



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE 414 – Sciences de la vie et de la santé
EA 7296 - Laboratoire de Neurobiologie et de Pharmacologie
CardioVasculaire

THÈSE présentée par :
Alessandro NASCIMENTO

soutenue le : **16 Septembre 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Sciences pharmaceutiques/ Pharmacologie

**Effets de l'inhibition du système sympathique
central sur les paramètres métaboliques et
microcirculatoires chez des rats obèses avec
syndrome métabolique.**

THÈSE dirigée par :

M. BOUSQUET Pascal

Professeur, Université de Strasbourg

M. TIBIRIÇA Eduardo

Docteur, Fundação Oswaldo Cruz

RAPPORTEURS :

Mme. BOUSQUELA Eliete
Janeiro

Professeur, Universidade do Estado do Rio de

M. DE AGUIAR Luiz Guilherme
Janeiro

Docteur, Universidade do Estado do Rio de

EXAMINATEUR :

M. GIES Jean Pierre

Professeur, Université de Strasbourg



Dedico este trabalho aos meus pais, Antonio e Sandra Nascimento, que dedicaram grande parte de suas vidas ao sucesso da minha.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao universo, pelas forças do acaso somadas ao desejo pessoal que permitiram a realização deste e dos projetos que se encaminham a partir desta nova fase que se inicia.

Aos animais utilizados na experimentação científica.

Ao meu companheiro e amigo, Rafael Janes Bastos, pela sua compreensão, parceria e incentivo durante todas as fases deste trabalho.

Ao Dr. Eduardo Tibiriçá, mais que um orientador, um pai científico, a quem serei eternamente grato pela oportunidade de fazer parte de sua equipe e por poder, ao seu lado, ter amadurecido profissionalmente. Seus ensinamentos fazem parte do que sou hoje e estarão sempre presentes ao longo desta carreira que se inicia.

Ao Prof. Pascal Bousquet, meu orientador, quem me acolheu em seu laboratório e em sua família. Por ter me participado da minha formação científica mesmo antes da realização desta tese em co-tutela. *Merci, pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire et pour m'avoir accordé votre confiance.*

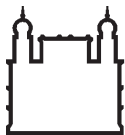
Ao Dr. Marcos Adriano Lessa e Dr. Hugues Greney, pela atenção e receptividade dada ao projeto, seja no Brasil, ou na França.

Aos amigos Marcus Vinícius, Vanessa Estado, Cláudia Valéria, Isabela Bonomo, Felipe Freitas, Claudia DeTapia, Nathália de Jesus e Fabiana Gomes, que muito contribuíram para que este projeto fosse concluído em tempo, além de ajudarem direta e indiretamente ao longo deste projeto, proporcionando momentos de grande aprendizado acadêmico.

Aos integrantes do Laboratório de Investigação Cardiovascular (Juliana Borges, Paula Jotha, Bárbara Antunes, Larissa Andrade, Daniele Nascimento e Nathalie Obadia) e do Laboratório de Neurobiologia e Farmacologia Cardiovascular (Roland Lawson, Lyne Fellmann, Camille Doras et Luc Gigou), pela presença e colaboração em diferentes fases deste projeto.

Aos membros desta banca, Dra. Eliete Bouskela, Dr. Luiz Guilherme Kraemer-Aguiar e Dr. Jean-Pierre Gies, e suplentes, Bruno Sabino e Luciana Garzoni.

Aos integrantes do Pavilhão Ozório de Almeida e órgãos de fomento CNPq, Capes e FAPERJ.

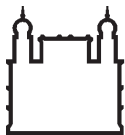


Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

“Em algum lugar,
alguma coisa incrível está esperando para ser conhecida.”
Carl Sagan



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

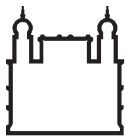
EFEITOS DA INIBIÇÃO DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO CENTRAL SOBRE OS PARÂMETROS METABÓLICOS E MICROCIRCULATÓRIOS EM RATOS OBESOS COM SÍNDROME METABÓLICA

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Alessandro Rodrigues do Nascimento

Fatores de risco cardiovascular e metabólico, incluindo hipertensão arterial, obesidade e intolerância à glicose, fazem parte da definição da Síndrome Metabólica (SM). Sabe-se, atualmente, que estes fatores de risco são acompanhados de uma hiperatividade do sistema nervoso simpático que pode desempenhar um papel importante na fisiopatologia dessas alterações. No presente estudo, investigamos os efeitos da modulação do sistema nervoso simpático sobre os parâmetros metabólicos e microvasculares de ratos submetidos à dieta rica em gordura (HFD) com suplementação de sal. Para isso, 50 ratos Wistar machos adultos receberam dieta normal (CON + VEI, n = 10) ou dieta hiperlipídica (HFD + VEI, n = 40) durante 20 semanas. Em seguida, o grupo HFD foi tratado com clonidina (HFD + CLO, 0,1 mg/kg), rilmenidina (HFD + RIL, 1 mg/kg), LNP599 (HFD + LNP, 10 mg/kg) ou veículo (HFD + VEI). A densidade capilar funcional (DCF) foi avaliada no músculo grácil (MG) e na pele da orelha através de videomicroscopia intravital e a densidade capilar estrutural (DCE) foi estudada no MG e no ventrículo esquerdo (VE) pela análise histoquímica. A pressão arterial sistólica (PAS) foi avaliada por fotopletimografia e as catecolaminas foram dosadas por meio de HPLC. Houve um aumento na PAS e frequência cardíaca ($p < 0,05$) no grupo HFD + VEI comparado ao grupo CON + VEI. O grupo HFD+VEI também apresentou uma diminuição na DCF e na DCE do MG, em relação ao grupo HFD+VEI (153 ± 8 vs 253 ± 16 capilares/mm² e $1,5 \pm 0,08$ vs $1,8 \pm 0,04$ capilares/fibra, $p < 0,05$, respectivamente). No entanto, não houve alteração na DCF da pele. A DCE foi reduzida no VE do grupo HFD+VEI quando comparado com o grupo CON+VEI ($0,18 \pm 0,01$ vs $0,33 \pm 0,01$ $V_{v[cap]}/V_{v[fib]}$, $p < 0,05$). Os grupos de animais com SM tratados com clonidina, rilmenidina ou LNP599 apresentaram uma redução similar da PAS ($p < 0,05$) quando comparados com o grupo HFD+VEI e dos níveis de adrenalina (68 ± 7 , 64 ± 8 e 64 ± 8 pg/ml, respectivamente, $p < 0,05$) quando comparados com o grupo HFD+VEI (89 ± 4 pg / ml). Os níveis de noradrenalina no plasma foram reduzidos com rilmenidina e LNP599 ($p < 0,05$) quando comparados com o grupo HFD+VEI. Estas reduções das catecolaminas foram acompanhadas por um aumento na DCF e DCE do músculo esquelético, quando comparadas com o grupo HFD+VEI. Por outro lado, houve um aumento na DCE do VE no grupo HFD+RIL. Concluiu-se que a modulação da atividade simpática resulta em redução simultânea da PAS e das catecolaminas no plasma, acompanhadas por uma diminuição da rarefação capilar no músculo esquelético e no ventrículo esquerdo, no modelo de SM em ratos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

THE EFFECTS OF CENTRAL SYMPATHETIC NERVOUS SYSTEM MODULATION ON METABOLIC AND MICROCIRCULATORY PARAMETERS IN OBESE RATS WITH METABOLIC SYNDROME

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Alessandro Rodrigues do Nascimento

Cardiovascular and metabolic risk factors that characterize the metabolic syndrome (MS), including high blood pressure, obesity and glucose intolerance, are accompanied by sympathetic hyperactivity. In this study, we investigated the effects of a chronic oral antihypertensive treatment using centrally-acting sympatho-inhibitory drugs on the metabolic and microvascular parameters in rats under long-term high-fat diet with salt supplementation. For that, fifty male adult Wistar rats were maintained under normal (CON+VEI, n = 10) or high-fat diet (HFD+VEI, n = 40) during 20 weeks. Thereafter, the HFD group received oral clonidine (HFD+CLO, 0.1 mg/kg), rilmenidine (HFD+RIL, 1 mg/kg), LNP 599 (HFD+LNP, 10 mg/kg) or vehicle (HFD+VEI). Functional capillary density (FCD) was evaluated in the gracilis muscle and skin of the ear using intravital videomicroscopy and structural capillary density (SCD) was studied in the skeletal muscle and left ventricle using histochemical analysis. Systolic blood pressure (SBP) was evaluated by photo-plethysmography and plasma catecholamines by HPLC. There was an increase in SBP and heart rate ($p < 0.05$) in the HFD+VEI compared to the CON+VEI group. The HFD+VEI group also presented a decrease in FCD and SCD in the gracilis muscle, compared to CON + VEI group (153 ± 8 vs. 253 ± 16 capillaries/ mm^2 and 1.5 ± 0.08 vs. 1.8 ± 0.04 capillaries/fiber, $p < 0.05$, respectively). However, there were no alterations in FCD in the skin. The SCD was reduced in the left ventricle of the HFD+VEI group when compared to the CON + VEI group (0.18 ± 0.01 vs. 0.33 ± 0.01 $V_{v[\text{cap}]} / V_{v[\text{fib}]}$, $p < 0.05$). The groups of animals submitted to HFD and treated with clonidine, rilmenidine and LNP 599 presented a similar reduction in SBP ($p < 0.05$) when compared to the HFD+VEI group and in adrenaline levels (68 ± 7 and 64 ± 8 and 64 ± 8 pg/mL, respectively, $p < 0.05$) when compared to the HFD+VEI group (89 ± 4 pg/mL). Plasma noradrenaline levels were reduced by rilmenidine and LNP 599 (242 ± 13 and 233 ± 25 pg/mL, respectively, $p < 0.05$) when compared to the HFD+VEI group (345 ± 31 pg/mL). These reductions in systemic catecholamines were accompanied by an increase in the FCD and SCD in the skeletal muscle when compared to the HFD+VEI group. Moreover, there was an increase in the SCD in the left ventricle in the HFD+RIL group when compared to the HFD+VEI group. We concluded that, the modulation of sympathetic activity results in a simultaneous reduction of SBP and plasma catecholamines accompanied by an improvement of capillary rarefaction in the skeletal muscle and left ventricle in an experimental model of MS in rats.

Sumário

Lista de Abreviaturas.....	1
Lista de Tabelas.....	5
Lista de Figuras	6
1. Introdução	8
1.1. Síndrome metabólica.....	8
Definição e diagnóstico	8
Fisiopatologia da Síndrome Metabólica	12
Tratamento da Síndrome Metabólica	21
1.2. Sistema Nervoso Simpático.....	22
Estrutura e Organização Anatômica.....	22
Os Receptores Adrenérgicos.....	27
Farmacologia dos Receptores α -Adrenérgicos	28
Hiperatividade Simpática na Síndrome Metabólica.....	33
2. Objetivos.....	36
2.1. Objetivo Geral	36
2.2. Objetivos Específicos	36
3. Metodologia.....	37
3.1. Efeitos da modulação do sistema nervoso simpático em ratos com SM.	37
3.2. O papel dos ligantes seletivos dos receptores periféricos I_1 das imidazolininas.	46
3.3. Desenvolvimento de um modelo farmacológico da hiperatividade simpática em camundongos.	52
4. Resultados	54
4.1. Desenvolvimento de um modelo experimental de síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica caracterizado pela presença de hiperatividade simpática.	54
4.2. Efeitos da modulação do sistema nervoso simpático em ratos com SM.	56
4.3. Detecção e função dos receptores periféricos I_1 das imidazolininas.	69
4.4. Desenvolvimento de um modelo farmacológico de hiperatividade simpática em camundongos.	73
5. Discussão	77
6. Conclusões.....	92
7. Trabalhos apresentados em congresso.....	93
8. Referências	94
9. Anexos (Artigos Publicados)	116

Lista de Abreviaturas

AGLs.....	Ácidos graxos livres
ANOVA	Análise de Variância; <i>Analysis of Variance</i>
ApoE ^{-/-}	Apolipoproteína E knockout
ATP III	Programa Nacional de Educação do Colesterol – <i>National Cholesterol Program Education – Adult Panel III</i>
AUC.....	Área Sob a Curva, <i>Area Under the Curve</i>
BSA.....	Albumina de Soro Bovino
CECAL.....	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CEUA.....	Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório
COMT.....	Catecol-O-Metiltransferase
CON.....	Grupo Controle
CLO.....	Grupo tratado com Clonidina
CVLM.....	Região Ventrolateral Caudal do Bulbo
DBH.....	Dopamina β -Hidroxilase
DCV	Doença Cardiovascular
DD.....	Dopa Descarboxilase
DES.....	Grupo tratado com Desipramina
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	Ácido Desoxirribonucleico; <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DKO.....	Duplo Knockout

DOPA..... Dihidroxifenilalanina

eNOS..... Óxido Nítrico Sintase Endotelial; *Endothelial Nitric Oxide Synthase*

EO.....Estresse Oxidativo

EPM Erro padrão da média

ET-1.....Endotelina 1

FC..... Frequência Cardíaca

FITC.....Fluoresceína-isotiocianato

GPX..... Glutathione Peroxidase

HDL Lipoproteína de Alta Densidade; *High-Density Lipoprotein*

HFD..... Grupo alimentado com Dieta Hiperlipídica; *High-Fat Diet*

HOMA..... Modelo de avaliação da homeostase; *Homeostasis model assessment*

IDF Federação Internacional do Diabetes; *International Diabetes Federation*

IL-6 Interleucina 6; *Interleukin 6*

IMC Índice de Massa Corporal

IR Receptor de Insulina; *Insulin Receptor*

IP..... Intraperitoneal

IV Intravenoso

Kd.....Constante de Dissociação

KO.....Knockout

LDL..... Lipoproteína de baixa densidade; *Low-Density Lipoprotein*

LNP.....Grupo tratado com LNP599; agonista seletivo dos receptores I₁-imidazolínicos.

LNPCV.....Laboratório de Neurobiologia e Farmacologia Cardiovascular; *Laboratoire de Neurobiologie et de Pharmacologie CardioVasculaire*

MAO.....Monoaminaoxidase

MCP-1.....Proteína Quimiotática de Monócito 1

NOR.....Noradrenalina

NET.....Transportador de Noradrenalina

NO..... Óxido Nítrico; *Nitric Oxide*

NOS..... Óxido Nítrico Sintase; *Nitric Oxide Synthase*

NTS.....Núcleo do Trato Solitário

OMS Organização Mundial de Saúde

PA Pressão Arterial

PAS Pressão Arterial Sistólica

PAI - 1 Inibidor do Ativador de Plasminogênio 1; *Plasminogen Activator Inhibitor 1*

PIC.....ParaiodoClonidina

ROS..... Espécies Reativas de Oxigênio; *Reactive Oxygen Species*

RI.....Resistência à Insulina

RI₁.....Receptores I₁-imidazolínicos

RIL.....Grupo tratado com Rilmenidina

RNA_m..... Ácido Ribonucleico mensageiro; *messenger Ribonucleic acid*

RNS.....Espécie Reativa de Nitrogênio

RVLM.....Região Ventrolateral Rostral do Bulbo

SHR..... Rato Espontaneamente Hipertenso; *Spontaneously Hypertensive Rats*

SNC.....Sistema Nervoso Central

SNP.....Sistema Nervoso Parassimpático

SNS.....Sistema Nervoso Simpático

SM..... Síndrome Metabólica

SOD..... Superóxido Dismutase; *Superoxide Dismutase*

TH.....Tirosina Hidroxilase

TOTG.....Teste Oral de Tolerância à Glicose

VE.....Ventrículo Esquerdo

VMA.....Ácido Vanil Mandélico

TNF Fator de Necrose Tumoral; *Tumor Necrosis Factor*

Lista de Tabelas

TABELA 1.1: COMPONENTES DA SM SEGUNDO O NCEP-ATP III (2001) E (2005).	10
TABELA 1.2: CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO PARA SM SEGUNDO À FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES (IDF):	11
TABELA 1.3: DEFINIÇÃO DOS RECEPTORES A-ADRENÉRGICOS SEGUNDO SEUS LIGANTES DE ALTA AFINIDADE.	27
TABELA 1.4: AFINIDADES DE DIFERENTES LIGANTES PARA RECEPTORES I ₁ - IMIDAZOLÍNICOS E RECEPTORES A ₂ -ADRENÉRGICOS.	33
TABELA 3.1: COMPOSIÇÃO DAS DIETAS.	38
TABELA 4.1: CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE SÍNDROME METABÓLICA BASEADA EM UMA DIETA HIPERLIPÍDICA DE 20 SEMANAS.	55
TABELA 4.2: COMPOSIÇÃO CORPORAL, INGESTÃO ALIMENTAR E DEPÓSITOS DE GORDURA VISCERAL E EPIDIDIMAL APÓS 4 SEMANAS DE TRATAMENTO COM ANTI- HIPERTENSIVOS DE AÇÃO CENTRAL.	57

