup>Life Sciences Center, Pontifical Catholic University of Campinas, Campinas - SP, Brazil.

\* Author for correspondence:

Departamento de Ciências Fisiológicas  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Universidade Estadual de Campinas

Av. Limeira, 901 - Vila Areião

13414-903. Piracicaba -SP, Brazil

E-mail: fklein@fop.unicamp.br

Phone/Fax: + 55 19 2106 5380/ 2106 5212

Number of pages: 21

Number of tables: 02

Number of figures: 04

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to analyze the effects of chronic mild unpredictable stress (CMS) on the sensitivity of right atria and thoracic aorta of rats to catecholamines, morphology of thoracic aorta and lipids profile. Male Sprague-Dawley rats were submitted to CMS, which consisted of the application of different stressors (7 days per week/3 weeks). The animals were sacrificed 15 days after stress. Although CMS did not change the chronotropic response to norepinephrine in right atria, CMS induced supersensitivity to phenylephrine in endothelium-intact thoracic aortic rings without changes in aortic rings without endothelium, or incubated with nitric oxide synthesis inhibitor. Rats submitted to CMS also presented hypertrophy of the endothelium and tunica media of thoracic aorta, higher seric levels of triglycerides, total cholesterol, very low-density lipoprotein cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol and an increased atherogenic index, without changes in high-density lipoprotein cholesterol levels, when compared with control animals. These data suggest that CMS seems to induce physiological and morphological changes that may contribute to the development of atherosclerosis by mechanisms related to deficiency in nitric oxide production and dyslipidemia.

**KEYWORDS:** aorta, stress, endothelium, atherosclerosis, lipoproteins, nitric oxide, rats.

## **INTRODUCTION**

During the stress reaction, the sympathetic nervous system and hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) are stimulated according to the quality, intensity and frequency of the stressor, as well as host age, gender and previous experiences (Tanno et al., 2002). This activation results in high levels of the stress hormones, glucocorticoids and catecholamines, which promote metabolic, cardiovascular and adaptive behavioral responses. Although the stimulation of adrenergic receptors by noradrenaline and adrenaline in blood vessels and cardiac muscle is related to adaptive responses, some negative effects may also be observed if adrenergic stimulation is maintained during chronic stress. In this context, the occurrence of hypertension in laboratory rats has been reported (Bernatova and Csizmadiova, 2006) and atherosclerosis in mice (Kumari et al,

2003).

Therefore, changes in tissue sensitivity to catecholamines may play an important role during stress. It has been observed that acute swimming stress promoted subsensitivity to phenylephrine (PE) in thoracic aorta from male rats *in vitro* (Moura et al., 2003). Moreover, acute immobilization stress induced subsensitivity to norepinephrine (NE) and isoprenaline in the right atria isolated from male rats (Capaz and De Moraes, 1988). On the other hand, acute swimming stress induced supersensitivity to noradrenaline in right atria isolated from female rats in proestrus, without changes during the other phases of the reproductive cycle (Tanno et al., 2002). Moreover, chronic stress induced by restraint and tail shocks has been associated with the development of lesions in the aortic intima of Sprague-Dawley rats (Gordon et al., 1981). Although stress could be related to deleterious effects on the cardiovascular system, events some time after the end of stress, these effects have not been well studied in rats submitted to the CMS protocol, which is a chronic stress model validated in the literature that does not allow adaptation of rats submitted to the repeated application of stressor stimuli.

Since the majority of the above-mentioned functional and structural changes in the heart or aorta of rodents submitted to stress can be related to changes in the metabolism of catecholamines (Tanno et al., 2002), dyslipidemia (Brindley et al., 1993; Kamgang et al., 2005) and dysfunction of endothelial NO production (Cunha et al., 2005; Bernatova and Csizmadiova, 2006), the aim of the present study was to analyze the medium term effects of chronic stress on the right atria and aorta sensitivity to catecholamines, morphology of thoracic aorta and blood levels of lipids in rats.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals and Experimental Design**

Male Sprague-Dawley rats (60 days old; 300-350 g) were used, which were obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation of the State University of Campinas, were used. The animals were housed one per cage at  $22 \pm 2$  °C with lights on from 6 am to 6 pm. The animals received commercial rodent chow (Labina-Purina<sup>®</sup>) and filtered drinking water *ad libitum*. All procedures were approved by the

Institutional Committee on Animal Research Ethics (CEEA–UNICAMP/Protocol Number 900-1) and carried out in accordance with the norms of the Brazilian College of Animal Experimentation.

After an acclimatization period of 1 week in the animal facilities, the rats were randomized into two groups: Control and CMS (n = 10/group); and were then analyzed during 7 weeks. In the CMS group, the stressors were applied during the 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> weeks. During 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> week, the animals were submitted only to the procedures related to the animal care routine. The rats were sacrificed by decapitation 15 days after the end of CMS protocol and the blood was collected from the trunk, centrifuged and serum and plasma were separated. The thoracic aortas and right atria were isolated.

### **Stress protocol**

The animals were submitted to a chronic mild stress (CMS) protocol that consisted of the application of different stressors throughout 7 days per week/ 3 consecutive weeks (3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> weeks) of an experimental protocol lasting 7 weeks. The CMS protocol, modified from the methodology described by Moreau et al., (1993) and Moreau (1997), is presented in the Table 1. Control rats were submitted only to the procedures related to their care.

**Table 1. Chronic, mild, unpredictable stress procedure.**

	Morning	Afternoon
Monday	8 a.m.: 1 h immobilization	1 p.m.: 1 h immobilization 6 p.m.: overnight illumination
Tuesday	8 a.m.: 1 h immobilization	2 p.m.: 1 h immobilization followed by water and food deprivation for 18 h
Wednesday	8 a.m.: access to restricted food for 2 h	1 p.m.: 1 h immobilization followed by water deprivation for 18 h
Thursday	8 a.m.: exposure to empty water bottle for 2 h 10 a.m.: 1 h immobilization	2 p.m.: 1 h immobilization 6 p.m.: humid cage for 18 h
Friday	8 a.m.: 1 h immobilization	6 p.m.: reversed light/dark cycle throughout the week-end.

### **Concentration-effect curve in right atria**

The heart was rapidly removed and the right atrium was isolated and used to analyze the effect of catecholamines on cardiac chronotropism as previously described by Tanno et al., (2002). Briefly, full concentration-effect curve to noradrenaline was obtained by stepwise increases in the agonist concentration (0.5 log units). A maximum response was obtained when a 0.5 log unit increase in agonist concentration did not produce an additional response. To evaluate the activities of the neuronal and extraneuronal uptake systems, the right atrium was exposed to phenoxybenzamine (10  $\mu$ M) for 30 min to block the neuronal uptake, before the second concentration-effect curve (Iversen et al., 1972). This was followed by 1 h of thorough washing. After recovery of the spontaneous beating rate, estradiol (5  $\mu$ M) was added to the organ-bath for 15 min to inhibit extraneuronal uptake (Salt, 1972). These concentrations produced maximum inhibition of the uptake systems (Iversen and Salt, 1970; Iversen et al., 1972). The second concentration-effect curve to noradrenaline was obtained in the presence of estradiol (Tanno et al., 2002). Changes in the sensitivity to the agonist were evaluated by determining the EC<sub>50</sub> and were expressed as the pD<sub>2</sub>.

### **Concentration-Effect Curve in aorta rings**

Two matched rings, taken from the same animal were obtained from the middle portion of each aorta and used for functional assays as previously described (Moura and Marcondes, 2001; Cunha et al., 2005). Briefly, cumulative concentration-effect curves to phenylephrine were obtained from one ring with intact endothelium and the other without endothelium. To evaluate the role of nitric oxide on the modulation of thoracic aorta sensitivity to phenylephrine, rings with intact endothelium obtained from other animals were incubated for 40 min with the nitric oxide synthesis inhibitor, N<sup>G</sup>-L-arginine-methyl-ester (L-NAME) ( $10^{-5}$  M) before concentration-effect curves. Changes in thoracic aorta sensitivity to phenylephrine were evaluated by determining the concentration that produced 50% of the maximum response (EC<sub>50</sub>) and were expressed as the mean negative logarithm (pD<sub>2</sub>).

### **Analytic Methods and Atherogenic Index**

Plasma corticosterone was assayed by radioimmunoassay, using the Coat-A-Count<sup>®</sup> Rat Corticosterone Kit (Diagnostic Products, USA). Seric triglycerides (TGL) were determined by using commercially available kit CELM<sup>®</sup>. Very low-density lipoprotein (VLDL) was calculated from TGL as described by kit CELM<sup>®</sup>. Seric total cholesterol (TC) and high density lipoprotein (HDL) were determined by using commercially available kit Laborlab<sup>®</sup>. Seric low density lipoprotein (LDL) was determined by Friedewald's formula:  $LDL = TC - HDL - (TGL \times 0.2)$  (Friedewald et al., 1972; Wakabayashi and Kobaba-Wadabayashi, 2002). Atherogenic index (AI) was determined by using the formula:  $AI = TC - HDL / TC$  in accordance with Kamgang et al., (2005).

### **Tissue Processing and Morphometric Study**

The thoracic aorta inferior third beginning 5 millimeters (mm) above the diaphragm muscle was immediately excised and placed in Karnovsky's fixative (Karnovsky, 1965) for 6 h at 4 °C. Next, the aorta fragments were washed in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3 and postfixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3, for 2 h at room temperature and dehydrated with 50, 70, 90 and 100% acetone. The fragments were included in Araldite-502 resin (Luft, 1961) and polymerized for 48 h to 60 °C.

Semithin transverse sections of the aorta were cut with 1 micrometer ( $\mu\text{m}$ ) thickness on a SORVALL<sup>®</sup> Porter-Blum MT2-B ultramicrotome equipped with glass knife (intervals of 10  $\mu\text{m}$  between the sections). The sections were stained with 0.5% toluidine blue in 1% sodium borate for 50 seconds followed by 1% basic fuchsin for 30 seconds. We obtained 5 sections of each aorta in 5 animals per group, totalizing 25 sections in each studied group to be analyzed by light microscopy.

The measurements of internal diameter, endothelium thickness and tunica media thickness of the thoracic aorta were made with the help of a photomicroscope (Carl Zeiss, West Germany) connected to a millimeter eyepiece (Ernest Leitz, Wetzlar, Germany, 12.5x) and using a millimeter ruler (Carl Zeiss 5+<sup>100</sup>/<sub>100</sub> mm) for calibration. From each

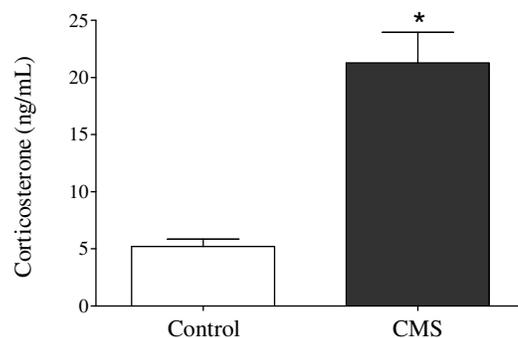
section, 3 measurements of the smaller diameter and 3 of the bigger diameter were made to determine the mean of the internal diameter. For these measurements an objective lens 1x and optovar 1.6x were used; the results were showed in mm. In addition, 24 measurements were made from each section to calculate the endothelium thickness and 24 measurements to calculate tunica media thickness. For the endothelium thickness measurements an objective lens 100x and optovar 1.6x were used, and the endothelium limits were considered between the luminal surface and the internal elastic lamina. For the tunica media measurements an objective lens 10x and optovar 2.0x were used, and the tunica media limits were considered between the internal and external elastic lamina. The results of endothelium and tunica media thicknesses were showed in  $\mu\text{m}$ .

## STATISTICAL ANALYSIS

Statistical differences were determined by the Student's-*t* test with GraphPad Prism<sup>®</sup> 4 software, San Diego, CA, USA – License G3-A 14920-830. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ . The results are presented as means  $\pm$  SEM.

## RESULTS

Figure 1 shows that plasmatic concentration of corticosterone was significantly increased in the chronic mild stress (CMS) group 15 days after the end of the CMS protocol, compared with the control group ( $p < 0.05$ ).



**Figure 1** – Plasmatic concentration of corticosterone from rats submitted to chronic mild stress (CMS), 15 days after stress protocol (n=5/group). \*( $p < 0.05$ ) indicates significant difference in comparison with control group.

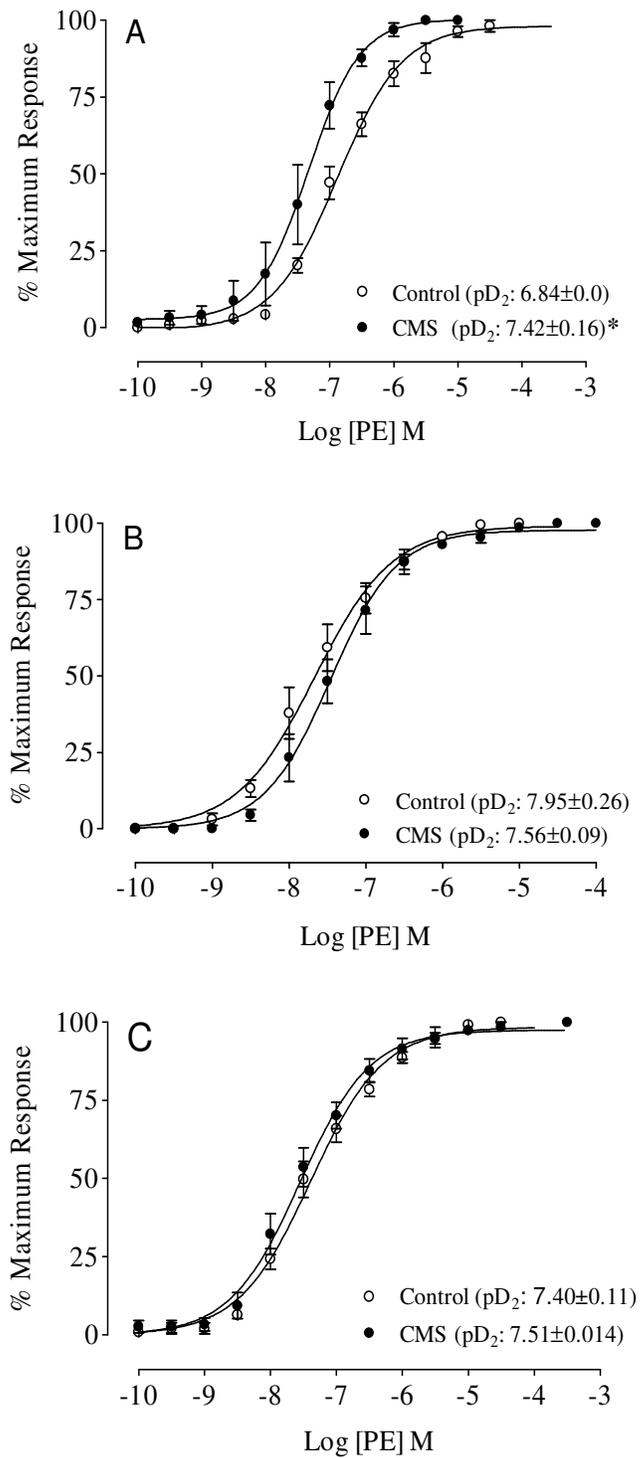
The effect of CMS on right atria sensitivity to noradrenaline is indicated in Table 2. There was no change in the initial beating frequency (IF), maximum response (MR) and sensitivity of right atria to noradrenaline between control and CMS groups ( $p>0.05$ ). Both in control and stress groups, the uptake system inhibitors phenoxybenzamine and estradiol induced significant shift to the left in the concentration-effect curves to noradrenaline in relation to the curves obtained in the absence of uptake inhibitors, in the same tissue ( $p<0.05$ ).

**Table 2.** Initial beating frequency, maximum response and potency of noradrenaline before and after uptake inhibition in right atria isolated from control and from rats submitted to chronic mild stress and sacrificed 15 days after the end of stress protocol.

