

Bruna Santos Almeida

**Participação do óxido nítrico nas alterações vasculares
induzidas pelo estresse crônico em ratos.**

**CAMPINAS
2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



BRUNA SANTOS ALMEIDA

Participação do óxido nítrico nas alterações vasculares
induzidas pelo estresse crônico em ratos

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Bruna Santos Almeida
Fernanda Klein Marcondes
Aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia, para a obtenção do Título
de Mestra em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes
Coorientadora: Profa. Dra. Maria José Costa Sampaio Moura

Campinas
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

AL64p

Almeida, Bruna Santos, 1985-
Participação do óxido nítrico nas alterações
vasculares induzidas pelo estresse crônico em ratos /
Bruna Santos Almeida. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Fernanda Klein Marcondes.
Coorientador: Maria José Costa Sampaio Moura.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Estresse. 2. Endotélio Vascular - Disfunção. 3.
Hipertensão. I. Marcondes, Fernanda Klein, 1970-. II.
Moura, Maria José Costa Sampaio. III. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Involvement of nitric oxide in the vascular changes induced by chronic stress in rats

Palavras-chave em Inglês:

Stress

Vascular endothelium - Dysfunction

Hypertension

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Fernanda Klein Marcondes [Orientador]

Everardo Magalhães Carneiro

Maria Claudia Gonçalves de Oliveira Fusaro


Data da defesa: 26-02-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular


Campinas, 26 de fevereiro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Everardo Magalhaes Carneiro


Assinatura

Profa. Dra. Maria Claudia Goncalves de Oliveira Fusaro


Assinatura

Profa. Dra. Tatiana de Sousa da Cunha

Assinatura

Profa. Dra. Juliana Trindade Clemente Napimoga

Assinatura

Agradecimentos

À Deus por sempre iluminar minha vida, direcionando-me ao caminho certo, corrigindo-me e orientando-me. “Todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus.” (Rm 8:28).

Ao meu Pai Oséias E. de Almeida *in memoriam* que nos seus últimos dias de vida ensinou-me o real significado do amor, que às vezes não valorizamos, porém ao perdê-lo percebemos o quão importante ele é. Família: Palavra forte, sentimento forte, amor que ultrapassa barreiras.

Agradeço a minha Mãe, Neusa de O. Santos, uma guerreira, que sempre ensinou-me a lutar visando conquistar vitórias. Com ela também aprendi que Deus é o principal item da nossa vida e que nunca devemos ter vergonha de perder, pois o mais importante é lutar com fé e perseverança.

À minha orientadora Profa. Dra. Fernanda Klein Marcondes por explicar quais os melhores caminhos a serem percorridos para a conclusão deste trabalho. Sua atenção e ensinamentos foram fundamentais. Agradeço por você ter aceitado minha participação em seu laboratório, como aluna de mestrado.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Maria José Costa Sampaio Moura (Pontifícia Universidade Católica de Campinas/ PUC – Campinas), pela colaboração na realização deste trabalho, em especial pelos experimentos relativos às curvas concentração-efeito em aorta torácica.

Às Profas. Dra. Maria do Carmo Franco e Zuleica Bruno Fortes (Universidade de São Paulo – USP), e à Beatriz Felice Ponzio pelo auxílio na quantificação da concentração de óxido nítrico e superóxidos na aorta torácica dos animais utilizados neste estudo.

Aos amigos de laboratório, Rafaela, Andréia, Mariana, Eduardo, Vander e Vinícius por proporcionarem muitos momentos de aprendizado e alegrias. Agradeço em especial a minha amiga Larissa, que sempre mostrou o valor da persistência para conquistar aquilo que almejamos.

Às secretárias Eliete (FOP) e Andréia Vigilato (IB) da Unicamp que com muito carinho sempre me orientaram sobre os termos legais a serem resolvidos durante todo o curso, principalmente na reta final durante a conclusão deste trabalho. Ao funcionário Feliciano pela ajuda imprescindível no quesito cuidado com animais.

A CAPES e a FAPESP, pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Não que, por nós mesmos, sejamos capazes de pensar alguma coisa, como se partisse de nós; pelo contrário, a nossa suficiência vem de Deus.

2 Coríntios 3:4

Resumo

O estresse é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e modelos animais têm sido utilizados para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesta associação. Em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, a aplicação do protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) em ratos induziu aumento da sensibilidade ao efeito vasoconstritor da fenilefrina, em anéis aórticos com endotélio intacto, sendo este efeito cancelado pela inibição da síntese de óxido nítrico. Estes achados sugeriam que os efeitos vasculares do ECMI estariam relacionados à diminuição na produção de óxido nítrico (ON). Aumento na inativação de ON, por exemplo por radicais livres, também poderiam estar relacionados às alterações induzidas pelo ECMI. O objetivo deste estudo foi avaliar em ratos adultos machos, o efeito do ECMI sobre a evolução temporal da pressão arterial e sobre a produção de óxido nítrico e ânion superóxido na aorta torácica isolada. Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais: Controle e Estresse (n = 15/grupo). A avaliação da pressão arterial foi realizada uma vez por semana, por pletismografia de cauda. Quinze dias após o final do protocolo de ECMI os animais foram eutanasiados por decapitação. O sangue foi coletado para posterior dosagem de corticosterona e catecolaminas, por ELISA e cromatografia líquida respectivamente. A aorta torácica foi isolada para obtenção dos anéis aórticos e realização de curva-concentração-efeito à acetilcolina, e para determinação da produção de ON e ânion superóxido pelos métodos do 4,5 diacetato de diaminofluoresceína (DAF-2) e da hidroetidina, respectivamente. A pressão arterial sistólica e diastólica dos animais estressados nas semanas 4, 5 e 6 foi maior em relação aos valores determinados no grupo controle. Quinze dias após o ECMI, ratos estressados apresentaram menor peso corporal, aumento dos níveis de corticosterona, adrenalina e noradrenalina em relação ao grupo controle. O efeito vasodilatador da acetilcolina foi significativamente menor na aorta torácica dos animais submetidos ao ECMI em relação ao grupo controle. Aortas isoladas de ratos estressados apresentaram significativa redução na concentração de óxido nítrico e aumento na concentração de ânion superóxido, em relação ao tecido isolado de animais controle. Estes resultados confirmam que o ECMI induz disfunção endotelial na aorta torácica de ratos e que este efeito está associado à redução na biodisponibilidade de ON.

Palavra Chave: Estresse, Disfunção endotelial e Hipertensão.

Abstract

Stress is considered a risk factor to cardiovascular diseases and animal protocols have been used in studies about physiopathologic mechanisms involved in this association. In a previous study, we observed increased sensitivity to the vasoconstrictor effect of phenylephrine in aortic rings with intact endothelium from rats submitted to the protocol of chronic moderate and unpredictable stress (CMUS). This effect was canceled by the inhibition of nitric oxide synthesis *in vitro*. These findings suggested that vascular effects of CMS could be related to decrease in the bioavailability of nitric oxide (NO). The objective of this study was to evaluate, in adult male rats, the effect of CMS on the time course of arterial blood pressure, and on the production of nitric oxide and superoxide anion in isolated thoracic aorta. The animals were randomly divided into two experimental groups: Control and Stress (n = 15/grupo). The blood pressure determination was done once a week by the tail plethysmography. Fifteen days after the end of the CMS protocol the animals were killed by decapitation. Blood was collected for posterior corticosterone and catecholamines determination by ELISA and liquid chromatography respectively. The thoracic aorta was isolated to obtain a concentration effect curve to acetylcholine and to determine the production of NO and superoxide anion by diaminofluoresceína 4.5 diacetate (DAF-2) and hidroetidina methods respectively. Systolic and diastolic blood of stressed animals at weeks 4, 5 and 6 was significantly higher compared to values determined in the control group. Fifteen days after the end of CMUS, stressed rats showed increased levels of corticosterone, adrenaline and noradrenaline in relation to the control groups. The vasodilator effect of acetylcholine was significantly lower in the thoracic aorta of rats subjected to CMUS in the control group. Sections of aorta isolated from stressed rats showed significant reduction in nitric oxide concentration and increase in the concentration of superoxide anion in comparison to control animals. These results confirm that the CMUS induced endothelial dysfunction in rat thoracic aorta, and this effect is associated with decreased bioavailability of NO.

Keyword: Stress, Endothelial dysfunction and Hypertension.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACh – Acetilcolina

BH₄ – Tetrahidrobiopterina

Ca⁺² – Cálcio

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CCE – Curva-concentração-efeito

CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório – UNICAMP

CO₂ – Dióxido de carbono

DAF-2 – 4,5 Diacetato de diaminofluoresceína (marcador fluorescente de ON)

ECMI – Estresse crônico moderado e imprevisível

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético “Ethylenediamine tetraacetic acid”

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”

EROx – Espécies reativas de oxigênio

FE – Fenilefrina

Fig. – Figura

FOP/UNICAMP – Faculdade de Odontologia de Piracicaba /Universidade Estadual de Campinas

GMPC – Monofosfato cíclico de guanosina

GTP – Guanosina trifosfato

HHA – Hipotálamo-hipófise-adrenal

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance “High-performance liquid chromatography”

ICB/USP – Instituto de Ciências Biomédicas/ Universidade de São Paulo

KCl – Cloreto de potássio

KH₂PO₄ – Di-hidrogenofosfato de potássio

L-NAME – N-nitro-L-arginina-metil-ester (Inibidor da síntese de ON)

MgSO₄ – Sulfato de magnésio

NaCl – Cloreto de sódio

NaHCO₃ – Bicarbonato de sódio

ON – Óxido nítrico

ONS-e – Óxido nítrico sintase endotelial

O₂ – Oxigênio

O₂⁻ – Ânion superóxido

PA – Pressão arterial

PB – Tampão fosfato (phosphate buffer)

PB + Ca – Tampão fosfato + Cálcio

SNC – Sistema nervoso central

SNS – Sistema nervoso simpático

SPF – Specific Patogen Free

TBS – Triangle Biomedical Sciences

Sumário

1. Introdução	1
2. Proposição	4
3. Metodologia	5
3.1 Delineamento experimental	5
3.2 Protocolo de estresse	6
3.3 Avaliação da pressão arterial	7
3.4 Coleta de amostras	7
3.5 Dosagem de corticosterona	8
3.6 Dosagem de catecolaminas	8
3.7 Curva concentração-efeito à ACh (CCE)	9
3.8 Avaliação quantitativa de ON (DAF-2)	10
3.9 Avaliação quantitativa de EROx	11
3.10 Análises estatísticas	11
4. Resultados	12
5. Discussão	18
6. Conclusão	23
7. Referências	24
Anexo 1 – Comitê de ética	31
Anexo 2 – Artigo publicado	33

1- Introdução

Estilo de vida das sociedades industrializadas caracterizado por aumento da ingestão de alimentos calóricos, do sedentarismo e de situações estressoras negativas do dia a dia está relacionado a ocorrência de distúrbios alimentares, síndrome metabólica, ansiedade, depressão e doenças cardiovasculares (Lopes, 2004; Kuo *et al.*, 2008, Kyrou e Tsigos, 2008). Além de favorecer a ocorrência de hipertensão arterial (Bedi *et al.*, 2000; Grippo e Johnson, 2009), arritmias cardíacas (Carpeggiani e Skinner, 1991) e fibrilação ventricular (Matta *et al.*, 1976), o estresse tem sido apontado para depressão e hipertensão arterial como o principal fator de risco para a ocorrência de aterosclerose, em 40% dos casos, nos quais não são identificados outros fatores causais conhecidos (Black e Garbutt, 2002).

Além disso, fatores estressores podem levar ao desenvolvimento de depressão, a qual, por sua vez, também tem sido apontada como um fator de risco para a morbidade e mortalidade relacionada a doenças cardíacas (Van der Kooy *et al.*, 2007). Entre 20 e 50% de pacientes mortos por enfarto do miocárdio sofreram de depressão anteriormente (Grippo e Johnson 2009). Porém a relação entre depressão e doenças cardiovasculares é bidirecional já que a presença de doenças cardíacas parece aumentar a probabilidade de ocorrência de estados depressivos (Grippo e Johnson, 2002), sendo que a prevalência de depressão pode aumentar de 2 a 9%, na população em geral, para 45% em pacientes acometidos por enfarto (Associação Americana de Psiquiatria, 2000).

O sistema cardiovascular participa ativamente do processo adaptativo na reação de estresse, seja por um aumento da frequência cardíaca, da contratilidade, do débito cardíaco ou da pressão arterial (Krantz e Manuck, 1984). O termo estresse foi empregado por Hans Selye, um pesquisador que estudava os efeitos de extratos de plantas. Ele observou o desenvolvimento de úlceras gastrointestinais, atrofia do sistema imune e aumento das glândulas adrenais em ratos. Para sua surpresa, os ratos do grupo controle, que haviam recebido injeção de solução salina, apresentaram alterações semelhantes – Selye concluiu que tais alterações estavam relacionadas à aplicação das repetidas injeções. Obteve-se os mesmos resultados expondo os animais ao frio, patógenos, toxinas e ruído (Selye, 1936; Sapolsky, 1990). Hoje, podemos definir o estresse como a resposta do organismo frente a estímulos aversivos, sejam eles físicos, químicos ou psicológicos.

Devido aos estímulos estressores resultarem em respostas hormonais generalizadas e não específicas, atingindo diferentes sistemas orgânicos, Selye as denominou de Síndrome Geral da Adaptação, a qual é composta de três fases: Alarme ou excitação, resistência e exaustão. A fase de alarme/excitação ocorre quando o organismo reconhece o estímulo como estressante, ativando o Sistema Nervoso Simpático (SNS) e o sistema adrenocortical, resultando em maior liberação de catecolaminas e glicocorticoides, respectivamente. Quando o estímulo estressor é mantido, a capacidade de reação diminui e o organismo desenvolve mecanismos adaptativos durante a fase seguinte, denominada fase de resistência. Não ocorrendo esta adaptação desenvolve-se a fase de exaustão, na qual o organismo torna-se suscetível a alguns distúrbios cardiovasculares, gastrointestinais e/ou imunológicos (Selye, 1936, Tanno e Marcondes, 2002; McEwen, 2006).

O estresse crônico caracteriza-se pela ativação prolongada do SNS e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e promove alterações que favorecem a ocorrência da síndrome metabólica, caracterizada por obesidade, dislipidemia, intolerância à glicose, diabetes tipo II e resistência à insulina (Bjorntorp, 1997; Epel *et al.*, 1999; Grundy *et al.*, 2004; Neves *et al.*, 2009 e 2012) e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Grippio *et al.* 2009).

Doenças cardiovasculares podem ter início com a disfunção do endotélio associada a alterações fisiológicas e/ou histológicas. A disfunção endotelial é considerada um passo inicial do processo aterogênico e é também referida como piora no relaxamento dependente do endotélio, causado por menor biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (Carvalho *et al.*, 2006; Hsueh *et al.*, 2004) O termo disfunção endotelial frequentemente é utilizado para se referir à piora no mecanismo de vasodilatação dependente do endotélio, apesar do endotélio produzir tanto substâncias vasodilatadores quanto vasoconstritores. Em 1980, Furchgott e Zawadski estabeleceram o papel do endotélio na modulação da atividade contrátil vascular, através da produção e liberação de um fator relaxante, posteriormente identificado como óxido nítrico (ON) (Palmer *et al.*, 1987, Moncada *et al.*, 1991). O ON é um radical livre produzido pela oxidação da L-arginina em L-citrulina, através da enzima óxido nítrico sintase endotelial (ONS-e) (Stamler *et al.*, 1992). A L-citrulina por sua vez liga-se à guanilato ciclase. Uma vez ativado, estimula a conversão de GTP em GMP cíclico (GMPc), sendo este o mediador final que promove a ação de relaxar a musculatura lisa, por diminuir

os níveis de íon cálcio (Ca^{+2}) intracelular, provocando o relaxamento da musculatura e a consequente vasodilatação. Além da ação vasodilatadora, o ON inibe a adesão e a agregação plaquetárias (Kimlay *et al.*, 2001), reduz a aderência de leucócitos no endotélio vascular, suprime a proliferação do músculo liso vascular (Gimbrone, 1995) e inibe a produção do fator tecidual (Yang e Loscalzo, 2000), que é um determinante crítico na geração do trombo. Portanto, a disfunção endotelial favorece o desenvolvimento de hipertensão arterial, trombose, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e aterosclerose.