Lista de Figuras

FIGURA 1.1: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA RAMIFICAÇÃO MICROVASCULAR (ADAPTADO DE GUYTON 2002).	18
FIGURA 1.2: ESQUEMA FUNCIONAL DOS NEURÔNIOS PRÉ E PÓS-GANGLIONARES DOS SISTEMAS NERVOSO SIMPÁTICO E PARASSIMPÁTICO E SUA ORGANIZAÇÃO. ACH: ACETILCOLINA. NOR: NORADRENALINA.....	23
FIGURA 1.3: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS VIAS AFERENTES, PRINCIPAIS ÁREAS DE INTEGRAÇÃO BULBAR E VIAS EFERENTES DO REFLEXO PRESSORRECEPTOR ARTERIAL.	24
FIGURA 1.4: SÍNTESE, LIBERAÇÃO E RECAPTAÇÃO DE NORADRENALINA NAS SINAPSES NORADRENÉRGICAS.....	26
FIGURA 1.5: ESTRUTURA QUÍMICA DA CLONIDINA, RILMENIDINA, MOXONIDINA E LNP599.	29
FIGURA 1.6: ANEL IMIDAZÓLICO.	30
FIGURA 3.1: DIVISÃO DOS GRUPOS(N=10 ANIMAIS) E O PROTOCOLO EXPERIMENTAL. PA = PRESSÃO ARTERIAL, FC= FREQUÊNCIA CARDÍACA.	39
FIGURA 3.2: SISTEMA PARA REGISTRO INDIRETO DA PRESSÃO ARTERIAL CAUDAL EM RATOS.....	40
FIGURA 3.3: IMAGENS REPRESENTATIVAS DA VIDEOMICROSCOPIA INTRAVITAL DA PELE E DO MÚSCULO GRÁCIL DE RATOS NORMOTENSOS WKY APÓS A ADMINISTRAÇÃO INTRAVENOSA DE FLUORESCÉINA-ISOTIOCIANATO (FITC) DEXTRAN INDICANDO OS CAPILARES.	41
FIGURA 3.4: IMAGENS REPRESENTATIVAS DE FOTOMICROGRAFIAS ADQUIRIDAS UTILIZANDO MICROSCOPIA FLUORESCENTE CONFOCAL PARA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA DENSIDADE CAPILAR ESTRUTURAL COM LECTINA <i>GRIFFONIA</i> <i>SIMPLICIFOLIA</i> ACOPLADA À FITC-CONJUGADO. O ARRANJO ANATÔMICO DA REDE CAPILAR DO MÚSCULO ESQUELÉTICO EM SEÇÕES TRANSVERSAIS PODE SER OBSERVADO EM (A). NO VENTRÍCULO ESQUERDO, A DENSIDADE CAPILAR ESTRUTURAL FOI AVALIADA EM SEÇÕES OBTIDAS UTILIZANDO O MÉTODO “ORIENTADOR”. AUMENTO 200X, BARRA = 100 MM (B).	44
FIGURA 4.1: PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA E FREQUÊNCIA CARDÍACA BASAL (BARRAS ABERTAS) E APÓS (BARRAS FECHADAS) TRATAMENTO CRÔNICO COM ANTI- HIPERTENSIVOS DE AÇÃO CENTRAL POR 28 DIAS.	58
FIGURA 4.2: EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ANTI-HIPERTENSIVOS DE AÇÃO CENTRAL SOBRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE NORADRENALINA (A), ADRENALINA (B), DOPAMINA (C) E LEPTINA (D).....	60
FIGURA 4.3: EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ANTI-HIPERTENSIVOS DE AÇÃO CENTRAL SOBRE A GLICEMIA DE JEJUM (A), A INSULINA (B), ÁREA SOB A CURVA (AUC) DO TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA A GLICOSE (C) E O HOMA-IR (D).	62
FIGURA 4.4: EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ANTI-HIPERTENSIVOS DE AÇÃO CENTRAL SOBRE O COLESTEROL TOTAL (A), HDL-C (COLESTEROL HDL, B), LDL-C (COLESTEROL LDL, C) E SOBRE OS TRIGLICERÍDEOS (D).	63
FIGURA 4.5: EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ANTI-HIPERTENSIVOS DE AÇÃO CENTRAL SOBRE A DENSIDADE CAPILAR FUNCIONAL NO MÚSCULO GRÁCIL E NA PELE DA ORELHA.	65
FIGURA 4.6: EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ANTI-HIPERTENSIVOS DE AÇÃO CENTRAL SOBRE A DENSIDADE CAPILAR ESTRUTURAL NO MÚSCULO GRÁCIL E NO VENTRÍCULO ESQUERDO.....	67
FIGURA 4.7: EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ANTI-HIPERTENSIVOS DE AÇÃO CENTRAL SOBRE O DIÂMETRO DE CARDIOMIÓCITO E A DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO NO VENTRÍCULO ESQUERDO.	68

FIGURA 4.8: ENSAIO DE COMPETIÇÃO DA [125 I] PARAIODOCLONIDINA (PIC) NA PRESENÇA DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE DIFERENTES LIGANTES SELETIVOS DOS RECEPTORES A ₂ -ADRENÉRGICOS (RAUWOLSCINA E UK 14304) EM CÉLULAS DO TECIDO ADIPOSEO DE RATOS WKY.	69
FIGURA 4.9: CURVA DE COMPETIÇÃO DA [125 I] PARAIODOCLONIDINA (PIC) NA PRESENÇA DE CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DO AGONISTA SELETIVO DOS RI ₁ (LNP599) EM CÉLULAS DO TECIDO ADIPOSEO DE RATOS WKY APÓS BLOQUEIO DOS RECEPTORES A ₂ -ADRENÉRGICOS.....	70
FIGURA 4.10: ENSAIO LIPOLÍTICO COM FORSCOLINA EM PRESENÇA DO UK 14304 OU LNP599 PARA AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO ADIPOCITÁRIA.	72
FIGURA 4.11: EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM DESIPRAMINA (DES, BARRAS FECHADAS) OU VEÍCULO (CON, BARRAS ABERTAS) SOBRE O PESO CORPORAL E A INGESTÃO ALIMENTAR EM CAMUNDONGOS APOE ^{-/-} DURANTE 16 SEMANAS.	73
FIGURA 4.12: EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM DESIPRAMINA (DES, BARRAS FECHADAS) OU VEÍCULO (CON, BARRAS ABERTAS) SOBRE A GLICEMIA DE JEJUM EM CAMUNDONGOS APOE ^{-/-} DURANTE 16 SEMANAS.....	74
FIGURA 4.13: EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM DESIPRAMINA (BARRAS FECHADAS) OU VEÍCULO (BARRAS ABERTAS) SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA E FREQUÊNCIA CARDÍACA EM CAMUNDONGOS APOE ^{-/-} DURANTE 16 SEMANAS.	75
FIGURA 4.14: EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM DESIPRAMINA (DES) OU VEÍCULO (CON) SOBRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE NORADRENALINA (A), ADRENALINA (B) E DOPAMINA (C) EM CAMUNDONGOS APOE ^{-/-}	76

1. Introdução

Na última década, o crescimento epidêmico das doenças crônicas não transmissíveis, principalmente doenças cardiovasculares e diabetes mellitus do tipo 2 (DM2), pode ser atribuído ao aumento da exposição aos principais fatores de risco para essas doenças e às mudanças na pirâmide demográfica, com o aumento da longevidade da população (1). Além disso, a maioria dos países em desenvolvimento passa por uma transição nutricional, acarretando no aumento expressivo da obesidade e das alterações cardiometabólicas que caracterizam a síndrome metabólica (SM).

Esta síndrome se tornou tão comum em países desenvolvidos e em desenvolvimento que hoje já é vista como uma patologia endêmica, com cerca de uma em cada cinco pessoas afetadas, sendo ela comum a ambos os sexos e todos os grupos étnicos, porém sua prevalência está relacionada à idade, com um pico entre pessoas de meia-idade e idosas (2). Sua prevalência é avaliada entre 20 a 25% da população geral, com comportamento crescente nas últimas décadas (3), e atingindo 42% dos indivíduos com idade superior a 60 anos (2).

Indivíduos com SM apresentam risco 2 a 3 vezes maior de morbi-mortalidade cardiovascular que indivíduos sem a síndrome (4). Em crianças e adolescentes a estimativa foi de 4,2%, sendo mais alta prevalência em meninos. Nos adolescentes com sobrepeso, calculado pela curva de percentil IMC/idade, esse número aumenta para 28,7% (5, 6). No Brasil, há poucos estudos com amostras significativas da prevalência de SM. Contudo, um estudo realizado em Vitória (ES) com 380 adolescentes de 10 a 14 anos revelou prevalência total de 1,3% nessa população (7). No mundo, os dados de prevalência da SM são muito preocupantes, já que esta síndrome estabelece um prognóstico de diabetes e doenças cardiovasculares (4, 8). Sendo assim, há um enorme apelo médico e socioeconômico para se identificar marcadores da SM que possam auxiliar no combate à progressão da atual epidemia.

1.1. Síndrome metabólica

Definição e diagnóstico

A SM foi descrita pela primeira vez em 1988 por Reaven sob o nome de síndrome X (9). Ele a definiu como a combinação de intolerância à glicose e resistência à insulina (RI), dislipidemia e hipertensão arterial. Posteriormente, outros critérios,

como a obesidade, foram adicionados a esta síndrome, que agora é mais conhecida como a SM. No entanto, em 1923 o médico sueco Eskil Kylin já havia observado uma tríade de alterações metabólicas em seus pacientes, composta pela hiperglicemia, hipertensão e hiperuricemia (10-12). Em 1989, a síndrome foi renomeada como “quarteto mortal” (obesidade, intolerância à glicose, hipertrigliceridemia e hipertensão) (13), e em 1992, esta foi novamente renomeada como “Síndrome da resistência à insulina” (8). Atualmente, o termo “síndrome metabólica” é o mais utilizado e tem sido empregado pela literatura especializada de forma ampla e rotineira, mesmo que sua definição ainda sofra variações.

A definição exata desta síndrome é tema de intenso debate no seio das comunidades médicas e científicas internacionais. Na verdade, existem várias definições desta síndrome, mas nenhuma delas apresenta um consenso, o que se tornou um problema de diagnóstico na prática clínica. Mesmo assim, o que é universalmente aceito, é que os pacientes com SM, independentemente da sua definição, apresentam um aumento muito significativo no risco de desenvolverem doenças cardiometabólicas como a insuficiência cardíaca e o DM2, os quais contribuem para a morbidade e mortalidade dessa síndrome (14-16).

Embora a SM tenha sido reconhecida em diferentes formas desde 1923, os componentes, a definição e a importância clínica são assuntos em debate até os nossos dias. Em 1998, a Organização Mundial da Saúde (OMS) desenvolveu a definição, sendo que a RI era pré-requisito absoluto para o diagnóstico, identificada por uma das seguintes alterações do metabolismo glicídico: glicemia de jejum alterada, alteração do teste de tolerância à glicose ou evidência de RI dado pelo índice de HOMA (produto de insulina de jejum e glicemia de jejum). Era também necessária a presença de 2 dos seguintes fatores de risco: obesidade, triglicerídeos ≥ 150 mg/dL, HDL-colesterol < 35 mg/dL, índice de massa corpórea > 30 kg/m² ou relação cintura/quadril $> 0,9$ para homens e $0,85$ para mulheres, uso de anti-hipertensivos ou níveis de pressão arterial $\geq 140/90$ mmHg, e excreção urinária de albumina > 20 mcg/min. A desvantagem dessa classificação é ser muito complexa para ser realizada (17).

Em 1999, o Grupo Europeu para o Estudo da Resistência a Insulina modificou o critério da OMS, mas, da mesma forma, a RI era considerada pré-requisito absoluto, além de mais 3 critérios adicionais: obesidade, hipertensão arterial e dislipidemia. Aqui,

o critério de obesidade era circunferência abdominal, enquanto o da OMS incluía a relação abdome/quadril ou o IMC. Sendo excluída desta classificação, a microalbuminúria.

Em 2001, o Programa de Educação do Colesterol Nacional - III Painel de Tratamento de Adultos (NCEP-ATP III) desenvolveu uma nova definição de SM, na qual a glicemia não é considerada um fator imprescindível (18). Essa definição foi revisada em 2005 e incluía 3 de 5 fatores de risco facilmente obtidos e, ainda hoje, esse critério é um dos mais utilizados. Tabela 1.1

Tabela 1.1: Componentes da SM segundo o NCEP-ATP III (2001) e (2005).

Componentes	Níveis (2001)	Níveis (2005)
Obesidade abdominal: Circunferência abdominal		
Homens	≥ 102 cm	≥ 102 cm
Mulheres	≥ 88 cm	≥ 88 cm
Triglicerídios	≥ 150mg/dL	≥ 150mg/dL
HDL-colesterol		
Homens	≤ 40 mg/dL	≤ 40 mg/dL
Mulheres	≤ 50 mg/dL	≤ 50 mg/dL
Pressão Arterial	≥ 130/85 mmHg	≥ 130/85 mmHg
Glicemia de Jejum	≥ 110mg/dL	≥ 100mg/dL

Em 2005, em uma revisão dos critérios de SM, a American Heart Association e o National Heart, Lung and Blood Institute mantiveram o critério do NCEP-ATP III, porque esse critério é mais simples de ser aplicado e não enfatiza uma única etiologia para a SM, apenas reduz o ponto de corte da glicemia de 110 para 100 mg/dL. Contudo, a I Diretriz Brasileira para o Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica, de 2005, utiliza o critério da NCEP-ATP III de 2001.

Pelas evidências da relação entre obesidade central e risco cardiovascular, em 2005, a Federação Internacional de Diabetes (IDF) publicou novo critério de SM, que requer a presença de obesidade abdominal e não necessariamente de RI, além de dois ou mais critérios (19). A Tabela 1.2 mostra valores diferenciados para a circunferência abdominal nas diferentes etnias.

Tabela 1.2: Critérios de diagnóstico para SM segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF):

CRITÉRIO	DEFINIÇÃO
Obesidade abdominal	
Homens	
Branco de origem europeia e negro	≥ 94 cm
Mulheres	
Branca de origem europeia e negra	≥ 80 cm
Triglicerídios	≥ 150 mg/dL ou em tratamento
HDL-colesterol	
Homens	≤ 40 mg/dL
Mulheres	≤ 50 mg/dL
Pressão Arterial	
Sistólica	≥ 130 mmHg ou em tratamento
Diastólica	≥ 85 mmHg ou em tratamento
Glicemia de Jejum	≥ 100 mg/dL ou em tratamento

Estas definições foram criadas para facilitar o diagnóstico da SM na prática clínica, onde a avaliação da RI não é uma rotina fácil. No entanto, a medida da glicemia de jejum é muitas vezes o primeiro marcador de resistência insulínica e, portanto, diabetes do tipo 2 (fator de risco cardiovascular alto). A medida da glicemia de jejum em pacientes obesos permitiria então, identificar pacientes em risco. Outras doenças estão associadas com a SM como um estado pró-inflamatório e pró-trombótico, mas não podem ser facilmente medidas em clínica. É por isso que estas definições baseiam-se em critérios simples de fácil avaliação. Ao contrário da primeira definição da OMS, que não está centrada na homeostase da glicose, de fato, trata-se de anormalidades glicídicas da mesma maneira que os outros componentes da SM. Usando definições como a da NCEP ATP III ou IDF o diagnóstico de SM seria então facilitado, através de observações simples, não há padrões absolutos. Os médicos definem um diagnóstico de SM, quando há pelo menos três elementos da lista, além da obesidade abdominal obrigatória.

Fisiopatologia da Síndrome Metabólica

Não há consenso real sobre fatores desencadeantes da SM. A ocorrência de anormalidades no metabolismo da glicose e dos lipídeos ainda é a possível causa mais aceita. O primeiro órgão mais afetado é o músculo esquelético, que se torna resistente à ação da insulina, reduzindo o transporte e a utilização de glicose circulante. A glicose aumentada induz aumento da secreção de insulina. A hiperinsulinemia é provavelmente, uma das principais causas da DM2, hipertensão arterial e disfunção metabólica (20).

A RI no músculo esquelético inicia uma alteração na utilização da glicose. A glicogênese muscular é reduzida em favor da lipogênese hepática resultando no aumento dos triglicerídeos e uma diminuição nos níveis de HDL do plasma, um perfil lipídico pró-aterogênico. Todavia, se a RI é a causa da SM, ainda restaria a questão da origem da própria RI.

A adiposidade visceral é outra anomalia mais frequentemente mencionada como parte essencial no desenvolvimento da SM associada a RI. No entanto, uma sequência cronológica para o surgimento das alterações funcionais a partir da associação adiposidade visceral/RI não seja clara. Hoje, o papel da RI é amplamente conhecido como elo entre a obesidade de distribuição central, intolerância à glicose, hipertensão arterial, dislipidemia, distúrbios da coagulação, hiperuricemia e microalbuminúria, integrantes da SM. Hotamisligil e cols. foram os primeiros a mostrar que a inflamação do tecido adiposo na obesidade estaria envolvida na RI (21). Além disso, a obesidade contribui para o estabelecimento de diversas alterações fisiológicas presentes na fisiopatologia da SM, são elas:

- Lipólise e liberação de ácidos graxos livres
- Aumento do estado pró-inflamatório
- Disfunção endotelial e Estresse Oxidativo
- A ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona
- Alterações microcirculatórias
- A ativação do sistema nervoso simpático

Lipólise E Liberação De Ácidos Graxos Livres

Um cenário alternativo é o possível papel dos ácidos graxos livres (AGLs). Uma corrente de investigadores acredita que os AGLs provenientes da lipólise na gordura visceral, liberados em grande quantidade na circulação portal, tenham papel definitivo na gênese da resistência tecidual à ação insulínica, tanto a nível hepático como periférico.