Group	IF <sup>a</sup> curve1 <sup>d</sup>	IF <sup>a</sup> curve 2 <sup>e</sup>	MR <sup>b</sup> curve 1 <sup>d</sup>	MR <sup>b</sup> curve 2 <sup>e</sup>	pD <sub>2</sub> <sup>c</sup> curve 1 <sup>d</sup>	pD <sub>2</sub> <sup>c</sup> curve 2 <sup>e</sup>
Control	262±06	279±09	163±08	148±09	7.20±0,09	7.51±0,10 <sup>#</sup>
CMS	270±07	268±08	159±10	148±09	7.00±0,07	7.59±0,09 <sup>#</sup>

<sup>#</sup> ( $p<0.05$ ) compared with the curve obtained in the same tissue before inhibition of the uptake systems. n= 8 animals/group. <sup>a</sup>Initial beating frequency; <sup>b</sup>Maximum response; <sup>c</sup>Negative logarithm of the molar concentration of agonist producing 50% of the maximum response; <sup>d</sup>Concentration-effect curves obtained in the absence of inhibitors of the catecholamine uptake systems; <sup>e</sup>Concentration-effect curves obtained after the inhibition of neuronal and extraneuronal uptake *in vitro*.

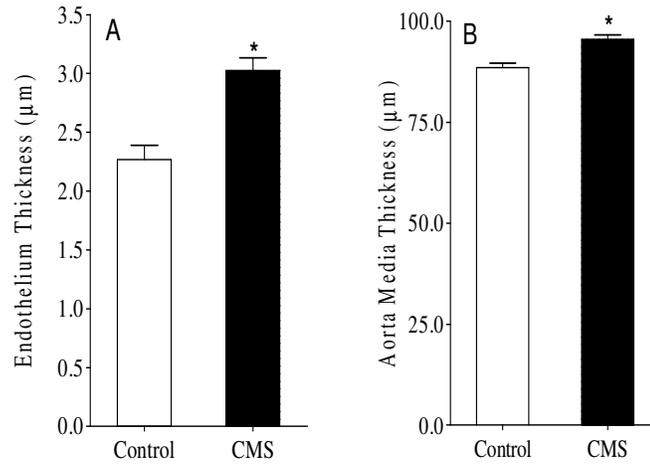
Figure 2 shows the concentration-effect curves (CCE) to phenylephrine obtained in isolated thoracic aorta. As there was no difference in the maximum response to the adrenergic agonist between control and CMS groups in aortic rings with endothelium-intact, endothelium-denuded and in presence of L-NAME ( $p>0.05$ ; data not shown), the CCE were expressed in percentage of maximum response. There was supersensitivity to phenylephrine in endothelium-intact aorta isolated from CMS group when compared with the control, with 3.8-fold shift to the left in the CCE ( $p<0.05$ ; Figure 2A), without change in endothelium-denuded aortic rings ( $p>0.05$ ; Figure 2B), and CCE obtained in presence of the inhibitor of nitric oxide synthesis L-NAME ( $p>0.05$ ; Figure 2C).



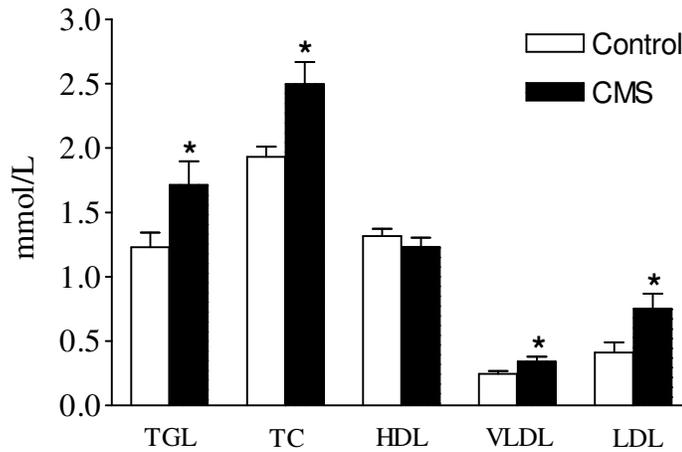
**Figure 2** - Concentration-effect curves to phenylephrine (PE) obtained in endothelium-intact (A), endothelium-denuded (B) and in the presence of L-NAME in the endothelium-intact (C) thoracic aorta rings isolated from rats submitted to chronic mild stress (CMS), 15 days after stress protocol (n=5/group). \*( $p < 0.05$ ) indicates significant difference in comparison with control group.

Thoracic aorta isolated from rats submitted to CMS presented a significant increase in the endothelium ( $p<0.05$ ; figure 3A) and tunica media ( $p<0.05$ ; figure 3B) thickness in relation to control, without changes in the aorta internal diameter (control:  $1.55 \pm 0.04$  mm, CMS:  $1.61 \pm 0.04$  mm;  $p>0.05$ ).

Serum levels of TGL, TC, VLDL and LDL were significantly increased in the CMS group ( $p<0.05$ , figure 4) with no statistical difference in the serum levels of HDL between the groups 15 days after the end of the CMS protocol ( $p>0.05$ ). Moreover, stressed rats presented higher AI ( $1.99 \pm 0.20$ ) in comparison with control animals ( $1.25 \pm 0.09$ ) ( $p<0.05$ ).



**Figure 3** – Endothelium (A) and media layer thickness (B) of thoracic aorta isolated from rats submitted to chronic mild stress (CMS), 15 days after stress protocol (n=5/group). \*( $p < 0.05$ ) indicates significant difference in comparison with the control group.



**Figure 4** - Effects of CMS on seric concentrations of triglycerides (TGL), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL), very low-density lipoprotein (VLDL) and low-density lipoprotein (LDL) in rats submitted to chronic mild stress (CMS), 15 days after stress protocol (n=9-12/group). \*( $p < 0.05$ ) indicates significant difference in comparison with the control group. The values are expressed as means  $\pm$  SEM.

## DISCUSSION

According to physiological and pathological studies, stress plays an important role in the development of cardiovascular diseases, mainly atherosclerosis, which is the most important vascular disease and is the main cause of death in western industrialized countries (Hauss et al., 1990). Therefore, it is important to understand the mechanisms involved in the pathogenesis of stress-induced chronic diseases, such as atherosclerosis and hypertension. Therefore, the present study was carried out to investigate the effects of chronic mild stress (CMS) on the *in vitro* sensitivity of chronotropic and vasoconstrictor response to catecholamines, aorta morphology and lipid profile in rats.

The effectiveness of the stress protocol was confirmed by the significant increase in corticosterone plasma levels in rats submitted to CMS compared with control animals, even 15 days after the end of CMS protocol, when the animals were sacrificed and hormonal levels were evaluated. This result shows that CMS is a useful protocol to study late effects of chronic stress in rats.

Although acute immobilization, swimming and cold exposure-stress were capable of inducing subsensitivity to noradrenaline in the isolated right atria (Capaz and De Moraes, 1988; Spadari and De Moraes, 1988), the data obtained in the present study showed that the chronic mild stress protocol did not change the right atria sensitivity to noradrenaline. Bassani and Bassani (1993) also observed no alterations of chronotropic response to noradrenaline in right atria isolated from rats submitted to acute foot shock stress. Thus, the data of the present study confirm that alterations in adrenergic sensitivity are dependent on the characteristics of the stressor. Moreover, since the animals were sacrificed 15 days after stress application, the absence of effects on the chronotropic response to noradrenaline could be explained by tissue adaptation to the stressors. If so, it is not possible to discard the hypothesis that some alteration had occurred and later was reverted during the 15-day interval between the end of stress and atria evaluation.

Although no changes in the cardiac chronotropism were observed, the same stress protocol was able to alter *in vitro* vascular function in the CMS group. CMS induced supersensitivity to phenylephrine in endothelium-intact aorta rings, but not in endothelium-denuded aorta, indicating that CMS effect was endothelium-dependent. Since there was no

difference between groups in the concentration-effect curves obtained in the presence of L-NAME, our data also indicate that stress-induced supersensitivity to phenylephrine seems to be related to a decrease in the nitric oxide (NO) production by the endothelium. Furthermore, considering that the  $pD_2$  values did not differ between the curve obtained in the presence and in the absence of L-NAME in aortic rings from rats submitted to chronic stress, endothelial nitric oxide synthase (eNOS) seems to have been inhibited by some other factor *in vivo*, not related to the addition of L-NAME in the incubation bath.

The data obtained in the present study are partially in agreement with the effects of chronic crowding stress in Wistar and Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) reported by Bernatova *et al.* (2007). Femoral arteries isolated from SHR and Wistar rats submitted to chronic crowding stress during 8 weeks presented higher noradrenaline-induced vasoconstriction, compared with the control group. Moreover, crowding reduced aortic NO synthase activity in the thoracic aorta from SHR rats, without changes in the tissue isolated from Wistar animals. On the other hand, acute immobilization (Cordellini and Vassilieff, 1998) and swimming stress (Moura *et al.*, 2003) seems to increase the production of eNOS in Wistar rats.

NO synthesized by endothelial cells, diffuses across the vascular smooth muscle cell membrane and promotes relaxation in vasculature. This effect is mediated by the increase in the cytosolic levels of cyclic guanosine-3'-5'-monophosphate, which promotes reduction in  $Ca^{++}$  concentration in vascular smooth muscle cell cytosol (Costa and Assreuy, 2005). Thus, NO plays an important role in the regulation of contractile activity. Therefore, a decrease in NO availability may exert a contrary effect of relaxation (Garg and Hassid, 1989). The results obtained in the present study, associated with the above-mentioned studies, showed that stress modulates endothelial nitric oxide synthesis, and that this effect is dependent on stressor quality, intensity and duration, as well as the host's characteristics (animal strain). Therefore the higher NO endothelial production induced by acute stress may have a protective effect on the vascular contractile function. On the other hand the NO synthesis inhibition induced by chronic stress may be associated with vascular dysfunction.

Indeed, the occurrence of functional changes in the thoracic aorta from rats submitted to CMS evidence pathophysiological alterations related to deficiency in nitric

oxide production which is similar to the changes found in hypertensive rats (Johns et al., 2001; Bernatova and Csizmadiova, 2006). According to Grunfeld and Eloy (1987), endogenous glucocorticoids also increase vascular reactivity to noradrenaline and this effect may be inhibited by antiglucocorticoids intervention. High levels of glucocorticoids reduce aortic dilatation in rats, as well as the expression of guanosine triphosphate cyclohydrolase 1 mRNA, which is necessary for the synthesis of tetrahydrobiopterin cofactor BH4 (Mitchel et al., 2003; Mitchel et al., 2004). BH4 participates in the stabilization of the active dimeric form of the eNOS and increases the affinity of eNOS for arginine, culminating in NO synthesis. Therefore BH4 is a co-factor for maximal activity of NO synthase isoforms (Schmidt et al., 1992; Mitchell et al., 2003; Forstermann and Münzel, 2006). The higher levels of corticosterone observed in rats submitted to CMS could explain the supersensitivity of thoracic aorta to phenylephrine, but further studies are necessary in order to confirm this hypothesis.

In the present study, *in vitro* functional changes observed in the thoracic aorta were associated with a significant increase in the aorta endothelium thickness and in aorta tunica media thickness in the CMS group in comparison with the control. These findings are in agreement with Gansburgskii (1985), who observed structural changes, such as hypertrophy of cellular nuclei, increase in the number of strangled nuclei and restorative transformations in tissues adjacent to the endothelium induced by chronic stress in rats. Gordon et al. (1981) also observed accumulation of subendothelial extracellular material and extensions of vascular smooth muscle cell from the media into the subendothelial space in rats submitted to stress by restriction and tail shocks, applied randomly over the 6-hour daily period for 2 weeks. Moreover, Hadjiisky et al., (1987) studying alterations related to atherosclerosis in aorta tunica media of spontaneously hypertensive rats observed an increase in vessel wall thickness, hypertrophy of vascular smooth muscle cells and migration of myocytes through the pores of the first elastic lamina to the subendothelial space. Moreover, Gatto et al., (1987) reported that foot shock stress may promote lipid deposition in the subendothelial space of rat aortas, which could also be associated with the structural changes observed in CMS group of this study.

It has been postulated that one of the functions of endothelium is to maintain the

mitogenic quiescence of vascular smooth muscle cell and nitric oxide also play an important role as modulator of vascular smooth muscle cell growth (Garg and Hassid, 1989). It has also been accepted that nitric oxide mediates the main inhibitory event of vascular smooth muscle cell proliferation through the activation of soluble guanylate cyclase and increase in cGMP levels in cellular cytosol (Costa and Assreuy, 2005). Therefore the lack of nitric oxide facilitates the differentiation of vascular smooth muscle cells (Margariti et al., 2006) and may induce excessive proliferation of these cells (Garg and Hassid, 1989). In this context, it seems reasonable to suggest that CMS-induced inhibition of nitric oxide production evidenced in the concentration-effect curve to phenylephrine obtained in thoracic aorta, could also be related to the aorta hypertrophy induced by CMS observed in the histomorphometric analysis of the present study. Although it could contribute to the increase of blood flow resistance and arterial hypertension, the impact of the morphological changes induced by CMS on arterial blood pressure remains to be studied.

In the present study, there was a significant increase in seric levels of triglycerides (TGL), total cholesterol (TC), low density lipoprotein (LDL) and very low density lipoprotein (VLDL) in rats submitted to CMS compared with control animals.

Some mechanisms can explain the effects of CMS on TGL, TC, VLDL and LDL metabolism observed in the CMS group. Stress leads to increased concentrations of glucocorticoids, catecholamines, and fatty acids in the blood (Black, 2002). Thus, corticosterone and cortisol sensitize adipose tissue to the lipolytic effects of catecholamines with the subsequent release of glycerol and fatty acids (MacCann et al., 1995; Black, 2002). In addition to this, hepatic production of TGL and VLDL increases, due to an agreed action of fatty-acids and cortisol, contributing to the establishment of the so-called hypertriglyceridemia of stress (Brindley et al., 1993). Moreover catecholamines inhibit the action of the lipoprotein lipase, an enzyme capable of increasing removal of TGL from the blood (Brindley and Rolland, 1989; Black, 2002). Thus, hypertriglyceridemia may occur during stress because of the decreased activity of lipoprotein lipase in adipose tissue (Brindley et al., 1993). With regard to the LDL particles, it is well documented that glucocorticoids and catecholamines decrease the degradation of LDL by liver cells

(Brindley & Rolland, 1989), resulting in a delay in the metabolism of LDL and consequently increasing its seric levels. As these particles of LDL carry most of the cholesterol in the bloodstream (Brindley et al., 1993) we can assume that excess corticosterone due to CMS may have delayed the clearance of LDL, resulting in the increase in cholesterol in the blood.

Stress hormones modulate the breakdown of proteins, glycogen, and triglyceride to molecules that can be rapidly metabolized in order to generate energy (Black, 2002), supporting the fight or flight strategy in the face of an aggressive agent. However these metabolic responses are also capable of generating an atherogenic lipid profile including high levels of cholesterol, lipoproteins, TGL, and free fatty acids (Stoney et al., 1999; Black, 2002; Ferreira et al., 2006). It has been demonstrated that electric shocks increase plasma cholesterol concentrations (Berger et al., 1980), and immobilization stress decreases HDL and increases LDL and VLDL blood levels in rats (Bryant *et al.*, 1988). According to these findings, the data of the present study strengthen the hypothesis that chronic stress contributes to unfavorable concentrations of lipoproteins that may predispose to atherosclerosis (Brindley et al., 1993).

HDL exerts a protective effect against atherogenesis (Schmidt et al., 1992), and although no changes in HDL levels were observed in rats submitted to CMS, higher levels of TGL, TC, LDL, VLDL levels were associated with higher atherogenic index values in comparison with the control group. Therefore it seems that the protective effect of HDL was disturbed. The atherogenic index is a parameter for determining the risk of atherosclerosis developing in man (Wakabayashi, 2004) and this index has also been used in rats (Kamgang et al., 2005; Montilla et al., 2005) for the same purpose. As stress may produce an atherogenic lipid profile (Black, 2002), and atherosclerosis is related to vessel stiffening (Taniwaki et al., 1999) and cardiac diseases, this index help us to understand and clarify the role of CMS as a risk factor for cardiovascular diseases.

It is well established that risk factors for atherosclerosis, such as chronic stress, LDL, VLDL (Badimón and Martínez-Gonzalez, 2002) may promote alterations in the endothelial barrier in relation to the contents of blood (Margariti et al., 2006). For instance, the catecholamines are capable of enhancing endothelial permeability to the traffic of

lipoproteins and oxidized lipids (Ross, 1999), causing functional and structural changes in the arterial endothelium (Kao et al, 1995). Moreover, it has been reported that incubation of isolated rabbit aorta with LDL reduced endothelium-dependent relaxation (Jacobs et al., 1990), and LDL reduces guanylate cyclase activation induced by vasodilators, an effect that is an early marker of atherosclerosis (Schmidt et al., 1992). Moreover, it has been shown that LDL decreases the expression of eNOS through a combination of early transcriptional inhibition and post-transcriptional messenger ribonucleic acid (mRNA) destabilization (Lial et al., 1995), and that LDL could oppose the NO vasodilating effect induced by anaerobic training in rats (Cunha et al., 2005). According to these reports, it may be suggested that the increase in LDL levels observed in the CMS group may have contributed to endothelial supersensitivity to phenylephrine and decreased NO production in the thoracic aorta isolated from stressed rats.