Por questões éticas e limitações dos estudos clínicos e epidemiológicos, a experimentação animal é muito útil para o estudo dos mecanismos fisiológicos relacionados às alterações desencadeadas pelo estresse. Apesar de estar bem estabelecido que roedores adaptam-se à aplicação repetida de estímulos estressores, esta adaptação não ocorre no protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI). Neste protocolo, a exposição a diferentes estressores alternadamente induz elevação mantida dos níveis de corticosterona em ratos (Moreau *et al.*, 1993; Willner, 2005), observada até 15 dias após a aplicação do estímulo estressor (Neves *et al.*, 2009). Assim, devido à ausência de adaptação aos estressores, o ECMI é validado como um modelo experimental de estresse crônico.

Estudo anterior de nosso grupo de pesquisa mostrou que o estresse crônico moderado e imprevisível (ECMI) promoveu aumento significativo na espessura do endotélio e da camada média vascular em aorta torácica isolada de ratos, além de ter induzido supersensibilidade à fenilefrina em anéis aórticos com endotélio intacto. Como este efeito não foi observado em anéis sem endotélio e em anéis com endotélio tratados com inibidor da síntese de óxido nítrico, os autores propuseram que a supersensibilidade à fenilefrina poderia estar relacionada à redução do ON endotelial (Neves *et al.*, 2009). Como esta interpretação foi feita de forma indireta, havia a necessidade de avaliação da produção de ON na aorta torácica para comprovação da hipótese levantada. Além disso, é importante avaliar se as alterações observadas *in vitro* na aorta torácica poderiam estar relacionadas a alguma alteração da pressão arterial.

2- Proposição

Estudar os mecanismos envolvidos nas alterações vasculares induzidas pelo estresse crônico moderado e imprevisível, e analisar o impacto destas alterações sobre a pressão arterial em ratos, avaliando:

- a concentração plasmática de corticosterona e catecolaminas;
- a resposta vasodilatadora à acetilcolina *in vitro*, em anéis da aorta torácica isolada;
- as concentrações de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio (EROx) em aorta torácica isolada;
- a evolução da pressão arterial durante todo o protocolo experimental.

3- Metodologia

3.1 Delineamento Experimental

Foram utilizados 30 ratos machos Sprague-Dawley, SPF (“Specific Patogen Free”), com 2 meses de idade no início do experimento, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório – UNICAMP (CEMIB), e mantidos no biotério de experimentação do Laboratório de Estresse, localizado no Departamento de Ciências Fisiológicas da FOP/ UNICAMP. Os animais foram alojados em gaiolas individuais e em sala climatizada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes acendendo às 6:00h). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Protocolo CEEA n°900-1), de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Os animais foram alimentados com dieta AIN93M em pó - formulada para a manutenção de roedores adultos - (Reeves *et al.*, 1993), contendo 3.6 Kcal/g (14.1% Kcal de proteínas, 75.9% Kcal de carboidratos, 10% kcal de gorduras). Esta dieta foi sintetizada pela empresa HN&C Nutriexperimental.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos experimentais: Controle e Estresse. Após uma semana de adaptação no biotério de experimentação, os animais foram analisados durante 7 semanas. No grupo submetido ao estresse, as aplicações dos estímulos estressores foram realizadas nas semanas 3, 4 e 5 do período experimental. Nas 1^a, 2^a, 6^a e 7^a semanas, os animais foram submetidos somente aos procedimentos relacionados à limpeza, alimentação e determinação da pressão arterial. Os animais do grupo controle foram submetidos apenas aos procedimentos de pressão arterial, limpeza e alimentação durante todo período experimental.

Os ratos foram eutanasiados, por decapitação, 15 dias após o término da aplicação do ECMI, no início da 8^a semana. O sangue foi coletado para posterior dosagem de corticosterona e catecolaminas. A aorta torácica foi isolada para análises funcionais.

3.2 Protocolo de Estresse

Nas 3^a, 4^a e 5^a semanas do período experimental, os animais do grupo estresse foram submetidos ao protocolo de ECMI, conforme estudo anterior (Neves *et al.*, 2009 e 2012). 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.

Tabela 1. Protocolo de estresse crônico moderado e imprevisível.

	Manhã	Tarde
Segunda-Feira	8:00 – 9:00h: Imobilização	13:00 – 14:00h: Imobilização. 18:00h: Iluminação contínua durante a noite.
Terça-Feira	8:00 – 9:00h: Imobilização	14:00 – 15:00h: Imobilização, seguida de privação de água e comida durante 18 horas.
Quarta-Feira	8:00 – 10:00h: Acesso restrito à comida durante duas horas.	13:00 – 14:00h: Imobilização, seguida de privação de água durante 18 horas.
Quinta-Feira	8:00 – 10:00h: Exposição a garrafas de água vazias. 11:00 – 12:00h: Imobilização	14:00 – 15:00h: Imobilização 18:00h: Pernoite em gaiolas com maravalha úmida.
Sexta-Feira	8:00 – 9:00h: Imobilização	18:00h: Ciclo Claro/Escuro invertido (até 08:00h da segunda-feira seguinte).
Sábado	Ciclo Claro/Escuro invertido	Ciclo Claro/Escuro invertido
Domingo	Ciclo Claro/Escuro invertido	Ciclo Claro/Escuro invertido

Durante a aplicação do ECMI, a imobilização dos animais foi realizada em garrafas pet de 600 mL, limitando totalmente a movimentação, conforme ilustra a Fig 1.



Figura 1. Imobilização dos animais com garrafas pet.

3.3. Avaliação da Pressão Arterial

A pressão arterial e a frequência cardíaca foram determinadas semanalmente, nas sextas-feiras às 14:00h, ao longo de todo o período experimental, por meio da conexão de um pletismógrafo à cauda dos animais (Krege *et al.*, 1995), utilizando o equipamento Visitech Systems Physiological Research Instruments (*BP-2000 Blood Pressure Analysis System* – Fig 2), em sala com isolamento acústico para diminuir fontes de ruído que pudessem interferir nessa avaliação.



Figura 2. Avaliação da pressão arterial pela conexão de um pletismógrafo à cauda dos animais.

3.4. Coleta de Amostras.

Quinze dias após o término da aplicação do ECMI os animais foram eutanasiados por decapitação. O sangue foi coletado em tubos com anticoagulante para centrifugação (1000G) e obtenção do plasma. As amostras de plasma foram armazenadas em freezer a – 20°C para posteriores dosagens de corticosterona e catecolaminas. Imediatamente após a coleta do sangue o tórax do animal foi aberto e a aorta torácica foi isolada e retirada, para as análises funcionais e quantitativas. O terço superior da aorta foi limpo e embebido em solução de Triangle Biomedical Sciences e rapidamente congelado em gelo seco para as análises quantitativas de óxido nítrico e ânion superóxido. Do terço médio da aorta, foram retirados anéis (3-5 mm) para as análises funcionais (curva concentração-efeito à ACh).

3.5. Dosagem de Corticosterona

A concentração plasmática de corticosterona foi determinada pelo ensaio imunoenzimático ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), através do uso de kit comercial Assay Designs® - Ann Arbor, MI, USA.

3.6. Dosagem de Catecolaminas

Para dosagem de catecolaminas, foi utilizado o método HPLC (High-performance liquid chromatography). O plasma foi submetido à purificação conforme descrito por Di Marco *et al.*, (2003). O sobrenadante foi filtrado (0,22 Mm) e injetado em coluna de fase reversa. As catecolaminas foram separadas, usando um par iônico acoplado com detecção eletroquímica (0,5 V). A separação isocrática foi obtida usando uma coluna Spheri-5 ODS 5 µm. O sistema de HPLC consta de uma bomba (modelo LC- 10 ADVP- Shimadzu), detector eletroquímico (modelo L-ECD- 6^A- Shimadzu), injetor automático (SIL- 20AC- Shimadzu), coluna 5µm, (4,6x 250 mm), pré-coluna RP 18, 7µm (15x3,2mm). As aminas biogênicas foram separadas por eluição isocrática, fluxo de 0,8 mL /minuto durante aproximadamente 25 minutos, sendo que a fase móvel foi composta de fosfato de sódio 0,02M (Merck), citrato de sódio 0,02M (Merck), EDTA 0,12 mM (Merck), heptano sulfônico 566mg/L (Sigma) e metanol (Licrosolv) 10% e ajustado o pH para 2,53 com ácido perclórico a 50 % (Merck). A concentração de monoamina foi expressa em pg/mL. Os cálculos foram feitos a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Pg A/mL} = \frac{\text{PsA/PsDHBA}}{\text{PstA/PstDHBA}} \times \text{quantidade do padrão} \times \text{fator de diluição}$$

Onde: Ps= área do pico da amina na amostra; A=amina; PsDHBA= área do pico do DHBA (dihidroxibenzilamina) na amostra; PstA= área do pico da amina no padrão; e PstDHBA= área do pico de DHBA no padrão. DHBA é o padrão interno de extração, usado para o cálculo de recuperação nos tempos de retenção esperados.

3.7. Curvas Concentração-Efeito (CCE) à Acetilcolina em Fragmento de Aorta Torácica Isoladas

Do terço medial da aorta, foi retirado 1 anel de cada animal. Os anéis (3 à 5 mm) foram montados sob 2g de tensão inicial, em câmara para órgão isolado, contendo 20mL de solução de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição [mM]: NaCl 115,0; KCl 4,7; CaCl₂.2H₂O 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄.7H₂O 2,5; NaHCO₃ 25,0; glicose 11,0; ácido ascórbico 0,11. Este último foi adicionado para diminuir a oxidação das catecolaminas, durante a obtenção das CCE. O líquido de incubação foi borbulhado continuamente com 95% de O₂ e 5% de CO₂ e a temperatura foi mantida à 36,5 ± 0,1°C, com auxílio de uma bomba de perfusão (Moura e Marcondes, 2001; Cunha *et al.*, 2005).

Antes de adicionar qualquer droga, os anéis aórticos permaneceram no banho para equilíbrio por 60 min e a solução de Krebs foi trocada a cada 15 min (Moura e Marcondes, 2001). Após o equilíbrio, a presença do endotélio foi comprovada fisiologicamente pela indução do relaxamento com adição de acetilcolina (10⁻⁶M) no anel pré-contraído com fenilefrina (FE) 10⁻⁷M. Considerou-se que o endotélio estava presente nos anéis que apresentaram 100% de relaxamento. Os anéis que apresentaram relaxamento inferior a 100%, em resposta à ACh, foram descartados. Após este teste, o anel foi lavado e mantido para nova estabilização por um período de 45 min, com troca de Krebs a cada 15 min (Moura e Marcondes, 2001; Cunha *et al.*, 2005).

Após estabilização e confirmação da integridade do endotélio, o anel foi contraído com FE 10⁻⁶M. E ao atingir uma resposta em platô à FE, uma curva concentração-efeito cumulativa à ACh foi obtida (3 x 10⁻⁸ – 10⁻⁶M) (Feng *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2008). O tempo de observação da resposta de cada anel da aorta torácica foi de 5 minutos, para cada concentração adicionada na cuba. O efeito máximo foi determinado quando três concentrações sucessivas e crescentes do agonista não alteravam a resposta obtida. O relaxamento induzido pela ACh foi expresso em porcentagem da pré-contracção produzida pela fenilefrina.

As CCE foram analisadas por regressão não linear, usando-se o programa GraphPAD prism (San Diego, CA, USA – licença G3-A 14920-830).

3.8. Determinação da Produção de Óxido Nítrico (ON) em Anéis Aórticos *in vitro* – Método do 4,5 Diacetato de Diaminofluoresceína (DAF-2)

Do terço superior da aorta torácica, foi coletado 1 anel aórtico ($\pm 1\text{cm}$) de cada animal, o qual foi limpo e embebido em pequenas formas de plástico contendo Triangle Biomedical Sciences (TBS) e rapidamente congelado em gelo seco. Para conservar as amostras, elas foram mantidas no freezer -80°C até o momento da dosagem. As amostras foram transportadas ao Laboratório de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB/USP) sobre refrigeração para a respectiva dosagem. Dos blocos de TBS, contendo as amostras, foram obtidos cortes transversais ($7\ \mu\text{m}$) no criostato a -25°C e colocados em lâminas de vidro contendo poli-L-lisina para fixação da amostra. De cada amostra (bloco) que corresponde a 1 animal, foram obtidos três cortes e colocados em uma única lâmina. Para determinar a produção de ON utilizou-se o marcador fluorescente sensível que reage com ON, o 4,5 diacetato de diaminofluoresceína (DAF-2). As lâminas (contendo as amostras) foram secas na plataforma aquecida e depois as amostras foram hidratadas a 37°C com tampão fosfato $0,1\ \text{M}$, que contém $0,45\ \mu\text{M}\ \text{CaCl}_2$ e $100\ \mu\text{M}\ \text{L-arginina}$ ($\text{PB}+\text{Ca}^{2+}$, $\text{pH}\ 7,4$) por 10 minutos. Após este processo a solução foi retirada e foram adicionados nos 3 cortes $100\ \mu\text{L}$ de $\text{PB}+\text{Ca}^{2+}$, sendo um corte o basal, e nos outros dois foram adicionados também $100\ \mu\text{M}$ de acetilcolina (estimulado). Passados 30 minutos, esta solução foi retirada e os cortes foram incubados com $\text{PB}+\text{Ca}^{2+}$ contendo $0,1\ \mu\text{M}\ \text{DAF-2}$, em ambiente escuro. Os cortes estimulados receberam $100\ \mu\text{M}$ de acetilcolina e o basal $100\ \mu\text{L}$ de $\text{PB}+\text{Ca}^{2+}$. Após 1 hora de incubação, as imagens digitais foram capturadas em microscópio (Nikon E1000) equipado com epifluorescência (excitação de 485nm ; emissão de 538nm); objetiva de $20\times$. As imagens foram analisadas em software (KS-300) pelo qual foi avaliada a densidade óptica média de fluorescência observada no endotélio. Os resultados foram expressos como aumento de produção ON em relação à produção basal de ON. As avaliações foram realizadas em três campos de cada corte (Akamine *et al.*, 2006a e 2006b, Franco *et al.*, 2009).

3.9. Análise quantitativa de Espécies Reativas de Oxigênio (EROx).

Para a medida da geração de ânion superóxido foram utilizados os mesmos blocos de TBS contendo o terço superior da aorta utilizados para a metodologia do ON. A avaliação foi determinada pela hidroetidina, substância permeável a membrana celular, que na presença de superóxido é transformada no composto fluorescente brometo de etídio. Os cortes transversais de aorta torácica (7 mm) foram obtidos em criostato a -25°C, coletados em lâminas de vidro contendo poli-L-lisina e incubados com hidroetidina 2×10^{-6} M (30 min, 37° C) em tampão fosfato (0,1M). Após o período de incubação, as imagens digitais foram coletadas em microscópio (Nikon E1000) equipado com epifluorescência e as imagens foram analisadas em software (KS-300) pela avaliação da densidade óptica média de fluorescência. Essa razão de fluorescência foi avaliada em três campos de cada corte e foram usadas seis aortas de diferentes animais de cada grupo experimental (Akamine *et al.*, 2006a e 2006b, Franco *et al.*, 2009).