Arner e colaboradores sugeriram que a infusão de AGLs na veia porta provenientes da gordura visceral, ao entrar diretamente no fígado, poderia ser responsável pelos efeitos prejudiciais na ação da insulina (teoria portal) (22). Está documentado que o aumento dos AGLs pela infusão de uma emulsão lipídica conduz, no prazo de algumas horas, a uma insulinoresistência substancial (23-25). Griffin e colaboradores examinaram os efeitos desta infusão e sugeriram que os AGLs interferem na sinalização da insulina ao nível da cascata da serina-quinase envolvendo a proteína cinase C, levando a defeitos na sinalização da insulina e no transporte de glicose (26). Outro mecanismo possível refere-se às ações hemodinâmicas da insulina, que atua para aumentar o volume de distribuição de um compartimento (27). Em 2006, Ellmerer e colaboradores documentaram que a capacidade da insulina para melhorar a distribuição, e presumivelmente o próprio acesso da insulina no músculo esquelético, está severamente atenuada em modelo de cão obeso alimentado com gordura (28).

No nível vascular, observa-se diminuição na vasodilatação dependente de endotélio após infusão de uma emulsão lipídica, com aumentos transitórios nos AGLs circulantes em voluntários saudáveis (29). Há evidências de que os AGLs reduzem a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) por inibição da atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e estimulação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela NADPH oxidase (30). Portanto, os AGLs seriam potentes candidatos para mediar os efeitos da deposição de gordura no desenvolvimento da RI.

Aumento Do Estado Pró-Inflamatório E Pró-Trombótico

De acordo com trabalho publicado em 1998, alguns estímulos como a superalimentação, principalmente quando baseada em alimentos ricos em gorduras saturadas, e também influências ambientais, como estresse crônico, causariam um aumento na secreção de citocinas que favoreceriam o desenvolvimento da RI e o agrupamento de fatores de risco cardiovasculares associados com a SM (31). Também é sabido que defeitos na ação da insulina nos tecidos-alvo, tais como músculo, fígado e o

tecido adiposo levam a um aumento do processo inflamatório crônico de baixa intensidade (32).

Na obesidade, o acúmulo de tecido adiposo induz um estado pró-inflamatório e pró-trombótico caracterizado pela secreção de diversas citocinas pelos adipócitos, como a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que, por sua vez, interferem na sinalização intracelular da insulina, comprometem a função endotelial e o metabolismo pós-prandial (33, 34). A expressão de receptores para TNF- α em obesos é duas vezes maior do que em não-obesos, e há forte correlação entre a densidade de receptores de TNF- α com o índice de massa corpórea e com a circunferência abdominal (35). Esta citocina aumenta a produção de endotelina 1 (ET-1) e de angiotensinogênio, semelhante à disfunção endotelial que pode ocorrer em obesos hipertensos (36), além de estimular a lipólise e inibir a lipogênese (37). O TNF- α associa-se, ainda, à promoção da aterosclerose por alterar a estabilidade plaquetária e a permeabilidade do endotélio, além de ativar monócitos (38).

Além disso, o adipócito é responsável por secretar proteínas quimiotáticas de monócitos-1, que induzem a atração de macrófagos. Os macrófagos são importantes na produção de citocinas, que infiltram o estroma do tecido adiposo abdominal, contribuindo para a exacerbação e perpetuação do processo inflamatório crônico (39). A expressão de marcadores inflamatórios é mais acentuada na gordura visceral que na subcutânea, fator esse que parece interferir no impacto metabólico da adiposidade intra-abdominal (34, 40, 41).

Estresse Oxidativo E Disfunção Endotelial

O termo estresse oxidativo (EO) corresponde ao evento resultante do desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e a geração de ROS ou de espécies reativas de nitrogênio (RNS). Tal desequilíbrio resulta na oxidação de importantes biomoléculas (lipídios, proteínas, carboidratos e DNA) geradas em um cenário de reações de óxido-redução, onde a oxidação implica em ganho de elétron e a redução, em perda (42, 43). As espécies reativas, também denominadas radicais livres, incluem: peroxinitrito (ONOO⁻), hidroxil ($\bullet$ OH), superóxido (O₂⁻ $\bullet$), peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Elas são geradas tanto por sistemas enzimáticos como não enzimáticos, têm sido implicadas não apenas em grande número de processos fisiológicos, mas também não fisiológicos durante a iniciação e progressão de doenças (44).

As principais fontes geradoras de espécies reativas são as mitocôndrias (através da redução incompleta do O_2), macrófagos e neutrófilos, endotélio, epitélio, sistemas enzimáticos (mieloperoxidase; xantina oxidase, NADPH-oxidase, NADPH-citocromo P450 redutase, ciclo-oxigenase, NOS), reações com metal (Ferro e Cobre) via reação de Fenton e de Haber-Weiss, e reação não enzimática entre os radicais superóxido e NO resultando na geração de peroxinitrito, (45). Embora as espécies reativas sejam essenciais para uma variedade de mecanismos de defesa celular as ROS (e também as RNS) podem causar lesão oxidativa em biomoléculas (lipídios, proteínas, carboidratos e DNA) quando presentes em quantidade superior à sua neutralização mediada pelo sistema de defesa antioxidante (46).

Na progressão da RI o comprometimento da ação da insulina também é associado diretamente ao EO. A concentração de insulina pode ser afetada pelo ferro existente na ferritina (Fe^{+++}) que é capaz de gerar radical hidroxil, uma das mais importantes espécies reativas do O_2 . De fato, a alta concentração nos estoques de Fe^{+++} pode diminuir a extração hepática de insulina (47) e também resultar na produção de $\bullet OH$ que, viabiliza a lipoperoxidação (48). Além disso, tem sido mostrado que a insulina pode modificar-se estruturalmente pelo peroxinitrito via nitração da insulina, o que compromete a sua ligação com o receptor; e, conseqüentemente resulta em RI (49). Além da modificação estrutural da insulina, o peroxinitrito pode também nitrar o receptor de insulina, uma glicoproteína constituída por tirosina (46). A nitração da insulina também pode ocorrer porque condições de hiperglicemia induzem diminuição de tetrahydrobiopterina (BH_4), que constitui elemento chave para a manutenção da integridade e função de proteínas compostas por tirosina, como é o caso da insulina, o que resulta em sua alteração estrutural seguida de disfunção (50).

A disfunção endotelial é outra manifestação da SM que está associada ao estresse oxidativo. Alguns componentes da SM, tais como baixos níveis de HDL-colesterol, aumento nos níveis de LDL, a hipertensão arterial e o aumento da oferta de ácidos graxos livres são fatores de risco independentes para o desenvolvimento de aterosclerose e estão associados com função anormal do endotélio vascular (51).

De fato, as espécies reativas podem induzir oxidação da fração LDL-colesterol uma das condições indutoras da formação de células espumosas. Além disso, as principais fontes formadoras de espécies reativas de oxigênio nos vasos sanguíneos são

os complexos enzimáticos: NADPH-oxidases e da eNOS desacoplada. Já foram descritas elevações na atividade da NADPH-oxidase pela exposição à angiotensina II e ao TNF- α em cultura de células musculares lisas vasculares (52). Animais com RI apresentam níveis reduzidos de BH4, co-fator responsável pelo desacoplamento da eNOS nos vasos sanguíneos e produção aumentada de superóxido com consequente disfunção endotelial. Além disso, a administração oral de BH4 em ratos com resistência à insulina se mostrou capaz de reverter estas condições (53).

Outro fator relevante na disfunção endotelial corresponde ao fato de que portadores de hipertensão arterial apresentam elevação dos níveis de angiotensina-II. Como já referido, a angiotensina-II pode aumentar a atividade da enzima NADPH-oxidase e a concentração de ET-1, condições que resultam em geração de espécies reativas (54). O aumento de superóxido resulta em diminuição da disponibilidade de NO, fato que contribui para a vasoconstrição e aumento da resistência vascular periférica (55). Estudos *in vivo* e *in vitro* também mostraram que o aumento da pressão intraluminal e do estresse de cisalhamento está associado ao aumento do estresse oxidativo (46). Além disso, o aumento do peroxinitrito tem sido demonstrado em vaso de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (56) e em modelo experimental de SM (57).

A presença de RI, secundária a um defeito sistêmico na via PI3-quinase, determina um defeito combinado no transporte de glicose e na vasodilatação dependente de endotélio mediados pela insulina. A ativação da via da MAP-quinase atua como fator estimulador do crescimento celular. Nos vasos sanguíneos, esta via medeia não somente o crescimento vascular, mas também a migração de células endoteliais, células musculares lisas e monócitos. Além disso, parece mediar a expressão de fatores pró-trombóticos e pró-fibróticos (58). Consequentemente, os efeitos resultantes dessa ativação são pró-aterogênicos. Questiona-se se esta via teria também suas ações atenuadas pela presença de RI. Estudos de biópsia de músculo glúteo com medidas da ativação da PI3-quinase e MAP-quinase, antes e após infusão de insulina em controles magros, obesos sem DM2 e pacientes com DM2, não confirmam tal suposição (59). Esses dados demonstram, inclusive, que a RI e os defeitos associados à SM são dependentes de um defeito específico da via de sinalização da PI-3-quinase.

Alterações Microcirculatórias

Entre pacientes com diabetes, é bem estabelecido que o acometimento de pequenos e grandes vasos frequentemente coexiste. Isso tem sido amplamente documentado em grandes estudos observacionais, por exemplo, o estudo publicado por Pirart J., em 1977 (60) e ensaios clínicos mais recentes, como o estudo Kingdom Prospective Diabetes Study United (UKPDS) (61). Alterações vasculares se desenvolvem frequentemente em vários tecidos de forma complexa e essas complicações podem favorecer a progressão de alguns casos de retinopatias, nefropatias, e neuropatias. (62). Desta maneira, o estabelecimento de alterações da microcirculação cria um ciclo vicioso que resulta em danos progressivos nos tecidos. Vale lembrar que a microcirculação (Figura 1.1) é responsável pelo transporte de nutrientes e oxigênio para os tecidos e pela remoção dos produtos do metabolismo celular (63). As pequenas arteríolas controlam o fluxo sanguíneo para cada área de tecido e, por sua vez, as condições locais dos tecidos controlam o diâmetro das arteríolas. Em geral, cada artéria nutridora que entra em um órgão ramifica-se por seis a oito vezes antes que as artérias se tornem suficientemente pequenas para serem chamadas de arteríolas, as quais geralmente têm diâmetros internos que variam de aproximadamente 5 a 100 μm . Então as próprias ramificam-se dando origem diretamente aos capilares (5 a 10 μm em diâmetro), ou, em alguns tecidos, às metarteríolas (10 a 20 μm em diâmetro), que então dão origem aos capilares (64). Os capilares asseguram as trocas de fluidos e metabólitos entre o plasma e os tecidos, uma função que requer uma alta permeabilidade das paredes, com consequente alta fragilidade das mesmas (64, 65). Sua distribuição varia de tecido para tecido, onde tecidos metabolicamente ativos apresentam alta densidade capilar, como o muscular cardíaco, ou esquelético(64).

Uma segunda função importante da microcirculação é evitar grandes variações na pressão hidrostática ao nível dos capilares que podem causar distúrbios nas trocas entre tecido e capilares. Finalmente, é ao nível da microcirculação que ocorre uma queda substancial na pressão hidrostática. Assim, a microcirculação é extremamente importante na determinação da resistência periférica total (64, 66, 67).

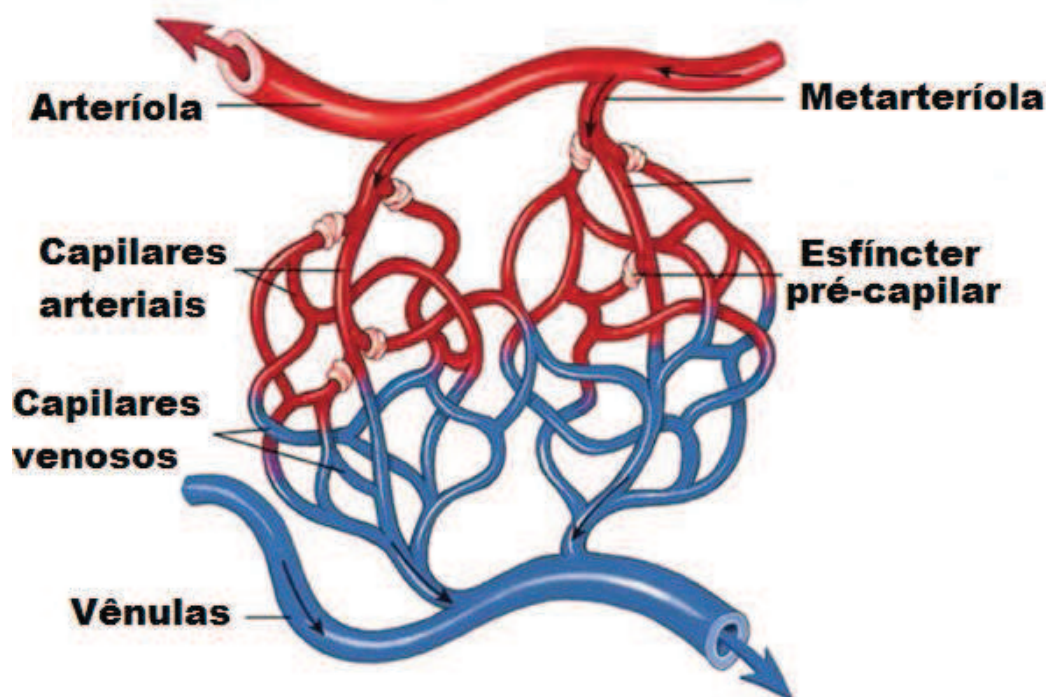


Figura 1.1: Representação esquemática da ramificação microvascular (adaptado de Guyton 2002).

De acordo com a fisiopatologia da hipertensão arterial, alterações microvasculares na resistência de vasos em aproximadamente todos os órgãos, e em particular no músculo esquelético, podem contribuir consideravelmente para o aumento da resistência vascular periférica (68). Duas hipóteses têm sido propostas para explicar esse aumento na resistência vascular. A primeira é a vasoconstrição causada pelo aumento da atividade do sistema nervoso simpático (69-72) ou aumento da sensibilidade a agentes vasoativos (68). A segunda é que o aumento crônico da pressão sanguínea causaria o remodelamento da estrutura do músculo liso vascular diminuindo a luz do vaso e o diâmetro interno das arteríolas (73). Em 2010, um trabalho publicado pelo nosso grupo mostrou que a modulação do SNS a partir da utilização de drogas anti-hipertensivas de ação central é capaz de reverter as alterações microvasculares funcionais e estruturais presentes em ratos espontaneamente hipertensos (74).

Em ratos Zucker obesos, modelo animal de SM, a rarefação capilar do músculo esquelético parece não depender do aumento da pressão arterial. Isso levanta a possibilidade de que outros fatores associados à SM, talvez a RI, podem estar envolvidos redução progressiva da densidade capilar nestes animais (75). Nos seres

humanos, a obesidade e a RI nos tecidos sensíveis à insulina, tais como o músculo esquelético, estão associadas com a diminuição da reatividade vascular e uma diminuição da insulina tecidual pelo recrutamento capilar (76, 77). Outras características da SM são também reconhecidas por predispor a uma densidade microvascular reduzida, denominada como rarefação microvascular (78), que pode contribuir para um aumento na resistência vascular periférica e resultar em redução da reserva funcional microvascular. Em conjunto, estes fatores irão limitar a troca de nutrientes para o tecido e aumentar as distâncias de difusão entre o compartimento vascular e celular. Na DM2, diversos fatores podem contribuir para a disfunção microvascular, incluindo redução de vasodilatação dependente do endotélio (79, 80), redução do recrutamento capilar (81) e menor densidade capilar (82). Além disso, o aumento da glicosilação das proteínas da membrana das hemácias, causando rigidez, pode também aumentar a resistência na passagem através da microcirculação devido a uma perda da capacidade de deformabilidade destas células (83). Alterações concomitantes do glicocálice de superfície das células endoteliais também podem alterar a função e a permeabilidade endotelial (84).

Embora os dados atuais suportem a relação entre a microcirculação e a SM, a direção, em termos de causa e efeito, permanece incerta (85). O que está se tornando cada vez mais claro é que os mecanismos compartilhados iniciam e mantêm as alterações em pequenos e grandes vasos sanguíneos de maneira similar. Eventos patológicos iniciais, principalmente alterações inflamatórias celulares, estão presentes tanto na macro e microcirculação.