In summary, the results of the present study indicate that chronic stress increased *in vitro* vasoconstrictor response of thoracic aorta and induced vascular wall hypertrophy. Since these effects seem to be related to the inhibition of endothelial nitric oxide synthesis production, dyslipidemia and increase in atherogenic index, the authors conclude that chronic mild stress induced proatherosclerotic effects in rats.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank FAPESP for its support (grant 05/060284-6). VJN and RC and MLT were recipient of FAPESP fellowships. RF was recipient of CNPq fellowship. The authors thank Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira – São Paulo State University, for corticosterone radioimmunoassay, and Margery Galbraith for editing the English of the manuscript.

## **REFERENCES**

- Badimón, L. and Martínez-González, J. (2002) Endotelio en la protección vascular: nuevos conocimientos. *Rev. Esp. Cardiol.* **55**, 17-26.
- Bassani, R.A. and Bassani, W.M.J. (1993) Effects of escapable and inescapable foot-shock on rat atrial  $\beta$ -adrenoceptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **44**, 869-875.

- Berger, D.F., Starzed, J.J. and Mason, E.B. (1980) The effects of differential psychological stress on plasma cholesterol levels in rats. *Psychosom. Med.* **42**, 481-492.
- Bernatova, I. and Csizmadiova, Z. (2006) Effect of chronic social stress on nitric oxide synthesis and vascular function in rats with family history of hypertension. *Life Sci.* **78**, 1726-1732.
- Bernatova, I., Csizmadiova, Z., Kopincova, J. and Puzserova, A. (2007) Vascular function and nitric oxide production in chronic social-stress-exposed rats with various family history of hypertension. *J. Physiol. Pharmacol.* **58**, 487-501.
- Black, P.H. (2002) Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. *Brain Behav. Immun.* **16**, 622-653.
- Brindley, D.N., McCann, B.S., Niaura, R., Stoney, C.M. and Suarez, E.C. (1993) Stress and lipoprotein metabolism: Modulators and mechanisms. *Metabolism.* **42**, 3-15.
- Brindley, D.N. and Rolland, Y. (1989) Possible connections between stress, diabetes, obesity, hypertension and altered lipoprotein metabolism that may result in atherosclerosis. *Clin. Sci. (Lond).* **77**, 453-461.
- Bryant, H.U., Story, J.A. and Yim, G.K.W. (1988) Assessment of endogenous opioid mediation in stress-induced hypercholesterolemia in the rat. *Psychosom. Med.* **50**, 576-585.
- Capaz, F.R. and De Moraes, S. (1988) Reduction by acute restraint stress of norepinephrine sensitivity in the isolated rat pacemaker. *Eur. J. Pharmacol.* **147**, 295-298.
- Cordellini, S and Vassilieff, V.S. (1998) Decreased endothelium-dependent vasoconstriction to noradrenaline in acute-stressed rats is potentiated by previous chronic stress: Nitric oxide involvement. *Gen. Pharmac.* **30**, 79-83.
- Costa, R.S.A. and Assreuy, J. (2005) Multiple potassium channels mediate nitric oxide-induced inhibition of rat vascular smooth muscle cell proliferation. *Nitric Oxide.* **13**, 145-151.
- Cunha, T.S., Moura, M.J.C.S., Bernardes, C.F., Tanno, A.P. and Marcondes, F.K. (2005) Vascular sensitivity to phenylephrine in rats submitted to anaerobic training and nandrolone treatment. *Hypertension.* **46**, 1010-1015.
- Ferreira, R., Costa, R., Tramascia, M.L., Neves, V.J. and Marcondes, F.K. (2006) Effects of chronic mild stress on the body weight of rats. *Physiological Mini-Reviews.* **2**, 204.
- Forstermann, U. and Münzel, T. (2006) Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.* **113**, 1708-1714.
- Friedewald, W.T., Levy R.I., Fredrickson, D.S. (1972) Estimation of the concentration of

low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* **18**, 499-502.

Gansburgskii, A.N. (1985) [State of the endothelium of the aorta during chronic stress]. *Arkh. Anat. Gistol. Embriol.* **88**, 38-44.

Garg, U.C. and Hassid, A. (1989) Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* **83**, 1774-1777.

Gatto, L.A., Houck, B.M. and Clancy, K.M. (1987) Morphological aspects of lipid deposition in the aorta of hypertensive and normotensive rats: Effects of electrical foot shock. *Trans. Am. Microsc. Soc.* **106**, 290-301.

Gordon, D., Guyton, J.R. and Karnovsky, M.J. (1981) Intimal Alterations in Rat Aorta Induced by Stressful Stimuli. *Lab. Invest.* **45**, 14-27.

Grunfeld, J.P. and Eloy, L. (1987) Glucocorticoids modulate vascular reactivity in the rat. *Hypertension.* **10**, 608-618.

Hadjiisky, P., Peyri, N. and Gorsogeat, Y. (1987) Tunica media changes in the spontaneously hypertensive rat (SHR). *Atherosclerosis.* **65**, 125-137.

Hauss, W.H., Bauch, H.J. and Schulte, H. (1990) Adrenaline and noradrenaline as possible chemical mediators in the pathogenesis of arteriosclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **598**, 91-101.

Iversen, L.L. and Salt, P.J. (1970) Inhibition of catecholamine uptake<sub>2</sub> by steroids in the isolated rat heart. *Br. J. Pharmacol.* **40**, 528-530.

Iversen, L.L., Salt, P.J. and Wilson, H.A. (1972) Inhibition of catecholamine uptake in isolated rat heart by haloalkylamines related to phenoxybenzamine. *Br. J. Pharmacol.* **46**, 647-657.

Jacobs, M., Plane, F. and Bruckdorfer, K.R. (1990) Native and oxidized low-density lipoproteins have different inhibitory effects on endothelium-derived relaxing factor in the rabbit aorta. *Br. J. Pharmacol.* **100**, 21-26.

Johns, D.G., Dorrance, A.M., Tramontini, N.L. and Webb, R.C. (2001) Glucocorticoids inhibit tetrahydrobiopterin-dependent endothelial function. *Exp. Biol. Med. (Maywood).* **226**, 27-31.

Kamgang, R., Mboumi, R.Y., N'dillé, G.P.R.M. and Yonkeu, J.N. (2005) Cameroon local diet-induced glucose intolerance and dyslipidemia in adult wistar rat. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **69**, 224-230.

- Kao, C.H., Chen, J.k., Kuo, J.S. and Yang, V.C. (1995) Visualization of the transport pathways of low density lipoproteins across the endothelial cells in the branched regions of rat arteries. *Atherosclerosis*. **116**, 27-41.
- Karnovsky, M.J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* **27**, 137A.
- Kumari, M., Grahame-Clarke, C., Shanks, N., Marmot, M., Lightman, S. and Vallance, P. (2003) Chronic stress accelerates atherosclerosis in the apolipoprotein E deficient mouse. *Stress*. **6**, 297-299.
- Liao, J.K., Shin, W.S., Lee, W.Y. and Clark, S.L. (1995) Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **270**, 319-324.
- Luft, J.H. (1961) Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 409.
- Margariti, A., Zeng, L. and Xu, Q. (2006) Stem cells, vascular smooth muscle cells and atherosclerosis. *Histol. Histopathol.* **21**, 979-985.
- McCann, B.S., Magee, M.S., Broyles, F.C., Vaughan, M., Albers, J.J. and Knopp, R.H. (1995) Acute psychological stress and epinephrine infusion in normolipidemic and hyperlipidemic men: effects on plasma lipid and apoprotein concentrations. *Psychosom. Med.* **57**, 165-176.
- Mitchell, B.M., Dorrance, A.M. and Webb, R.C. (2003) GTP cyclohydrolase 1 downregulation contributes to glucocorticoid hypertension in rats. *Hypertension*. **41**, 669-674.
- Mitchell, B.M., Dorrance, A.M., Mack, E.A. and Webb, R.C. (2004) Glucocorticoids decrease GTP cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin-dependent vasorelaxation through glucocorticoid receptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **43**, 8-13.
- Montilla, P., Barcos, M., Muñoz, M.C., Bujalance, I., Muñoz-Castañeda, J.R. and Tunez, I. (2005) Red wine prevents brain-oxidative stress and nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Biochem. Mol. Biol.* **38**, 539-544.
- Moreau, J.L., Jenck, F., Martin, J.R., Perrin, S. and Haefely, W.E. (1993) Effects of repeated mild stress and two antidepressant treatments on the behavioral response to 5HT<sub>1C</sub> receptor activation in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. **110**, 140-144.
- Moreau, J.L. (1997) Validation of an animal model of anhedonia, a major symptom of depression. *Encephale*. **23**, 280-289.
- Moura, M.J.C.S. and Marcondes, F.K. (2001) Influence of estradiol and progesterone on the sensitivity of rat thoracic aorta to noradrenaline. *Life Sci.* **68**, 881-888.

Moura, M.J.C.S., Quintal, M.M. and Marcondes, F.K. (2003) A natação forçada induz subsensibilidade à fenilefrina em aorta torácica de rato. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. **39**, 433-439.

Ross, A. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **340**, 115-126.

Salt, P.J. (1972) Inhibition of noradrenaline uptake<sub>2</sub> in the isolated rat heart by steroids, clonidine and methoxylated phenylethylamines. *Eur. J. Pharmacol.* **20**, 329-40.

Schmidt, K., Werner, E.R., Mayer, B., Wachter, H. and Kukovetz, W.R. (1992) Tetrahydrobiopterin-dependent formation of endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) in aortic endothelial cells. *Biochem. J.* **281**, 297-300.

Spadari, R.C. and De Moraes, S. (1988) Repeated swimming stress and responsiveness of the isolated rat pacemaker to the chronotropic effect of noradrenaline and isoprenaline: Role of adrenal corticosteroids. *Gen. Pharmacol.* **19**, 553-557.

Stoney, C.M., Niaura, R., Bausserman, L. and Matacin, M. (1999) Lipid reactivity to stress: I. Comparison of chronic and acute stress responses in middle-aged airline pilots. *Health. Psychol.* **18**, 241-250.

Taniwaki, H., Kawagishi, T., Emoto, M., Shoji, T., Kanda, H., Maekawa, K., Nishizawa, Y and Morii, H. (1999) Correlation between the intima-media thickness of the carotid artery and aortic pulse-wave velocity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* **22**, 1851-1857.

Tanno, A.P., Bianchi, F.J., Moura, M.J.C.S. and Marcondes, F.K. (2002) Atrial supersensitivity to noradrenaline in stressed female rats. *Life Sciences.* **71**, 2973-2981.

Wakabayashi, I. (2004) Effects of age on relationship of alcohol drinking and obesity to atherosclerosis risks. *Geriatrics and Gerontology International.* **4**, S292-S295.

Wakabayashi, I. and Kobaba-Wakabayashi, R. (2002) Effects of age on relationship between drinking and atherosclerotic risk factors. *Gerontology.* **48**, 151-156.

## **CAPÍTULO 2**

Efeitos vasculares da associação entre estresse crônico e dieta hipercalórica em ratos. Neves VJ, Moura MJCS, Tamascia ML, Ferreira R, Costa R, Romani EAON, Bernardes CF, Novaes PD, Marcondes FK.

**Neste capítulo, discutimos alterações funcionais e estruturais vasculares, bem como as alterações lipídicas, que ocorrem em ratos alimentados com dieta controle e hipercalórica submetidos a estresse crônico.**

Este artigo refere-se aos dados obtidos no presente estudo e será submetido para publicação em periódico internacional indexado, após as sugestões da banca examinadora e tradução do texto para a língua inglesa. Como esta dissertação ficará disponível na Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP/UNICAMP, optamos por apresentar o segundo capítulo em português, o que facilitará sua consulta por pesquisadores iniciantes.

Efeitos vasculares da associação entre estresse crônico e dieta hipercalórica em ratos.

Neves VJ<sup>1</sup>, Moura MJCS<sup>2</sup>, Tamascia ML<sup>1</sup>, Ferreira R<sup>1</sup>, Costa R<sup>1</sup>, Montemor PL<sup>2</sup>, Romani EAON<sup>1</sup>, Bernardes CF<sup>2</sup>, Novaes PD<sup>1</sup>, Marcondes FK<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba - SP, Brasil.

<sup>2</sup>Centro de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Campinas - SP, Brasil.

**\* Autor para correspondência:**

Departamento de Ciências Fisiológicas  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Universidade Estadual de Campinas  
Av. Limeira, 901 - Vila Areião  
13414-903. Piracicaba -SP, Brasil  
E-mail: fklein@fop.unicamp.br  
Phone/Fax: + 55 19 2106 5380/ 2106 5212

Palavras-chave: estresse, dieta hipercalórica, aorta, endotélio, lipídeos, ratos.

## RESUMO

Considerando que distúrbios cardiovasculares e dislipidemias associados ao estresse constituem um importante problema de saúde pública e demandam estudos para a compreensão dos mecanismos envolvidos nas alterações fisiológicas deles decorrentes, e que estudos em animais representam uma importante ferramenta experimental complementar aos estudos em humanos, nossa proposta foi estudar os efeitos vasculares e metabólicos da associação entre estresse crônico e dieta hipercalórica em ratos. Foram utilizados ratos Sprague-Dawley com 2 meses de idade no início do experimento, divididos em 4 grupos experimentais: 1) Dieta Controle, 2) Dieta Hipercalórica, 3) Dieta Controle + Estresse e 4) Dieta Hipercalórica + Estresse. Nos grupos submetidos a estresse, a aplicação dos estímulos estressores foi realizada nas semanas 3, 4 e 5, segundo o modelo de estresse crônico moderado e imprevisível. Quinze dias após a aplicação do estresse, os animais foram sacrificados para avaliação da adiposidade, sensibilidade vascular *in vitro* à fenilefrina, para análises histológicas da aorta torácica e dosagens sanguíneas de lipídios e corticosterona. Com relação à adiposidade, foi observada redução da razão gordura visceral/peso corporal em ratos alimentados com dieta controle e submetidos a estresse crônico, e efeito contrário, com aumento deste parâmetro, em ratos alimentados com dieta hipercalórica e submetidos ao mesmo protocolo de estresse, em relação aos respectivos grupos alimentados com a mesma dieta e não submetidos a estresse. O estresse crônico aumentou a concentração sanguínea de corticosterona, colesterol total e lipoproteína de baixa densidade (LDL), e induziu supersensibilidade à fenilefrina e aumento na espessura do endotélio e da camada média na aorta torácica de ratos alimentados com dieta controle ou com dieta hipercalórica, em relação aos respectivos grupos não submetidos a estresse. Porém, em animais alimentados com dieta controle, o estresse crônico induziu aumento na concentração sérica de triglicérides e de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), sem alteração em ratos alimentados com dieta hipercalórica. Os resultados obtidos mostram que o efeito da dieta hipercalórica sobre o acúmulo de gordura corporal foi potencializado pelo estresse crônico, e que o estresse crônico induziu respostas vasculares, pró-ateroscleróticas, relacionadas à inibição da síntese de óxido nítrico endotelial e à elevação da concentração sérica de LDL.

## INTRODUÇÃO

A associação de fatores de risco para doenças cardiovasculares causa hoje grande preocupação nos órgãos de Saúde Pública em vários países do mundo (Lopes, 2004). Somente os fatores de risco convencionais como altas taxas de colesterol e hipertensão arterial não nos permitem explicar plenamente as alterações fisiopatológicas que levam à aterosclerose, sugerindo a necessidade de investigações adicionais sobre outros fatores de risco para tal doença (Kumari *et al.*, 2003). Quando crônico, o estresse pode promover injúrias no endotélio vascular, no qual células inflamatórias se aderem e translocam a parede arterial (Black, 2002), iniciando ou contribuindo com o processo aterogênico. E, em aproximadamente 40% dos casos nos quais não são identificados outros fatores causais conhecidos, o estresse parece ser o único fator de risco para a aterogênese (Rozanski *et al.*, 1999; Ross, 1999; Black & Garbutt, 2002).