3.10. Análises Estatísticas

Para análise dos dados obtidos ao final do experimento, foi utilizado o Teste *t* de Student para comparação dos grupos controle e estresse.

Para a análise dos dados obtidos semanalmente referentes à pressão arterial foi utilizada Análise de Variância para medidas repetidas – Modelo Misto, seguidos do Teste de Tukey-Kramer para comparação múltipla das médias.

Valores de *p* menores do que 0,05 foram indicativos de significância estatística. Os resultados foram apresentados como médias \pm erros-padrão das médias.

4- Resultados

No início do experimento os animais dos grupos controle e estresse não apresentaram diferença no peso corporal (Fig. 3; $p > 0,05$). O peso corporal final, determinado 15 dias após o fim do ECMI, foi significativamente maior em relação ao peso inicial, tanto em ratos controle quanto aos que foram submetidos a estresse (Fig. 3; $p < 0,05$). Porém, animais submetidos ao ECMI apresentaram menor peso corporal final quando comparados ao grupo controle (Fig. 3; $p < 0,05$).

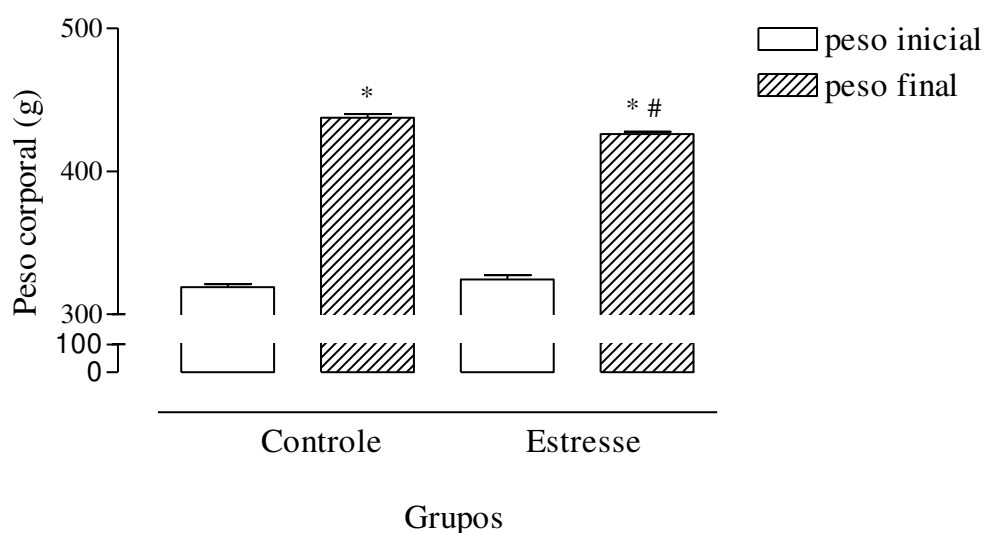


Figura 3. Peso inicial e final de ratos dos grupos controle e estresse. * Diferença em relação ao peso inicial do mesmo grupo. # Diferença em relação ao peso final do grupo controle ($p < 0,05$). $N = 15/\text{grupo}$ ($p < 0,05$; ANOVA bifatorial + Tukey).

Quinze dias após a aplicação do ECMI, animais submetidos a estresse apresentaram aumento nas concentrações plasmáticas de corticosterona, noradrenalina e adrenalina, em relação aos animais do grupo controle (Fig. 4; $p < 0,05$).

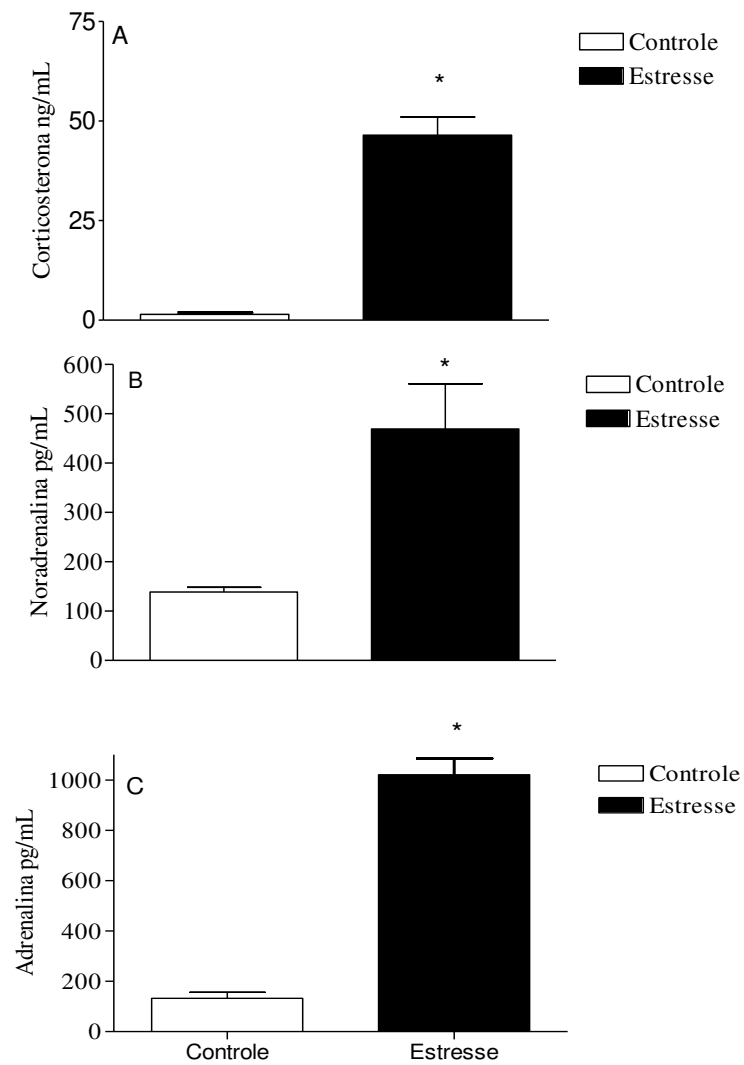


Figura 4. Concentração plasmática de corticosterona (A), noradrenalina (B) e adrenalina (C) de ratos dos grupos controle e estresse. N = 10/grupo. *Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$; teste *t* de Student).

As curvas concentração-efeito obtidas *in vitro* na aorta torácica mostraram que o ECMI reduziu para 61% a resposta vasodilatadora à ACh em relação ao grupo controle, no qual foi observado 96% de relaxamento induzido pela ACh (Fig. 5; $p < 0,05$). Não houve diferença significativa, entre os grupos controle e estresse, na sensibilidade da aorta torácica à ACh, determinada pela concentração de ACh que induziu 50% da resposta máxima: controle ($3,8 \pm 0,62 \times 10^{-8} \text{M}$) e estresse ($9,3 \pm 0,63 \times 10^{-8} \text{M}$).

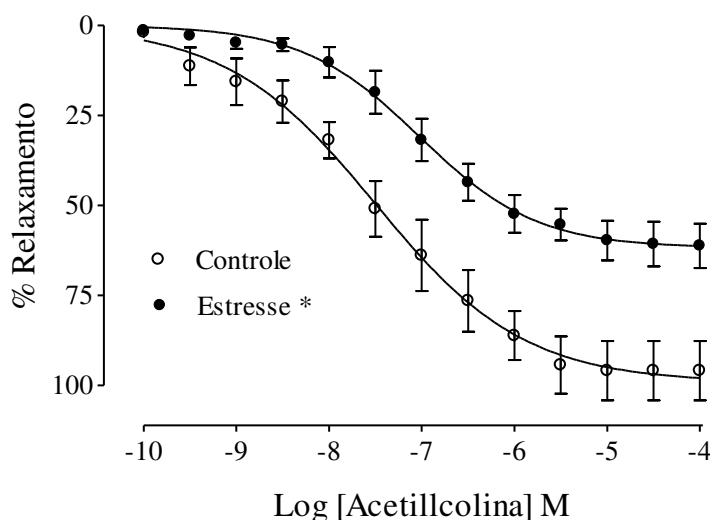
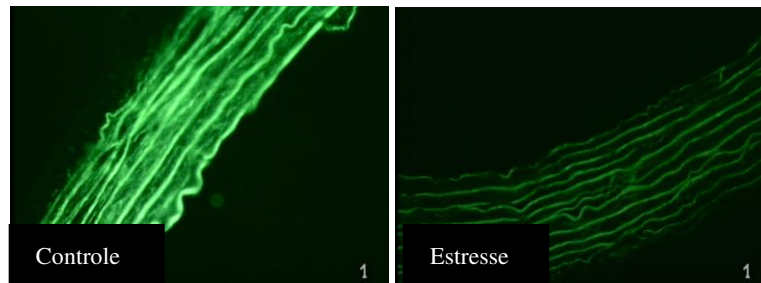


Figura 5. Curvas concentração-efeito à ACh obtida de anéis pré-contraídos com fenilefrina. Os anéis foram obtidos da aorta torácica isolada, de ratos controle (N = 6) e de ratos submetidos a estresse crônico moderado e imprevisível (N = 5). A resposta está expressa em porcentagem de pré-contracção induzida pela fenilefrina. *Diferença significativa em relação ao grupo controle, no valor da resposta máxima ($p < 0,05$; teste *t* de Student).

Na aorta torácica de animais submetidos ao protocolo de ECMI, observou-se redução da produção endotelial de óxido nítrico, em resposta à ACh, quando comparada à produção observada no tecido isolado de ratos controle (Fig. 6; $p < 0,05$).

A)



B)

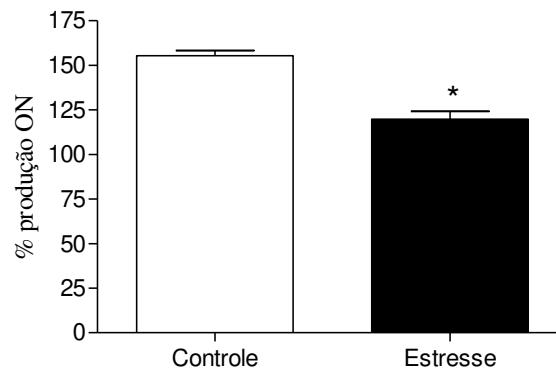
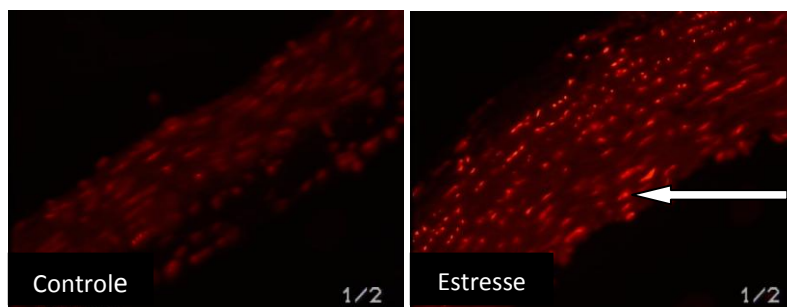


Figura 6. (A) Imagens digitais coletadas de anéis aórticos estimulados com acetilcolina do grupo controle e estresse. (B) Porcentagem de produção de óxido nítrico endotelial (ON), determinada a partir da avaliação da densidade óptica média de fluorescência, em anéis aórticos isolados de ratos dos grupos controle e estresse (n = 6 animais/grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$; teste t de Student).

Aortas torácicas isoladas de animais submetidos ao ECMI apresentaram aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROx) em relação ao grupo controle (Fig. 7; $p < 0,05$).

A)



B)

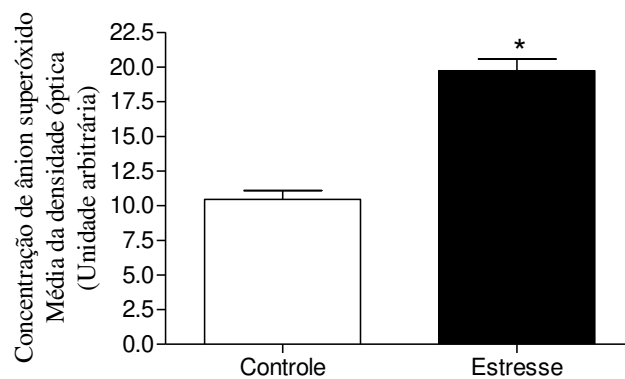


Fig. 7. (A) Imagens digitais das secções transversais de anéis aórticos, tratados com hidroetidina dos grupos controle e estresse. (B) Resultados expressos pela marcação quantitativa de espécies reativas de oxigênio (EROx) em aorta torácica dos grupos controle e estresse (n = 6 animais/grupo). *Diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,05; teste *t* de Student).

Os animais estressados apresentaram aumento da pressão arterial média e diastólica nas semanas 3, 4, 5 e 6 do período experimental, quando comparados aos animais controle (Fig. 8A e 8C; $p < 0,05$). A pressão arterial sistólica dos animais submetidos ao estresse foi significativamente maior em relação ao grupo controle, nas semanas 4, 5 e 6 do período experimental (Fig. 8B; $p < 0,05$), sem diferença na frequência cardíaca (Fig 8D; $p < 0,05$).

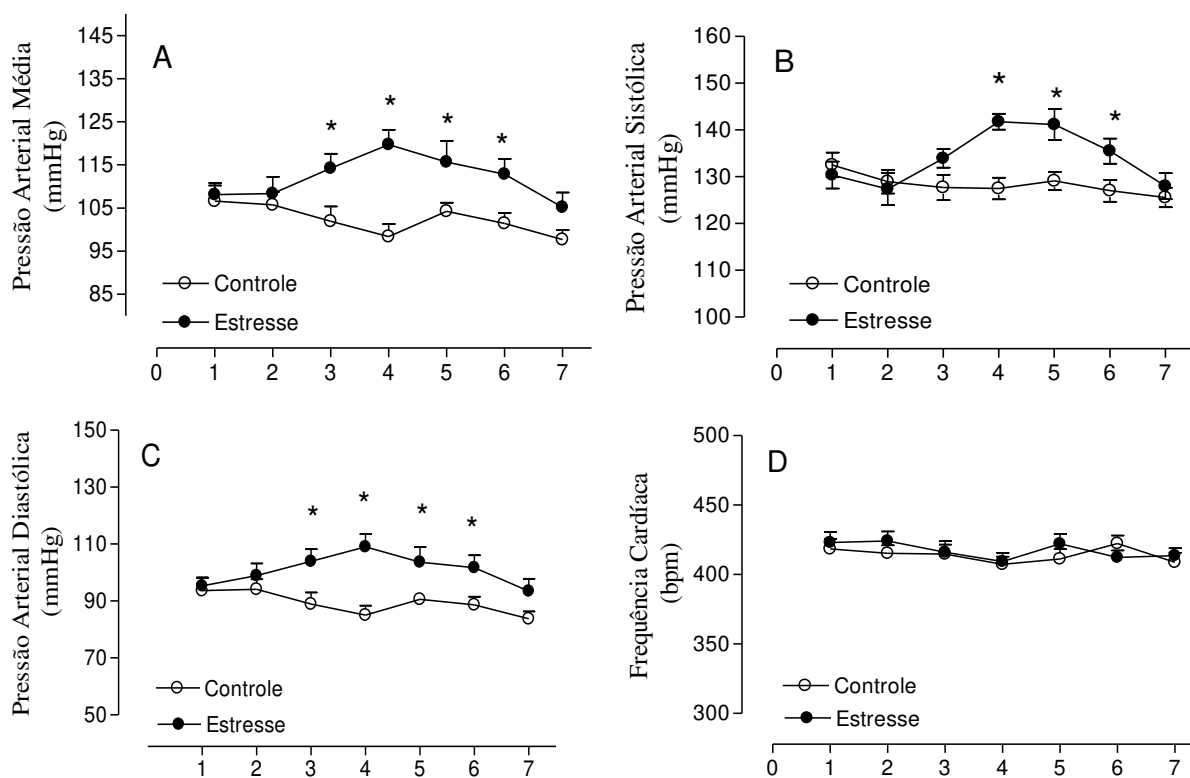


Fig. 8. Pressão arterial média (A), sistólica (B), diastólica (C) e frequência cardíaca (D) dos grupos controle e estresse, determinada por pletismografia de cauda, ao final de cada semana do período experimental. * Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$; Anova para medidas repetidas). N= 12/grupo.