Ativação Do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

O gene do angiotensinogênio é detectado no tecido adiposo, apesar da expressão de seu RNA mensageiro (RNAm) não estar correlacionada com a adiposidade. O angiotensinogênio é o precursor da angiotensina I, que, após a conversão em angiotensina II, desempenha um papel fundamental na regulação da pressão arterial. A expressão do RNAm do angiotensinogênio é maior na gordura visceral (86, 87), o que explica parcialmente a relação entre hipertensão arterial sistêmica e obesidade na SM. Camundongos com superexpressão seletiva angiotensinogênio no tecido adiposo, ou knockout (KO) para o angiotensinogênio, com produção restrita ao tecido adiposo, desenvolvem obesidade e, especialmente, a hipertensão, após uma dieta rica em

gordura, o que é compatível com o envolvimento do tecido adiposo na secreção de angiotensinogênio na gênese deste fenótipo (88).

Além disso, a atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) também está aumentada nos estados de RI e no curso da aterosclerose. Os componentes do SRAA estão expressos no tecido adiposo e no endotélio vascular, sugerindo que este atue tanto de maneira endócrina quanto parácrina, contribuindo para a disfunção endotelial. A infusão de angiotensina II induz a RI em animais, causando dano à sinalização de insulina por interferir com a interação entre o IRS-1 (receptor de insulina 1) e a PI-3-quinase (89). Ao mesmo tempo, o bloqueio farmacológico do SRAA é capaz de melhorar a sensibilidade insulínica (90). Hall e colaboradores sugerem a participação de um fator mecânico, onde a massa de gordura visceral determinaria o aumento da pressão intra-abdominal, cujos efeitos sobre os rins ativariam o SRAA e contribuiriam para a elevação da pressão arterial presente na SM (91).

Paralelamente, o aumento da angiotensina II também resulta em hiperatividade de NADPH-oxidase, e incremento da produção de ET-1. A ET-1 é um importante peptídeo vasoconstritor secretado pelas células endoteliais em resposta à insulina e outros agonistas. Níveis elevados de ET-1 são observados em indivíduos com RI e naqueles com aterosclerose (92), sugerindo um possível mecanismo patogênico. A ET-1 mostrou-se capaz de inibir a sinalização de insulina via PI-3-quinase (92). A inibição crônica da ET-1 melhorou a vasodilatação dependente de endotélio em ratos hiperinsulinêmicos, mas não teve nenhum efeito em animais controles (93). Por outro lado, níveis elevados de ET-1 inibem a sinalização da insulina e estimulam a NADPH-oxidase endotelial a produzir adicional superóxido (54).

Ativação Do Sistema Nervoso Simpático

Entre todos os mecanismos fisiopatogênicos, a elevação do tônus simpático é, sem dúvida, o mais evidente no hipertenso obeso. Também há evidências de que a noradrenalina plasmática se encontre elevada no curso de dietas hipercalóricas e que, por outro lado, esteja reduzida mediante restrição calórica (94).

Os principais fatores envolvidos tanto na hiperatividade simpática como na obesidade presente na SM não são totalmente reconhecidos, no entanto, o aumento da atividade do sistema nervoso simpático (SNS) por estimulação da secreção de insulina ocorre após ingestão calórica rica em carboidratos e gorduras, favorecendo o aumento

dos níveis pressóricos, mediado pelos rins, coração e sistema vascular (95). É importante ressaltar que a insulina tem efeitos tanto no sistema nervoso central (SNC) quanto na terminação nervosa periférica, aumentando o tráfico de impulsos nervosos e a disponibilidade das catecolaminas na fenda sináptica (96). Além da hiperinsulinemia, a leptina, produzida no tecido gorduroso, tem sido relacionada a elevações do tônus simpático, além de promover retenção de sódio, aumento da pressão arterial e frequência cardíaca (97).

Voltaremos mais adiante a este último tópico, que é a principal hipótese desta tese.

Tratamento da Síndrome Metabólica

O tratamento da SM consiste em medidas gerais não farmacológicas e terapia medicamentosa.

Terapia Não Medicamentosa

Mudanças no estilo de vida, como maior atividade física, restrição calórica, perda de peso, cessação do hábito de fumar e atenuação de atividades estressantes têm mostrado bons resultados (1), pois minimizam a RI, reduzindo assim muitos dos efeitos deletérios da SM. Como muitos dos indivíduos portadores da SM têm sobrepeso ou obesidade, a dieta deve visar primariamente à redução ponderal, o que por si só pode determinar uma melhora na sensibilidade à insulina, em alguns casos. Experimentalmente, em modelos animais, foi demonstrado que uma dieta rica em gorduras poliinsaturadas induz RI, e no homem, indiretamente, este dado também foi observado (98). Indica-se, atualmente, uma menor ingestão de alimentos ricos em gorduras poliinsaturadas, preferindo, com moderação, aqueles ricos em gorduras monoinsaturadas (98). Alguma restrição na ingestão de carboidratos também é desejável, objetivando reduzir os níveis glicêmicos e, por conseguinte, a insulina e os triglicerídeos plasmáticos (99). Alimentos ricos em fibras e outras proteínas, com menor conteúdo glicídico são também indicados (98).

A atividade física regular é uma intervenção eficaz na redução do peso corporal, alterando favoravelmente a composição corporal, especialmente em indivíduos com sobrepeso ou obesidade moderada (100, 101). A adiposidade abdominal é outro fator em que o exercício físico sabidamente atua de forma benéfica, reduzindo os níveis de gordura visceral (102) e periférica (103), e, conseqüentemente, diminuindo a RI (104, 105).

Terapia Medicamentosa

O tratamento medicamentoso dos componentes da SM deve ser considerado quando não há melhora destes apesar das mudanças de estilo de vida, para que haja diminuição da progressão das alterações e do risco de desenvolvimento de doença aterosclerótica. No entanto, até o presente momento não existe nenhuma droga específica recomendada para tratamento da SM. No entanto, as principais substâncias utilizadas no tratamento da SM visam melhorar a sensibilidade periférica à insulina e prevenir ou minimizar as complicações oriundas desta alteração metabólica primária e de todas as outras advindas dela (106). Quando os pacientes com hiperglicemia não respondem ou deixam de responder adequadamente às medidas não-medicamentosas, devem ser inseridos um ou mais agentes antidiabéticos, com a finalidade de controlar a glicemia e promover a queda da hemoglobina glicosilada (107). O tratamento medicamentoso da hipertensão arterial na SM tem como objetivo reduzir a morbidade e a mortalidade cardiovascular, além de prevenir o agravamento dos perfis lipídico e glicídico (105). Além disso, o uso das estatinas deve ser considerado como terapia prioritária no tratamento da dislipidemia da SM devido à existência de evidências robustas relacionando-as à redução da morbimortalidade cardiovascular (18, 108).

1.2.Sistema Nervoso Simpático

Estrutura e Organização Anatômica

O sistema nervoso autônomo regula o funcionamento de vários órgãos e devido a sua complexidade, ele foi dividido em duas partes: o sistema nervoso simpático (SNS) e parassimpático (SNP). O SNS tem seu início nos centros bulbares, de onde partem as fibras pré-ganglionares que, em seguida, deixam o tronco cerebral e a medula espinhal. Eles resultam em gânglios paravertebrais localizados de cada lado da medula espinhal ou da medula adrenal. A partir desses gânglios parte fibras pós-ganglionares simpáticas que liberam noradrenalina, neurotransmissor responsável pela ativação de receptores adrenérgicos. Poucas fibras simpáticas pós-ganglionares liberam dopamina ou acetilcolina (Figura 1.2) (63, 109).

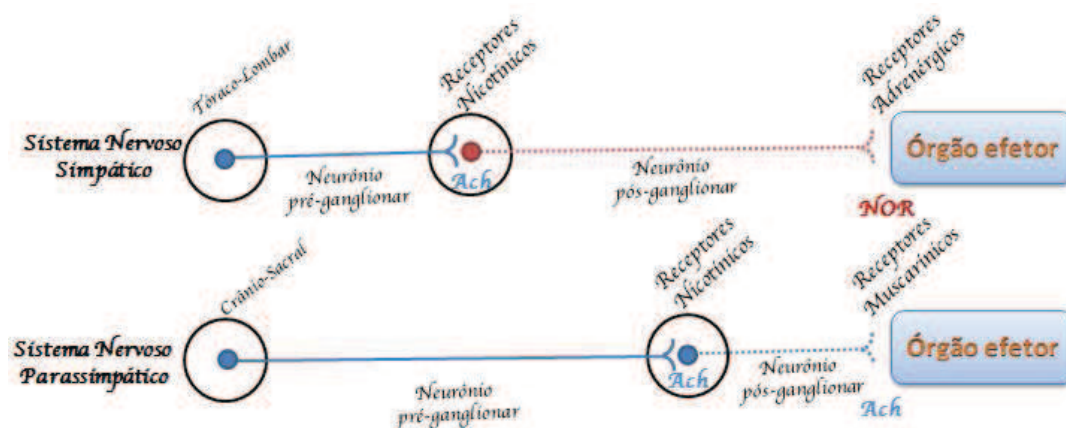


Figura 1.2: Esquema funcional dos neurônios pré e pós-ganglionares dos sistemas nervoso simpático e parassimpático e sua organização. Ach: acetilcolina. Nor: noradrenalina.

Os centros nervosos simpáticos

Os centros simpáticos localizados no bulbo raquidiano modulam a atividade do sistema, o qual inerva todos os órgãos. O SNS regula especificamente o funcionamento do coração e dos vasos sanguíneos e, finalmente, a pressão arterial. Informações sobre os níveis de pressão arterial alcançam os centros nervosos a partir dos barorreceptores da aorta e da artéria carótida (nervos Ludwig-cyon) que, através do núcleo do trato solitário (NTS), irão exercer uma atividade inibitória sobre os centros simpáticos (109, 110).

De uma forma simplificada, as fibras dos nervos aórticos e carotídeos que trafegam através dos nervos glossofaríngeo e vago convergem para o NTS, considerado então a primeira estação central dos sinais sensoriais originados do sistema nervoso periférico. A partir do NTS, neurônios de segunda ou terceira ordem projetam-se para dois grupamentos de neurônios no bulbo ventrolateral (Figura 1.3) (110-113):

1) Neurônios inibitórios na região ventrolateral caudal (CVLM) no bulbo raquidiano, que por sua vez projetam-se para neurônios pré-motores (neurônios simpatoexcitatórios) do SNS na região ventrolateral rostral (RVLM) do bulbo raquidiano. Finalmente, os neurônios da RVLM projetam-se para os neurônios pré-ganglionares do SNS localizados na coluna intermediolateral da medula espinhal ("fonte" do fluxo simpático para a periferia, coração e vasos);

2) O outro grupamento de neurônios está localizado no núcleo ambíguo e núcleo dorsal motor do nervo vago que contêm os corpos celulares dos neurônios pré-ganglionares do SNP. De cada uma dessas áreas e núcleos bulbares, neurônios projetam-se para áreas e núcleos mais rostrais do SNC levando informações cardiovasculares.

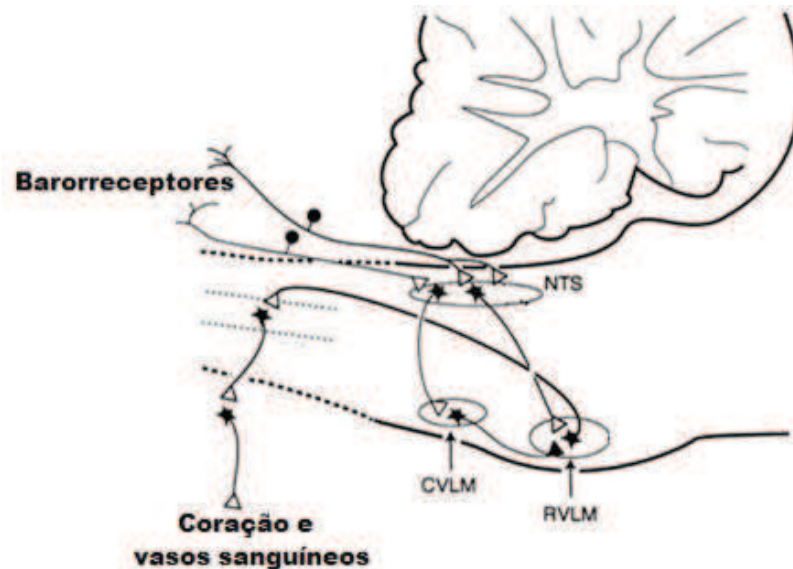


Figura 1.3: Representação esquemática das vias aferentes, principais áreas de integração bulbar e vias eferentes do reflexo pressorreceptor arterial.

NTS = núcleo do trato solitário; RVLM = região ventrolateral rostral do bulbo; CVLM = região ventrolateral caudal do bulbo. Triângulos abertos = impulsos sinápticos excitatórios; Triângulos fechados = impulsos sinápticos inibitórios, adaptado de Dampney, 2002.

Síntese, Liberação e Degradação de Noradrenalina

A síntese de noradrenalina ocorre a partir da tirosina, um aminoácido fornecido pela dieta. A tirosina é incorporada na fibra pós-gangliar por um transportador específico, e, em seguida, hidroxilada a L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) pelas tirosina-hidroxilase (TH) e, posteriormente, convertida em dopamina por ação da dopa descarboxilase (DD). A dopamina é, então, transformada em noradrenalina, sob a ação catalítica da dopamina β -hidroxilase (DBH). A noradrenalina, logo que sintetizada, é concentrada nos grânulos de armazenamento e liberada por exocitose para o espaço

sináptico após a chegada do impulso nervoso (potencial de ação propagado ao longo da fibra) (Figura 1.4) (109).

Na medula adrenal (estimulada diretamente pela acetilcolina liberada das fibras esplâncnicas), a noradrenalina é metilada em adrenalina pela feniletanolamina N-metiltransferase. Células cromafins da medula supra-renal são neurônios pós-ganglionares modificados que produzem noradrenalina e principalmente adrenalina (112).

A monoamina oxidase (MAO) e a catecol-O-metiltransferase (COMT) são enzimas responsáveis pela degradação das catecolaminas. A ação da MAO sobre a noradrenalina produz o ácido dihidroximandélico, e o produto da COMT é a normetanefrina (metanefrina para adrenalina). O metabólito final é o ácido 3-metoxi-4-hidroxi mandélico ou ácido vanililmandélico (VMA). Uma estimativa do volume de catecolaminas produzido pode ser obtida pela determinação da quantidade destes metabólitos excretada na urina ao longo de 24 horas (metanefrinas totais e VMA) (63).

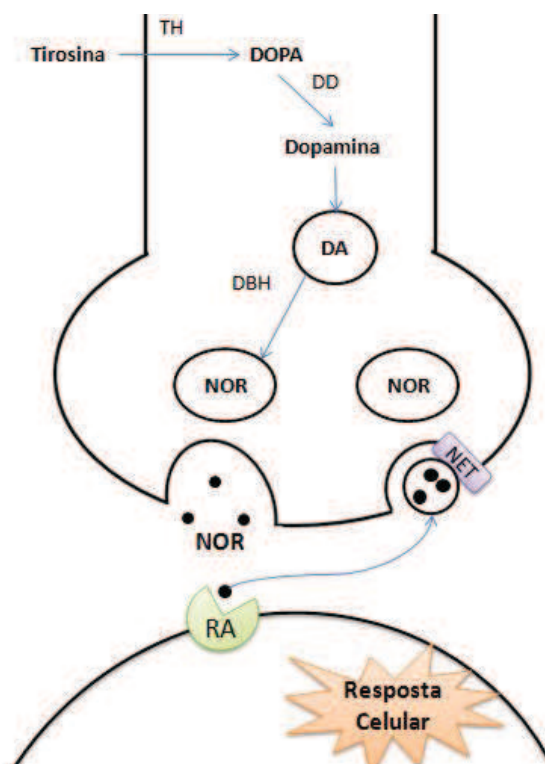


Figura 1.4: Síntese, liberação e recaptação de noradrenalina nas sinapses noradrenérgicas.

TH: tirosina-hidroxilase. DOPA: dihidroxifenilalanina. DD: dopa-descarboxilase. DA: dopamina. DBH: Dopamina beta hidroxilase. NOR: noradrenalina RA: receptor adrenérgico. NET: Transportador de noradrenalina. A tirosina hidroxilase é uma etapa limitante.

Papel das catecolaminas

A noradrenalina é altamente conservada em vertebrados durante a evolução e exerce uma ampla gama de efeitos fisiológicos. A nível central, a noradrenalina é um neurotransmissor diretamente envolvido no equilíbrio do humor, na regulação do sono, na agressividade, no estado de alerta e vigília, exercendo também um controle central sobre o sistema endócrino (63).

Em neurônios pós-ganglionares periféricos, a noradrenalina regula reflexos cardiovasculares e de gastos energéticos aos estímulos ambientais. A noradrenalina induz um perfil de respostas fisiológicas características de situações de estresse, em resposta à secreção de corticosteróides endógenos pelo córtex adrenal. A liberação de catecolaminas tem muitos efeitos cardiovasculares (aumento da frequência cardíaca e da

pressão arterial) e metabólicos (utilização de glicose muscular e glicogenólise), que constituem geralmente uma reação inconsciente para se preparar para lutar ou fugir.

As catecolaminas não são apenas liberadas em situações de perigo, mas também em situações em que há variação das condições fisiológicas, como o exercício físico ou a mudança de postura. As catecolaminas, portanto, desempenham tanto o papel de neurotransmissor quanto de hormônio do estresse.