A aterosclerose é uma lesão complexa da parede vascular, que afeta, essencialmente, a camada íntima da artéria (Duque, 1998). Há evidências de que a aterosclerose resulta de processos inflamatórios crônicos e que a maioria dos hormônios do estresse podem induzir a fase aguda da resposta inflamatória, que é similar à resposta do organismo frente a invasões de microorganismos ou traumas substanciais (Black, 2003). Além disso, o consumo de dietas hipercalóricas, por estar relacionado ao desenvolvimento de obesidade e gerar perfil lipídico aterogênico (Stoney *et al.*, 1999; Black, 2002; Ferreira *et al.*, 2006), é um fator de risco capaz de iniciar ou contribuir para o progresso da aterosclerose. Desta forma, estudar o efeito de dietas hipercalóricas em associação ao estresse crônico é de grande importância para se determinar o grau de influência destas duas variáveis sobre a função e estrutura vascular. Neste contexto, para ampliar informações obtidas em estudos clínicos, a respeito dos efeitos do estresse e de dietas hipercalóricas sobre a gênese da obesidade e da aterosclerose, modelos animais têm sido utilizados por permitirem aos pesquisadores reduzir o número de variáveis experimentais.

Durante a reação de estresse, a elevação dos níveis de glicorticóides e catecolaminas promove respostas cardiovasculares e metabólicas que visam permitir ao organismo adaptar-se ao estímulo estressor. Dentre estas, podem ser citadas o aumento do cronotropismo e inotropismo cardíaco, alterações do tônus vascular e a liberação de

substratos energéticos na corrente sanguínea a partir das reservas orgânicas armazenadas no tecido hepático e adiposo. Porém quando tais respostas são mantidas por tempo prolongado, em situações de estresse crônico, efeitos deletérios podem ser observados, tais como a ocorrência de hipertensão arterial e dislipidemia, a médio ou longo prazo.

A modulação da sensibilidade dos diferentes tecidos orgânicos às catecolaminas também contribui para que a estimulação adrenérgica seja eficiente para garantir a manutenção da homeostasia. Ratos submetidos a estresse agudo por sessão única de natação (Spadari & De Moraes, 1988; Tanno *et al.*, 2002) apresentaram supersensibilidade da resposta cronotrópica às catecolaminas. Por outro lado, animais submetidos a três sessões de estresse por natação desenvolveram subsensibilidade da resposta cronotrópica e vasoconstritora às catecolaminas, respectivamente, em átrio direito (Spadari & De Moraes, 1988; Marcondes *et al.*, 1996) e aorta isolada (Moura *et al.*, 2003). Porém não há dados na literatura sobre os efeitos do estresse crônico na sensibilidade vascular às catecolaminas.

Considerando-se que o protocolo experimental de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) é um modelo validado na literatura por não permitir a adaptação de ratos à aplicação repetida de estímulos estressores, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos, a médio prazo, da associação entre ECMI e dieta hipercalórica sobre o metabolismo lipídico e a estrutura e função vasculares de ratos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Delineamento Experimental**

Foram utilizados ratos machos Sprague-Dawley com 2 meses de idade, pesando entre 300 e 350 g no início do experimento, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram alojados em gaiolas individuais e em sala climatizada ( $22 \pm 2$  °C), com ciclo claro/escuro de 12/12 h (luzes acendendo às 06:00 h). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Processo CEEA nº 900-1) de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: Dieta controle (DC),

Dieta Hipercalórica (DH), Dieta controle + Estresse (DCE) e Dieta Hipercalórica + Estresse (DHE). Após uma semana de adaptação ao biotério de experimentação, os animais foram analisados durante 7 semanas. Como dieta controle, foi utilizada a dieta comercial Labina-Purina<sup>®</sup>, composta por 17% de proteínas, 72% de carboidratos e 11% de gorduras. A dieta hipercalórica foi sintetizada por empresa da área de nutrição animal (Nutriexperimental), com a seguinte composição: 17% de proteínas, 51% de carboidratos e 32% de gorduras (Farley *et al.*, 2003). O peso corporal dos animais e o comprimento naso-anal foram avaliados semanalmente para determinar o índice de Lee (g/cm) (índice de obesidade) pela fórmula: Raiz cúbica do peso corporal/comprimento naso-anal (Bernardis, 1970; Diniz *et al.*, 2006).

Nos grupos submetidos a estresse, as aplicações dos estímulos estressores foram realizadas nas semanas 3, 4 e 5 do período experimental. Nas 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> semanas os animais foram submetidos somente aos procedimentos relacionados à limpeza e alimentação. Os ratos foram mortos, por decapitação, 15 dias após o fim da aplicação do ECMI, no início da 8<sup>a</sup> semana. O sangue foi coletado para posterior dosagem de corticosterona e lipídeos. A aorta torácica foi isolada para análises funcionais *in vitro* e histológicas. As gorduras epididimal e perirenal foram extraídas e pesadas, e a adiposidade foi calculada pela soma resultante dos pesos das mesmas para posterior avaliação da relação gordura/peso corporal.

### **Protocolo de Estresse**

Nas 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> semanas do período experimental, os animais foram submetidos ao protocolo de ECMI, modificado a partir da metodologia descrita por Moreau *et al.*, (1993) e Moreau (1997). O protocolo de ECMI consiste na aplicação de diferentes estímulos estressores ao longo de 7 dias, repetindo-se os procedimentos por 3 semanas consecutivas, conforme está detalhado na tabela 1. As adaptações em relação ao protocolo original descrito por Moreau *et al.*, (1993) e Moreau (1997) foram as seguintes:

- a) O confinamento em espaço restrito foi substituído por imobilização;
- b) A exposição dos animais a garrafas de água vazias, após jejum de 18 horas, foi realizada por 2 horas e não 1 hora;

- c) O agrupamento dos animais em gaiolas com maravalha suja e úmida, por 18 horas, foi substituído por maravalha úmida, sem agrupamento dos animais.
- d) Neste trabalho, não foi realizada a auto-estimulação utilizada por Moreau *et al.*, (1997). (A auto-estimulação é uma técnica utilizada para estudar estados motivacionais e hedônicos em ratos e baseia-se no implante de eletrodos em áreas do cérebro relacionadas aos mecanismos de recompensa).

**Tabela 1.** Protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível.

	Manhã	Tarde
Segunda-feira	8:00 - 9:00 h: imobilização	13:00-14:00 h: Imobilização 18:00 h: Iluminação contínua durante a noite
Terça-feira	8:00 - 9:00 h: imobilização	14:00 h: 1 hora de imobilização seguida de privação de água e comida durante 18 horas
Quarta-feira	8:00 - 10:00 h: Acesso restrito a comida por 2 horas.	13:00 h: 1 hora de imobilização seguida de privação de água durante 18 horas
Quinta-feira	8:00 - 10:00 h: Exposição a garrafas de água vazias. 11:00 - 12:00 h: Imobilização	14:00 - 15:00 h: Imobilização 18:00 h: Pernoite em gaiolas com maravalha úmida
Sexta-feira	8:00 - 9:00 h: imobilização	18:00 h: Ciclo claro/escuro invertido (até 08:00 h da segunda-feira seguinte)

### Curvas concentração-efeito à fenilefrina em aorta torácica isolada

A aorta torácica foi cuidadosamente isolada para preservação do endotélio. Do terço medial de cada aorta foram obtidos dois anéis (3-5 mm). Em um deles, a superfície interna foi delicadamente massageada para remoção do endotélio. Os anéis foram montados sob 2 g de tensão inicial, em câmara para órgão isolado, contendo 20 mL de solução de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição [mM]: NaCl 115.0; KCl 4.7; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2.5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 2.5; NaHCO<sub>3</sub> 25.0; glicose 11.0; ácido ascórbico 0.11. Este último foi adicionado para diminuir a oxidação das catecolaminas durante a obtenção das curvas concentração-efeito (CCE). O líquido de incubação foi borbulhado continuamente com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> e a temperatura foi mantida a 36.5 ± 0.1 °C, com auxílio de uma bomba de perfusão (Moura & Marcondes, 2001; Cunha *et al.*, 2005).

Antes da adição de qualquer substância, os anéis da aorta torácica permaneceram no banho para equilíbrio por 60 min e a solução de Krebs foi trocada a cada 15 min (Moura

& Marcondes, 2001). Após o equilíbrio, a presença do endotélio foi comprovada fisiologicamente pela indução de relaxamento com a adição de acetilcolina ( $10^{-6}$  M) em anéis pré-contraídos com fenilefrina ( $10^{-7}$  M). Foi considerado que o endotélio estava presente nos anéis que apresentaram 100% de relaxamento. Dentre os anéis que tiveram a superfície interna massageada, a ausência total de resposta à acetilcolina confirmou a ausência de endotélio. Anéis que não atenderam a estes critérios, apresentando algum grau de relaxamento inferior a 100%, foram descartados. Após a avaliação funcional da integridade do endotélio, os anéis foram lavados e mantidos para nova estabilização por um período de 45 min, com troca de solução de Krebs-Henseleit a cada 15 min (Moura & Marcondes, 2001; Cunha *et al.*, 2005).

Após o período de reequilíbrio acima descrito, uma CCE à fenilefrina foi obtida em cada anel, com e sem endotélio. As CCE foram obtidas de acordo com o método cumulativo (Van Rossum, 1963), com incrementos da concentração molar de 0.5 unidade logarítmica. O efeito máximo foi determinado quando três concentrações sucessivas e crescentes do agonista não alteraram a resposta obtida com a concentração imediatamente anterior. Ao final do experimento, os anéis foram pesados. As respostas foram expressas em gf/100 mg de tecido (Moura & Marcondes, 2001; Cunha *et al.*, 2005).

Para avaliação do papel do óxido nítrico, derivado do endotélio, sobre as alterações de sensibilidade à fenilefrina, anéis com endotélio intacto de aortas de outros animais, submetidos aos mesmos tratamentos, foram preparados como descrito acima. Após incubação, por 40 min, com  $N^G$ -L-Arginina-metil-éster (L-NAME,  $10^{-5}$  M), um inibidor da óxido nítrico sintase, uma CCE à fenilefrina foi obtida em cada anel (Cunha *et al.*, 2005).

As CCE foram analisadas por regressão não linear, usando-se o programa GraphPAD prism (San Diego, CA, USA – Licença G3-A 14920-830) de acordo com a equação  $E = E_{max}/((1+(10^c/10^x)^n) + \Phi)$ , onde E representa o aumento na resposta contrátil induzida pelo agonista;  $E_{max}$  é o efeito máximo do agonista; c é o logaritmo da concentração do agonista que produz 50% do  $E_{max}$ ; n representa o coeficiente angular e  $\Phi$ , o efeito na ausência do agonista. A sensibilidade da aorta foi avaliada pela determinação do valor  $pD_2$ , que corresponde ao logaritmo negativo da concentração molar do agonista que determina

um efeito igual a 50% da resposta máxima (CE<sub>50</sub>) em experimentos individuais (Miller *et al.*, 1948).

### **Análises Histológicas**

O terço inferior da aorta torácica, 5 mm acima do diafragma, foi removido de cada animal, seccionado em fragmentos de 1 mm de comprimento e estes foram colocados em fixador de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 6 horas a 4 °C. Após a fixação, os fragmentos foram lavados em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.3 e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.3, por 2 hora em temperatura ambiente. As amostras foram, então, desidratadas em soluções com concentrações crescentes de acetona 50%, 70%, 90% e finalmente foram feitas 3 trocas em acetona pura. Os fragmentos foram embebidos e incluídos em resina Araidite 502 (Luft, 1961) e polimerizados por 48 horas em estufa a 60 °C. Cortes semi-finos (1 µm de espessura) foram obtidos utilizando um ultramicrotomo MT2B Sorvall® Porter Blum com navalhas de vidro (intervalo de 10 µm entre as secções). As secções foram coradas com azul de toluidina 0.5% em borato de sódio 1% por 50 segundos e na seqüência foram coradas com fuccina básica 1% por 30 segundos. Foram obtidas 5 secções de cada aorta, de 5 animais por grupo, totalizando 25 secções em cada grupo estudado para serem analisadas em microscopia de luz.

O diâmetro interno e as espessuras do endotélio e da camada média da aorta torácica foram medidos em um fotomicroscópio (Carl Zeiss, West Germany) conectado a uma ocular milimetrada (Ernest Leitz, Wetzlar, Germany, 12.5x), usando-se uma régua milimetrada (Carl Zeiss 5+<sup>100</sup>/<sub>100</sub> mm) para calibração. De cada secção foram feitas 3 medidas do maior diâmetro e 3 do menor diâmetro para determinar a média do diâmetro interno do vaso. Para estas medidas foram usadas uma lente objetiva 1x e optovar 1.6x e os resultados foram obtidos em mm. Também, de cada secção foram feitas 24 medidas para calcular a espessura do endotélio e 24 medidas para calcular a espessura da camada média do vaso. Para as medidas da espessura do endotélio foram usadas uma lente objetiva 100x e optovar 1.6x e os limites do endotélio foram considerados entre a superfície luminal e a lâmina elástica interna. Para as medidas da camada média foram usadas uma lente objetiva 10x e optovar 2.0x e as lâminas elásticas interna e externa foram consideradas os limites da

camada média. Os resultados da espessura do endotélio e da camada média do vaso foram indicados em  $\mu\text{m}$ .

### **Dosagens Bioquímicas e Índice Aterogênico**

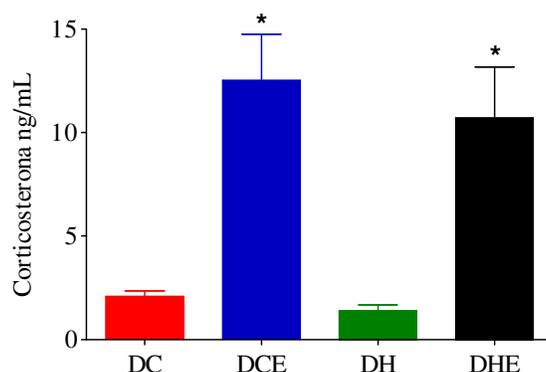
A concentração plasmática de corticosterona foi determinada pelo método enzimático-colorimétrico, através do uso de kit comercial Assay Designs<sup>®</sup>. Colesterol total (CT) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) foram determinadas pelo mesmo método utilizando-se kits comerciais Laborlab<sup>®</sup>. Os níveis séricos de triglicerídeos (TGL) foram determinados pelo método enzimático-colorimétrico, por meio do uso de kits comerciais CELM<sup>®</sup> e os níveis séricos de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) foram determinados a partir dos TGL, conforme descrito pelo kit CELM<sup>®</sup> (TGL/5). A concentração sérica de lipoproteína de baixa densidade (LDL) foi determinada pela fórmula de Friedewald:  $\text{LDL} = \text{CT} - \text{HDL} - (\text{TGL} \times 0.2)$  (Friedwald *et al.*, 1972; Wakabayashi & Kobaba-Wakabayashi, 2002). O índice aterogênico (IA) foi determinado pela fórmula:  $\text{IA} = \text{CT} - \text{HDL}/\text{CT}$  de acordo com Kangang *et al.* (2005).

### **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As diferenças estatísticas foram determinadas por Análise de Variância Bifatorial (ANOVA) seguida de Teste de Tukey para comparações múltiplas de médias. Valores de  $p$  menores que 0.05 foram indicativos de significância estatística. Os resultados foram apresentados como médias  $\pm$  erros-padrão das médias.

## RESULTADOS

A Figura 1 mostra significativo aumento na concentração plasmática de corticosterona, 15 dias após o fim da aplicação do protocolo de ECMI, nos grupos submetidos a estresse ( $p < 0,05$ ), em relação aos respectivos grupos alimentados com a mesma ração e não submetidos a estresse.



**Figura 1:** Concentração plasmática de corticosterona, 15 dias após o término de aplicação do protocolo de estresse crônico, em ratos alimentados com dieta controle ou hipercalórica, submetidos, ou não, a estresse. DC – Dieta Controle; DCE – Dieta Controle + Estresse; DH – Dieta Hipercalórica; DHE – Dieta Hipercalórica + Estresse. \*Diferença significativa em relação ao grupo alimentado com a mesma dieta, não submetido a estresse ( $p < 0,05$ ; ANOVA bifatorial + Tukey). N=7-9/grupo.