5- Discussão

Neste estudo, observamos que o ECMI causou disfunção endotelial em ratos Sprague-Dawley, associada à redução da biodisponibilidade de óxido nítrico na aorta torácica e elevação da pressão arterial.

A significativa elevação da concentração plasmática de catecolaminas e de corticosterona, observada em animais submetidos ao ECMI, comprovou a efetividade do protocolo experimental de estresse utilizado, bem como a ausência de adaptação a este protocolo, e está de acordo com os estudos de Moreau *et al.*, (1993) e Willner, (2005). E, conforme previamente demonstrado por nosso grupo de pesquisa (Neves *et al.*, 2009 e 2012), os níveis aumentados dos hormônios do estresse, observados 15 dias após a aplicação dos estímulos estressores, confirma que o protocolo de ECMI utilizado permite a análise dos efeitos do estresse crônico a longo prazo.

O menor ganho de peso corporal dos animais estressados, em relação ao grupo controle, também confirma a efetividade do protocolo de estresse crônico. As catecolaminas e os glicocorticoides, além de promoverem aumento do cronotropismo e inotropismo cardíaco (Roy *et al.*, 1998; Tanno e Marcondes, 2002; Luecken *et al.*, 2005), também desempenham um papel fundamental na mobilização de substratos energéticos para o sistema nervoso central (SNC) e tecido muscular em situação de estresse. Estes hormônios estimulam a glicogenólise, lipólise e proteólise (Chrousos, 1998; Ottenweller, 2000). Desta forma, o menor ganho de peso observado no grupo submetido ao ECMI pode estar relacionado aos efeitos catabólicos das catecolaminas e glicocorticóides.

Com relação aos efeitos vasculares do ECMI, Neves *et al.*, (2009) observaram que o mesmo protocolo utilizado no presente estudo havia induzido supersensibilidade à fenilefrina na aorta torácica, com endotélio intacto, isolada de animais estressados em relação ao grupo controle. Como não havia sido observada alteração em anéis sem endotélio ou em anéis pré-tratados com o inibidor da síntese de óxido nítrico, os autores sugeriram que a supersensibilidade à fenilefrina poderia estar relacionada à menor biodisponibilidade de óxido nítrico. No presente estudo, a menor resposta vasodilatadora à acetilcolina, associada à menor produção de óxido nítrico na aorta torácica isolada de animais estressados, em comparação ao grupo controle, confirmam que o ECMI induz disfunção endotelial e reduz a biodisponibilidade de óxido nítrico na aorta torácica de ratos.

Outros estudos demonstraram que os efeitos vasculares são dependentes de características genéticas dos animais. Bernatova e Csizma-Diova (2006) evidenciaram que o estresse crônico por superpopulação reduziu o relaxamento vascular induzido por ACh na artéria femoral e diminuiu a atividade da óxido nítrico sintase na aorta, em ratos adultos pré-hipertensos, filhos de mães normotensas. Porém não houve alteração na atividade da óxido nítrico sintase na aorta de ratos Wistar normotensos submetidos ao estresse por superpopulação (Bernatova *et al.*, 2007).

Na literatura estão descritos vários mecanismos envolvidos na redução da biodisponibilidade de óxido nítrico: diminuição da atividade ou expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (Wilcox *et al.*, 1997); alterações na sinalização celular de modo que a óxido nítrico sintase endotelial não seja apropriadamente ativada (Shimokawa *et al.*, 1991); degradação acelerada da óxido nítrico sintase endotelial; ausência de substrato L-arginina; aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROx), as quais reagem em alta velocidade com o óxido nítrico, inativando – o (Zanchi *et al.*, 2006).

Dentre as moléculas que exploram a química oxidante do superóxido, a hidroetidina é a que tem sido amplamente utilizada como marcador da produção de ânion radical superóxido, principalmente pela fácil observação em microscopia de fluorescência em células e tecidos (Bindokas *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1998). No presente estudo, o uso desta metodologia evidenciou que o ECMI aumentou significativamente a produção de EROx, caracterizando um quadro de estresse oxidativo vascular.

O desequilíbrio oxidativo ocorre quando existe uma maior produção de EROx ou uma menor atividade dos mecanismos antioxidantes. Neste caso instala-se o chamado estresse oxidativo, que está envolvido em diversas condições patológicas destacando a hipertrofia das células vasculares, hipertensão arterial, aterosclerose e eventos tromboembólicos (Touyz e Schiffrin, 2004; Nascimento *et al.*, 2005). Este resultado está de acordo com o aumento da camada média da aorta torácica e índice aterogênico, também induzido pelo ECMI, observado em estudo anterior (Neves *et al.*, 2009).

Outro trabalho desenvolvido por nosso grupo de pesquisa mostrou que o ECMI aumentou significativamente a atividade tecidual da enzima conversora de angiotensina (ECA) na aorta torácica, a atividade da renina e ECA circulantes e as concentrações plasmáticas de angiotensina II (Sanches, 2012). Considerando que, no tecido vascular, a

angiotensina II estimula a produção de espécies reativas de oxigênio, o que diminui a biodisponibilidade de óxido nítrico, resultando em injúria do vaso (Hsueh *et al.*, 2004), o aumento de EROx observado no presente estudo, poderia estar relacionado ao aumento da atividade do sistema renina angiotensina induzido pelo ECMI. Estudos estão em andamento para avaliar esta hipótese.

A alteração da atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial também poderia estar relacionada à menor biodisponibilidade de óxido nítrico, induzida pelo ECMI. A óxido nítrico sintase endotelial é um citocromo p450 redutase que requer o cofator BH₄ ligado ao seu grupo heme para transferir elétrons a L-arginina e formar citrulina e óxido nítrico. Portanto, a redução ou ausência de BH₄ ou de L-arginina pode reduzir a produção de óxido nítrico endotelial (Pou *et al.*, 1992).

A redução ou ausência de BH₄ também está relacionada ao aumento da produção endotelial de ânion radical superóxido (O₂⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Esse fenômeno tem sido referido como desacoplamento da óxido nítrico sintase endotelial (Wattanapitayakul e Bauer, 2001; Wassmann *et al.*, 2004) e se refere à situação em que a transferência de elétrons da óxido nítrico sintase endotelial não se completa de modo adequado. Estes elétrons que “vazam” durante a atividade enzimática são captados pelo oxigênio molecular que é, por excelência, o aceptor de elétrons em organismos aeróbicos gerando o radical superóxido (O₂ + elétrons → O₂⁻) e peróxido de hidrogênio (Harrison 1997; Vasquez-Virar *et al.*, 1998).

De acordo com Mitchell *et al.*, (2003 e 2004), os glicocorticóides em excesso podem promover a redução da expressão de RNAm para a produção de guanosina trifosfato ciclodiolase 1, uma enzima fundamental para a síntese do cofator BH₄. Portanto, não é possível descartar a hipótese de que a elevação mantida da corticosterona plasmática, observada em resposta ao ECMI, poderia reduzir a produção do cofator BH₄, diminuindo a atividade da enzima óxido nítrico sintase, favorecendo a produção de radicais livres na aorta torácica de ratos.

Outro fator que poderia estar envolvido na disfunção endotelial observada no presente estudo é a insulina. Neves *et al.*, (2012) observaram que o mesmo protocolo de ECMI utilizado no presente estudo promoveu aumento do índice HOMA (Homeostasis Model Assessment) (Sondergaard *et al.*, 2006), e da área sob a curva no teste de tolerância a

glicose de ratos estressados em relação ao grupo controle, mostrando que o ECMI induziu resistência à insulina.

A associação entre disfunção endotelial e resistência à insulina foi demonstrada por diferentes autores. A suplementação com BH₄ melhorou a resposta vascular endotélio-dependente à acetilcolina na aorta de ratos resistentes à insulina (Meininger *et al.*, 2000) e restabeleceu a vasodilatação endotélio-dependente (Akamine *et al.*, 2006a). Ratos resistentes à insulina tratados com insulina, por quatro semanas, apresentaram aumento de BH₄ na aorta (Shinozaki *et al.*, 1999). A adição de insulina em culturas de células endoteliais aumentou os níveis intra e extracelulares de BH₄ (Ishii *et al.*, 2001). Akamine *et al.*, (2006a) observaram que a redução na produção de óxido nítrico foi parcialmente corrigida pelo tratamento com insulina. Com base nestas evidências, futuros estudos deverão ser desenvolvidos para investigar a relação entre resistência à insulina e as alterações vasculares induzidas pelo ECMI.

No presente estudo também avaliamos o impacto das alterações vasculares induzidas pelo ECMI, observadas *in vitro*, sobre a pressão arterial. O ECMI aumentou a pressão arterial média, sistólica e diastólica nas semanas 4, 5 e 6, sem alteração na frequência cardíaca. E na semana 3 do período experimental, também observamos aumento da pressão arterial média e diastólica. Estes dados estão de acordo com Grippo *et al.*, (2002) que relataram que o estresse crônico induziu o aumento na pressão arterial em ratos.

Como o aumento da pressão arterial sistólica e diastólica, observado a partir da terceira semana do período experimental, não foi acompanhado de alteração da frequência cardíaca, é possível concluir que os efeitos pressóricos do ECMI estão relacionados ao aumento da resistência periférica total, e não à estimulação simpática do cronotropismo cardíaco.

No estudo de Ramos *et al.* (2006), ratos Wistar foram tratados com N-nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME), um potente inibidor da síntese de óxido nítrico. Este tratamento causou um aumento na pressão arterial sistólica, média e diastólica em relação aos animais controle. Assim como os animais tratados com L-NAME, os ratos submetidos ao ECMI também tiveram aumento da pressão arterial. Em condições fisiológicas, o relaxamento vascular ocorre quando receptores de membrana das células endoteliais são ativados por alguns estímulos, a saber: acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato,

serotonina ou quando há um aumento do atrito exercido das células sanguíneas sobre a camada endotelial (*shear-stress*/ força de cisalhamento), levando à ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial presente nestas células e à consequente produção de óxido nítrico (Busconi e Michel, 1993). O *shear stress* induz aumento da produção de óxido nítrico pela maior expressão do gene da óxido nítrico sintase nas células endoteliais através de ativação da via tirosina cinase (Graham e Rusch, 2004; Higashi e Yoshizumi; 2004). Considerando estas informações, podemos sugerir que a menor biodisponibilidade de óxido nítrico induzida pelo ECMI poderia levar a aumento da resistência periférica e da pressão arterial.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem alguns mecanismos que possivelmente estão contribuindo para a ocorrência da disfunção endotelial e aumento da pressão arterial induzida pelo ECMI. Todavia, além da menor biodisponibilidade de óxido nítrico, outras substâncias vasoativas derivadas do endotélio também podem estar alteradas, tais como o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), prostaciclina, endotelina-1 e tromboxano A2 (Mombouli e Vanhoute, 1999; Carvalho *et al.*, 2006), os quais devem ser investigados. As hipóteses propostas da participação de uma possível redução do cofator BH₄, da resistência à insulina e do aumento da atividade do sistema renina - angiotensina na disfunção endotelial e aumento da pressão arterial induzidos pelo ECMI deverão ser investigadas em estudos futuros para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nos efeitos cardiovasculares do estresse crônico.

6- Conclusões

O ECMI causou disfunção endotelial em ratos e este efeito está associado à redução da biodisponibilidade de óxido nítrico e aumento de radicais livres na aorta torácica, e aumento da pressão arterial.

7- Referências Bibliográficas ¹

1. Akamine EH, Kawamoto EM, Scavone C, Nigro D, Carvalho MH, Cássia A Tostes R, Britto LR, Fortes ZB. Correction of endothelial dysfunction in diabetic female rats by tetrahydrobiopterin and chronic insulin. *J Vasc Res.* 2006a; 43(4): 309-20.
2. Akamine EH, Urakawa TAEVM; Oliveira MA, Nigro D, Carvalho MHC, Cássia A Tostes R, Fortes ZB. Decreased endothelium-dependent vasodilation in diabetic female rats: Role of prostanoides. *J Vasc Res* 2006b; 43: 401-10.
3. American Psychiatric Association. (2000). Diagnostic and statistical manual of mental disorders, fourth edition, text revision. Washington, DC: American Psychiatric Association.
4. Bedi M., Varshney V.P., Babbar R. Role of cardiovascular reactivity to mental stress in predicting future hypertension. *Clin Exp. Hypertens.* 2000; 22:1-22.
5. Bernatova I, Csizmadiova Z. Effect of chronic social stress on nitric oxide synthesis and vascular function in rats with family history of hypertension. *Life Sci.*2006; 78:1726-1732.
6. Bernatova I, Csizmadiova Z , Kopincova J, Puzserova A. Vascular function and nitric oxide production in chronic social- stress-exposed rats with various family history of hypertension. *J Physiol Pharmacol.* 2007; 58:487-501.
7. Bindokas VP, Jordan J, Lee CC, Miller RJ. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci.* 1996; 16 (4):1324-36.
8. Bjorntorp P. Body fat distribution, insulin resistance, and metabolic diseases. *Nutrition.* 1997; 13: 795-803.
9. Black, P.H, Garbutt, L.D. Stress, inflammation and cardiovascular disease. *J. Psychosom. Res.* 2002; 52, 1-23

¹ De acordo com a norma da UNICAMP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editor – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

10. Busconi L e Michel T. Endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 1993; 268(12): 8410-3.
11. Carpeggiani C.; Skinner J.E. Coronary flow and mental stress. Experimental findings. *Circulation.* 1991; 83: 90-93.
12. Carvalho MHC, Colaço AL, Fortes ZB. Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 2006; 50 (2): 304-12.
13. Chrousos G P. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. *Ann. N. Y. Acad. Sci, New York.* 1998; 851: 311-35.
14. Cunha TS, Moura MJCS, Bernardes CF, Tanno AP, Marcondes FK. Vascular sensitivity to phenylefrine in rats submitted to anaerobic training and nandrolone treatment. *Hypertension.* 2005; 46(2): 1-6.
15. Di Marco GS, Naffah-Mazzacoratti MG, Vio CP, Dos Santos OF, Schor N, Casarini DE Mesangial cells are able to produce catecholamines *in vivo*. *J. Cell. Biochem.* 2003; 89: 144-51.
16. Epel EE, Moyer AE, Martin CD, Macary S, Cummings N, Rodin J, Rebuffe-Scrive M. Stress-induced cortisol, mood, and fat distribution in men. *Obes Res.* 1999; 7: 9-15.
17. Feng GG, Yamada M, Wongsawatkul O, Li C, Huang L, An J, Komatsu T, Fujiwara Y, Naohisa I. Role of naofen, a novel WD repeated-containing protein, in reducing nitric-oxide-induced relaxation. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008 *in press*.
18. Franco MC, Ponzio BF, Gomes GN, Gil FZ, Tostes R, Carvalho MHC, Fortes ZB. Micronutrient prenatal supplementation prevents the development of hypertension and vascular endothelial damage induced by intrauterine malnutrition. *Life Sciences.* 2009; 85: 327-333.
19. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288:373-76.
20. Gimbrone MA Jr. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1995; 75: 67B-70B.