Os Receptores Adrenérgicos

Receptores α -adrenérgicos

Eles foram divididos em α_1 e α_2 de acordo com as suas diferentes coeficientes de afinidade¹ frente a seus agonistas e antagonistas (Tabela 1.3).

Tabela 1.3: Definição dos receptores α -adrenérgicos segundo seus ligantes de alta afinidade.

α_1	α_2
Alta afinidade para:	
Metoxamina (agonista)	Clonidina (agonista)
Prazosina (antagonista)	Ioimbina (antagonistas)

Os receptores α -adrenérgicos 1 e 2 foram ainda subdivididos em A e B de acordo com o seu nível de afinidade para outros ligantes: a prazosina para os receptores α_2 -adrenérgicos (A, baixa afinidade e B, alta afinidade) (114).

Os receptores α_1 -adrenérgicos são predominantemente pós-sinápticos enquanto que os receptores α_2 -adrenérgicos são pré-sinápticos. Em receptores adrenérgicos centrais, os receptores α_2 -adrenérgicos predominam. Estas diferentes localizações explicam porque uma substância interagindo com receptores α -adrenérgicos tem efeitos diferentes dependendo do receptor que ela estimule ou bloqueie (114, 115).

¹ Inverso da constante de dissociação K_d , que representa a concentração que produz uma ocupação de 50% dos receptores. A afinidade expressa a capacidade de um ligante para se ligar a um receptor. Quanto mais forte ele liga-se, isto é, em concentrações baixas, maior a afinidade, ou seja, menor o K_d .

EFEITOS α_1 -ADRENÉRGICOS PERIFÉRICOS

- Vasos (aumento da PA e da resistência periférica)
- Bexiga (promove a micção)
- Intestino: contração dos músculos do esfíncter
- Músculo dilatador da íris (midríase)
- Coração: aumenta a força de contração (efeito inotrópico positivo)
- Fígado: glicogenólise (hiperglicemia)

EFEITOS α_2 -ADRENÉRGICOS PERIFÉRICOS

- Contração de certos músculos lisos vasculares (fibras não inervadas);
- Adipócitos: inibição da lipólise;
- Relaxamento da musculatura lisa intestinal (reduzindo a liberação de acetilcolina através da ação α -adrenérgica pré-sináptica);
- Diminuição da secreção de água e sal;
- Estimulação da agregação de plaquetas
- Diminuição da secreção de renina
- Redução da liberação de Nad (efeito pré-sináptico)
- Diminuição da secreção de insulina

EFEITOS α_2 -ADRENÉRGICOS CENTRAIS

- Sedação
- Redução do tônus simpático (PA baixa)
- Redução da secreção de algumas glândulas exócrinas, como as glândulas salivares, levando a xerostomia (boca seca).

Farmacologia dos Receptores α -Adrenérgicos

Ativação dos Receptores α -adrenérgicos

AGONISTAS α_1 –ADRENÉRGICOS

Os agonistas α_1 -adrenérgicos têm sido utilizados principalmente como ferramentas farmacológicas. Eles são atualmente utilizados na terapêutica, principalmente como vasoconstritores locais (fenilefrina, metoxamina, e outros) (115).

AGONISTAS α_2 -ADRENÉRGICOS (Inibidores Simpáticos Centrais)

❖ 1ª Geração: Clonidina

Inicialmente, a clonidina foi desenvolvida como um fármaco agonista α_2 , descongestionante da mucosa nasal (Figura 1.5). O efeito hipotensor dessa substância foi descoberto por acaso, durante o seu desenvolvimento nos anos 60.

A clonidina reduz a pressão arterial através da redução do tônus simpático central e reduz a frequência cardíaca através da estimulação simultânea do tônus parassimpático. Ela age diretamente nos neurônios localizados na RVLM (116, 117). Contudo, a clonidina não impede o funcionamento do barorreflexo, permitindo a manutenção da pressão arterial, especialmente quando o paciente se desloca para posição em pé. Não é, portanto, um indutor de hipotensão ortostática (118). Seus efeitos colaterais são devido à estimulação de receptores centrais α -adrenérgicos, sedação, boca seca, depressão, além do potencial efeito rebote após a interrupção do tratamento prolongado devido ao aumento da atividade simpática (119).

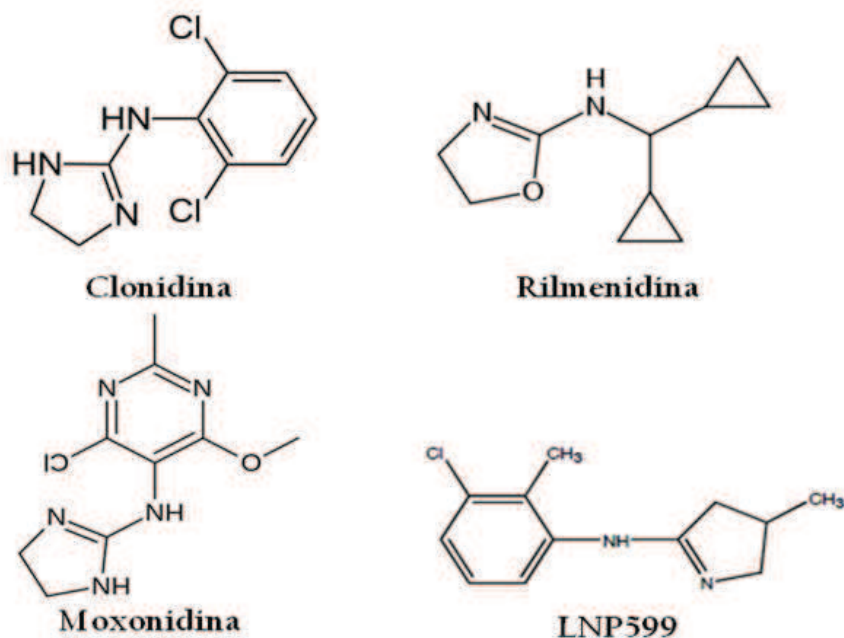


Figura 1.5: Estrutura química da clonidina, rilmenidina, moxonidina e LNP599.

Diversos análogos à clonidina foram sintetizados numa tentativa de superar esses efeitos colaterais (Figura 1.5). Estas moléculas são construídas a partir de uma estrutura padrão, o anel imidazólico (Figura 1.6), com exceção da rilmenidina, que é uma oxazolina.

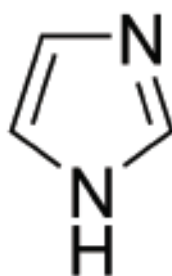


Figura 1.6: Anel imidazólico.

Receptores imidazolínicos

Em 1984, Bousquet e cols. demonstraram que a clonidina, cujo efeito anti-hipertensivo era atribuído a um efeito agonista sobre receptores α_2 -adrenérgicos no bulbo raquidiano, também era capaz de ativar sítios de ligação insensíveis às catecolaminas, mas capazes de reconhecer especificamente moléculas imidazolínicas (120).

Ainda nos anos 1980, os estudos sobre o mecanismo do efeito anti-hipertensivo central de análogos da clonidina demonstraram a existência de outro receptor além do α_2 -adrenérgico, um receptor específico para imidazolininas (120). Neste contexto, foi demonstrado que os receptores α_2 -adrenérgicos localizados na região do locus coeruleus, centro neuronal envolvido na regulação do ciclo sono-vigília, estariam envolvidos na maioria dos efeitos secundários centrais (sedação e xerostomia) e os receptores imidazolínicos da face ventrolateral bulbar seriam responsáveis pelos efeitos anti-hipertensivos (116, 120, 121).

A existência de sítios de ligação específicos para as imidazolininas radiomarcadas foi demonstrada no cérebro e em vários tecidos periféricos (122, 123).

Dois sítios de ligação foram identificados e classificados em diferentes subgrupos (124):

- O tipo I_1 liga-se com igual afinidade à clonidina e ao idazoxan (antagonista dos receptores imidazolínicos e receptores α_2 -adrenérgicos) (125).
- O tipo I_2 , localizado principalmente nas mitocôndrias, está associado à MAO, sensível ao idazoxan, mas não à clonidina (126).
- O tipo I_3 está localizado no pâncreas, onde estimula a secreção de insulina (127).

O subtipo de receptor imidazolínico I_1 (RI_1) foi identificado no núcleo reticular lateral, localizado na RVLM do bulbo, que é um sítio excitatório simpático conhecido e principal condutor das respostas barorreflexas (128). O receptor RI_1 também está presente em órgãos periféricos e em outras células como adipócitos marrons (129) e células cromafins da medula supra-renal (130).

Desde a revelação de sua existência, estudos têm demonstrado o envolvimento do RI_1 na regulação de outros processos além da hipertensão arterial, tais como arritmias ventriculares, a SM, o diabetes e certos transtornos do humor. Estas observações fomentaram a proposta de agonistas do receptor I_1 seletivos na formação de uma nova geração de anti-hipertensivos de ação central desprovidos de efeitos colaterais associados aos receptores α_2 -adrenérgicos, sendo os primeiros representantes a rilmenidina e a moxonidina (Figura 1.5) (131).

❖ 2ª Geração

A segunda geração de anti-hipertensivos de ação central é representada pela moxonidina e pela rilmenidina (Figura 1.5). A moxonidina é uma imidazolina, que assim como a rilmenidina, induz seu efeito anti-hipertensivo pela ativação dos receptores I_1 Imidazolínicos situados em neurônios do bulbo raquidiano. Assim como a rilmenidina, a moxonidina apresenta alta seletividade pelos receptores I_1 , com relação aos receptores α_2 -adrenérgicos, e desse modo é um agente bastante efetivo no controle da pressão arterial, sem induzir sonolência significativa. De qualquer forma, os efeitos colaterais mediados pela ativação dos receptores α_2 -adrenérgicos ainda podem ser vistos em doses elevadas das drogas de segunda geração (128, 131).

Ao contrário das drogas de primeira geração (clonidina), a moxonidina não induz efeito rebote da pressão arterial após a interrupção do tratamento. Alguns efeitos colaterais podem ocorrer, mas menos acentuados e de maneira transitória quando comparados à clonidina, devido à baixa afinidade pelo receptor α_2 -adrenérgico (132).

A afinidade da moxonidina pelo receptor I_1 é similar à apresentada pela rilmenidina, porém a moxonidina oferece maior seletividade para estes receptores em relação aos receptores α_2 -adrenérgicos (Tabela 1.4) (133).

❖ Os LNPs

Durante a última década, os químicos do Laboratório de Neurobiologia e Farmacologia Cardiovascular (Strasbourg, França) se dedicaram à síntese de compostos imidazolinicos (a partir da rilmenidina), seletivos para o receptor I_1 e, se possível, sem afinidade para o receptor α_2 -adrenérgico (Tabela 1.4).

Estes compostos são batizados como LNP, em referência ao nome do laboratório (*Laboratoire de Neurobiologie et de Pharmacologie CardioVasculaire*).

- LNP 509: primeiro LNP publicado sem afinidade α_2 -adrenérgico detectável, capaz de reduzir a pressão arterial após injeção central, mas não é capaz de passar pela barreira hematoencefálica após injeções parenterais (134, 135).
- LNP 599 (Figura 1.5) e LNP 640: nenhuma afinidade α_2 -adrenérgico detectável, capaz de reduzir a pressão arterial após injeção central e periférica, tendo em vista a passagem pela barreira hematoencefálica (Figura 1.4).
- LNP 911: primeiro marcador mais seletivo do que o marcador de referência, a paraíodo-clonidina marcador radioativo (136).
- LNP 906: primeiro ligante de alta afinidade seletivo para o receptor I_1 e fotoativável, isto é, capaz de formar uma ligação covalente irreversível com o sítio de ligação, que é muito útil para estudos de identificação (137).

Tabela 1.4: Afinidades de diferentes ligantes para receptores I₁-imidazólicos e receptores α_2 -adrenérgicos.

COMPOSTO	AFINIDADE I ₁	AFINIDADE α_2
Clonidina	14,8	3,8
Rilmenidina	83,6	180
Moxonidina	77,8	75
LNP509	540	-
LNP599	8,1	-
LNP906	0,97	-
LNP911	0,2	-
LNP640	0,5	-

Quanto menor o K_i , maior é a afinidade do ligante pelo seu receptor. - : Afinidade não detectável ($>10nM$).

Hiperatividade Simpática na Síndrome Metabólica

Ingestão Calórica E A Atividade Simpática

Atualmente, já é conhecido que o excesso de ingestão calórica seria um fator para aumento da atividade simpática e a pressão arterial (94, 138), assim como o estresse psicossocial, por influenciar também no comportamento alimentar. Além disso, sabe-se que a obesidade é um fenômeno complexo, que envolve também a participação do sistema nervoso, mas nem todos os obesos têm hiperatividade simpática. Estudos em roedores e humanos têm mostrado que o jejum inibe o SNS (139). Em contraste, a ingestão em excesso aumenta a atividade do SNS (140). A ingestão de carboidratos e gordura (141), mas não de proteínas (142) estimula o SNS. O aparecimento das modificações do SNS induzidas pela alimentação parece preceder e desencadear alterações na atividade do SRAA (94). Achados de estudos experimentais têm provido informações para os mecanismos pelos quais a obesidade e a RI ativam o sistema nervoso simpático e contribui para o risco de doença cardiovascular. Os resultados dos estudos indicam que a relação entre obesidade, RI e função simpática é complexa e parece ser modificada por fatores genéticos e ambientais (143).

A existência de uma associação entre o estado nutricional e a atividade do SNC é conhecida pela influência da ingestão sobre o SNS. Dentro deste contexto, como a

maioria dos pacientes obesos também apresenta hiperinsulinemia, tem sido sugerido que a hiperatividade simpática poderia estar relacionada na regulação da insulina sobre o metabolismo glicídico de neurônios centrais (132). Além disso, sabe-se também que a insulina induz efeitos hemodinâmicos diretos, aumentando a pressão arterial através da retenção renal de sódio e, da volemia, mediada pelo SNS. Em pacientes com dislipidemia, a insulina está diretamente relacionada com os níveis de adrenalina (95).

Ativação do Sistema Nervoso Simpático na Síndrome Metabólica

Nestes últimos 25 anos, estudos clínicos têm demonstrado que vários componentes da SM estão associados com "marcadores" diretos ou indiretos da hiperatividade simpática (144). Em pacientes obesos com hipertensão, existe uma taquicardia de repouso e um aumento significativo nos níveis de noradrenalina plasmática (145), sendo este também o caso de pacientes com RI. A redução da pressão arterial durante a perda de peso observada em pacientes obesos está associada com uma diminuição de noradrenalina plasmática (146).

FREQUÊNCIA CARDÍACA AUMENTADA

Tendo em vista que a frequência cardíaca é modulada pelo tônus simpático vagal, através da liberação de noradrenalina ou acetilcolina, os valores de repouso podem ser marcadores da atividade simpática. Os indivíduos com SM têm um aumento da frequência cardíaca (147) e existência de uma relação contínua entre a frequência cardíaca e a mortalidade cardiovascular já é conhecida (148).

NORADRENALINA PLASMÁTICA AUMENTADA

Em casos de hipertensão arterial os níveis de noradrenalina circulante estão aumentados (149). Existe também um aumento na liberação de noradrenalina renal em casos de obesidade, o que pode afetar a retenção de água, estimular o SRAA e, assim, aumentar a pressão sanguínea (149).

MICRONEUROGRAFIA

A medida direta da atividade simpática por microneurografia permitiu a confirmação da associação dos elementos da SM (hipertensão, obesidade, RI e diabetes) com um aumento de impulsos nervosos simpáticos ao nível do músculo esquelético (150). O aumento da atividade elétrica simpática não é necessariamente relacionado com a presença de hipertensão arterial. No entanto, está diretamente relacionada à sensibilidade à insulina (150).

A hiperatividade simpática mensurada desta forma poderia ser um marcador precoce de SM em indivíduos suscetíveis, que ainda não desenvolveram uma forma clinicamente diagnosticável (144). Um estudo clínico realizado em pacientes com susceptibilidade ao desenvolvimento da SM demonstrou que existe um aumento significativo em impulsos nervosos simpáticos medidos por microneurografia do nervo peroneal, em comparação com indivíduos saudáveis (151).

DISFUNÇÃO DO BARORREFLEXO

O barorreflexo arterial exerce uma grande influência inibitória sobre as eferências simpáticas, que quando alterado promove um aumento da estimulação simpática. Grassi et al. haviam demonstrado que as perturbações do barorreflexo (152, 153), em casos de diabetes e hipertensão, estavam associadas com a obesidade visceral. Isto pode ser explicado pela perda da elasticidade arterial observada na SM. A capacidade de modular o diâmetro arterial e responder as alterações na hipertensão arterial está alterada. Outra explicação é baseada na ruptura do equilíbrio dinâmico existente entre substâncias vasodilatadoras (NO) e vasoconstritoras (ET-1). Na SM, o desequilíbrio entre NO e ET-1 favorece a vasoconstrição (154, 155).

REGULAÇÃO NEGATIVA DOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS

A hiperatividade simpática pode desempenhar um papel na resposta adaptativa ao excesso de peso, aumentando a homeostase cardiovascular dependente da termogênese (95), levando a dessensibilização dos receptores adrenérgicos no longo prazo. Este último estaria diretamente ligado à diminuição no efeito regulador da ativação simpática na sobrecarga calórica presente em casos de obesidade (156).