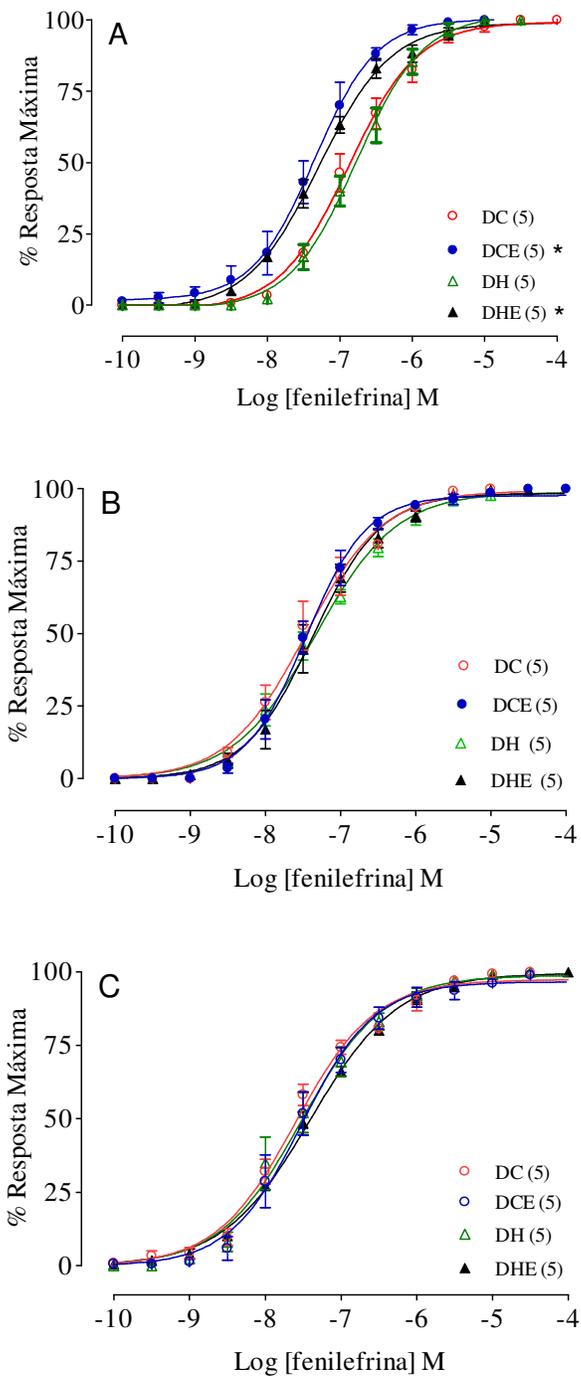
Com relação às análises realizadas na aorta torácica, os tratamentos realizados não modificaram o peso seco dos anéis aórticos obtidos ( $p > 0,05$ ; ANOVA bifatorial + Tukey; Tabela 2) e não induziram alteração significativa nos valores de resposta máxima à fenilefrina entre os quatro grupos, nas curvas concentração–efeito obtidas em anéis com endotélio intacto, anéis sem endotélio ou em anéis analisados em presença do inibidor da síntese de óxido nítrico, L-NAME ( $p > 0,05$ ; ANOVA bifatorial + Tukey; Tabela 2). Como não houve alteração de resposta máxima ao agonista utilizado, as curvas concentração–efeito estão apresentadas em porcentagem de resposta máxima na Figura 2. O estresse induziu supersensibilidade à fenilefrina, em anéis aórticos com endotélio intacto, no grupo DCE em relação ao grupo DC, e no grupo DHE em relação ao grupo DH, com deslocamentos significativos à esquerda nas curvas concentração–efeito ( $p < 0,01$ ; ANOVA bifatorial + Tukey; Figura 2A), sem diferença nas curvas concentração–efeito obtidas em

anéis aórticos sem endotélio (Figura 2B) ou na presença de L-NAME ( $p > 0,05$ ; ANOVA bifatorial + Tukey; Figura 2C).

**Tabela 2:** Peso seco (PS - mg), resposta máxima (RM - gf/100 mg de tecido) e potência ( $pD_2$ ) da fenilefrina, em anéis de aorta torácica isolada de ratos alimentados com dieta controle ou hipercalórica, submetidos, ou não, ao protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível.

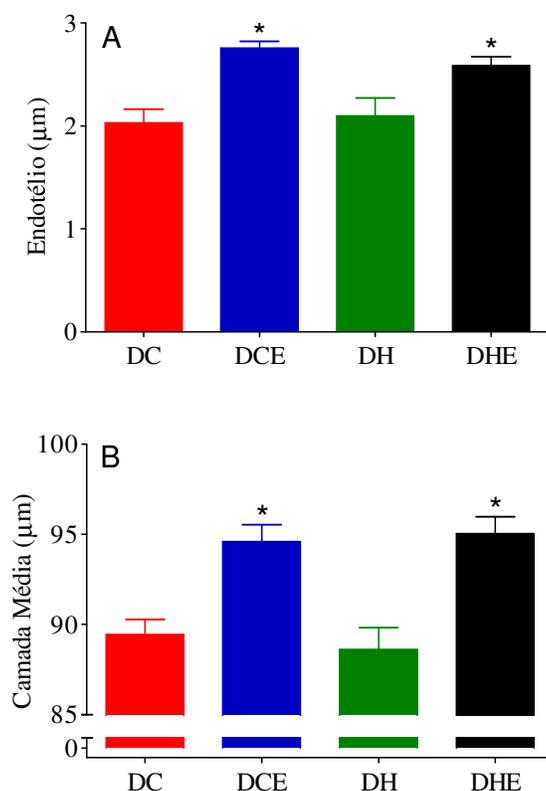
	Grupos	n	PS	RM	$pD_2$
DC	Com Endotélio	5	107,8 ± 6,63	10,30 ± 1,79	6,85 ± 0,11
	Sem Endotélio	5	95,20 ± 5,85	10,51 ± 2,50	7,64 ± 0,14
	L-NAME	5	93,00 ± 3,73	11,66 ± 2,80	7,62 ± 0,07
DCE	Com Endotélio	5	97,00 ± 2,55	13,59 ± 1,86	7,42 ± 0,20*
	Sem Endotélio	5	105,8 ± 3,60	8,96 ± 1,47	7,46 ± 0,12
	L-NAME	5	97,80 ± 2,65	10,22 ± 1,92	7,52 ± 0,14
DH	Com Endotélio	5	104,60 ± 5,93	8,03 ± 0,949	6,75 ± 0,10
	Sem Endotélio	5	96,60 ± 5,02	10,88 ± 2,185	7,33 ± 0,09
	L-NAME	5	98,00 ± 9,46	11,51 ± 1,675	7,54 ± 0,17
DHE	Com Endotélio	5	107,60 ± 3,12	12,27 ± 2,906	7,26 ± 0,07*
	Sem Endotélio	5	97,60 ± 5,71	13,35 ± 1,805	7,38 ± 0,14
	L-NAME	5	106,60 ± 4,86	12,47 ± 1,500	7,40 ± 0,04

DC – Dieta Controle; DCE – Dieta Controle + Estresse; DH – Dieta Hipercalórica; DHE – Dieta Hipercalórica + Estresse. n = número de animais/grupo.  $pD_2$  = logaritmo negativo da concentração molar do agonista que produz 50% da resposta máxima. Os valores foram indicados pelas médias ± os erros-padrão das médias. \*Diferença significativa em relação ao grupo alimentado com a mesma dieta, não submetido a estresse ( $p < 0,05$ ; ANOVA bifatorial + Tukey).



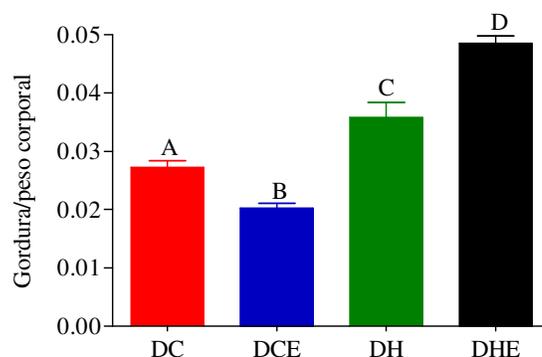
**Figura 2:** Curvas concentração-efeito à fenilefrina obtidas em anéis com endotélio (A), sem endotélio (B) e com endotélio, na presença de L-NAME (C), de aorta torácica isolada de ratos alimentados com dieta controle ou hipercalórica, submetidos, ou não, ao protocolo de estresse crônico, moderado e imprevisível. DC – Dieta Controle; DCE – Dieta Controle + Estresse; DH – Dieta Hipercalórica; DHE – Dieta Hipercalórica + Estresse \*Diferença significativa em relação ao grupo alimentado com a mesma dieta, não submetido a estresse ( $p < 0,01$ ; ANOVA bifatorial + Tukey). N=5/grupo.

O estresse promoveu aumento significativo na espessura do endotélio vascular em aorta torácica isolada de ratos alimentados com dieta controle ou dieta hiperacalórica, e submetidos a estresse (DCE, DHE), em relação aos respectivos grupos alimentados com a mesma dieta e não submetidos a estresse (DC, DH) ( $p < 0,01$ ; ANOVA bifatorial + Tukey; Figura 3A). O protocolo de estresse crônico utilizado também induziu aumento significativo na espessura da camada média vascular, em aorta torácica isolada de animais do grupo DCE em relação ao grupo DC, e do grupo DHE em relação ao grupo DH ( $p < 0,01$ ; ANOVA bifatorial + Tukey; Figura 3B). Não houve diferença significativa no diâmetro interno da aorta torácica, entre os grupos estudados: DC=1.558±0.0292 mm; DCE=1.490±0.0385 mm; DH=1.560±0.0261 mm; DHE=1.584±0.0287 mm ( $p > 0,05$ ; ANOVA bifatorial + Tukey).



**Figura 3:** Espessura do endotélio e da camada média de aorta torácica isolada de ratos alimentados com dieta controle ou hiperacalórica, submetidos, ou não, ao protocolo de estresse crônico, moderado e imprevisível. DC – Dieta Controle; DCE – Dieta Controle + Estresse; DH – Dieta Hiperacalórica; DHE – Dieta Hiperacalórica + Estresse. \*Diferença significativa em relação ao grupo alimentado com a mesma dieta, não submetido a estresse ( $p < 0,01$ ; ANOVA bifatorial + Tukey). N=5/grupo.

Na Figura 4, observa-se que a dieta hipercalórica promoveu aumento da relação gordura/peso corporal, o que foi evidenciado pela diferença observada entre os grupos DH e DC, bem como entre os grupos DHE e DCE. Porém, como a análise de variância mostrou interação significativa entre os fatores dieta e estresse ( $p < 0,05$ ), foi observado que o efeito do estresse foi dependente da dieta utilizada. Ratos estressados e alimentados com dieta controle (DCE) apresentaram redução da gordura/peso corporal em relação ao respectivo grupo não submetido a estresse (DC). Ao contrário, em animais alimentados com dieta hipercalórica, o estresse induziu aumento da relação gordura/peso corporal (DHE x DH) ( $p < 0,05$ ; Figura 2). Não foram observadas diferenças significativas, entre os grupos, no índice de Lee: DC=0.2890±0.0023; DCE=0.2895±0.0008; DH=0.2897±0.0017; DHE=0.2934±0.0018 ( $p > 0,05$ ; ANOVA bifatorial + Tukey).



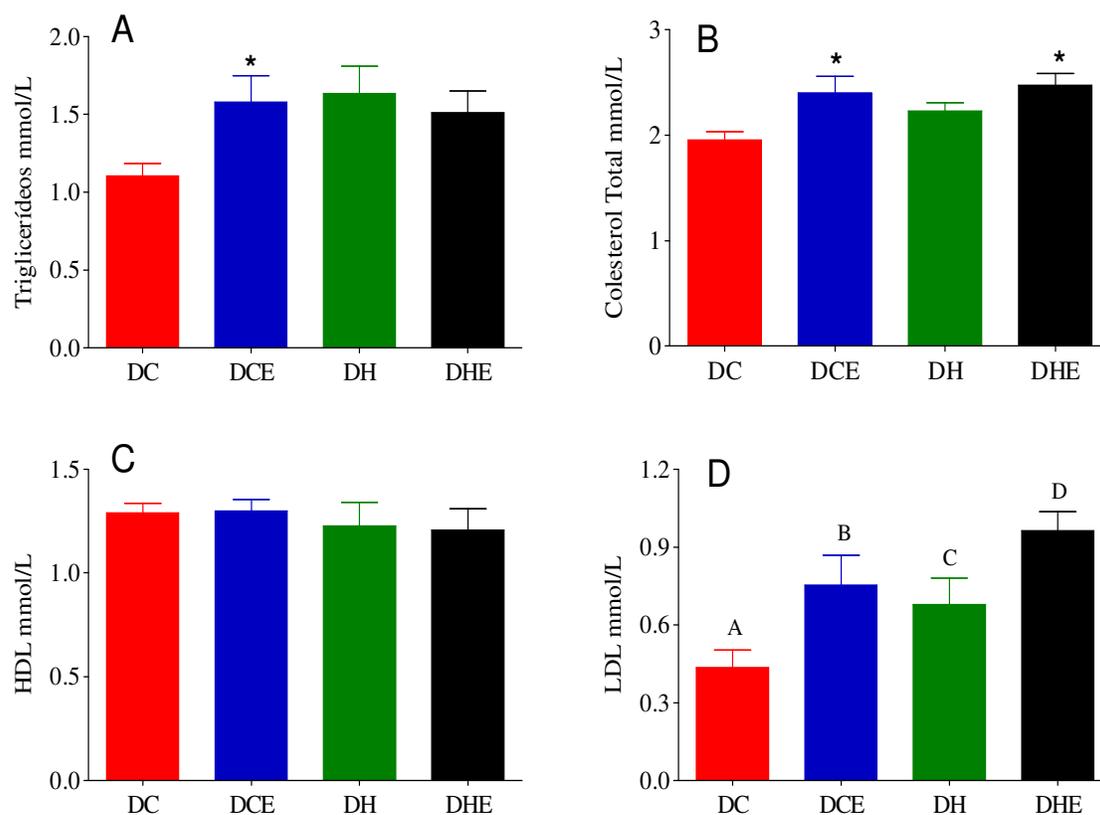
**Figura 4:** Razão entre adiposidade (gordura epididimal + gordura perirenal) e peso corporal, 15 dias após o término de aplicação do protocolo de estresse crônico, em ratos alimentados com dieta controle ou hipercalórica, submetidos ou não a estresse. DC – Dieta Controle; DCE – Dieta Controle + Estresse; DH – Dieta Hipercalórica; DHE – Dieta Hipercalórica + Estresse. Letras diferentes indicam grupos significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ; ANOVA bifatorial + Tukey). N= 8-10/grupo.

Com relação às concentrações séricas de triglicerídeos (Figura 3A), houve interação significativa entre os fatores dieta e estresse ( $p = 0,028$ ) e o pós-teste (Tukey), para comparação múltipla das médias, evidenciou aumento significativo nas concentrações de triglicerídeos no grupo DCE em relação ao grupo DC ( $p < 0,05$ ; Figura 3A), sem diferença entre os grupos alimentados com dieta hipercalórica.

Houve aumento significativo na concentração sérica de colesterol total, nos grupos submetidos a estresse, em relação aos respectivos grupos alimentados com a mesma dieta e

não submetidos a estresse ( $p < 0,05$  - Figura 3B), sem diferença nas concentrações séricas de HDL ( $p > 0,05$ ; ANOVA bifatorial + Tukey; Figura 3C).

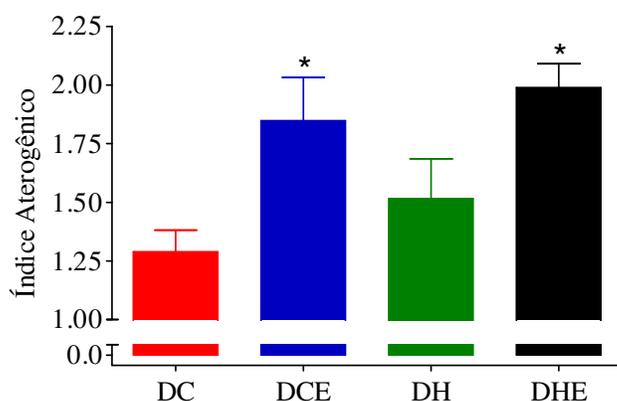
Com relação às concentrações séricas de LDL, os fatores dieta e estresse foram significativos ( $p = 0,018$ ,  $p = 0,002$ , respectivamente), sem a ocorrência de interação entre os mesmos. Desta forma observa-se, na Figura 3D, que ratos alimentados com dieta hipercalórica (DH) apresentaram elevação das concentrações séricas de LDL em relação ao grupo alimentado com dieta controle (DC) ( $p < 0,05$ ; Figura 3D). E ratos submetidos ao protocolo de ECMI apresentaram maiores concentrações séricas de LDL em relação aos respectivos grupos não submetidos a estresse, independentemente da dieta recebida ( $p < 0,05$ ; Figura 3D).