21. Grahan, DA, Rush JW. Exercise training improves aortic endothelium-dependent vasorelaxation and determinants of nitric oxide bioavailability in spontaneously hypertensive rats. *J Appl Physiol* 2004; 96: 2088–2096.
22. Grippo AJ, Moffitt JA, Johnson AK. Cardiovascular alterations and autonomic imbalance in an experimental model of depression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002, 282(5): 1333-41.
23. Grippo A. e Johnson A.K. Biological mechanisms in the relationship between depression and heart disease. *Neurosci. Rev.* 2002; 26: 941-962.
24. Grippo A, Johnson AK. Stress, depression and cardiovascular dysregulation: a review of neurobiological mechanisms and the integration of research from preclinical disease models. *Stress.* 2009; 12:1-21.
25. Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 13-18.
26. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest.* 1997; 100: 2153-57.
27. Higashi Y, Yoshizumi M. Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. *Pharmacol Ther.* 2004; 102: 87–96.
28. Hsueh WA, Lyon CJ, Quiñones MJ. Insulin resistance and the endothelium. *Am J Med.* 2004; 117(2): 109-17.
29. Ishii M, Shimizu S, Nagai T, Shiota K, Kiuchi Y, Yamamoto T. Stimulation of tetrahydrobiopterin synthesis induced by insulin: possible involvement of phosphatidylinositol 3-kinase. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001; 33: 65–73.
30. Kimlay S, Libby P, Ganz P. Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidiol.* 2001;12:383-89.
31. Krantz DS, Manuck SB. Acute psychophysiologic reactivity and risk of cardiovascular disease: a review and methodologic critique. *Psychol Bull.* 1984; 96(3): 435-64.

32. Krege JH, Hodgin JB, Hagaman JR, Smithies O. A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension*. 1995; 25: 1111-15.
33. Kuo L. E., Czarnecka M., Kitlinska J., Tilan J., Kvetnasnky R., Zulowska Z. Chronic stress, combined with a high-fat/high-sugar diet, shifts sympathetic signaling toward neuropeptide Y and leads to obesity and metabolic syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008; 1148: 232-237.
34. Kyrou I., Tsigos C. Chronic stress, visceral obesity and gonadal dysfunction. *Hormones*, 2008; 4: 287-93.
35. Lopes, H.F. Síndrome metabólica: Aspectos históricos, prevalência, e morbidade e mortalidade. *Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo*. 2004; 4: 539-543.
36. Luecken LJ, Rodriguez AP, Appelhans BM. Cardiovascular stress responses in young adulthood associated with family-of-origin relationship experiences. *Psychosom Med*. 2005; 67(4): 514-21.
37. Matta R.J., Lawler J. E., Lown B. Ventricular electrical instability in the conscious dog: effects of psychologic stress and beta adrenergic blockade. *Am. J. Cardiol*. 1976; 38: 594-598.
38. McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialogues Clin Neurosci*. 2006; 8(4): 367-81.
39. Meininger CJ, Marinos RS, Hatakeyama K, Martinez-Zaguilan R, Rojas JD, Kelly KA, Wu G. Impaired nitric oxide production in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat is due to tetrahydrobiopterin deficiency. *Biochem J*. 2000; 349: 353-56.
40. Miller FJ Jr, Gutterman DD, Rios CD, Heistad DD, Davidson BL. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res*. 1998; 82 (12): 1298-305.
41. Mitchell BM, Dorrance AM, Mack EA, Webb RC. Glucocorticoids decrease GTP cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin-dependent vasorelaxation through glucocorticoid receptors. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004; 43: 8-13.
42. Mitchell BM, Dorrance AM, Webb RC. GTP cyclohydrolase 1 downregulation contributes to glucocorticoid hypertension in rats. *Hypertension*. 2003; 41:669-74.

43. Mombouli J, Vanhoute PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol.* 1999; 31:61-74.
44. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathology and pharmacology. *Pharmacol. Rev. Bethesda.* 1991; 43:109-42.
45. 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_{1C} receptor activation in rats. *Psychopharmacology.* 1993; 110(1-2): 140-4.
46. Moura MJCS, Marcondes FK. Influence of estradiol and progesterone on the sensitivity of rat thoracic aorta to noradrenaline. *Life Sci.* 2001; 68(8): 81-88.
47. Nascimento CA, Patriarca G, Heimann JC. (2005). Estrutura orgânica do endotélio vascular. In: Luz PL da, Laurindo FRM, Chagas ACP. *Endotélio & Doenças Cardiovasculares.* São Paulo – SP. Atheneu, p. 04-09.
48. Neves VJ, Moura MJCS, Almeida BS, Costa R, Sanches A, Ferreira R, Tamascia ML, Romani EAO, Novaes PD, Marcondes F. K. Chronic stress, but not hypercaloric diet, impairs vascular function in rats. *Stress.* 2012; 15: 138-148.
49. Neves VJ, Moura MJCS, Tamascia ML, Ferreira R, Silva NS, Costa R, Montemor PL, Narvaes EAO, Bernardes CF, Novaes PD, Marcondes FK. Proatherosclerotic effects of chronic stress in male rats: Altered phenylephrine sensitivity and nitric oxide synthase activity of aorta and circulating lipids. *Stress.* 2009; 12 (4): 320-7.
50. Ottenweller J E. Animals models (nonprimate) for human stress. In: FINK, G., ed. *Encyclopedia of Stress.* New York: Academic Press. 2000; 1: 200-5.
51. Palmer RMJ, Ferridge AC, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987; 327: 524-26.
52. Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1992; 267:24173–24176.
53. Ramos L, Labat R, Carvalho SAF, Martin BA, Lopes-Martins BAR. Efeito da administração oral de arginina sobre a pressão arterial e parâmetros cardíacos em ratos submetidos ao bloqueio crônico da síntese de óxido nítrico. *Rev. Bras. Med. Esporte.* 2006; 12 (4): 169-74.

54. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 1993; 123: 1939-1951.
55. Roy MP, Steptoe A, Kirschbaum C. Life events and social support as moderators of individual differences in cardiovascular and cortisol reactivity. *J Pers Soc Psychol.* 1998; 75(5): 1273-81.
56. Sanches, A. Participação do sistema renina-angiotensina nos efeitos metabólicos e cardiovasculares induzidos por estresse crônico em ratos [Dissertação]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2012.
57. Sapolsky RM. Stress in the wild. *Scientific American.* 1990; 262 (1): 106-13.
58. Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 1936; 138: 32.
59. Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM. Loss of endothelial pertussis toxin-sensitive G protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circulation.* 1991; 83:652-60.
60. Shinozaki K, Kashiwagi A, Nishio Y, Okamura P, Yoshida Y, Masada M, Toda M, Kikkawa R. Abnormal biopterin metabolism is a major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/O₂- imbalance in insulin-resistant rat aorta. *Diabetes.* 1999; 48: 2437-45.
61. Sondergaard LG, Stoltenberg M, Doering P, Flyvbjerg A, Rungby J. Zinc ions in the endocrine and exocrine pancreas of zinc deficient rats. *Histol Histopathol.* 2006; 21(6): 619-25
62. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science.* 1992; 258: 1898-902.
63. Sun MW, Zhong MF, Gu J, Qian FL, Gu JZ, Chen H. Effects of different levels of exercise volume on endothelium-dependent vasodilation: roles of nitric oxide synthase and heme oxygenase. *Hypertens Res.* 2008; 31(4):805-16.
64. Tanno AP, Marcondes FK. Estresse, ciclo reprodutivo e sensibilidade cardíaca às catecolaminas. *RBCF.* 2002; 38(3): 273-289.
65. Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol.* 2004; 122 (4): 339-52.

66. Van der Kooy K; Van Hout H.; Marwijk H.; Marten H.; Stehouwer C.; Beekman A. Depression and the risk for cardiovascular diseases: systematic review and meta analysis. *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, 2007; 22: 613-626.
67. Vasquez-Virar J, Kalyanaraman B, Martasek P *et al.* Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: The influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 9220-5.
68. Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*. 2004; 44: 381-6.
69. Wattanapitayakul SK, Bauer JA. Oxidative pathways in cardiovascular disease. Roles, mechanisms and therapeutic implications. *Pharmacol Ther*. 2001; 89:187-206.
70. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17: 2479 -88.
71. Willner P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*. 2005; 52(2): 90-110.
72. Yang Y, Loscalzo J. Regulation of tissue factor expression in human microvascular endothelial cells by nitric oxide. *Circulation*. 2000;101:2144-148.
73. Zanchi NE, Bechara LRG, Tanaka LY, Debras V, Bartholomeu T, Ramires PR. Efeitos do treinamento físico aeróbio sobre a bioatividade do óxido nítrico e a vasodilatação aórtica. *Rev. Bras. Educ. Fís. Esp*. 2006; 20 (4): 239-47.

ANEXO 1

CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Obs: Este certificado refere-se ao projeto de pesquisa principal do qual esta dissertação de mestrado é um subprojeto, e que recebeu auxílio FAPESP – Processo 2005/59483-4. O projeto principal e o auxílio financeiro haviam sido aprovados antes do início desta dissertação de mestrado.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada: **Participação do óxido nítrico nas alterações vasculares induzidas pelo estresse crônico em ratos**

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. _____, Instituição:

() CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 900-1, Instituição:
UNICAMP

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição:

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Bruna Santos Almeida

Aluno: (nome completo)

BRUNA SANTOS ALMEIDA

Fernanda K. Marcondes

Orientador: (nome completo)

FERNANDA KLEIN MARCONDES

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Ana Maria Aparecida Guaraldo

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura



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

ANEXO 2

ARTIGO PUBLICADO

Este artigo compreende parte dos dados obtidos nesta dissertação de mestrado (curvas concentração efeito à acetilcolina em aorta torácica de ratos submetidos ao ECMI). Os demais resultados apresentados nesta dissertação farão parte de outro artigo científico, em conjunto com outros resultados experimentais obtidos pelo grupo de pesquisa.

Chronic stress, but not hypercaloric diet, impairs vascular function in rats

V. J. NEVES¹, M. J. C. S. MOURA², B. S. ALMEIDA¹, R. COSTA¹, A. SANCHES¹, R. FERREIRA¹, M. L. TAMASCIA¹, E. A. O. ROMANI³, P. D. NOVAES³, & F. K. MARCONDES¹

¹Laboratory of Stress, Department of Physiological Sciences, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Piracicaba, Sao Paulo, Brazil, ²Life Sciences Center, Pontifical Catholic University of Campinas, Campinas, Sao Paulo, Brazil, and ³Department of Morphology, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Piracicaba, Sao Paulo, Brazil

(Received 25 September 2010; revised 28 April 2011; accepted 24 June 2011)

Abstract

The aim of this study was to evaluate vascular and metabolic effects of chronic mild unpredictable stress (CMS) and hypercaloric diet (HD) without carbohydrate supplementation in rats. Male Sprague-Dawley rats were randomly assigned to four groups: Control, HD, CMS, and HD plus CMS. CMS consisted of the application of different stressors for 3 weeks. The rats were killed 15 days after CMS exposure. The HD group presented higher plasma lipid concentrations, without changes in fasting glucose concentration, glucose tolerance test, and vascular function and morphology, in comparison with the control group. Stressed rats presented higher fasting blood concentration of insulin, higher homeostasis model assessment index values and area under the curve in an oral glucose tolerance test, in comparison with non-stressed rats. CMS increased the plasma concentrations of corticosterone and lipids, and the atherogenic index values, without change in high-density lipoprotein level. CMS increased intima-media thickness and induced endothelium-dependent supersensitivity to phenylephrine, and lowered the relaxation response to acetylcholine in the thoracic aorta isolated from rats fed with control or HD, in comparison with non-stressed groups. CMS effects were independent of diet. In non-stressed rats, the HD induced dyslipidemia, but did not change glucose metabolism, vascular function, or morphology. The data from this study indicate that CMS promotes a set of events which together can contribute to impair function of the thoracic aorta.

Keywords: *Aorta, endothelium, insulin resistance, nitric oxide, lipids, stress*

Introduction

In Western societies, regular consumption of hypercaloric diets (HDs) and obesity are often associated with the occurrence of metabolic and cardiovascular diseases. Atherogenic dyslipidemia is a major underlying cause for the development of atherosclerosis (Sheril et al. 2009). However, a high-fat, high-sugar diet alone cannot account for the current epidemic of obesity (Ludwig 2003) and coronary heart disease (Gu et al. 2009). Moreover, despite the association between atherosclerosis and increase in serum lipid concentration, many individuals develop severe atherosclerotic lesions while they have low serum lipid concentration, and others develop far more severe

atherosclerosis than would be expected on the basis of a modest elevation of serum lipids (Kaplan et al. 1983).

As exposure to chronic stress also correlates with an increasing incidence of visceral obesity, insulin resistance, hypertension, and atherosclerosis, stress has been recognized as a risk factor for cardiovascular and metabolic diseases (Kyrou and Tsigos 2007; Shively et al. 2009). However, in response to stress, some people lose weight while others gain weight and the mechanisms involved in the relationships among chronic stress, visceral obesity, dyslipidemia, and cardiovascular diseases have not yet been completely clarified.

Animal experimentation is a useful tool to complement clinical research and epidemiological

Correspondence: F. K. Marcondes, Departamento de Ciências Fisiológicas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Avenue Limeira, 901-Vila Areião, 13414-903 Piracicaba, SP, Brazil. Tel/Fax: 55 19 2106 5380/2106 5212. E-mail: fklein@fop.unicamp.br

data. Rodents generally adapt to repeated application of stressors; however, this does not occur if the presentation of stimuli is unpredictable, as it is in chronic mild unpredictable stress (CMS). (Moreau et al. 1994; Moreau 1997). In a previous study (Neves et al. 2009), it was observed that CMS induced proatherogenic changes in rats and that this effect seems to be related to a decrease in the bioavailability of endothelial nitric oxide (NO) induced by stress. Here, we tested the hypothesis that CMS would adversely alter vascular function independently of high-fat diet.

Since insulin resistance and dyslipidemia are involved in atherogenesis and endothelium dysfunction, the aim of the present study was to evaluate the effects of CMS and high-fat HD on the reactivity of thoracic aorta to phenylephrine and acetylcholine, morphology of the thoracic aorta, blood lipid concentrations, and glucose metabolism.

Materials and methods

Animals and experimental design

Seventy-two male Sprague-Dawley rats (60 days old; 290–340 g) were randomly assigned to four groups: Control, HD, CMS, and HD plus CMS (HD + CMS). Rats were housed one per cage at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ with lights on from 06:00 to 18:00 h, and received filtered water *ad libitum*. All procedures were approved by the UNICAMP Committee on Animal Research Ethics (Protocol number 900-1) and were in accordance with the guidelines of the National Council of Control of Animal Experimentation (CONCEA).

For 7 weeks, the control and CMS groups were fed a control diet based on AIN-93M, formulated for the maintenance of adult rodents (Reeves et al. 1993), containing 3.6 kcal/g (14.1% kcal protein, 75.9% kcal carbohydrate, 10.0% kcal fat). The HD and HD + CMS groups received a modified high-fat but not high-sugar HD, based on a purified moderately high fat (PMHF) diet (Lauterio et al. 1994) containing 4.41 kcal/g (16.8% kcal protein, 51.4% kcal carbohydrate, 31.8% kcal fat). In this study, all the butterfat (52 g) and corn oil (118 g) in the PMHF diet were replaced by coconut fat (44.2 g) and soybean oil (118 g), respectively. The soybean oil was used to

replace corn oil because it was also used in the control diet, and because the literature has postulated that it may contribute to promoting insulin resistance in rodents (Bueno et al. 2008). The coconut fat replaced butterfat to increase the amount of saturated fatty acids (SFA). Coconut fat is a highly saturated fat (containing >76 g SFA/100 g fat), rich mainly in lauric, myristic and palmitic acids, which have been shown to be capable of promoting dyslipidemia in rats (Kamgang et al. 2005; Silva et al. 2006).