Embora a relação do SNS com o desenvolvimento de alterações cardiometabólicas da obesidade já esteja bem descrita, o presente trabalho está concentrado na patogênese da SM, a fim de estabelecer um nexo de causalidade entre a hiperatividade simpática e os vários elementos da SM, o que poderia ajudar a obter um modelo adequado para o estudo da SM (com algumas das suas formas, no mínimo) e proporcionar uma estratégia terapêutica eficaz.

2. Objetivos

2.1.Objetivo Geral

Investigar a participação do sistema nervoso simpático na fisiopatologia das alterações cardiovasculares e metabólicas da síndrome metabólica.

2.2.Objetivos Específicos

- 1) Desenvolver um modelo experimental de síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica caracterizado pela presença de hiperatividade simpática.
- 2) Avaliar o efeito da modulação do sistema nervoso simpático em ratos obesos com síndrome metabólica sobre:
 - A composição corporal;
 - O metabolismo glicídico e lipídico;
 - Os parâmetros hemodinâmicos;
 - A densidade capilar funcional e estrutural.
- 3) Avaliar o papel de ligantes I₁ seletivos sobre a função adipocitária de ratos.
 - Determinar a presença de receptores I₁-imidazolínicos em adipócitos;
 - Investigar a participação dos ligantes I₁ seletivos na lipólise.
- 4) Desenvolver um modelo experimental de hiperatividade simpática em camundongos.
 - Avaliar os parâmetros hemodinâmicos;
 - Realizar a quantificação das catecolaminas plasmáticas

3. Metodologia

Este trabalho foi dividido em 3 partes, respeitando a ordem estabelecida anteriormente nos “Objetivos Específicos”, sendo que a metodologia da caracterização do modelo de SM é comum aos 2 objetivos iniciais. É importante informar que devido o caráter de tese em co-tutela, a realização das partes 3.2 e 3.3, se deu no Laboratório de Neurobiologia e Farmacologia Cardiovascular, (LNPCV, *Laboratoire de Neurobiologie et de Pharmacologie CardioVasculaire*) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Strasbourg, França, sob orientação do Prof. Dr. Pascal Bousquet.

3.1.Efeitos da modulação do sistema nervoso simpático em ratos com SM.

Ética no uso animal

Os procedimentos de manuseio e experimentação realizados no Laboratório de Investigação Cardiovascular da FIOCRUZ neste estudo foram previamente aprovados pelo comitê de ética no uso animal (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz, sob o número LW-31/10, atendendo ao disposto na Lei 11794/08 sobre o uso científico de animais de laboratório.

Modelo animal e protocolo experimental

Foram utilizados ratos Wistar-Kyoto (WKY) machos, com seis semanas de idade, providos pelo centro de criação de animais de laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL/Fiocruz). Os animais foram mantidos em condições controladas de umidade ($60\pm 10\%$), temperatura ($21\pm 2^\circ\text{C}$) e luz (ciclo de 12 horas claro/escuro), com livre acesso a ração e água. Inicialmente, os ratos foram divididos em dois grupos experimentais: 1) animais alimentados com ração comercial padrão² (CON + VEI n=10); 2) animais tratados com dieta hiperlipídica (HFD n = 40) por 20 semanas. A dieta hiperlipídica (HFD) foi composta por 50% da ração comercial padrão, com adição de gordura animal (banha de porco), leite condensado, amido de milho e NaCl (157). A composição das dietas do grupo CON e do grupo HFD é apresentada na tabela 3.1.

² Nuvilab – CR1, Nuvital Nutrientes Ltda, Colombo, Paraná – Brasil.

Tabela 3.1: Composição das dietas.

	CON	HFD
Ingredientes (%)		
Ração Comercial	100%	50%
Banha de porco	-	20%
Amido de milho	-	16,5%
Leite condensado	-	13%
NaCl	-	0,5%
Macronutrientes (%)		
Proteína	23%	14%
Carboidrato	71%	56%
Lipídeos	6%	30%
Energia (kJ/kg)	17,9	23

Descrição dos grupos e protocolo de tratamento

Após 20 semanas de dieta, período mínimo para que as alterações metabólicas induzidas pela dieta fossem observadas, os animais alimentados com a HFD foram divididos em 4 grupos, sendo um grupo controle tratado com veículo por gavagem (**HFD + VEI** n= 10), assim como o grupo **CON + VEI**, e em 3 grupos de tratamento (n=10, cada grupo). Esses animais foram tratados com clonidina (0,1 mg/kg/dia, **HFD + CLO**), rilmenidina (1 mg/kg/dia, **HFD + RIL**) ou LNP599 (10 mg/kg/dia, **HFD + LNP**) durante 4 semanas. A figura 3.1 ilustra detalhadamente a divisão dos grupos e o protocolo experimental.



Figura 3.1: Divisão dos grupos(n=10 animais) e o protocolo experimental. PA = Pressão arterial, FC= Frequência cardíaca.

Pesagem dos animais e ingestão de ração

A livre ingestão de ração e água foi permitida aos animais ao longo de todo o experimento. A massa corporal e a ingestão de comida foram aferidas antes e depois do tratamento através de balança digital com carga mínima de 25g (urano, UDI 10000/1, Brasil).

Avaliação hemodinâmica

Foram realizadas medidas indiretas da pressão arterial sistólica (PAS) e da FC nos animais conscientes, através de um sistema computadorizado de pletismografia caudal (BP-2000, Visitech blood pressure analysis system, USA) (Figura 3.2). Os animais foram colocados numa caixa de contenção sobre a superfície aquecida (37°C) do aparelho. A cauda foi então colocada em manguitos e fixada com fita entre a fonte de luz e o sensor fotoelétrico para a detecção dos pulsos de pressão. O fluxo sanguíneo nas caudas produzia ondas oscilatórias que eram digitalmente captadas 200 vezes por segundo e analisadas durante uma rotina programável de inflagem e desinflagem dos manguitos. Os valores médios da PAS e FC foram obtidos após cada rotina do equipamento.

As medidas da PAS e FC foram realizadas na 20ª semana de dieta para configurar as alterações metabólicas induzidas pela dieta (157) e na 24ª semana de dieta,

para avaliar o efeito das 4 semanas de tratamento. Antes das medidas finais da PA, os animais foram adaptados por três dias consecutivos ao aparelho para minimizar o estresse e, conseqüentemente, as interferências sobre os resultados.

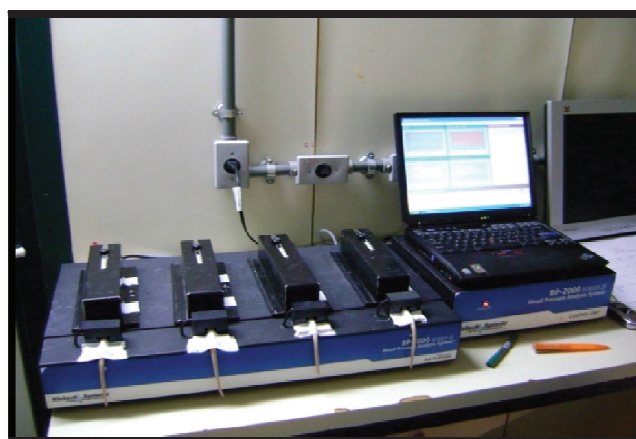


Figura 3.2: Sistema para registro indireto da pressão arterial caudal em ratos.

Metabolismo glicídico

Ao final da 24^a semana de dieta, foi realizado um teste oral de tolerância à glicose (TOTG), onde alíquotas de sangue foram coletadas da ponta da cauda dos animais para análise dos níveis séricos de glicose (glicômetro, Accu-Chek, Roche) após 12 horas de jejum (momento 0) e nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de uma sobrecarga de glicose (2 g/kg, i.p.) (158).

Videomicroscopia intravital por fluorescência

Na manhã dos experimentos terminais, após 4 semanas de tratamento oral crônico, os animais foram anestesiados com a associação de pentobarbital sódico (70 mg/kg) e fentanil (3 µg/kg) administrados por via i.p. Os ratos foram intubados através de traqueostomia com cânula de polietileno, imobilizados com brometo de pancurônio (1 mg/kg, i.v.) e artificialmente ventilados com ar ambiente através de um ventilador para animais de pequeno porte (Ugo Basile, model 7025, Biological Research Apparatus, Varese, Italy), com volume respiratório de 1,5 mL e frequência respiratória

de 50 incursões/min. A veia jugular foi cateterizada para permitir a administração de drogas e marcadores fluorescentes para a microscopia intravital (159).

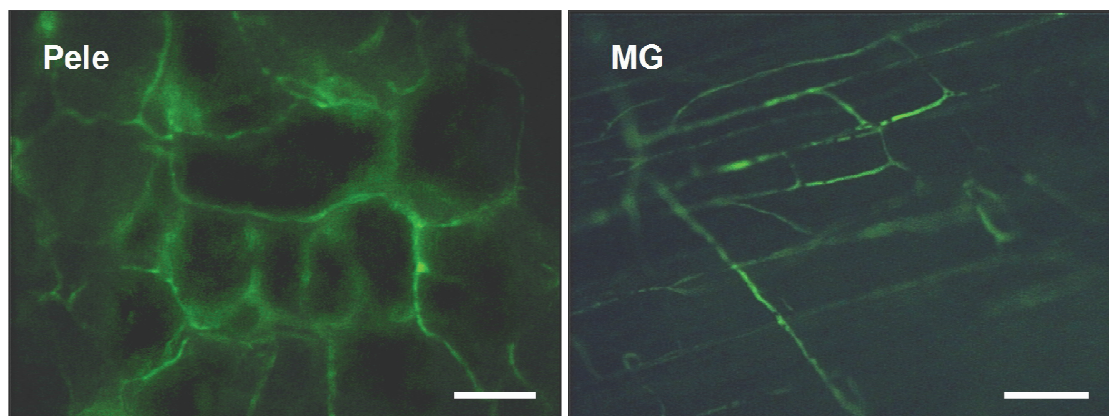


Figura 3.3: Imagens representativas da videomicroscopia intravital da pele e do músculo grácil de ratos normotensos WKY após a administração intravenosa de fluoresceína-isotiocianato (FITC) dextran indicando os capilares.

MG=Músculo Grácil; Aumento 100x, barra = 100 μ m.

Para a avaliação da microcirculação do músculo esquelético (160), uma incisão mediana foi feita na pele da pata esquerda, assim como na fáscia ventral da coxa, permitindo a visualização do músculo grácil. O animal foi então colocado sob o microscópio, de modo que o músculo grácil permanecesse sob o feixe de luz.

A avaliação da microcirculação cutânea foi realizada na pele da orelha. Para isso, os pelos da orelha foram retirados com o auxílio de um creme depilatório e os animais colocados sob o microscópio, de modo que a orelha permanecesse fixada sob o feixe de luz.

A visualização dos capilares do músculo grácil e da pele da orelha foi possível graças ao contraste obtido pela administração 0,15 mL de fluoresceína-isotiocianato (FITC) acoplada ao dextran a 5% (i.v.) (Figura 3.3). As imagens da microcirculação foram obtidas através de um microscópio de fluorescência de base fixa (Olympus BX51/WI, USA) acoplado a um sistema de câmera de vídeo digital (Optronics, Goleta, CA, USA). Foi utilizada uma objetiva Olympus com aumento de 10x nos experimentos, produzindo um aumento final de 100x no monitor.

A contagem em tempo real dos capilares foi realizada com o auxílio do *software* Saisam 5.1.3 (Microvision, France). Para isso, inicialmente foi obtida aleatoriamente uma imagem do músculo esquelético que permitisse a perfeita visualização dos capilares perfundidos. Nesta imagem, foi delimitado um campo microscópico equivalente a 1 mm^2 e, nesta área, foram contados todos os capilares espontaneamente perfundidos durante o período de 4 minutos. Foram considerados capilares perfundidos apenas os vasos que permitissem o fluxo contínuo e unitário de hemácias pelo vaso. Além disso, toda vez que ocorresse a ramificação do capilar, os vasos originados desta ramificação eram considerados como sendo novos capilares. O valor total de capilares contados foi considerado como sendo a densidade capilar funcional muscular esquelética. Após a contagem, eram feitas quatro fotos representativas do campo microscópico utilizado, através do *software* Archimed 3.7.0 (Microvision, France) (159). Os mesmos procedimentos acima descritos foram utilizados para a visualização da microcirculação da pele e determinação da densidade capilar cutânea.

Metabolismo lipídico e glicídico e cálculo do HOMA-IR

Logo após a microscopia intravital, ainda sob o efeito da anestesia, o sangue dos animais foi coletado através de punção cardíaca. Avaliou-se novamente a glicemia de jejum (12 horas) e após centrifugação do sangue (1500 rpm por 15min) o soro foi aliquotado e congelado (-80°C) para posteriormente serem dosadas a insulina de jejum por radioimunoensaio, utilizando kit comercial (MP Biomedicals, USA), e o colesterol total, o HDL-c e os triglicerídeos, através de reações colorimétricas com leitura pelo aparelho Cobas-Mira (Roche). O colesterol LDL foi calculado pela fórmula de Friedewald, $\text{LDL} = [\text{CT} - \text{HDL} - (\text{TG} / 5)]$, onde CT representa o colesterol total e TG o triglicerídeo (161). A RI foi avaliada pelo cálculo do HOMA (*homeostasis model assessment index*) onde: $\text{HOMA-IR} = [\text{insulina } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glicose } (\text{mMol/L})] / 22,5$ (162).

Quantificação da gordura retroperitoneal e epididimal

Após a morte dos animais, os depósitos de gordura visceral e epididimal foram dissecados e pesados em balança analítica com precisão de 0,01g (A&D, GR-200, Japan). Foi considerada visceral a gordura aderida à parede abdominal posterior, ao

redor dos rins e na parte abdominal do ureter. A gordura abdominal localizada na porção inferior do abdome e conectada ao epidídimo foi considerada como gordura epididimal.

Análises histológicas

Amostras de tecido (ventrículo esquerdo, fígado e gordura retroperitoneal) foram fixadas em *Milloning*, desidratadas em uma série graduada de etanol (70, 95 e 100%) e emblocadas em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em seções de 5 µm com auxílio de um micrótomo (Leica, RM 2125, Germany) e fixadas em lâminas para posteriormente serem coradas conforme a análise pretendida para o tecido.

O ventrículo esquerdo e o músculo grácil foram utilizados para a determinação da densidade capilar estrutural. O ventrículo esquerdo foi ainda utilizado na determinação do diâmetro do cardiomiócito e na avaliação da deposição de colágeno.

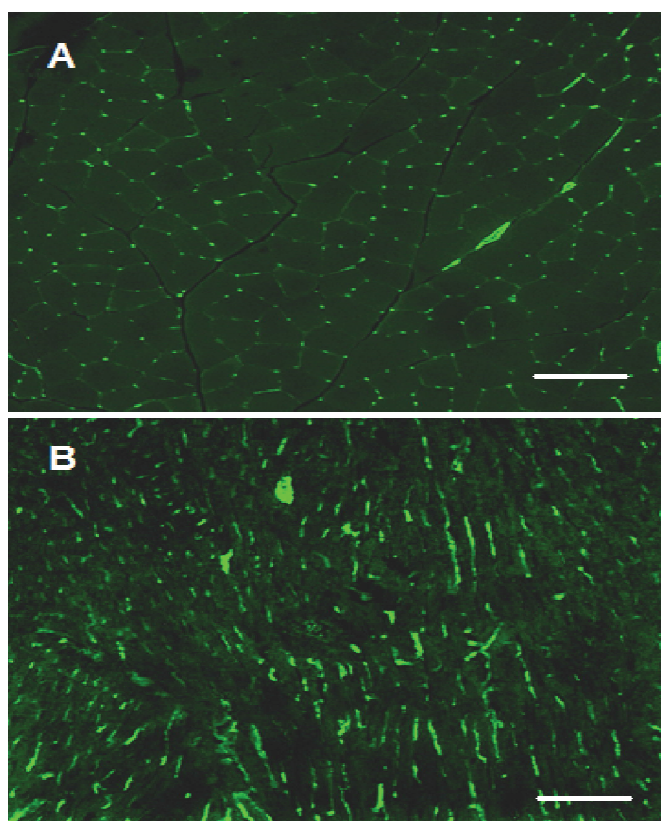


Figura 3.4: Imagens representativas de fotomicrografias adquiridas utilizando microscopia fluorescente confocal para avaliação histológica da densidade capilar estrutural com lectina *Griffonia simplicifolia* acoplada à FITC-conjugado. O arranjo anatômico da rede capilar do músculo esquelético em seções transversais pode ser observado em (A). No ventrículo esquerdo, a densidade capilar estrutural foi avaliada em seções obtidas utilizando o método “orientator”. Aumento 200x, barra = 100 μ m (B).