**Figura 5:** Concentração sérica de triglicerídeos (A), colesterol total (B), HDL (C) e LDL (D), 15 dias após o término de aplicação do protocolo de estresse crônico, em ratos alimentados com dieta controle ou hipercalórica, submetidos ou não a estresse. DC – Dieta Controle; DCE – Dieta Controle + Estresse; DH – Dieta Hipercalórica; DHE – Dieta Hipercalórica + Estresse. Em cada gráfico, \* indica diferença significativa em relação ao grupo alimentado com a mesma dieta, não submetido a estresse ( $p < 0,05$ ; ANOVA bifatorial + Tukey), e letras diferentes indicam grupos significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ; ANOVA bifatorial + Tukey). N=7-9/grupo.

Na análise das concentrações séricas de VLDL, houve interação significativa entre os fatores dieta e estresse ( $p=0,025$ ), evidenciando-se aumento significativo das concentrações séricas de VLDL no grupo DCE ( $0.350\pm 0.045$ ) em relação ao grupo DC ( $0.228\pm 0.016$ ;  $p<0,05$ ), sem diferença entre os demais grupos (DH= $0.326\pm 0.035$ ; DHE= $0.302\pm 0.028$ ;  $p>0.05$ ).

Além das alterações encontradas nas concentrações séricas de lipídeos, os ratos estressados apresentaram alto índice aterogênico em relação aos animais controles que comeram a mesma dieta ( $p<0,05$ ; figura 6).



**Figura 6:** Índice aterogênico, 15 dias após o término de aplicação do protocolo de estresse crônico, em ratos alimentados com dieta controle ou hipercalórica, submetidos ou não a estresse. DC – Dieta Controle; DCE – Dieta Controle + Estresse; DH – Dieta Hipercalórica; DHE – Dieta Hipercalórica + Estresse. \* indica diferença significativa em relação ao grupo alimentado com a mesma dieta, não submetido a estresse ( $p<0,05$ ; ANOVA bifatorial + Tukey). N=8/grupo.

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos mostram que a elevada concentração sanguínea de lipoproteína de baixa densidade induzida por dieta hipercalórica, isoladamente, não é capaz de promover efeitos aterogênicos em aorta torácica de ratos, todavia, o estresse crônico parece ser fator determinante para o desenvolvimento de tais efeitos, independentemente do tipo de dieta ingerida. Além disso, os resultados sugerem que as alterações vasculares funcionais e estruturais, decorrentes do estresse crônico, parecem estar relacionadas à inibição da síntese de óxido nítrico endotelial.

Tanto o estresse quanto dietas hipercalóricas parecem exercer importante papel no desenvolvimento de doenças vasculares, tanto no homem quanto em animais de laboratório. Neste contexto, o rato de laboratório tem sido amplamente utilizado em investigações científicas sobre este tema, por apresentar um curto tempo de vida, ser onívoro, estar facilmente disponível (Kao *et al.*, 1995) e poder tornar-se obeso experimentalmente (Diniz *et al.*, 2006). Por estes motivos, neste trabalho, escolhemos ratos como modelo experimental com o intuito de investigarmos os efeitos do estresse crônico, associado ou não à dieta hipercalórica, sobre o sistema vascular e o metabolismo de lipídeos.

A efetividade do protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) utilizado foi confirmada pela maior concentração plasmática de corticosterona em ratos alimentados com dieta controle ou hipercalórica, e submetidos ao ECMI (grupos DCE e DHE), quando comparados aos grupos alimentados com a mesma dieta, mas não estressados (DC e DH, respectivamente). Como esta elevação na corticosterona plasmática foi evidenciada 15 dias após a aplicação do ECMI, nossos dados mostram que a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) foi mantida, após o fim da aplicação de estímulos estressores, e que o protocolo de estresse utilizado foi adequado ao objetivo proposto de se avaliar os efeitos a médio prazo do estresse crônico.

O ECMI induziu supersensibilidade à fenilefrina em anéis da aorta torácica com endotélio. Este efeito foi independente da dieta utilizada, e o tratamento com dieta hipercalórica isoladamente não alterou a sensibilidade da resposta vasoconstritora da aorta torácica isolada. A ocorrência de supersensibilidade à fenilefrina em anéis aórticos com endotélio, isolados de ratos, tratados com dieta controle (grupo DCE) ou hipercalórica

(grupo DHE), em relação aos respectivos grupos não submetidos a estresse (DC e DH), e ausência de alterações em anéis aórticos desprovidos de endotélio, indicam que este efeito foi dependente do endotélio e não parece estar relacionado a uma ação direta do estresse sobre a musculatura lisa vascular. Como na presença de L-NAME também não houve diferença entre os grupos analisados, a supersensibilidade da aorta torácica ao efeito vasoconstritor da fenilefrina, induzida pelo estresse, parece estar relacionada à diminuição na síntese de óxido nítrico (NO) endotelial. Além disso, considerando que não houve diferença significativa entre os valores de  $pD_2$  obtidos na presença e na ausência de L-NAME nas aortas torácicas isoladas de ratos submetidos a estresse (DCE e DHE), é possível sugerir que, nestes grupos, a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) tenha sido inibida por outro fator independente da adição de L-NAME ao banho de incubação.

Os dados obtidos neste estudo estão parcialmente de acordo com os efeitos do estresse crônico induzido por superlotação de gaiolas-moradia, em ratos Wistar e ratos espontaneamente hipertensos (SHR), conforme relatado por Bernatova *et al.*, (2007). A artéria femoral isolada de ratos SHR e Wistar, submetidos a este tipo de estresse durante 8 semanas, apresentou maior resposta vasoconstritora à noradrenalina em relação aos animais controles. Além disso, em animais SHR, o estresse induziu diminuição da resposta vasodilatadora à acetilcolina na artéria femoral e menor atividade da eNOS na aorta torácica. Por outro lado, o estresse agudo por imobilização (Cordellini & Vassilieff, 1998) e por natação (Moura *et al.*, 2003) parece elevar a produção de NO endotelial em ratos Wistar.

O NO sintetizado pelas células endoteliais exerce um importante papel na regulação da atividade contrátil do vaso, pois ele é um gás que se difunde através da membrana das células musculares lisas (CMLs) e promove relaxamento vascular através de um mecanismo mediado por elevação dos níveis de guanosina monofosfato cíclica (cGMP) e diminuição das concentrações de  $Ca^{++}$  citoplasmático (Costa & Assreuy, 2005). Logo, uma diminuição na disponibilidade de NO pode exercer um efeito contrário ao relaxamento (Garg & Hassid, 1989). Sendo assim, os resultados obtidos neste estudo, associados às alterações relatadas nos trabalhos supramencionados, mostram que o estresse modula a síntese de NO endotelial e pode promover disfunções pró-hipertensivas em ratos.

Alguns mecanismos relacionados a disfunções na síntese de NO endotelial poderiam explicar a supersensibilidade observada na aorta torácica isolada de ratos submetidos ao ECMI. De acordo com Mitchel *et al.* (2003) e Mitchel *et al.* (2004), os glicocorticóides endógenos, em excesso, podem promover redução da dilatação da aorta torácica de ratos e podem diminuir a expressão de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) para a produção de guanosina trifosfato ciclohidrolase 1, uma enzima fundamental para a síntese do cofator tetrahydrobiopterina (BH4). O BH4 auxilia na estabilização dos dímeros ativos que constituem a enzima eNOS e aumenta a afinidade desta enzima pela arginina, culminando na síntese final de NO (Giovanelli *et al.*, 1991; Schimidt *et al.*, 1992; Simmons *et al.*, 1996). Associado a isto, a presença de outros fatores de risco como hipertensão arterial e ingestão de alta quantidade de glicose e lipídeos sobrecarrega o endotélio vascular e culmina em elevada produção de ânions superóxido, que reagem avidamente com BH4 e o transformam em produtos biologicamente inativos. Com isso, a proteção vascular conferida pelo endotélio vagorosamente desaparece (Förstemann & Münzel, 2006), para dar lugar a eventos vasculares deletérios. Logo, no presente estudo, é possível que os altos níveis de corticosterona induzidos pelo estresse, e mantidos 15 dias após o término de sua aplicação, possam ter reduzido a produção do cofator BH4 e/ou favorecido a produção de substâncias que o inativam, contribuindo para menor síntese ou atividade da eNOS e resultando na supersensibilidade observada, em função da menor produção de NO.

As alterações funcionais observadas na aorta torácica foram acompanhadas por aumento significativo na espessura do endotélio e da camada média vascular nos grupos DCE e DHE, em relação aos seus respectivos controles, não submetidos a estresse (DC e DH). Estas alterações estão de acordo com achados de Gansburgskii (1985), que observou alterações estruturais, tais como hipertrofia de núcleos celulares e aumento do número de núcleos estrangulados nos tecidos adjacentes ao endotélio vascular da aorta de ratos submetidos a estresse crônico. Além disso, foi observado por Hadjiisky *et al.*, (1987) hipertrofia de CMLs e migração de miócitos através dos poros da lâmina elástica interna para o espaço subendotelial em aorta de ratos SHR. O aumento da espessura do endotélio pode decorrer de possíveis alterações na sua permeabilidade devido a ações conjuntas das catecolaminas com as LDL circulantes no sangue, o que resulta em deposição de moléculas

na íntima vascular (Kao *et al.*, 1995); e o aumento na espessura da camada média pode decorrer de possíveis quedas na disponibilidade de NO endotelial, conforme mencionado abaixo.

Tem sido aceito que o NO endotelial seja capaz de mediar o principal evento inibitório intracelular da proliferação de CMLs, por meio da ativação da guanilato ciclase solúvel, com conseqüente aumento dos níveis citosólicos de cGMP (Costa & Assreuy, 2005). Como o repouso mitogênico das CMLs da camada média vascular é mantido por uma função endotelial normal, a redução na síntese de óxido nítrico endotelial pode permitir crescimento e proliferação destas células na camada média, bem como sua migração para a íntima vascular (Garg & Hassid, 1989). Assim, as altas concentrações sanguíneas de corticosterona, nos grupos DCE e DHE, podem ter inibido a síntese de NO pelos mecanismos supracitados, contribuindo para redução do efeito anti-mitogênico do NO endotelial sobre a camada média vascular e possível hipertrofia e proliferação das CMLs desta camada.

Como alterações vasculares podem estar relacionadas à ocorrência de dislipidemia, neste estudo foram feitas, também, avaliações do metabolismo lipídico nos 4 grupos estudados. A dieta hipercalórica não promoveu obesidade, avaliada pelo índice de Lee, em qualquer um dos grupos analisados, todavia foi observado aumento significativo da razão adiposidade/peso corporal nos animais alimentados com dieta hipercalórica (grupo DH), em relação àqueles alimentados com dieta controle (grupo DC). O índice de Lee tem sido utilizado como uma opção viável para estimar obesidade em ratos (Bernardis, 1970; Scallet & Olney, 1986; Diniz *et al.*, 2006). No homem, o índice de massa corporal permite classificar a situação do indivíduo em peso normal, sobrepeso e obesidade. O índice de Lee, por sua vez, permite apenas determinar se o animal está obeso ou não. Como o desenvolvimento de obesidade está também relacionado ao aumento da adiposidade visceral, e isto foi observado no grupo alimentado com dieta hipercalórica (DH), em relação ao grupo alimentado com dieta controle (DC), nossos dados indicam que, embora a dieta hipercalórica não tenha induzido obesidade, mostrou-se eficaz na indução de alterações no tecido adiposo de ratos, semelhantes àquelas observadas em humanos.

A elevação significativa da razão adiposidade/peso corporal observada no grupo DH

em relação ao grupo DC foi uma ocorrência esperada, pois a ingestão de dieta hipercalórica é capaz de propiciar acúmulo energético nos adipócitos. Todavia, esta ocorrência não foi acompanhada por alterações nos níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), sugerindo que os triglicerídeos dietéticos foram metabolizados normalmente por ação da lipase lipoprotéica, e que o fígado pode não ter sido estimulado a produzir triglicerídeos e VLDL excessivamente neste grupo. A elevação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), no grupo DH, indica que estas lipoproteínas participaram efetivamente da transferência dos elevados aportes de colesterol dietético para os tecidos periféricos, uma ocorrência também esperada devido à ingestão da dieta hipercalórica.

Nos animais submetidos ao protocolo de estresse crônico e alimentados com dieta controle, houve diminuição significativa da razão gordura/peso corporal. Ao contrário, em animais alimentados com dieta hipercalórica, o estresse induziu aumento neste parâmetro. Estes achados confirmam que tanto o estresse quanto dietas hipercalóricas promovem alterações nos complexos mecanismos envolvidos no controle do equilíbrio energético (Ely *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 2006), podendo resultar em lipólise, por ação das catecolaminas no tecido adiposo, ou em acúmulo de gordura abdominal em ratos submetidos a estresse e alimentados com dietas ricas em gordura (Buwalda *et al.*, 2001).

Além de alterações no acúmulo de tecido adiposo, o ECMI, associado ou não à dieta hipercalórica, provocou também alterações nas concentrações sanguíneas de lipídeos, indicando que nossos resultados estão de acordo com a literatura, pois os hormônios que participam da resposta de estresse são capazes de gerar perfil lipídico aterogênico (Stoney *et al.*, 1999; Black, 2002; Ferreira *et al.*, 2006), em decorrência da mobilização de substratos energéticos fundamentais para gerar energia na presença de agentes estressantes. Berger *et al.*, (1980) demonstraram que estresse agudo por choque elétrico, (30 sessões/30 dias), aumenta a concentração de colesterol plasmático em ratos e (Bryant *et al.*, 1988) demonstraram que o estresse por imobilização (10 horas/5 dias) aumenta as concentrações sanguíneas de LDL e VLDL em ratos.

No presente estudo, o ECMI aumentou os níveis séricos de colesterol total e LDL, independentemente da dieta ingerida; porém, o ECMI aumentou os níveis séricos de

triglicerídeos e de VLDL somente em animais alimentados com dieta controle. Estes resultados podem ser explicados por alguns mecanismos que se seguem. A inervação simpática do tecido adiposo afeta a atividade metabólica (Cousin *et al.*, 1993), podendo promover tanto diminuição quanto aumento de peso corporal no homem e em animais de laboratório (Tataranni, 1998; Black, 2003). As catecolaminas, por serem lipolíticas, aumentam a hidrólise de triglicerídeos em diversos depósitos de tecido adiposo do organismo e inibem a proliferação de adipócitos (Lafontan *et al.*, 1997). Desta maneira, a atividade simpática aumentada é capaz de diminuir significativamente a massa adiposa corporal (Bougueres *et al.*, 1997; Hauner, 1997; Black, 2003), conforme observado no grupo alimentado com dieta controle e submetido a estresse.

Associado a isto, as catecolaminas são capazes de inibir a ação da enzima extra-hepática lipase lipoprotéica, que hidrolisa os triglicerídeos das VLDL para armazená-los nos adipócitos como reservas energéticas. Esta inibição da lipase lipoprotéica diminui a remoção de triglicerídeos circulantes no sangue (Brindley & Rolland, 1989; Black, 2002) e reduz seu armazenamento nos adipócitos, contribuindo para o estabelecimento da chamada hipertrigliceridemia do estresse. Esta hipertrigliceridemia ocorre devido a uma diminuição da atividade desta enzima no tecido adiposo (Brindley *et al.*, 1993). Além de ser uma provável causa da diminuição da adiposidade no grupo tratado com dieta controle e submetido a estresse (DCE), esta é também uma das prováveis causas dos elevados níveis séricos de triglicerídeos encontrados neste grupo. Além disto, a capacidade do fígado de sintetizar triglicerídeos é intensificada devido a uma ação combinada dos glicocorticóides e dos ácidos graxos circulantes sobre a atividade da enzima fosfatidato fosfoidrolase na via biossintética dos triglicerídeos (Brindley *et al.*, 1993). Neste caso, é natural que ocorra, simultaneamente, elevação das concentrações séricas de VLDL, como ocorreu no grupo DCE, pois a própria síntese dos triglicerídeos proporciona o estímulo imediato para a formação e secreção hepática das VLDL, cuja finalidade é exportar triglicerídeos do fígado para os tecidos extra-hepáticos (Murray *et al.*, 2002).