Stress protocol

The CMS protocol used in this study is based on the model described by Moreau (1997) and modified according to Neves et al. (2009). It consisted of the application of different stressors for 7 days per week for a period of three consecutive weeks (from the 3rd to 5th week) as described in Table I. In this CMS model, a different stressor is presented every day and it does not allow the rodents to adapt to the stressors. The absence of adaptation was confirmed in a pilot study carried out in our laboratory; plasma corticosterone determinations showed that 1 and 15 days after the end of CMS, stressed rats had higher corticosterone concentrations (32.6 ± 2.4 ; 21.2 ± 0.9 ng/mL, respectively) in comparison with non-stressed rats (2.4 ± 0.4 ng/mL). As the aim of this study was to evaluate long-term effects of CMS, the metabolic and vascular evaluations were carried out 10 or 15 days after CMS. Control rats were subjected only to the procedures related to their normal care.

Oral glucose tolerance test and homeostasis model assessment (HOMA index)

Ten days after stress, the rats were fasted for 6 h prior to the collection of tail blood in heparin-coated tubes for subsequent determination of fasting glucose and insulin concentrations. Between 13:00 and 14:00 h, the rats were anaesthetized with Halothane, the tail was cut and blood samples were collected to determine the glucose and insulin fasting concentrations. Immediately afterwards, an oral glucose load (2 g/kg) solution was administered by oral gavage. Additional blood samples were collected without additional anesthesia at 30-, 60-, 90-, and 120-min

Table I. Chronic mild unpredictable stress procedure.

	Morning	Afternoon
Monday	08:00 h, 1 h immobilization	13:00 h, 1 h immobilization; 18:00 h, overnight illumination
Tuesday	08:00 h, 1 h immobilization	14:00 h, 1 h immobilization followed by water and food deprivation for 18 h
Wednesday	08:00 h, access to food restricted for 2 h	13:00 h, 1 h immobilization followed by water deprivation for 18 h
Thursday	08:00 h, exposure to empty water bottle for 2 h; 11:00 h, 1 h immobilization	14:00 h, 1 h immobilization; 15:00 h, wet bedding for 17 h
Friday	08:00 h, 1 h immobilization	18:00 h, reversed light/dark cycle throughout the weekend

time intervals. The blood collected for all analysis was obtained from the same site as the first bleeding, which was halted by applying a tourniquet. In each rat, only one tail cut was made. Plasma fasting insulin concentration was measured with a commercially available kit (LINCO Research®, St Charles, MO, USA) with a sensitivity of 3.4 pmol/L. Blood glucose was measured using the Prestige LX® glucosimeter. The homeostasis model assessment (HOMA) index was used to assess insulin resistance and it was calculated by the formula: [fasting plasma glucose (mmol/L) × fasting plasma insulin (μU/mL)]/22.5 (Søndergaard et al. 2006).

Analytic methods and tissue collection

All the rats were killed by decapitation 15 days after the end of stress, without previous anesthesia to avoid anesthetic-induced increase in plasma corticosterone concentrations (Vahl et al. 2005). Trunk blood was collected in heparin-coated tubes, and the plasma was used to determine corticosterone and lipids by enzymatic colorimetric assays. The thoracic aorta was isolated. Three depots of visceral white adipose tissue, which have been associated with insulin resistance and cardiovascular diseases, were carefully removed and weighed. The above-mentioned depots were the epididymal fat pad (around the testis and *ductus deferens*), retroperitoneal (located on the border between the spine and the posterior abdominal wall) and perirenal fat pad (along the posterior wall from the kidney to the hip region) (Cinti 2005; Tran and Kahn 2010). The ratio of total fat pad weight to final body weight was calculated (Levin et al. 2000).

Corticosterone was assayed using the Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit (Assay Designs®, Ann Arbor, MI, USA), with sensitivity of 0.027 ng/mL, the intra- and inter-assay coefficients of variation being 7.7 and 9.7%, respectively. Total cholesterol (TC) was assayed using a commercially available kit (Laborlab®, Guarulhos, SP, Brazil), with sensitivity of 0.03 mmol/L; the intra- and inter-assay coefficients of variation were 3 and 2.7%, respectively. Triglycerides (TGL) were also assayed using the Laborlab® kit, with sensitivity of 0.02 mmol/L. High-density lipoprotein (HDL) was determined using the Laborlab® kit, with sensitivity of 0.01 mmol/L. The Friedewald's formula: low-density lipoprotein (LDL) = TC - HDL - (TGL × 0.2) was used to determine the plasma LDL concentrations (Friedewald et al. 1972). The atherogenic index (AI) was determined using the formula: AI = TC - HDL/TC (Kamgang et al. 2005).

Concentration-effect curves

The middle portion of thoracic aorta was excised free of fatty and connective tissue and then cut into two

3-mm-long to 5-mm-long rings. One ring was manipulated carefully to avoid damaging the endothelium, and the intimal surface of the second ring was scraped gently with a scalpel blade to remove the endothelial layer. The rings were suspended in a 20 mL organ bath containing Krebs–Henseleit solution. (Moura and Marcondes 2001). The aortic rings were connected to an isometric force transducer model 7004 (Ugo Basile, Varese, Italy), which was in turn connected to an Ugo Basile 2-channel Gemini recorder model 7070 (Ugo Basile) for registration of contractile responses. Concentration-effect curves (CEC) were obtained for aortic rings with and without endothelium to determine whether there were changes in the contractile activity of the thoracic aorta and whether the change was endothelium dependent, or was mediated directly by changes in the vascular smooth muscle (Cunha et al. 2005; Neves et al. 2009).

After 60 min of stabilization, the intactness of the endothelium was assessed by determining the vasodilating response to acetylcholine (1 μM) in rings pre-contracted with phenylephrine (0.1 μM). Only aortic rings that presented 100% relaxation by acetylcholine were considered to have an intact endothelium. The effectiveness of mechanical removal of the endothelium was confirmed by the complete absence of response to acetylcholine. The aortic rings were rinsed and allowed to re-equilibrate for 60 min. One cumulative CEC for phenylephrine (0.1 nM–0.1 mM) was obtained in each ring and the maximum response was evidenced when an increase in agonist concentration did not produce any additional response (Cunha et al. 2005; Neves et al. 2009). Changes in thoracic aorta sensitivity to phenylephrine were evaluated by determining the concentration that produced 50% of the maximum response and were expressed as the mean negative logarithm (pD₂).

To evaluate the role of NO in modulating the thoracic aorta sensitivity to phenylephrine, aortic rings with intact endothelium, obtained from other rats subjected to the same treatments, were isolated as described above and were incubated with the NO synthesis inhibitor, N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (10 μM) for 40 min. A CEC for phenylephrine was obtained in the presence of L-NAME.

A CEC for acetylcholine was obtained in endothelium-intact thoracic aorta rings isolated from other rats subjected to the same treatments. In these experiments, the aortic rings with intact endothelium were pre-contracted with phenylephrine (1 μM). After stabilizing the contractile response to phenylephrine, acetylcholine (0.1 nM–0.1 mM) was cumulatively added into the bath medium to induce relaxation. The relaxation responses were expressed as percentages of the response to phenylephrine (1 μM).

The stock solutions of phenylephrine and acetylcholine (Sigma Chemical®, St Louis, MO, USA) were dissolved in 2% ascorbic acid and stored at -10°C for

1 week. The dilutions for the CECs were prepared immediately before use and later discarded. For the Krebs–Henseleit solution, standard salts (Merk®; Darmstadt, Germany) were prepared in deionized water. The quality of the water was assessed weekly by measuring its conductivity and pH.

Morphometric study

To evaluate whether the functional changes in the aorta observed in the CEC were associated with morphological alterations, the inferior third of the thoracic aorta beginning 5 mm above the diaphragm muscle was placed in Karnovsky's fixative (Karnovsky 1965). In a previous analysis, we observed that the supersensitivity to phenylephrine observed in CEC obtained in the middle portion of thoracic aorta was also observed in its inferior third. Therefore, in order to decrease the number of rats used in the experiments, the morphometric study was carried out in the inferior third of the aorta isolated from the same rats from which aortas were used for obtaining the CEC to phenylephrine in the presence of L-NAME. The aorta fragments were washed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3, for 2 h at room temperature and dehydrated with 50, 60, 70, 90, and 100% acetone. The fragments were embedded in Araldite-502 resin (Luft 1961), and polymerized for 48 h at 60°C.

Semi-thin (1 µm) transverse sections of the aorta were cut on a SORVALL® Porter-Blum MT2-B ultramicrotome with a glass knife, and collected at 10 µm intervals. The sections were stained with 0.5% toluidine blue in 1% sodium borate for 50 s followed by 1% basic fuchsin for 30 s. Five sections of each aorta in five rats per group were obtained, totaling 25 sections in each studied group for analysis by light microscopy.

The measurements of total intima-media thickness (IMT) were made using a photomicroscope (Carl Zeiss, Oberkochen, West Germany) connected to a millimeter eyepiece (Ernest leitz, Wetzlar, Germany, 12.5X), and using a millimeter ruler (Carl Zeiss 5 + 100/100 mm) for calibration. To calculate the IMT, 24 measurements were made in each section,

using a 25X objective lens and 1.6X optovar, considering the IMT limits to be between the luminal surface and external elastic lamina. The IMT results are shown in micrometers (Neves et al. 2009).

Statistical analysis

Statistically significant differences were determined by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test for multiple comparisons of means ($p < 0.05$). Stress and diet were considered the main factors, and their interaction was also analyzed. Values are presented as means \pm SE of the means (SEM).

Results

Two-way ANOVA carried out on plasma corticosterone concentration evidenced a significant main effect of stress [$F(1,44) = 60.14$, $p = 0.000$, Table II], without significant effect of diet ($p = 0.883$) or interaction ($p = 0.634$). Stressed rats showed a higher plasma corticosterone concentration in comparison with non-stressed groups (Table II). There were no significant differences in initial body weight ($p > 0.05$, Table II) among the four groups. However, 15 days after CMS, there was a significant main effect of stress [$F(1,44) = 5.106$, $p = 0.029$], and diet [$F(1,44) = 30.198$, $p = 0.000$] on final body weight, without significant interaction ($p = 0.306$, Table II). In the FP/BW_f ratio, a significant stress/diet interaction [$F(1,44) = 18.174$, $p = 0.000$, Table II] was observed. The groups fed with a HD (HD and HD + CMS) presented a higher FP/BW_f value when compared with the groups treated with the control diet ($p = 0.000$, Tukey's test, Table II). However, considering the effect of stress, stressed rats treated with a HD (HD + CMS) showed a higher FP/BW_f when compared with non-stressed rats treated with the same diet (HD) ($p = 0.000$ with Tukey's test, Table II), without difference between stressed (CMS) and non-stressed (control) rats fed the control diet ($p = 0.392$ with Tukey's test, Table II).

Two-way ANOVA carried out on TGL values evidenced significant effects of stress [$F(1,44) = 10.102$, $p = 0.003$, Figure 1], and diet

Table II. Plasma concentrations of corticosterone and body weight of control and stressed rats, fed with control, or HD.

Variable	Control	CMS	HD	HD + CMS
Corticosterone, ng/mL	2.02 \pm 0.41	19.42 \pm 2.86*	3.34 \pm 0.66	18.72 \pm 3.02 [†]
Initial body weight, g	319.1 \pm 2.1	324.3 \pm 3.0	319.9 \pm 3.6	324.4 \pm 2.5
Final body weight, g	437.5 \pm 2.4	426.0 \pm 1.6*	453.1 \pm 4.5*	448.8 \pm 4.5 [‡]
FP/BW _f	0.0303 \pm 0.0012	0.0269 \pm 0.0013	0.0372 \pm 0.0024*	0.0472 \pm 0.0014 [§]

Control, non-stressed rats fed with control diet; CMS, chronic mild unpredictable stress; HD, hypercaloric diet; HD + CMS, hypercaloric diet + chronic mild unpredictable stress. FP/BW_f = ratio of total (epididymal + retroperitoneal + perirenal) fat pad weight to final body weight. $N = 12$ animals/group. *Significant difference vs. control ($p < 0.05$; two-way ANOVA + Tukey). [†]Significant vs. HD ($p < 0.05$; two-way ANOVA + Tukey). [‡]Significant vs. CMS ($p < 0.05$; two-way ANOVA + Tukey). [§]Significant vs. control, HD and CMS ($p < 0.05$; two-way ANOVA + Tukey). Values are mean \pm SEM.

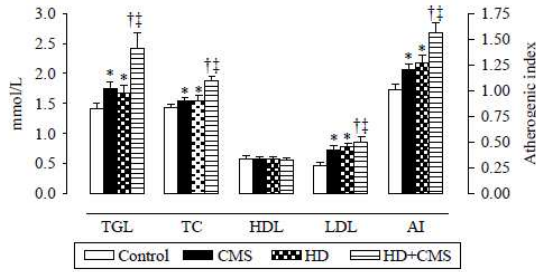


Figure 1. Effects of stress on plasma lipid concentrations of TGL, TC, HDL, and LDL in control rats, stressed rats subjected to CMS, non-stressed rats fed with HD, and rats fed with HD and subjected to CMS (HD + CMS), 15 days after the end of stress protocol ($n = 12$ rats per group). The AI for each of the four studied groups is presented on the right axis of graph ($n = 12$ rats per group). Data are mean \pm SEM. *Significant difference vs. control ($p < 0.05$; two-way ANOVA + Tukey). †Significant vs. HD ($p < 0.05$; two-way ANOVA + Tukey). ‡Significant vs. CMS ($p < 0.05$; two-way ANOVA + Tukey).

[$F(1,44) = 7.251, p = 0.010$], without significant interaction ($p = 0.236$). Significant main effects of stress [$F(1,44) = 10.01, p = 0.003$], and diet [$F(1,44) = 9.86, p = 0.003$, Figure 1] were also observed for TC plasma concentration, without significant effects for plasma concentration of HDL ($p > 0.05$). With regard to LDL, there was a significant main effect of stress [$F(1,44) = 5.881, p = 0.019$, Figure 1], and diet [$F(1,44) = 8.777,$

$p = 0.005$, Figure 1], but no interaction ($p = 0.222$). Similarly, for the AI, there was a significant effect of stress [$F(1,44) = 10.782, p = 0.002$, Figure 1], and diet [$F(1,44) = 16.746, p = 0.000$, Figure 1], without interaction ($p = 0.526$). Therefore, statistical analysis showed that the groups fed with a HD (HD and HD + CMS) presented higher plasma TGL concentrations, TC and LDL as well as higher AI values in comparison with the groups treated with the control diet (control and CMS). As regards the effects of stress, CMS increased the plasma concentrations of these lipids both in rats fed with the control and HD, and this effect was more pronounced in the HD + CMS group.