Diâmetro do cardiomiócito e deposição de colágeno

A análise morfométrica cardíaca foi realizada pela medida do diâmetro do cardiomiócito. As amostras foram coradas com hematoxilina e eosina e os cardiomiócitos visualizados através de um microscópio de fluorescência (Olympus BX50/WI, USA) acoplado a um sistema de câmera de vídeo digital (Optronics, Goleta, CA, USA). Foi utilizada uma objetiva de 40x e um aumento de 400x no monitor. A medida do diâmetro transversal dos cardiomiócitos foi realizada pelo *software* Saisam 5.1.3 (Microvision, France). Para isso, a régua de medida foi colocada sobre o menor diâmetro do cardiomiócito, desde que este possibilitasse a passagem sobre o núcleo da célula. Foram avaliadas pelo menos cinco imagens digitais dos cortes histológicos de

seções teciduais aleatoriamente selecionadas, sendo medidos pelo menos 10 cardiomiócitos de cada imagem, totalizando aproximadamente 500 medidas de cardiomiócitos por grupo.

O volume de colágeno foi determinado utilizando a técnica de marcação com Picrosirius-red (163). Em resumo, as secções foram colocadas num microscópio de projeção, onde 20 campos visuais foram selecionados e o colágeno intersticial determinado através de um sistema de análise de imagem, ImagePro-PlusVR 6.3 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD, EUA). O volume de colágeno foi calculado como a soma de todas as áreas dos tecidos conectivos corrigido pela soma de todas as áreas musculares em todos os campos. Para marcação do colágeno presente no VE amostras foram coradas com hematoxilina-picro-sírius (163). Para determinar a % de área de colágeno, foi utilizada a fórmula padrão: deposição de colágeno do VE (%) = $AC \times 100/AT$, onde AC é a área de colágeno de cada campo do microscópio, e AT é a área total do campo do microscópio.

Análise estatística

Os dados são apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Todos os gráficos e as estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism GraphPad Software Inc. (San Diego, CA, EUA). A normalidade da distribuição dos dados foi determinada através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk. As variáveis morfológicas (peso, ganho de peso, peso das gorduras retroperitoneal e epididimal e % de gordura corporal), morfométricas (diâmetro do cardiomiócito e densidade capilar funcional e estrutural), perfil lipídico e perfil glicídico foram comparados entre os grupos por meio da análise de variância (ANOVA one-way) e o Post-Hoc de Bonferroni foi utilizado para localizar as diferenças quando $p < 0,05$.

3.2.0 papel dos ligantes seletivos dos receptores periféricos I₁ das imidazolininas.

Modelo e protocolo experimental

Foram utilizadas células do tecido adiposo visceral de ratos WKY com 20 semanas de vida. Os animais foram mantidos em condições controladas de umidade ($60 \pm 10\%$), temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) e luz (ciclo de 12 horas claro/escuro), com livre acesso a ração e água.

Os animais foram sacrificados com uma overdose de pentobarbital sódico via i.p. para que fosse realizada a extração do tecido adiposo visceral através de incisão da região abdominal.

Bioensaio 1 (binding)

PREPARAÇÃO DAS FRAÇÕES MEMBRANARES

O tecido adiposo dos ratos foi macerado e centrifugado a 1000 rpm/min durante 5 minutos em tampão de lise Tris-Hepes gelado (Tris 5 mM de Hepes, pH 7,7, EDTA 0,5 mM, MgCl_2 0,5 mM e EGTA 0,5 mM) contendo inibidores de proteases (leupeptina a 10 $\mu\text{g/mL}$ de inibidor de tripsina 1 $\mu\text{g/mL}$ benzamidina 5mg/mL).

As células foram então homogeneizadas e, em seguida, centrifugadas a 75000 g durante 20 min a 4°C (equipamento Beckman). O sedimento de membrana foi ressuspenso em tampão de lise de Tris-Hepes resfriado. As membranas foram, então, homogeneizadas. Em seguida, elas foram novamente ultracentrifugadas a 75000 g durante 20 minutos a 4°C . As membranas foram, então, homogeneizadas uma última vez antes de serem distribuídas em frascos e armazenadas a -80°C até utilização.

DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A quantidade de proteína foi determinada pelo método de Bradford (164). Uma curva padrão (0 a 10 μg) é feita com albumina de soro bovino como referência. 1 ml de reagente de Bradford (0,01% de azul de Coomassie G-250, 8,5% de ácido fosfórico, 4,75 % de etanol) é adicionado em 100 μL de amostra da curva padrão, ou em amostra do ensaio. Após agitação e o surgimento da cor, a densidade óptica é medida com um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 595 nm. As concentrações de proteínas das amostras são derivadas dos valores obtidos a partir da curva padrão.

ENSAIO DE LIGAÇÃO ESPECÍFICA

Experimentos de ligação específica com a [125 I] ParaIodoClonidina (PIC) foram todos realizados a 25° C. A reação de ligação da [125 I] PIC é iniciada a partir da incubação de 100 μ l de membranas de células adipocitárias (50-100 mg) com 25 μ l de radioligante (0,5 nM) e 25 μ l de ligante frio (não marcado) para determinar a ligação não específica (ver abaixo para a determinação das condições desta ligação) ou drogas que competem pelo mesmo sítio de ligação em um volume de reação final de 250 μ l contendo um tampão ligação específica, Tris- HEPES resfriado, (5 mM de Tris pH 7,7, 0,5 mM de Hepes EDTA, 0,5 mM EGTA e 0,5 mM $MgCl_2$). A reação foi incubada durante 45 min (tempo necessário para atingir as condições de equilíbrio da ligação) e 25° C (165). A ligação específica de [125 I] PIC aumenta linearmente com a concentração de proteína variando de 8 mcg a 150 mcg, por isso mantivemos uma concentração média de 50 mcg para permanecer na linearidade da ligação específica (165).

A incubação foi interrompida por filtração a vácuo em equipamento Brandel sobre filtros Whatman GF/B tratados com 0,03% de polietilenimina durante 3 horas a 4 ° C (um agente polimerizante capaz de reduzir a malha e manter a melhor filtração dos complexos formados).

Os filtros foram então lavados três vezes com tampão de lavagem de Tris-HCl gelado (50 mM Tris-HCl, pH 7,4) e, durante a noite, foram secos à temperatura ambiente. A quantidade de radioatividade retida no filtro foi contada diretamente em um contador γ Minaxi (Packard, Meridien CT). A ligação não específica foi determinada utilizando a PIC (100 nM) por ser um ligante dos mais puros e mais seletivos para os sítios de ligação específica da [3H] clonidina ou do [3H] idazoxan (166) em relação aos receptores α_1 e α_2 -adrenérgicos. A concentração utilizada foi determinada através de experiências piloto, que mostrou que a ligação residual obtida com a PIC é similar ao obtido com outros fármacos testados como a clonidina ou LNP911. Notamos também que todas as drogas alteram a curva no mesmo ponto, incluindo a PIC, o que significa que a PIC não interfere na ligação não específica. A ligação não específica obtida com 100 μ M de PIC representa aproximadamente 50% da radioatividade total, quando 0,5 nM de [125 I] PIC foi utilizada (concentração correspondente à constante de afinidade (Kd), determinada em experiências de saturação prévias (165). Nos ensaios de competição, o mesmo protocolo foi usado com 0,5 nM de [125 I] PIC e concentrações crescentes de fármacos competidores (de 10^{-3} a 10^{-10} M).

Bioensaio 2 (lipólise)

Este procedimento, realizado a partir de amostras do tecido adiposo de ratos WKY, consistiu na preparação e ativação de adipócitos em um ensaio lipolítico controlado que permite a avaliação da função celular através da dosagem de glicerol.

CONSTITUINTES

- Soluções Tampão utilizadas:

- Tampão de KREBS-RINGER pH 7,4 (1L)

118 mM NaCl,	6,890g
4,7 mM KCL,	0,350g
1,2 mM MgSO ₄ .[7H ₂ O]	0,295g
2,5 mM CaCl ₂ ,	0,368g
1,2 mM KH ₂ PO ₄ ,	0,163g
25 mM HEPES,	5,950g
1 mM EDTA,	0,292g
2 mM glicose,	0,360g

- Tampão *nature* (KREBS-RINGER + BSA)

1% albumina do soro bovino V (BSA).

Foram utilizados 200ml deste tampão por animal para fabricar os tampões seguintes.

- Tampão de lavagem

Tampão *nature* + 500nM adenosina

(Peso Molecular = 267 => 5mM = 1,33mg/ml => 8,5µl adenosina em 85ml de tampão *nature*)

Foram utilizados 85ml deste tampão por animal.

- Tampão de digestão

Tampão de lavagem + 1mg/ml de collagenase tipo 1A

Foram utilizados 5ml deste tampão por animal.

- Tampão de reação

Tampão *nature* + 1U/ml adenosina desaminase (ADA), cerca de 3μl de solução estoque para 5ml)

4% BSA V

É um tampão utilizado para inativar os resíduos da adenosina, permitindo assim a lipólise. A albumina utilizada é responsável pela captura dos AGLs.

- Ensaio farmacológico em adipócitos:

Diferentes concentrações, em um intervalo de 10^{-4} a 10^{-9} M, dos fármacos utilizados foi realizado a partir de uma diluição em cascata de 1:10, em tampão *nature*. Estas concentrações permitem a construção de uma curva de dose-resposta para o ensaio de lipólise.

- Forscolina em diferentes concentrações:

A forskolina ajuda a estimular a lipólise nos adipócitos. A concentração de forskolina utilizada é de 10^{-4} a 10^{-9} M e é também preparada em cascata através de diluição de 1:10 em tampão *nature*.

PREPARAÇÃO DOS ADIPÓCITOS

O tecido adiposo retirado dos animais é preservado em tampão de lavagem contendo adenosina, que impede a lipólise, atuando em seu receptor. Esta propriedade é explorada para evitar a drenagem do conteúdo de triglicérides dos adipócitos durante o preparo.

Para facilitar a digestão, o tecido é cortado em pequenos pedaços e colocado em tampão de digestão contendo collagenase. Esta enzima é capaz de quebrar as ligações de peptídeos de colágeno, que mantém o tecido. Assim, a ação desta enzima fará com que

haja dissociação do tecido em adipócitos isolados. A preparação é colocada a 37° C, a temperatura de funcionamento ideal da enzima.

A suspensão é passada através de um filtro de 500 µm de reticulação que permite a passagem de adipócitos (máx. 150 µm de diâmetro), mas impede que o tecido não digerido passe. O produto da digestão foi centrifugado a 1200 g durante 4 min. Esta etapa de centrifugação é usada para separar os adipócitos das células pré-adipocitárias com base nas suas diferentes densidades. A preparação dos adipócitos é então lavada com tampão de lavagem para remover as impurezas e a collagenase.

A densidade celular da suspensão foi avaliada. Para isso, a suspensão foi diluída em azul de metileno; 6 µL desta suspensão é colocado em uma câmara de Neubauer. Todas as células são contadas ao longo de toda a superfície da lâmina. E assim, o número de células contidas nos 6 µL é conhecido e pode relacionar-se com a concentração da suspensão. A concentração da preparação de adipócitos é ajustada com tampão *nature* para se obtenha o número desejado de células nos espaços onde será realizado o bioensaio. Este tampão não contém qualquer tipo de adenosina, ao contrário do tampão de lavagem. De fato, a adenosina não é mais necessária porque a etapa seguinte será o bioensaio, onde a lipólise deixará de ser inibida.

ENSAIO LIPOLÍTICO

Os adipócitos preparados em concentrações conhecidas foram imediatamente transferidos para a placa de Elisa contendo o agente ativador de lipólise, um tampão de reação e o fármaco a ser analisado. Os adipócitos foram então incubados por 3 horas em uma estufa de cultura celular com 5% de CO₂ a 37° C, condição fisiológica ideal para realização do bioensaio.

Medida da função lipolítica: dosagem do glicerol

Durante a lipólise, glicerol e ácidos graxos são liberados da célula. Desta maneira, para determinar a função lipolítica dosamos o glicerol no meio extracelular. No nosso caso, recuperamos o sobrenadante do bioensaio para a determinação de glicerol, os adipócitos, pela sua densidade, flutuam na superfície.

Para tornar o glicerol um produto colorido, utilizamos um kit para um ensaio colorimétrico (Free Glycerol - FG0100, SIGMA). Este ensaio é realizado através de três

reações em cadeia, que permitem a obtenção de um composto de cor cuja absorbância se dá a 540 nm, sendo proporcional à concentração de glicerol contido no teste.

DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE GLICEROL

Para determinar a quantidade de glicerol contido numa amostra, é necessário que o valor de absorbância correspondente esteja dentro da parte linear da curva de forscolina. Se a quantidade de glicerol na amostra não estiver incluído na região linear da curva (fora do intervalo), é necessário efetuar uma diluição adequada da amostra para que o valor de absorbância correspondente esteja dentro da curva linear.

Análise estatística

Todos os gráficos e as estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism GraphPad Software Inc. (San Diego, CA, EUA). Os resultados são apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

3.3. Desenvolvimento de um modelo farmacológico da hiperatividade simpática em camundongos.

Modelo animal

Para este estudo, foram utilizados camundongos knockout (KO) ApoE^{-/-} com 12 semanas de vida, importados pela Taconic Europe (Ejby, Dinamarca). Todos os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Strasbourg, com ciclo claro/escuro de 12h/12h, sendo controlados os parâmetros ambientais (temperatura, umidade) e o acesso *ad libitum* à água e ração. O consumo de água, alimentos e alterações de peso dos animais foram monitorados durante toda a duração dos protocolos.

Protocolo experimental

Foram utilizados dois grupos de KO ApoE^{-/-}, modelo experimental reconhecido para o estudo da aterogênese, tratados com desipramina na água de beber (**DES**, 10 mg/kg/dia, n = 10) ou com veículo (**CON**), durante 16 semanas, seguido de uma avaliação dos parâmetros hemodinâmicos antes e outra após o tratamento crônico. Vale ressaltar que a desipramina é um inibidor da recaptação da Nad no espaço sináptico, e outros neurotransmissores.

Avaliação hemodinâmica

Foram realizadas medidas indiretas da PAS e da FC nos animais conscientes a cada 4 semanas, através de um sistema computadorizado de pletismografia caudal (BP-2000, Visitech blood pressure analysis system, USA).

Análise da glicemia

Após o tratamento, os animais foram mantidos por 6 horas de jejum antes de serem anestesiados com injeção de pentobarbital sódico (70mg/kg, i.p.) que permitiu a análise dos níveis séricos de glicose através do sangue acessado pela cauda (glicômetro, Accu-Chek, Roche).

Dosagem das catecolaminas plasmáticas

Ainda com o animal anestesiado, foi realizada a punção cardíaca para coleta do volume máximo de sangue possível, o qual foi transferido para tubos de ensaio. Os tubos foram centrifugados a 15000 rpm por 15 minutos a 4°C para a dosagem das catecolaminas no plasma por HPLC.

É importante notar que o volume de sangue circulante é muito baixo, cerca de 2 ml num camundongo de 30g. É por esta razão que realizamos apenas a dosagem das catecolaminas.

Análise estatística

Todos os gráficos e as estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism GraphPad Software Inc. (San Diego, CA, EUA). Todos os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média, com um intervalo de confiança de 95%. Utilizou-se teste t de Student para fins de comparação entre os dois grupos experimentais.

4. Resultados

4.1. Desenvolvimento de um modelo experimental de síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica caracterizado pela presença de hiperatividade simpática.

Antes de dar início ao tratamento farmacológico, realizamos a caracterização do modelo de SM baseado em dieta hiperlipídica (157).

Em primeiro lugar, observou-se que em animais do grupo HFD a pressão arterial sistólica e a frequência cardíaca aumentaram significativamente após 20 semanas de dieta HFD. Além disso, as catecolaminas plasmáticas, noradrenalina e adrenalina, foram significativamente aumentadas no grupo HFD confirmando o envolvimento da atividade simpática no desenvolvimento da SM (Tabela 4.1).

O consumo de alimentos e o peso final não foram afetados nos dois grupos, embora um aumento significativo na gordura visceral e epididimal tenham sido observados (Tabela 4.1). A dieta HFD também apresentou efeito sobre a glicose de jejum, colesterol total, LDL e triglicerídeos (Tabela 4.1). Além disso, o nosso modelo de SM induzido por este regime apresentou aumento da adiposidade visceral associado à hipertensão moderada sugerindo um papel das alterações metabólicas, incluindo dislipidemia e disglicemia no desenvolvimento de hipertensão.

Foi possível identificar uma rarefação capilar funcional no músculo esquelético do grupo HFD (Tabela 4.1). Em contraste, a densidade capilar funcional da pele, leito microvascular que não está diretamente envolvido na regulação da resistência vascular periférica, não foi alterado.

Este estudo também revelou que a dieta HFD induz a rarefação capilar estrutural no VE e no músculo esquelético de animais (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Caracterização do modelo de síndrome metabólica baseada em uma dieta hiperlipídica de 20 semanas.