Por outro lado, em ratos alimentados com dieta hipercalórica, o estresse crônico promoveu aumento da gordura visceral (grupo DHE), o que poderia estar relacionado a alterações na resposta do tecido adiposo às catecolaminas. Três tipos de adrenoceptores

coexistem em adipócitos de ratos (adrenoceptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ ) e causam lipólise em resposta à ativação pelas catecolaminas (Hollenga, 1989). Uma dessensibilização ou *down-regulation* de receptores adrenérgicos nos adipócitos pode promover acúmulo de tecido adiposo (Black, 2003) e conduzir o animal, submetido a estresse crônico, à obesidade por diminuição da atividade lipolítica catecolaminérgica (Bougnères *et al.*, 1997; Hauner, 1997; Reynisdottir *et al.*, 1995; Black, 2003). É possível que alterações semelhantes possam ter ocorrido nos animais do grupo DHE, resultando em redução do efeito lipolítico das catecolaminas e aumento da razão gordura/peso corporal.

Além disso, a adiposidade elevada no grupo DHE, em relação aos demais grupos e a ausência de aumento de triglicerídeos e VLDL no grupo DHE em relação ao grupo DH, sugerem que não tenha ocorrido inibição da lipase lipoprotéica pelos glicocorticóides e pelas catecolaminas, permitindo a hidrólise normal dos triglicerídeos das VLDL e o armazenamento dos mesmos nos adipócitos como reserva energética. Isto sugere, também, que a dieta hipercalórica pode ter sido capaz de modular a reação de estresse no grupo DHE, cancelando a ocorrência da chamada hipertrigliceridemia do estresse, observada no grupo DCE.

Nesse sentido, há evidências na literatura (Buwalda *et al.*, 2001) de que ratos alimentados com dietas ricas em gordura apresentam reduzida resposta simpática a estressores e menor nível de ansiedade no teste do labirinto em cruz elevado (Prasad & Prasad, 1996). Há também evidências de que a resposta do eixo HHA é menos intensa em ratos alimentados com dieta hipercalórica, semelhante ao que ocorre no homem (Levin *et al.*, 1996; Strack *et al.*, 1997; Pecoraro *et al.*, 2004). Segundo Pecoraro *et al.*, (2004), dietas hipercalóricas agem no hipotálamo reduzindo a expressão de RNAm para a síntese de hormônio liberador de corticotropina, resultando em diminuição da atividade do eixo HHA e incrementando os estoques de gordura abdominal (Dallman *et al.*, 2003). Evidência de que uma atividade menos eficiente do eixo HHA possa ter ocorrido no presente estudo, é ausência de elevados níveis séricos de triglicerídeos e VLDL no grupo DHE. Apesar de 15 dias após a aplicação do ECMI a concentração plasmática de corticosterona não diferir entre os grupos DCE e DHE, nossos dados não nos permitem avaliar se ocorreram diferenças no aumento da secreção deste hormônio, imediatamente após a aplicação dos

estressores, ou no período decorrido entre o fim do protocolo de estresse e o sacrifício dos animais, quando as amostras para dosagem hormonal foram coletadas. Experimentos complementares são necessários para avaliar a hipótese de que, em animais alimentados com dieta hipercalórica e submetidos ao estresse crônico, o aumento na concentração sanguínea de corticosterona seja insuficiente para elevar a síntese hepática de triglicérides e VLDL.

Quanto às LDL, foi descrito que os glicocorticóides e as catecolaminas diminuem a degradação das LDL pelas células hepáticas (Brindley & Rolland, 1989), resultando em retardo na metabolização desta fração das lipoproteínas e conseqüente elevação dos seus níveis séricos. Como as partículas de LDL transportam grandes quantidades de colesterol na circulação sanguínea, um retardo na remoção destas partículas pode também retardar a liberação do colesterol associado a elas, aumentando as concentrações séricas de colesterol (Brindley & Rolland, 1989; Brindley *et al.*, 1993). Desta forma, o aumento das concentrações séricas de LDL e colesterol total, nos grupos submetidos a estresse (DCE e DHE), sugere que a corticosterona e as catecolaminas possam ter promovido uma diminuição de receptores hepáticos de LDL, retardando a remoção desta fração das lipoproteínas e de colesterol do sangue circulante. Estas alterações nos níveis séricos de LDL também podem estar relacionadas às alterações vasculares funcionais e estruturais observadas nos grupos DCE e DHE.

A elevação da concentração sanguínea de LDL tem sido associada à ocorrência de supersensibilidade à fenilefrina em aorta torácica isolada de ratos (Cunha *et al.*, 2005) e à diminuição da produção de óxido nítrico endotelial em humanos e bovinos (Casino *et al.*, 1993; Hirata *et al.*, 1995). Feron *et al.*, (1999) relataram que altos níveis de LDL diminuem a produção de óxido nítrico, por promoverem maior interação entre a proteína estrutural caveolina e a enzima eNOS. Além disso, altos níveis de LDL diminuem a expressão de RNAm para a produção de eNOS, por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais (Lial *et al.*, 1995), e reduzem a ativação da guanilato ciclase induzida por vasodilatadores, marco inicial do processo aterogênico (Schmidt *et al.*, 1992). Estes relatos sugerem que os elevados níveis de LDL, associados à maior secreção de corticosterona, observados nos grupos DCE e DHE, podem ter contribuído para o desenvolvimento de supersensibilidade a

fenilefrina e hipertrofia vascular observadas nas aortas torácicas isoladas dos animais submetidos ao ECMI, neste estudo.

Embora no grupo DH o aumento de LDL também tenha ocorrido, este aumento não foi acompanhado de alterações na secreção de corticosterona plasmática ou na sensibilidade vascular a fenilefrina ou na espessura do endotélio e da camada média da aorta. Assim, no grupo DH, um possível efeito isolado das LDL sobre a síntese de NO não teria sido suficiente para promover alterações na sensibilidade adrenérgica e na espessura da parede vascular, sendo necessária uma ação conjunta de altos níveis de LDL-colesterol com altos níveis de corticosterona circulantes no sangue. Isto nos permite sugerir que o estresse seja capaz de incrementar o potencial aterogênico das LDL.

As alterações nos níveis séricos de colesterol total, sem alterações nos níveis séricos de HDL, propiciaram elevados índices aterogênicos nos grupos DCE e DHE, demonstrando que o estresse crônico moderado e imprevisível apresenta elevado potencial aterogênico. O índice aterogênico é um parâmetro para determinar o risco de desenvolvimento de aterosclerose no homem (Wakabayashi, 2004), mas tem sido utilizado em ratos para o mesmo propósito (Kamgang *et al.*, 2005; Montilla *et al.*, 2005). Como o estresse está relacionado ao desenvolvimento de perfil lipídico aterogênico (Black, 2002) e a aterosclerose está relacionada a dislipidemias, este índice é capaz de nos ajudar a entender o papel do ECMI como fator de risco para doenças cardiovasculares.

É importante ressaltar, também, que as catecolaminas são capazes de aumentar a permeabilidade da barreira endotelial para o tráfego de lipoproteínas e lipídeos oxidados (Ross, 1999) do sangue para o espaço subendotelial, causando alterações funcionais e estruturais no endotélio vascular (Kao *et al.*, 1995). Neste contexto, nossos resultados fortalecem dados prévios da literatura (Johns *et al.*, 2001; Grünfeld & Eloy, 1987) e contribuem para demonstrar que dislipidemias associadas ao ECMI podem estar relacionadas a uma possível diminuição da produção de NO endotelial, à supersensibilidade em aorta torácica *in vitro* e ao risco potencial de desenvolvimento de doenças vasculares.

Enfim, nossos resultados confirmam que o consumo de dieta hipercalórica promove acúmulo de tecido adiposo visceral e mostram que, quando há associação entre o consumo de dieta hipercalórica e estresse crônico, este efeito pode ser potencializado. Nossos

resultados indicam também que o estresse crônico promoveu aumento da sensibilidade da aorta torácica ao efeito vasoconstritor de agonista  $\alpha$ -adrenérgico *in vitro* e hipertrofia vascular, por mecanismos possivelmente relacionados à inibição da síntese de óxido nítrico endotelial e elevação da concentração sérica de lipoproteínas de baixa densidade, independentemente do tipo de dieta consumida, produzindo assim, efeitos pró-ateroscleróticos em ratos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

Bernardis, L.L. (1970) Prediction of carcass fat, water and lean body mass from Lee's nutritive ration in rats with hypothalamic obesity. *Experientia*. **26**, 789-790.

Berger, D.F., Starzed, J.J. and Mason, E.B. (1980) The effects of differential psychological stress on plasma cholesterol levels in rats. *Psychosom. Med.* **42**, 481-492.

Bernatova, I., Csizmadiova, Z., Kopincova, J. and Puzserova, A. (2007) Vascular function and nitric oxide production in chronic social-stress-exposed rats with various family history of hypertension. *J. Physiol. Pharmacol.* **58**, 487-501.

Black, P.H. (2002) Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. *Brain. Behav. Immun.* **16**, 622-653.

Black, P.H. (2003) The inflammatory response is an integral part of the stress response: Implications for atherosclerosis, insulin resistance, type II diabetes and metabolic syndrome X. *Brain. Behav. Immun.* **17**, 350-364.

Black, P.H., Garbutt, L.D. (2002) Stress, inflammation and cardiovascular disease. *J. Psychosom. Res.*, **52**, 1-23.

Bougneres, P., Stunff, C.L., Pecqueur, C., Pinglier, E., Adnot, P., Ricquier, D. (1997) In vivo resistance of lipolysis to epinephrine. A new feature of childhood onset obesity. *J. Clin. Invest.* **99**, 2568-2573.

Brindley, D.N., McCann, B.S., Niaura, R., Stoney, C.M., Suarez, E.C. (1993) Stress and lipoprotein metabolism: Modulators and mechanisms. *Metabolism*. **42**, 3-15.

Brindley, D.N., Rolland, Y. (1989) Possible connections between stress, diabetes, obesity,

---

\* Apresentada de acordo com as normas do periódico *Stress*.

hypertension and altered lipoprotein metabolism that may result in atherosclerosis. *Clin. Sci. (Lond)*. **77**, 453-461.

Bryant, H.U., Story, J.A. and Yim, G.K.W. (1988) Assessment of endogenous opioid mediation in stress-induced hypercholesterolemia in the rat. *Psychosom. Med.* **50**, 576-585.

Buwalda, B., Blom, W.A.M., Koolhaas, J.M., Dijk, G.V. (2001) Behavioral and physiological responses to stress are affected by high-fat feeding in male rats. *Physiol. Behav.* **73**, 371-377.

Casino, P.R., Kilcoyne, C.M., Quyyumi, A.A., Hoeg, J.M., Panza, J.A. (1993) The role of nitric oxide in endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic patients. *Circulation.* **88**, 2541-2547.

Cordellini, S and Vassilieff, V.S. (1998) Decreased endothelium-dependent vasoconstriction to noradrenaline in acute-stressed rats is potentiated by previous chronic stress: Nitric oxide involvement. *Gen. Pharmac.* **30**, 79-83.

Costa, R.S.A., Assreuy, J. (2005) Multiple potassium channels mediate nitric oxide-induced inhibition of rat vascular smooth muscle cell proliferation. *Nitric Oxide.* **13**, 145-151.

Cousin, B., Casteilla, L., Lafontan, M., Ambid, L., Langin, D., Berthault, M.F., Penicaud, L. (1993) Local sympathetic denervation of white adipose tissue in rats induces preadipocyte proliferation without noticeable changes in metabolism. *Endocrinology.* **133**, 2255-2262.

Cunha, T.S., Moura, M.J.C.S., Bernardes, C.F., Tanno, A.P., Marcondes, F.K. (2005) Vascular sensitivity to phenylephrine in rats submitted to anaerobic training and nandrolone treatment. *Hypertension.* **46**, 1010-1015.

Dallman, M.F., Pecoraro, N., Akana, S.F., La Fleur, S.E. Gomez, F., Houshyar, H., Bell, M.E., Bhatnagar, S., Laugero, K.D., Manalo, S. (2003) Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 11696-11701.

Diniz, Y.S., Rocha, K.K.H.R., Souza, G.A., Galhardi, C.M., Ebaid, G.M.X., Rodrigues, H.G., Filho, J.L.V.B., Cicogna, A.C., Novelli E.L.B. (2006) Effects of *N*-acetylcysteine on sucrose-rich diet-induced hyperglycaemia, dyslipidemia and oxidative stress in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **543**, 151-157.

Duque, F.L.V. (1998) Aterosclerose: Aterogênese e fatores de risco. *Revista de Angiologia e Cirurgia Cardiovascular.* **7**, 50-58.

Ely, D.R., Dapper, V., Marasca, J., Correa, J.B., Gamaro, G.D., Xavier, M.H., Michalowski, M.B., Catelli, D., Rosat, R., Ferreira, M.B., Dalmaz, C. (1997) Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. *Physiol. Behav.* **61**, 395-398.

Farley, C., Cook, J.A., Spar B.D., Austin, T.M., Kowalski, T.J. (2003) Meal pattern analysis of diet-induced obesity in susceptible and resistant rats. *Obes. Res.* **11**, 845-851.

Feron, O., Dessy, C., Moniotte, S., Desager, J.P., Balligand, J.L. (1999) Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest.* **103**, 897-905.

Ferreira, R., Costa, R., Tramascia, M.L., Neves, V.J., Marcondes, F.K. (2006) Effects of chronic mild stress on the body weight of rats. *Physiological Mini-Reviews.* **2**, 204.

Forstermann, U., Munzel, T. (2006) Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.* **113**, 1708-1714.

Friedwald, W.T., Levy, R.I., Fredrickson, D.S. (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* **18**, 499-502.

Gansburgskii, A.N. (1985) [State of the endothelium of the aorta during chronic stress]. *Arkh. Anat. Gistol. Embriol.* **88**, 38-44.

Garg, U.C., Hassid, A. (1989) Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* **83**, 1774-1777.

Giovanelli, J., Campos, K.L., Kaufman, S. (1991) Tetrahydrobiopterin, a cofactor for rat cerebellar nitric oxide synthase, does not function as a reactant in the oxygenation of arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **88**, 7091-7095.

Grunfeld, J.P., Eloy, L. (1987) Glucocorticoids modulate vascular reactivity in the rat. *Hypertension.* **10**, 608-618.

Hadjiisky, P., Peyri, N. and Gorsgogeat, Y. (1987) Tunica media changes in the spontaneously hypertensive rat (SHR). *Atherosclerosis.* **65**, 125-137.

Hauer, H. (1997) Obesity and diabetes--potential for intervention? *J. Endocrinol.* **155**, 223.

Hirata, K., Miki, N., Kuroda, Y., Sakoda, T., Kawashima, S., Yokoyama, M. (1995) Low

concentration of oxidized low-density lipoprotein and lysophosphatidylcholine upregulate constitutive nitric oxide synthase mRNA expression in bovine aortic endothelial cells. *Circ. Res.* **76**, 958-962.

Hollenga, C., Zaagsma, J. (1989) Direct evidence for the atypical nature of functional beta-adrenoceptors in rat adipocytes. *Br. J. Pharmacol.* **98**, 1420-1424.

Johns, D.G., Dorrance, A.M., Tramontini, N.L., Webb, R.C. (2001) Glucocorticoids inhibit tetrahydrobiopterin-dependent endothelial function. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. **226**, 27-31.

Kamgang, R., Mboumi, R.Y., N'dillé, G.P.R.M. and Yonkeu, J.N. (2005) Cameroon local diet-induced glucose intolerance and dyslipidemia in adult wistar rat. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **69**, 224-230.

Kao, C.H., Chen, J.k., Kuo, J.S., Yang, V.C. (1995) Visualization of the transport pathways of low density lipoproteins across the endothelial cells in the branched regions of rat arteries. *Atherosclerosis*. **116**, 27-41.

Karnovsky, M.J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* **27**, 137A.