Figure 2 displays the mean fasting plasma glucose (Panel A) and insulin (Panel B) concentrations, area under the oral glucose tolerance test (OGTT) curve (AUC) (Panel C), and HOMA index (Panel D) of the four experimental groups. There was no significant difference in fasting glucose among the groups ($p > 0.05$), but two-way ANOVA revealed a significant main effect of stress on fasting insulin [$F(1,36) = 7.572, p = 0.009$], AUC [$F(1,28) = 38.065, p = 0.000$], and on the HOMA index [$F(1,36) = 9.169, p = 0.005$], without significant effect of diet or interaction ($p > 0.05$). These results showed that CMS increased the fasting insulin concentration, AUC and HOMA indices, but not the fasting glucose concentration in rats fed with the

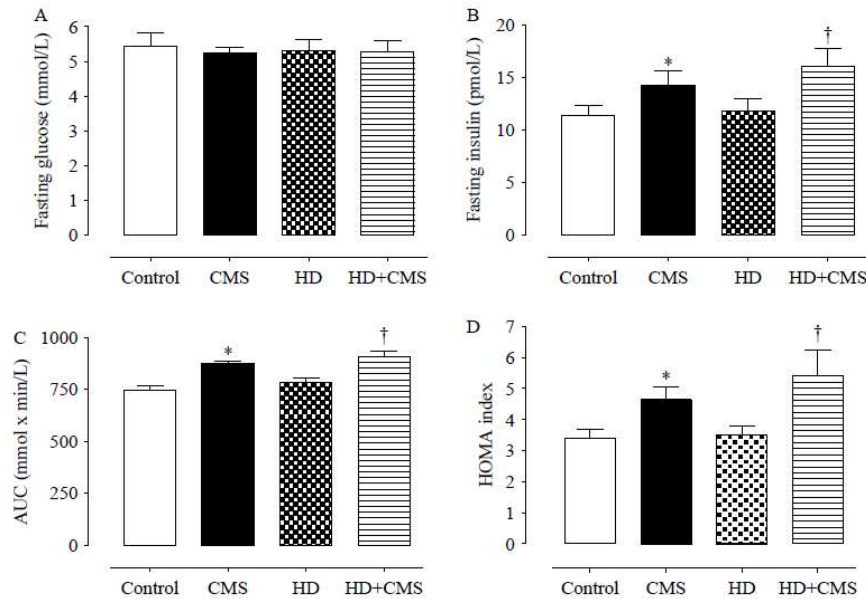


Figure 2. Fasting plasma glucose ($n = 10$ rats/group), fasting plasma insulin ($n = 10$ rats/group) concentrations, area under the OGTT curve (AUC) (7–9 rats/group), and HOMA index (10 rats per group) carried out in control rats, stressed rats subjected to CMS, non-stressed rats fed with HD, and rats fed with HD and subjected to CMS (HD + CMS), 10 days after the end of stress protocol. Data are presented as mean \pm SEM. *Significant difference vs. control ($p < 0.05$; two-way ANOVA + Tukey). †Significant vs. HD ($p < 0.05$; two-way ANOVA + Tukey).

Table III. Dry weight of aorta rings and maximum contractile response (MR) to phenylephrine in endothelium-intact, endothelium-denuded thoracic aortic rings and in the presence of L-NAME, isolated from control and stressed rats, fed with control or HD.

Groups		Dry weight (mg)	MR (mg/100 mg tissue)	pD ₂
Control	Endothelium-intact	106.80 ± 5.45	11.03 ± 1.98	6.82 ± 0.09
	Endothelium-denuded	98.76 ± 6.77	10.45 ± 2.12	7.63 ± 0.11
	L-NAME	102.10 ± 2.54	10.98 ± 2.45	7.66 ± 0.09 [‡]
CMS	Endothelium-intact	98.05 ± 3.43	12.09 ± 1.66	7.45 ± 0.26*
	Endothelium-denuded	103.40 ± 3.43	10.34 ± 1.54	7.47 ± 0.11
	L-NAME	97.80 ± 3.14	11.34 ± 1.67	7.50 ± 0.12
HD	Endothelium-intact	101.02 ± 4.45	9.89 ± 0.87	6.76 ± 0.11
	Endothelium-denuded	98.40 ± 5.13	10.34 ± 1.78	7.23 ± 0.10
	L-NAME	102.00 ± 8.44	10.65 ± 1.54	7.34 ± 0.11 [‡]
HD + CMS	Endothelium-intact	99.45 ± 2.42	11.34 ± 1.34	7.32 ± 0.06 [†]
	Endothelium-denuded	97.56 ± 5.61	12.34 ± 1.67	7.36 ± 0.11
	L-NAME	101.40 ± 3.66	11.35 ± 0.98	7.40 ± 0.09

Control, non-stressed rats fed with control diet; CMS, chronic mild unpredictable stress; HD, hypercaloric diet; HD + CMS, hypercaloric diet + chronic mild unpredictable stress. *N* = 5 rats/group. pD₂ = negative logarithm of the molar concentration of agonist producing 50% of the maximum response. L-NAME = N^G-nitro-L-arginine methyl ester. Data are presented as mean ± SEM. *Significant difference vs. control (*p* < 0.05; two-way ANOVA + Tukey). [†]Significant vs. HD (*p* < 0.05; two-way ANOVA + Tukey). [‡]Significant vs. the CEC obtained in the endothelium-intact aortic ring in the same group (*p* < 0.05; two-way ANOVA + Tukey).

control or HD, in comparison with the non-stressed groups (control and HD) (Figure 2). The HD did not change these parameters (Figure 2).

As the treatments did not modify the maximum response to phenylephrine and dry weight of aortic rings among the groups (*p* > 0.05; Table III), the CEC were expressed as percentages of maximum response (Figure 3). Considering pD₂ values of

phenylephrine of endothelium-intact rings (Table III), two-way ANOVA revealed a significant main effect of stress [*F*(1,16) = 37.923, *p* = 0.000], without significant effect of diet or interaction (*p* > 0.05). Therefore, stress induced supersensitivity to phenylephrine in the thoracic aorta with a 3.7-fold shift to the left in endothelium-intact aortic rings of the CMS group when compared with the control

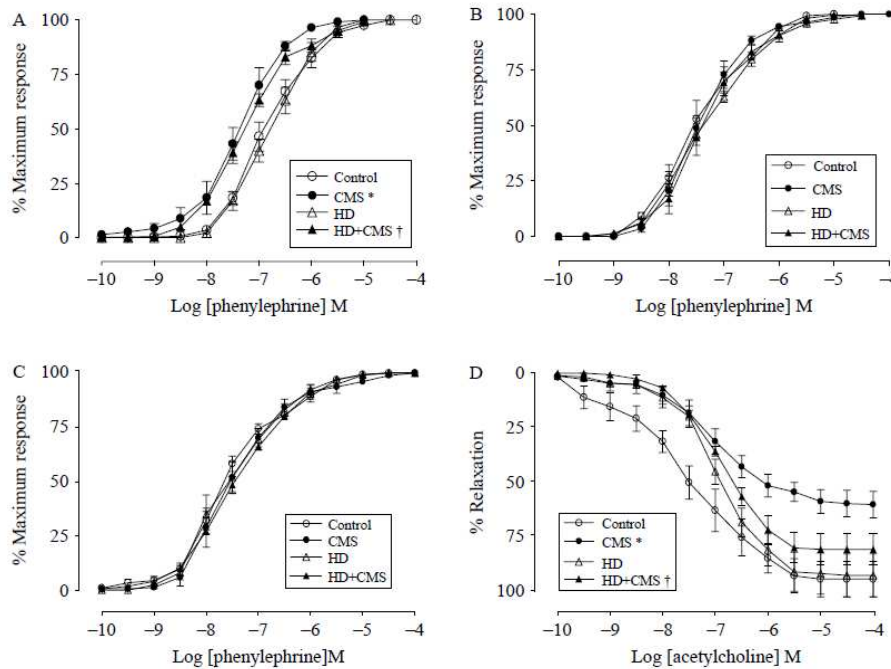


Figure 3. CEC for phenylephrine in endothelium-intact (A), endothelium-denuded (B), and in the presence of L-NAME in the endothelium-intact (C), and CEC to acetylcholine (D) obtained in the thoracic aorta isolated from control rats, stressed rats subjected to CMS, non-stressed rats fed with HD, and rats fed with HD and subjected to CMS (HD + CMS), obtained 15 days after stress protocol (*N* = 5–6 rats/group). Data are presented as mean ± SEM. *Significant difference vs. control (*p* < 0.05). [†]Significant vs. HD (*p* < 0.05).

group (Figure 3A), and a 3.2-fold shift to the left of the HD + CMS group when compared with HD group (Figure 3A). Among the groups, there was no difference in CEC obtained in aortic rings without endothelium ($p > 0.05$; Figure 3B; Table III) or in CEC obtained in the presence of L-NAME ($p > 0.05$; Figure 3C; Table III). In the aorta isolated from the control and HD groups, pD_2 values for phenylephrine obtained in the presence of L-NAME were higher in comparison with those pD_2 values obtained in the endothelium-intact aortic rings of the same group. However, L-NAME did not change pD_2 for phenylephrine in the aorta from the CMS and HD + CMS groups when compared with the endothelium-intact aorta (Table III). Considering the CEC to acetylcholine, two-way ANOVA revealed a significant main effect of stress [$F(1,19) = 8.522$, $p = 0.009$] in the maximal acetylcholine-induced relaxation, with no effect of diet or interaction ($p > 0.05$). Aortic rings isolated from stressed rats presented a markedly impaired maximal acetylcholine-induced relaxation, when compared with non-stressed groups (Control = 95.97 ± 8.22 ; CMS = 61.27 ± 6.14 ; HD = 94.21 ± 6.14 ; HD + CMS = $82.09 \pm 7.29\%$) ($p < 0.05$, Figure 3D).

When considering aortic morphology, there was a significant main effect of stress on the aorta IMT [$F(1,16) = 39.217$, $p = 0.000$], without significant effect of diet or interaction ($p > 0.05$). CMS and HD + CMS groups presented greater aorta IMT in comparison with the control and HD groups, respectively (Control = $91.3 \pm 0.7 \mu\text{m}$; CMS = $96.9 \pm 1.1 \mu\text{m}$; HD = $90.6 \pm 1.2 \mu\text{m}$; HD + CMS = $97.7 \pm 1.0 \mu\text{m}$, $p < 0.05$).

Discussion

This study showed that CMS induced insulin resistance, high concentration of lipids in the circulation, impaired the function and morphology of the thoracic aorta from the stressed groups, fed with control or high-fat but not high-sugar HD. The data indicate that CMS seems to be the determinant factor for these effects, since dyslipidemia induced by the high-fat HD alone was not sufficient to induce functional or morphological changes in the thoracic aorta.

As reported in other studies (Willner 1997; Marin et al. 2007), the high plasma corticosterone concentrations and lower final body weight observed after the end of the stress protocol in stressed rats in comparison with non-stressed rats, confirm the efficacy of the CMS protocol and support the absence of adaptation to stressors. The aim of this study was to analyze long-term effects of CMS. According to Moreau et al. (1994), CMS promotes a state of anhedonia in rats, which can last for up to 20 days after stress. Hence, the purpose of waiting 15 days

after the end of CMS was to analyze the level of corticosterone within this 20-day period of anhedonia. The sustained increase in the plasma corticosterone concentration 15 days after the end of stress confirms that CMS is an effective protocol to study the delayed effects of chronic stress in rats.

The higher values observed for final body weight, FP/BW_F, and dyslipidemia with regard to the HD versus control diet indicate the effectiveness of HD treatment to disrupt the control of body weight. These effects observed in the HD and HD + CMS when compared with the control and CMS groups could be related to the high-fat content in the HD. The oleic acid present in soybean oil, and coconut fat in the presence of sucrose (Bueno et al. 2008) can readily be converted into acetate and then into cholesterol. The SFA contained in coconut fat, mainly lauric, myristic, and palmitic acids (Mendis et al. 2001), and in soybean oil (palmitic) (Bueno et al. 2008), could increase the production of TGL and cholesterol by the liver, and could also decrease LDL catabolism by repressing its receptors (Kamgang et al. 2005). In addition, when associated with oleic acid, palmitic acid (Black 2002) could increase the biosynthesis of chylomicrons (rich in TGL) (Silva et al. 2006).

Unlike the effects of a HD on lipids, in the present study, there were no differences in fasting plasma glucose and insulin concentrations between non-stressed rats fed with hypercaloric and control diets. Moreover, the HD alone did not induce insulin resistance. Although HD intake can be associated with hyperglycemia and insulin resistance, different authors have shown that these effects are often controversial, and seem to be dependent on a high supply of fat associated with high-sugar content. While a sucrose-rich diet impaired glucose homeostasis and induced insulin resistance before the increase in adiposity was detected (Soria et al. 2001), a diet rich in coconut oil and cholesterol without a significant increase in sugar content induced an increase in blood lipids accompanied by hypoglycemia and lower concentrations of serum insulin in rats (Zulet et al. 1999). In healthy women, replacing 4% of the energy in the form of palmitic or lauric acid by mono-unsaturated fatty acids had only minor effects on serum lipids and lipoproteins and caused no changes in glucose metabolism (Schwab et al. 1995). It has also been reported that the area under the curve during the intravenous glucose tolerance test was significantly lower, or did not change, after healthy women were treated with a diet enriched with monounsaturated fatty acid or SFA, respectively (Uusitupa et al. 1994). Therefore, the fact that the carbohydrate supply was not increased in the HD used in the present study could explain the absence of differences in glucose metabolism between the HD and control groups.

The duration of treatment also influences the metabolic effects of HDs. While the treatment of rats with a high-fat diet rich in saturated and unsaturated fatty acids for a period of 24 weeks increased the blood concentration of insulin and glucose, no differences were observed after 4 or 12 weeks of treatment in comparison with the group treated with low-fat diet (Song et al. 2006). Therefore, the results of the present study confirm that the effect of a HD on glucose metabolism is dependent on the association between high-fat and high-sucrose content, since all the rats in the present study were subjected to the same period of treatment and the HD had a higher lipid content but not a higher carbohydrate content in comparison with the control diet.

When considering the metabolic effects of chronic stress, in the present study, it was observed that CMS increased the blood lipid concentration, and the association between the HD and CMS potentiated the dyslipidemia as well as the increase in FP/BW_f observed in the HD + CMS group in comparison with the control and HD groups. This effect could be related to a possible stress-induced desensitization or down-regulation of adrenoceptors in the fat cells (Black 2003), leading to lower catecholamine-induced lipolysis and increased adiposity in this group.

Another hypothesis is that the interaction between HD and CMS could have an additive effect on CMS-induced insulin resistance. In the present study, while the HD alone did not change glucose metabolism, CMS increased the fasting insulin concentrations, HOMA index values, and OGTT responses in stressed animals when compared with non-stressed rats. Therefore, the high TGL and TC concentrations in the circulation of the stressed groups may be a consequence of the insulin resistance promoted by the stress hormones. Under chronic stress conditions, corticosteroids may cause insulin resistance (Black 2002; Kyrou and Tsigos 2009), which facilitates TGL synthesis in the liver and may delay the clearance of lipoproteins, also resulting in hypercholesterolemia (Brindley et al. 1993). Moreover, the glucocorticoids may decrease the binding and degradation of LDL by liver cells (Brindley et al. 1993; Black 2002).

The metabolic effects of CMS observed in the present study are in agreement with the evidence that chronic stress interacts with dietary habits to determine the occurrence of metabolic diseases. In the chronic psychosocial stress model, it has been observed that subordination is associated with increased weight gain and dominance is associated with lower weight gain or weight loss in mice fed on a standard diet. However, opposite effects were observed in mice fed on a high-fat diet (Bartolomucci et al. 2009). It has been proposed that when chronic stress to which animals and humans cannot easily adapt is combined with high-fat high-sugar diets, it

stimulates the sympathetic nerves to upregulate the expression of neuropeptide Y, which is an adrenergic co-transmitter and stress mediator. Stress and a HD also increase the glucocorticoid concentration in visceral fat, which in turn upregulates the expression of neuropeptide Y and its receptor Y2R, resulting in fat growth, hyperinsulinemia and hyperlipidemia (Kuo et al. 2008). In the present study, although there was a cumulative effect of HD plus CMS on the elevation of blood lipid concentration, it seems that this effect did not influence the increase in fasting insulin or lead to insulin resistance. This could be explained by the duration of treatment because in the present study the rats were treated for a period of 7 weeks.