Kumari, M., Grahame-Clarke, C., Shanks, N., Marmot, M., Lightman, S., Vallance, P. (2003) Chronic stress accelerates atherosclerosis in the apolipoprotein E deficient mouse. *Stress*. **6**, 297-299.

Lafontan, M., Barbe, P., Galitzky, J., Tavernier, G., Langin, D., Carpenne, C., Bousquet-Melou, A., Berlan, M. (1997) Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. *Hum. Reprod. Suppl.* **1**, 6-20.

Levin, B.E. (1996) Reduced paraventricular nucleus norepinephrine responsiveness in obesity-prone rats. *Am. J. Physiol.* **270**, R456-R461.

Liao, J.K., Shin, W.S., Lee, W.Y., Clark, S.L. (1995) Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **270**, 319-324.

Lopes, H.F. (2004) Síndrome metabólica: Aspectos históricos, prevalência, e morbidade e mortalidade. *Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo*. **4**, 539-543.

Luft, J.H. (1961) Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 409.

Marcondes, F.K., Vanderlei, L.C.M., Lanza, L.L.B., Spadari-Bratfisch, R.C. (1996) Stress-induced subsensitivity to catecholamines depends on the estrous cycle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **74**, 663-669.

Miller, L.C., Becker, T.J., Tainter, M.L. (1948) The quantitative evaluation of spasmolytic drugs "in vitro". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **92**, 260-268.

Mitchell, B.M., Dorrance, A.M., Webb, R.C. (2003) GTP cyclohydrolase 1 downregulation contributes to glucocorticoid hypertension in rats. *Hypertension.* **41**, 669-674.

Mitchell, B.M., Dorrance, A.M., Mack, E.A., Webb, R.C. (2004) Glucocorticoids decrease GTP cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin-dependent vasorelaxation through glucocorticoid receptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **43**, 8-13.

Montilla, P., Barcos, M., Muñoz, M.C., Bujalance, I., Muñoz-Castañeda, J.R. and Tunez, I. (2005) Red wine prevents brain-oxidative stress and nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Biochem. Mol. Biol.* **38**, 539-544.

Moreau, J.L., Jenck, F., Martin, J.R., Perrin, S. and Haefely, W.E. (1993) Effects of repeated mild stress and two antidepressant treatments on the behavioral response to 5HT<sub>1C</sub> receptor activation in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. **110**, 140-144.

Moreau, J.L. (1997) [Validation of an animal model of anhedonia, a major symptom of depression]. *Encephale.* **23**, 280-289.

Moura, M.J.C.S., Marcondes, F.K. (2001) Influence of estradiol and progesterone on the sensitivity of rat thoracic aorta to noradrenaline. *Life Sci.* **68**, 881-888.

Moura M.J.C.S., Momeso, M.Q., Marcondes, F.K. (2003) A natação forçada induz subsensibilidade à fenilefrina em aorta torácica de rato. *Bras. J. Pharmac. Sci.* **39**, 433-439.

Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. Harper: Bioquímica. 9 ed. São Paulo: Atheneu. 2002, 271 p.

Pecoraro, N., Reyes, F., Gomez, F., Bhargava, A., Dallman, M.F. (2004) Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: Feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology.* **145**, 3754-3762.

Prasad, A., Prasad, C. (1996) Short-term consumption of a diet rich in fat decreases anxiety response in adult male rats. *Physiol. Behav.* **60**, 1039-1042.

Reynisdottir, S., Wahrenberg, H., Carlstrom, K., Rossner, S., Arner, P. (1995) Catecholamine resistance in fat cells of women with upper body obesity due to decreases expression of  $\beta$  2-adrenoreceptors. *Diabetologia*. 38, 126-128.

Rozanski, A., Blumenthal, J.A., Kaplan, J. (1999) Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation*. 99, 2192-2217.

Ross, A. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340, 115-126.

Scallet, A., Olney, J.W. (1986) Components of hypothalamic obesity: bipiperidyl-mustard lesions add hyperphagia to monosodium glutamate-induced hyperinsulinemia. *Brain. Res.* 374, 380-384.

Schmidt, K., Werner, E.R., Mayer, B., Wachter, H., Kukovetz, W.R. (1992) Tetrahydrobiopterin-dependent formation of endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) in aortic endothelial cells. *Biochem. J.* 281, 297-300.

Simmons, W.W., Ungureanu-Longrois, D., Smith, G.K., Smith, T.W., Kelly, R.A. (1996) Glucocorticoids regulate inducible nitric oxide synthase by inhibiting tetrahydrobiopterin synthesis and L-arginine transport. *J. Biol. Chem.* 271, 23928-23937.

Spadari, R.C., De Moraes, S. (1988) Repeated swimming stress and responsiveness of the isolated rat pacemaker to the chronotropic effect of noradrenaline and isoprenaline: Role of adrenal corticosteroids. *Gen. Pharmacol.* 19, 553-557.

Stoney, C.M., Niaura, R., Bausserman, L., Matacin, M. Lipid reactivity to stress: I. (1999) Comparison of chronic and acute stress responses in middle-aged airline pilots. *Health. Psychol.* 18, 241-250.

Strack, A.M., Akana, S.F., Horsley, C.J., Dallman, M.F. (1997) A hypercaloric load induces thermogenesis but inhibits stress responses in the SNS and HPA system. *Am. J. Physiol.* 272, R840-R848.

Tanno, A.P., Bianchi, F.J., Moura, M.J.C.S., Marcondes, F.K. (2002) Atrial supersensitivity to noradrenaline in stressed female rats. *Life Sciences.* 71, 2973-2981.

Tataranni, P.A. (1998) From physiology to neuroendocrinology: a reappraisal of risk factors of body weight gain in humans. *Diabetes Metab.* 24, 108-115.

Van Rossum, J.M. (1963) Cumulative dose-reponse curves. II. Technique for the making of

dose-response curves in isolated organs and the evaluation of the drug parameters. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **143**, 299-330.

Wakabayashi, I. (2004) Effects of age on relationship of alcohol drinking and obesity to atherosclerosis risks. *Geriatrics and Gerontology International.* **4**, S292-S295.

Wakabayashi, I., Kobaba-Wakabayashi, R. (2002) Effects of age on the relationship between drinking and atherosclerotic risk factors. *Gerontology.* **48**, 151-156.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à FAPESP pelo suporte financeiro (Proc.: 05/060284-6). Neves VJ, Costa R, Tamascia ML foram bolsistas FAPESP. Ferreira R foi bolsista CNPq.

## CONCLUSÕES

1. O modelo de estresse crônico moderado e imprevisível e o tratamento de rato de laboratório com dieta hipercalórica constituem modelos experimentais adequados para o estudo dos efeitos, a médio prazo, do estresse sobre a estrutura e função vasculares e sobre o metabolismo lipídico.
2. O estresse crônico moderado e imprevisível promove efeitos pró-ateroscleróticos, em ratos, independentemente do tipo de dieta ingerida, controle ou hipercalórica; e potencializa os efeitos aterogênicos das lipoproteínas de baixa densidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATP III. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001, 285(19): 2486-97.

Black PH. Stress and the inflammatory response: A review of neurogenic inflammation. *Brain Behav Immun*. 2002; 16(6): 622-53.

Black PH. The inflammatory response is an integral part of the stress response: Implications for atherosclerosis, insulin resistance, type II diabetes and metabolic syndrome X. *Brain Behav Immun*. 2003; 17(5): 350-64.

Black PH, Garbutt LD. Stress, inflammation and cardiovascular disease. *J Psychosom Res*. 2002, 52(1): 1-23.

Bodkin NL, Hannah JS, Ortmeyer HK, Hansen BC. Central obesity in rhesus monkeys: association with hyperinsulinemia, insulin resistance and hypertriglyceridemia? *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1993; 17(1), 53-61.

Brandão AP, Brandão AA, Berenson GS, Fuster V. Síndrome Metabólica em crianças e adolescentes. *Arq Bras Cardiol*. 2005; 85(2): 79-81.

Cuevas AM, Germain AM. Diet and endothelial function. *Biol Res*. 2004; 37(2): 225-30.

Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, Houshyar H *et al*. Chronic stress and obesity: a new view of “comfort food”. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(20): 11696-701.

Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. Metabolic Síndrome. A comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation*. 2005; 111(11): 1448-54.

Duque FLV. Aterosclerose: Aterogênese e fatores de risco. *Revista de Angiologia e Cirurgia Cardiovascular*. 1998; 7(2): 50-8.

Epel EE, Moyer AE, Martin CD, Macary S, Cummings N, Rodin J *et al*. Stress-induced cortisol, mood, and fat distribuitin in men. *Obes Res*. 1999; 7(1): 9-15.

Grippe AJ, Moffitt JA, Johnson AK. Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in a experimental model of expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002; 282(5): R1333-41.

Grundty SM, Brewere HB Jr. Cleeman JI; Smith SCJ, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome. *Circulation*. 2004; 109(3): 433-38.

Heras N, Cediél E, Oubiña MP, Agagoncillo P, Sanz-Rosa D, Lahera V *et al.* Comparison between the effects of mixed dyslipidaemia and hypercholesterolaemia on endothelial function, atherosclerotic lesions and fibrinolysis in rabbits. *Clin Sci (Lond)*. 2003; 104(4): 357-65.

Kumari M, Grahanme-Clarke C, Shanks N, Marmot M, Lightman S, Vallance P. Chronic stress accelerates atherosclerosis in the apolipoprotein E deficient mouse. *Stress*. 2003; 6(4): 297-99.

Kurihara, E. & Marcondes. Oral Concentration of Volatile Sulphur Compounds in Stressed Rats. *Stress*. 2002; 5(4): 295-98.

Leon M, Chan P, Volteas N, Labropoulos N, Nicolaides A. Progression of carotid arteriosclerosis. Three year follow-up and analysis of risk factors. *J Cardiovasc Surg*. 1993, 34(6): 461-64.

Lopes HF. Síndrome Metabólica: Aspectos históricos, prevalência, e morbidade e mortalidade. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 2004; (4): 539-43.

Lloyd-MacGilp SA, Nelson SM, Florin M, Lo M, McKinnell J, Sassard J *et al.* 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and corticosteroid action in lyon hypertensive rats. *Hypertension*. 1999, 34(5): 1123-8.

Marcondes FK, Vanderlei LCM, Lanza LLB, Spadari-Bratfisch RC. Stress-induced subsensitivity to catecholamines depends on the estrous cycle. *Can J Physiol Pharmacol*. 1996, 74(6): 663-9.

Matthews KA, Owens JF, Kuller LH, Sutton TK, Lassila HC, Wolfson SK. Stress-induced pulse pressure change predicts women's carotid atherosclerosis. *Stroke*. 1998; 29(8): 1525-30.

Moura MJCS, Momesso MQ, Marcondes FK. A natação forçada induz subsensibilidade à fenilefrina em aorta torácica de rato. *Braz J Pharmac Sci*. 2003; 39 (4): 433-9.

Moreau JL. Validation of an animal model of anhedonia, a major symptom of depression. *Encephale*. 1997; 23(4): 280-9.

Moreau JL, Jenck F, Martin JR, Perrin S, Haefely WE. Effects of repeated mild stress and two antidepressant treatments on the behavioral response to 5HT<sub>1C</sub> receptor activation in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 1993; 110(1-2): 140-4.

Nourani FRR, Spadari RC, DE Moraes S. Footshock stress-induced supersensitivity to isoprenaline in the isolated pacemaker of the rat: effects of the compounds RU-38486 and RU-28362. *Gen Pharmacol*. 1992; (23): 787-91.

Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman MF. Chronic stress promotes

palatable feeding, which reduces signs of stress: Feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology*. 2004; 145(8): 3754-62.

Raikkonen K, Hautanen A, Deltikangas-Jarvinen L. Association of stress and depression with regional fat distribution in healthy middle-aged men. *J Behav Med*. 1994, 17(6): 605-16.

Rodriguez Echandia EL, Gonzalez AS, Cabrera R, Fracchia LN. A further analysis of behavioral and endocrine effects of unpredictable chronic stress. *Physiol Behav*. 1988; 43(6): 789-95.

Rosmond R. Role of stress in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Psychoneuroendocrinology*. 2005; 30(1): 1-10.

Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999; 340(2): 115-126.

Rozanski A, Blumenthal JA, Kaplan J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation*. 1999; 99(16): 2192-217.

Santos IN, Marcondes FK, Spadari-Bratfisch RC. The beta1-adrenoceptor site activated by CGP12177 varies in behavior according to the estrous cycle phase and stress. *Can J Physiol Pharmacol*. 2003; 81 (5): 459-68.

Schoen FJ. In: Contran RS, Kumar V, Collins T. Editors. *Pathologic Basis of Disease*. 7.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p. 511-30.

Spadari RC, DE Moraes S. Repeated swimming stress and responsiveness of the isolated rat pacemaker to the chronotropic effects of noradrenaline and isoproterenol: role of adrenal corticosteroids. *Gen Pharmacol*. 1988, 19(4): 553-57.

Tanno AP, Bianchi FJ, Moura MJCS, Marcondes FK. Atrial supersensitivity to noradrenaline in stressed female rats. *Life Sci*. 2002; 71(25): 2973-81.

Vanderlei LCM, Marcondes FK, Lanza LLB, Spadari-Bratfisch RC. Influence of the estrous cycle on the sensitivity to catecholamines in right atria from rats submitted to footshock stress. *Can J Physiol Pharmacol*. 1996; (74): 670-78.

Yang Y, Zhou L, Gu Y, Zhang Y, Tang J, Li Fengying *et al*. Dietary chickpeas reverse visceral adiposity, dyslipidaemia and insulin resistance in rats induced by a chronic high-fat diet. *Br J Nutr*. 2007; 98(4): 720-726.

## **ANEXOS**

Comprovante de submissão do artigo 1 desta Dissertação;

Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal – UNICAMP;

Declaração do Direito Autoral Transferido à Editora.

----- Original Message -----

From: "Biomedical Sciences" <[Stress@ed.ac.uk](mailto:Stress@ed.ac.uk)>

To: <[fklein@fop.unicamp.br](mailto:fklein@fop.unicamp.br)>

Sent: Tuesday, January 29, 2008 2:29 PM

Subject: Stress:EDS415

STRESS the International Journal on the Biology of Stress  
Taylor & Francis Health  
Sciences

Dear Dr Marcondes,

Re: ?Effects of chronic stress on thoracic aorta and right atria isolated from rats?

By Neves VJ, Moura MJCS, Tamascia ML, Ferreira R, Costa R, Montemor PL, Romani EAON, Bernardes CF, Novaes PD, Marcondes FK

Thank you for submitting your paper for consideration for publication in Stress.

The paper is being sent to expert referees for review, and as soon as the referees have returned their reports and I have made a decision on publication you will hear from me again.

Your manuscript has been assigned the serial number: EDS415. Please quote this number in any communication with us.

Yours sincerely,

John A Russell

--

The University of Edinburgh is a charitable body, registered in Scotland, with registration number SC005336.



Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

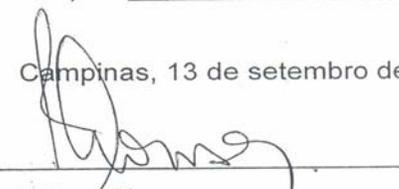
Certificamos que o Protocolo nº 900-1, sobre "RESPOSTAS METABÓLICAS, CARDIOVASCULARES E COMPORTAMENTAIS INDUZIDAS POR DIETA HIPERCALÓRICA E ESTRESSE CRÔNICO, EM RATOS" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 13 de setembro de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 900-1, entitled "METABOLIC, CARDIOVASCULAR AND BEHAVIORAL RESPONSES INDUCED BY HIPERCALORIC DIET AND CHRONIC STRESS IN RATS", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on September 13, 2005.

Campinas, 13 de setembro de 2005.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

  
Fátima Alonso  
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP



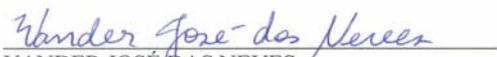
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

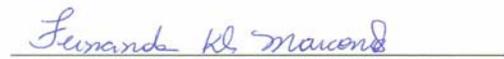


## DECLARAÇÃO

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação de Mestrado intitulada "Efeitos Aterogênicos do Estresse Crônico em Aorta Torácica de Ratos.", não infringem os dispositivos da Lei nº 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Piracicaba, 19 de Março de 2008.

  
VANDER JOSÉ DAS NEVES  
RG: M-7240197  
Autor(a)

  
FERNANDA KLEIN MARCONDES  
RG: 04.727.436-2  
Orientador(a)