Since dyslipidemia and insulin resistance are also associated with vascular diseases and high risk of atherogenesis, the function and morphology of the thoracic aorta were also evaluated in the present study. The use of adrenergic agonists, which are not substrates of the catecholamine uptake systems, are a tool for the study of the mechanisms involved in alterations of vascular reactivity. In experiments carried out *in vitro*, comparison among the responses of endothelium-intact and endothelium-denuded aortic rings, and CEC obtained in the presence and in the absence of inhibitors of NO synthesis, are used as pharmacological tools to investigate the role of the endothelium and NO, respectively, in the modulation of vascular activity. In addition, CEC to acetylcholine may provide a direct evaluation of NO involvement in vascular physiology. In the present study, CMS induced supersensitivity to phenylephrine in aortic rings with endothelium, and this effect was independent of diet. The absence of difference in the CEC obtained in the endothelium-denuded aortic rings among the groups indicates that CMS-induced supersensitivity to phenylephrine was endothelium dependent. The absence of difference between groups, in aortic rings incubated with L-NAME, which is an NO synthesis inhibitor, indicates that endothelial NO synthase (eNOS) seems to be inhibited *in vivo*, by some other factor not related to the addition of L-NAME in the incubation bath (Neves et al. 2009). This effect seems to stem from the exposure to CMS. The lower relaxation response to acetylcholine observed in the thoracic aorta isolated from stressed groups in comparison with control and HD groups indicates that CMS decreased NO bioavailability.

Considering that dyslipidemia induced by HD in non-stressed rats did not change the sensitivity to phenylephrine or acetylcholine in the thoracic aorta, it seems that the increase in corticosterone levels and insulin resistance induced by CMS could be the main factors involved in the vascular changes observed in the present study. Glucocorticoids reduce the expression of guanosine triphosphate cyclohydrolase

1 mRNA, which is necessary for the synthesis of the cofactor tetrahydrobiopterin, essential for stabilizing eNOS (Mitchell et al. 2004). Insulin stimulates endothelium-derived NO production (Muniyappa et al. 2008) and during insulin resistance, there is a decrease in endothelial eNOS activation and an increase in NO destruction by the reactive oxygen species. These effects result in diminished vasodilatation (Whaley-Connell and Sowers 2009) and increased endothelin-mediated vasoconstriction (Muniyappa and Quon 2007), and could also be involved in the effects of CMS.

Other authors have shown that the vascular effects of other stress protocols are dependent on the genetic background of the animals. Bernatova and Csizmadiova (2006) showed that chronic crowding stress significantly reduced NO synthase activity in the aorta, and acetylcholine-induced relaxation of the femoral artery in borderline hypertensive adult rats with normotensive mothers. Bernatova et al. (2007a) did not observe change in the activity of NO synthase in the aorta of Wistar normotensive rats subjected to crowding stress. In addition, Bernatova et al. (2007b) showed that crowding stress increased the acetylcholine-induced relaxation in the femoral and mesenteric arteries from normotensive Wistar-Kyoto rats. While borderline hypertensive rats (BHR) subjected to crowding stress showed a reduction in NO synthase activity, suggesting a reduction in NO production, when compared with the control BHR, no changes were observed in Wistar normotensive rats (Okruhlicova et al. 2008). Cordellini et al. (2006) studied the effect of acute and chronic stress by immobilization in Wistar and spontaneous hypertensive rats (SHR). These authors showed that the vascular adaptive response to stress involves hyperactivity of the endothelial NO system in normotensive rats. However, in the SHR strain, this adaptive response is impaired, independently of the hypertensive state.

In addition to the influence of genetic background, the differences observed between crowding and the vascular effects of CMS could also be related to stress intensity. Since crowding is a mild stress protocol with predictable stressors, and seems to be capable of eliciting adaptive mechanisms to prevent cardiovascular dysfunctions in normotensive rats, the repeated and unpredictable characteristics of the stressors used in the CMS protocol prevent the rodents from adapting, and seem to impair endothelial function. This hypothesis is supported by the high plasma corticosterone concentrations observed in stressed rats in the present study, and the absence of significant difference in plasma corticosterone between rats subjected to chronic crowding stress and control rats (Bernatova et al. 2007a).

Diminished NO availability could also be related to the increased aorta IMT in stressed groups

(Okruhlicova et al. 2008). Morphological evaluation of IMT in the carotid artery is considered a marker of target organ damage in human hypertension (Sierra and de la Sierra 2008), and experimental studies (Razuvaev et al. 2008). Considering that decreased NO bioavailability may lead to the loss of mitogenic quiescence of vascular smooth muscle cells and consequent vessel wall hypertrophy (Costa and Assreuy 2005), the results of this study suggest that the aortic hypertrophy could be the result of the possible lack of NO elicited by the higher plasma corticosterone concentrations and insulin resistance induced by CMS.

Therefore, the proatherogenic and prohypertensive functional and morphological changes observed in the thoracic aorta from stressed rats are in agreement with the high AI values observed in both the CMS and HD + CMS groups. However, in spite of the increase in the AI value, non-stressed rats fed with the HD diet did not develop any alteration in the thoracic aorta. Another hypothesis to explain the absence of diet-induced deleterious vascular effects is that dyslipidemia has to be associated with high concentration of stress hormones or insulin resistance to be capable of generating vascular damages in rats. Further studies are needed to evaluate these hypotheses. These results indicate that rats, although resistant to the atherosclerosis induced only by diet (Moghadasian 2002), may present proatherogenic effects induced by CMS via insulin resistance.

In conclusion, the present study showed that the CMS protocol appears to be an appropriate model for the investigation of the cardiovascular and metabolic effects of stress. Investigation into the vascular damage associated with dyslipidemia induced by stress but not associated with dyslipidemia induced by the consumption of a high-fat, but not high-sugar, HD could help to clarify why some people present high cholesterol concentrations in the circulation in the absence of cardiovascular disease, while chronically stressed individuals could suffer heart attacks, for example. The association between glucocorticoids, insulin resistance, and dyslipidemia in rats may be one of the keys of association between chronic stress and cardiovascular diseases, and may be investigated in the CMS protocol providing insights for future clinical studies of the relationship between chronic stress and atherosclerosis.

Acknowledgements

The authors thank Margery Galbraith for English editing.

Declaration of interest: This work was supported by FAPESP and CNPq, Brazil. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- Bartolomucci A, Cabassi A, Govoni P, Ceresini G, Cero C, Berra D, Dadomo H, Franceschini P, Dell'Omo G, Parmigiani S, Palanza P. 2009. Metabolic consequences and vulnerability to diet-induced obesity in male mice under chronic social stress. *PLoS One* 4:e4331.
- Bernatova I, 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, Puzserova A. 2007a. Vascular function and nitric oxide production in chronic social-stress-exposed rats with various family history of hypertension. *J Physiol Pharmacol* 58:487–501.
- Bernatova I, Puzserova A, Navarova J, Csizmadiova Z, Zeman M. 2007b. Crowding-induced alterations in vascular system of Wistar-Kyoto rats: Role of nitric oxide. *Physiol Res* 56:667–669.
- Black PH. 2002. Stress and the inflammatory response: A review of neurogenic inflammation. *Brain Behav Immun* 16:622–653.
- Black PH. 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.
- Brindley DN, McCann BS, Niaura R, Stoney CM, Suarez E. 1993. Stress and lipoprotein metabolism: Modulators and mechanisms. *Metabolism* 42:3–15.
- Bueno AA, Oyama LM, de Oliveira C, Pisani LP, Ribeiro EB, Silveira VL, Oller do Nascimento CM. 2008. Effects of different fatty acids and dietary lipids on adiponectin gene expression in 3T3-L1 cells and C57BL/6J mice adipose tissue. *Pflugers Arch* 455:701–709.
- Cinti S. 2005. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73:9–15.
- Cordellini S, Novo R, Lanza U, Jr. 2006. Exposure to stress: Differential vascular adaptive response in spontaneously hypertensive and Wistar rats: Role of nitric oxide, and prohypertensive and hypertensive states. *Life Sci* 79:646–653.
- Costa RS, Assreuy J. 2005. Multiple potassium channels mediate nitric oxide-induced inhibition of rat vascular smooth muscle cell proliferation. *Nitric Oxide* 13:145–151.
- Cunha TS, Moura MJCS, Bernardes CF, Tanno AP, Marcondes FK. 2005. Vascular sensitivity to phenylephrine in rats submitted to anaerobic training and nandrolone treatment. *Hypertension* 46:1010–1015.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18:499–502.
- Gu H, Tang C, Peng K, Sun H, Yang Y. 2009. Effects of chronic mild stress on the development of atherosclerosis and expression of toll-like receptor 4 signaling pathway in adolescent apolipoprotein E knockout mice. *J Biomed Biotechnol* 613879: 10–13.
- Kamgang R, Mboumi RY, N'dillé GP, Yonkeu JN. 2005. Cameroon local diet-induced glucose intolerance and dyslipidemia in adult Wistar rat. *Diabetes Res Clin Pract* 69:224–230.
- Kaplan JR, Manuck SB, Clarkson TF, Lusso FM, Taub DM, Miller EW. 1983. Social stress and atherosclerosis in normocholesterolemic monkeys. *Science* 220:733–735.
- Karnovsky MJ. 1965. A formaldehyde–glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:137A–138A.
- Kuo LE, Czarnecka M, Kitlinska JB, Tilan JU, Kvetnansky R, Zukowska Z. 2008. Chronic stress, combined with a high-fat/high-sugar diet, shifts sympathetic signaling toward neuropeptide Y and leads to obesity and the metabolic syndrome. *Ann NY Acad Sci* 1148:232–237.
- Kyrou I, Tsigos C. 2007. Stress mechanisms and metabolic complications. *Horm Metab Res* 39:430–438.
- Kyrou I, Tsigos C. 2009. Stress hormones: Physiological stress and regulation of metabolism. *Curr Opin Pharmacol* 9:787–793.
- Lauterio TJ, Bond JP, Ulman EA. 1994. Development and characterization of a purified diet to identify obesity-susceptible and resistant rat populations. *J Nutr* 124:2172–2178.
- Levin BE, Richard D, Michel C, Servatius R. 2000. Differential stress responsivity in diet-induced obese and resistant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R1357–R1364.
- Ludwig DS. 2003. Novel treatments for obesity. *Asia Pac J Clin Nutr* 12:S8.
- Luft JH. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol* 9:409–414.
- Marin MT, Cruz FC, Planeta CS. 2007. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiol Behav* 90:29–35.
- Mendis S, Samarajeewa U, Thattil RO. 2001. Coconut fat and serum lipoproteins: Effects of partial replacement with unsaturated fats. *Br J Nutr* 85:583–589.
- Mitchell BM, Dorrance AM, Mack EA, Webb RC. 2004. Glucocorticoids decrease GTP cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin-dependent vasorelaxation through glucocorticoid receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 43:8–13.
- Moghadasian MH. 2002. Experimental atherosclerosis: A historical overview. *Life Sci* 70:855–865.
- Moreau JL. 1997. Validation of an animal model of anhedonia, a major symptom of depression. *Encephale* 23:280–289.
- Moreau JL, Bourson A, Jenck F, Martin JR, Mortas P. 1994. Curative effects of the atypical antidepressant mianserin in the chronic mild stress-induced anhedonia model of depression. *J Psychiatry Neurosci* 19:51–56.
- Moura MJCS, Marcondes FK. 2001. Influence of estradiol and progesterone on the sensitivity of rat thoracic aorta to noradrenaline. *Life Sci* 68:881–888.
- Muniyappa R, Quon MJ. 2007. Insulin action and insulin resistance in vascular endothelium. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10: 523–530.
- Muniyappa R, Iantorno M, Quon MJ. 2008. An integrated view of insulin resistance and endothelial dysfunction. *Endocrinol Metab Clin North Am* 37:685–711.
- Neves VJ, Moura MJCS, Tamascia ML, Ferreira R, Silva NS, Costa R, Montemor PL, Narvaes EAO, Bernardes CF, Novaes PD, Marcondes FK. 2009. Proatherosclerotic effects of chronic stress in male rats: Altered phenylephrine sensitivity and nitric oxide synthase activity of aorta and circulating lipids. *Stress* 12: 320–327.
- Okruhlicova L, Dlugosova K, Mitasikova M, Bernatova I. 2008. Ultrastructural characteristics of aortic endothelial cells in borderline hypertensive rats exposed to chronic social stress. *Physiol Res* 57:S31–S37.
- Razuvaev A, Lund K, Roy J, Hedin U, Caidahl K. 2008. Noninvasive real-time imaging of intima thickness after rat carotid artery balloon injury using ultrasound biomicroscopy. *Atherosclerosis* 199:310–316.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123:1939–1951.
- Schwab US, Niskanen LK, Maliranta HM, Savolainen MJ, Kesäniemi YA, Uusitupa MI. 1995. Lauric and palmitic acid-enriched diets have minimal impact on serum lipid and lipoprotein concentrations and glucose metabolism in healthy young women. *J Nutr* 125:466–473.
- Sheril A, Jeyakumar SM, Jayashree T, Giridharan NV, Vajreswari A. 2009. Impact of feeding polyunsaturated fatty acids on cholesterol metabolism of dyslipidemic obese rats of WNIN/GR-Ob strain. *Atherosclerosis* 204:136–140.
- Shively CA, Register TC, Clarkson TB. 2009. Social stress, visceral obesity, and coronary artery atherosclerosis: Product of a primate adaptation. *Am J Primatol* 71:742–751.

- Sierra C, de la Sierra S. 2008. Early detection and management of the high-risk patient with elevated blood pressure. *Vasc Health Risk Manag* 4:289–296.
- Silva AP, Guimarães DE, Mizurini DM, Maia IC, Ortiz-Costa S, Sardinha FL, do Carmo MG. 2006. Dietary fatty acids early in life affect lipid metabolism and adiposity in young rats. *Lipids* 41:535–541.
- Søndergaard LG, Stoltenberg M, Doering P, Flyvbjerg A, Rungby J. 2006. Zinc ions in the endocrine and exocrine pancreas of zinc deficient rats. *Histol Histopathol* 21:619–625.
- Song GY, Gao Y, Di YW, Pan LL, Zhou Y, Ye JM. 2006. High-fat feeding reduces endothelium-dependent vasodilation in rats: Differential mechanisms for saturated and unsaturated fatty acids? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33:708–713.
- Soria A, D'Alessandro ME, Lombardo YB. 2001. Duration of feeding on a sucrose-rich diet determines metabolic and morphological changes in rat adipocytes. *J Appl Physiol* 91:2109–2116.
- Tran TT, Kahn CR. 2010. Transplantation of adipose tissue and stem cells: Role in metabolism and disease. *Nat Rev Endocrinol* 6:195–213.
- Uusitupa M, Schwab U, Sari Makimattila S, Karhapää P, Sarkkinen E, Maliranta H, Agren J, Penttilä I. 1994. Effects of two high-fat diets with different fatty acid compositions on glucose and lipid metabolism in healthy young women. *Am J Clin Nutr* 59:1310–1316.
- Vahl TP, Ulrich-Lai YM, Ostrander MM, Dolgas CM, Elfers EE, Seeley RJ, D'Alessio DA, Herman JP. 2005. Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E823–E828.
- Whaley-Connell A, Sowers JR. 2009. Hypertension and insulin resistance. *Hypertension* 54:462–464.
- Willner P. 1997. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: A 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)* 134:319–329.
- Zulet MA, Barber A, Garcin H, Higuera P, Martínez JA. 1999. Alterations in carbohydrate and lipid metabolism induced by a diet rich in coconut oil and cholesterol in a rat model. *J Am Coll Nutr* 18:36–42.