	CON	HFD
Massa corporal (g)	402±14	385±6
Ingestão (g/dia)	14±0,5	15±0,5
PAS (mmHg)	146±7	168±2*
FC (bpm)	382±14	435±8*
Noradrenalina (pmol/ml)	3,5±0,6	8,2±0,4***
Adrenalina (pmol/ml)	11,8±0,5	11,4±0,3
Gordura Visceral (g)	4,4±0,5	9,0±0,9*
Gordura Epididimal (g)	4,4±0,3	5,9±0,6*
Glicemia de jejum (mg/dL)	108±3	122±3*
Insulina (μIU/ml)	27,7±4,3	41,9±2,9*
Colesterol total (mg/dL)	47±2,3	62±4,1*
HDL colesterol (mg/dL)	29±8	34±3
LDL colesterol (mg/dL)	11±2	18±2*
Triglicerídeos (mg/dL)	30±6	50±6*
DCF muscular (capilar/mm²)	250±12	157±12***
DCF cutânea (capilar/mm²)	256±10	234±15
DCE muscular (capilar/fibra)	1,86±0,07	1,53±0,06**
DCE cardíaca (Vv_[capilar]/Vv_[fibra])	0,24±0,024	0,16±0,006**

PAS – Pressão Arterial Sistólica, HDL – *High Density Lipids*, LDL – *Low Density Lipids*, DCF – Densidade Capilar Funcional e DCE - Densidade Capilar Estrutural.

Os valores representam a média ± EPM de 10 experimentos.

* p <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001 vs grupo controle (CON);

4.2.Efeitos da modulação do sistema nervoso simpático em ratos com SM.

Composição Corporal, Ingestão Alimentar e Depósitos de Gordura visceral e epididimal

A massa corporal e a ingestão alimentar dos animais foram monitoradas ao longo das primeiras 20 semanas de dieta HFD, sendo que, para avaliação do efeito farmacológico, apenas os valores registrados antes e após o tratamento crônico foram levados em consideração.

Podemos observar na Tabela 4.2, que não foram observadas diferenças na massa corporal entre os grupos experimentais tratados com veículo. Ao final das 4 semanas de tratamento, verificou-se uma redução significativa na massa corporal do grupo tratado com rilmenidina (HFD + RIL) em comparação com o grupo controle que recebeu dieta HFD.

Os animais que receberam doses diárias de anti-hipertensivos de ação central apresentaram uma redução significativa na quantidade diária de ração ingerida quando comparados aos grupos controles com (HFD + VEI), ou sem (CON + VEI) SM.

Em relação aos depósitos de gordura visceral e epididimal, o grupo controle alimentado com HFD apresentou aumento desses depósitos em relação ao grupo que recebeu dieta normal. Já, entre os grupos de tratamento, apenas o grupo tratado com clonidina não foi capaz de promover redução significativa dos depósitos de gordura visceral, vista nos grupos tratados com rilmenidina e LNP599, e epididimal, o qual foi reduzido, desta vez, apenas pelo grupo tratado com rilmenidina (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Composição Corporal, Ingestão Alimentar e Depósitos de Gordura visceral e epididimal após 4 semanas de tratamento com anti-hipertensivos de ação central.

	CON + VEI	HFD + VEI	HFD + CLO	HFD + RIL	HFD + LNP
Massa corporal (g)	445±13	453±13	422±16	400±8#	418±14
Ingestão (g/dia)	14±0,7	12±0,3	10±0,3#*	9,7±0,3#*	9,7±0,3#*
Gordura Visceral (g)	5,1±0,7	13,7±1,5*	10,0±1,9	7,2±0,6#	8,5±0,8#
Gordura Epididimal (g)	4,6±0,5	9,4±0,8*	6,4±1,3	5,0±0,6#	6,8±0,8

Os valores representam a média ± EPM de 10 experimentos.

* p < 0,05 vs grupo controle (CON + VEI);

p < 0,05 vs grupo HFD (HFD + VEI).

Parâmetros Hemodinâmicos

As medidas da PAS e da FC foram realizadas através da pletismografia caudal ao final da 20ª semana de dieta e ao final da 4ª semana de tratamento farmacológico (24ª semana de dieta). Ao final do tratamento, conforme mostra a Figura 4.1, podemos observar que o consumo da dieta HFD aumentou significativamente a PAS (178 ± 2 mmHg) e a FC (412 ± 8 bpm) quando comparados ao grupo que recebeu dieta normal (138 ± 3 mmHg e 336 ± 5 bpm, respectivamente). Em relação aos grupos de animais tratados, observou-se redução significativa da PAS em todos os grupos (155 ± 4 , CLO; 157 ± 4 , RIL e 156 ± 4 mmHg, LNP) quando comparados ao grupo HFD+VEI. De forma similar, este comportamento foi observado com relação à FC dos animais tratados (361 ± 8 , CLO; 365 ± 11 , RIL e 374 ± 7 bpm, LNP) (Figura 4.1).

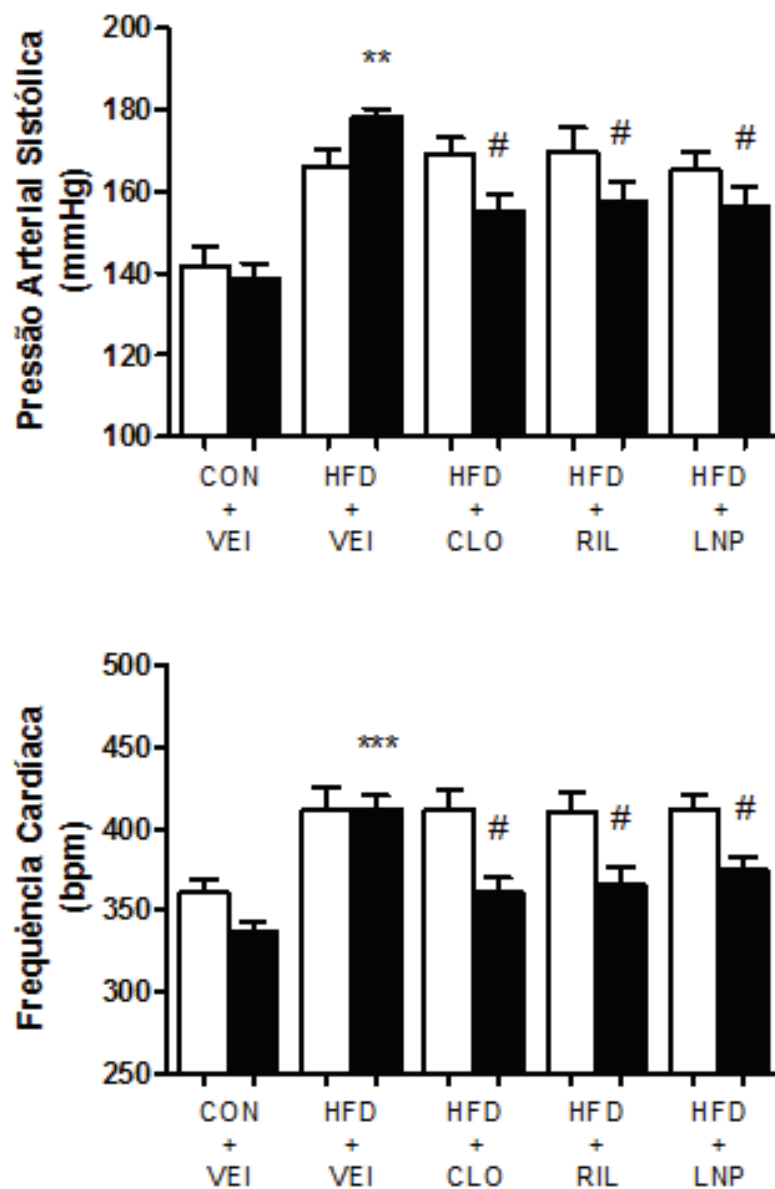


Figura 4.1: Pressão arterial sistólica e frequência cardíaca basal (barras abertas) e após (barras fechadas) tratamento crônico com anti-hipertensivos de ação central por 28 dias.

Os valores representam a média $\pm$ EPM de 10 animais.

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. CON + VEI após tratamento.

$p < 0,05$ vs. HFD + VEI após tratamento.

Catecolaminas e Leptina Plasmática

De acordo com a Figura 4.2 (A e B), o grupo HFD + VEI mostrou um aumento significativo nos níveis plasmáticos de noradrenalina (344 ± 31 pg/mol) e adrenalina (89 ± 4 pg/mol) quando comparados com os valores encontrados no grupo CON + VEI (215 ± 16 , noradrenalina; 61 ± 4 pg/mol, adrenalina). Todos os grupos de tratamento foram capazes de reduzir os níveis plasmáticos de adrenalina (68 ± 7 , CLO; 64 ± 8 , RIL e 64 ± 7 pg/mol, LNP) quando comparados com o grupo HFD + VEI, mas o mesmo não foi visto quando avaliamos os resultados da dosagem de noradrenalina, onde os valores apresentados pelos grupos tratados com rilmenidina e LNP599 (242 ± 13 e 233 ± 25 pg/mol, respectivamente) não foram acompanhados pelo grupo que recebeu clonidina (303 ± 18 pg/mol).

Quanto à dosagem de dopamina e leptina (Figura 4.2, C e D), os resultados não demonstram uma influência significativa exercida pela dieta HFD ou pela modulação do SNS. No entanto, a dosagem de leptina no grupo HFD + VEI ($2,3 \pm 0,7$) sugere uma tendência ao aumento quando comparada com o grupo CON + VEI ($1,5 \pm 0,2$) (Figura 4.2, D).

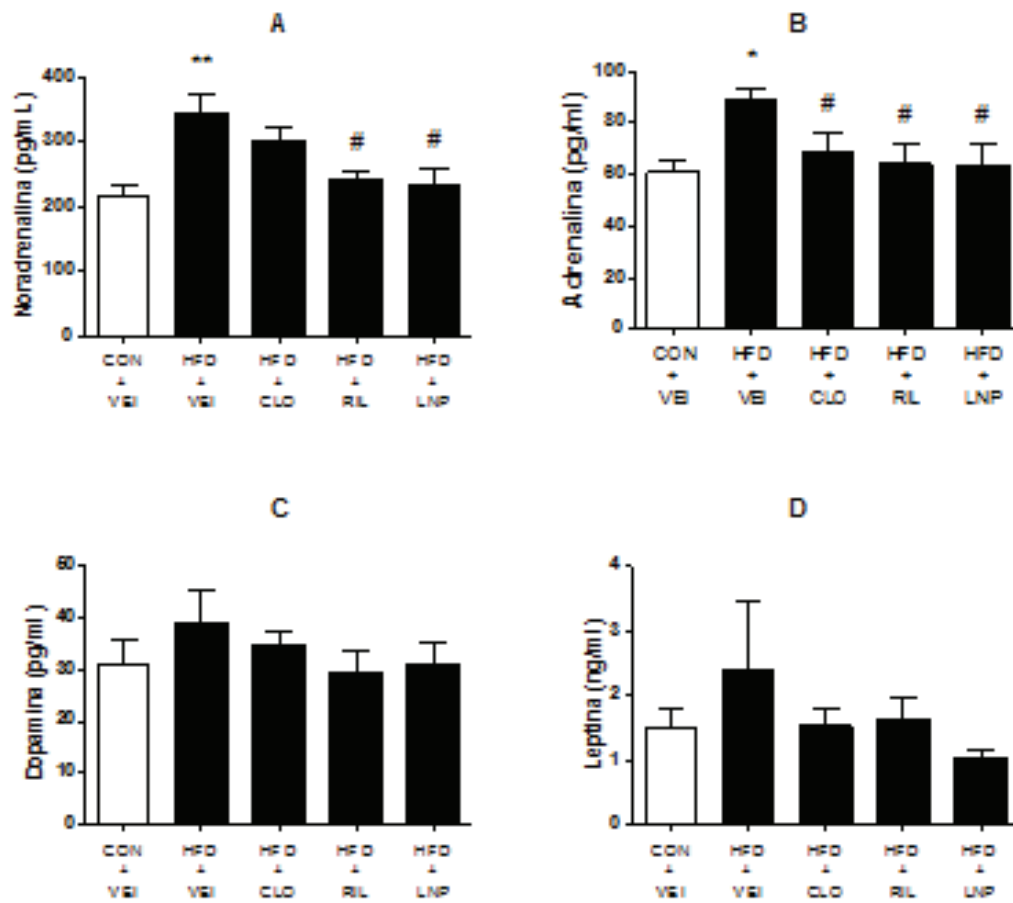


Figura 4.2: Efeito do tratamento crônico com anti-hipertensivos de ação central sobre os níveis plasmáticos de noradrenalina (A), adrenalina (B), dopamina (C) e leptina (D).

Os valores representam a média $\pm$ EPM de 10 animais.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. CON + VEI.

$p < 0,05$ vs. HFD + VEI.

Metabolismo Glicídico

O metabolismo glicídico foi influenciado pela ingestão da dieta HFD. Na Figura 4.3 (A), observou-se um aumento de 16% na glicemia de jejum dos animais do grupo HFD + VEI (100 ± 2 mg/dL) em relação ao grupo CON + VEI (86 ± 3 mg/dL). Os níveis glicêmicos foram mantidos elevados nos demais grupos de tratamento, considerando, porém, que apenas o grupo que recebeu clonidina tenha apresentado um aumento significativamente maior que o grupo CON + VEI (105 ± 5 mg/dL). Esses mesmos dois grupos (HFD + VEI e HFD + CLO) mantiveram elevados os níveis glicêmicos nos momentos 30, 60, 90 e 120 minutos após a sobrecarga de glicose, caracterizando uma alteração no metabolismo de glicose, confirmado através do cálculo da área sob a curva (AUC) apresentado na Figura 4.3 (C). De maneira interessante, quando avaliamos os resultados dos animais tratados com rilmenidina e LNP599, podemos perceber que eles apresentam uma redução significativa destas alterações (Figura 4.3, C).

A dieta HFD promoveu aumento dos níveis de insulina plasmática (58 ± 4 μ IU/mL, HFD + VEI) em relação ao grupo que recebeu dieta normal (29 ± 5 μ IU/mL, CON + VEI) (Figura 4.3, B). No entanto, nenhuma redução significativa foi observada nos grupos tratados, ainda que, o grupo tratado com rilmenidina apresentou uma tendência (42 ± 3 μ IU/mL) quando comparado com o grupo CON + VEI.

Ainda na Figura 4.3 (D), vemos que quando analisados os resultados do cálculo do HOMA-IR, os animais dos grupos HFD + VEI e HFD + CLO apresentaram valores significativamente superiores ao grupo CON + VEI. Este fato, aparentemente demonstra que a dieta HFD, por si só, é capaz de conduzir a uma resistência insulínica nesses animais. No entanto, os animais que foram tratados com rilmenidina ou LNP599 não apresentaram alterações significativas.

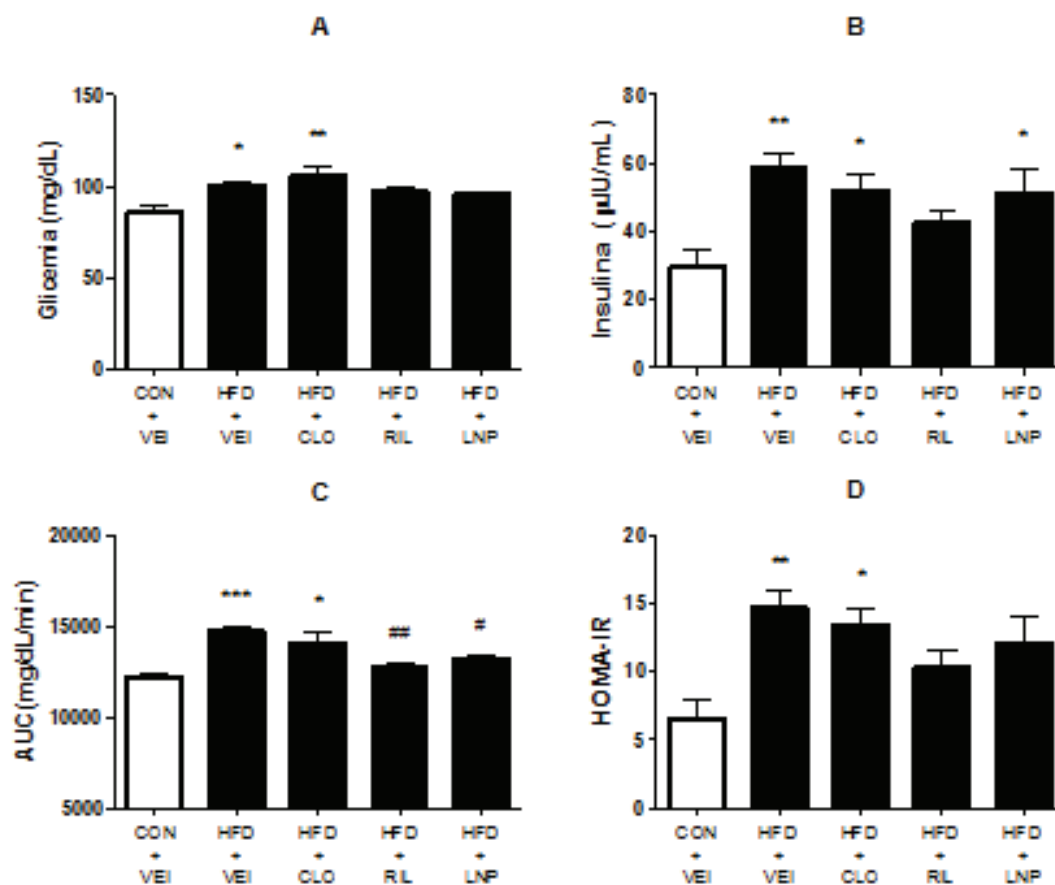


Figura 4.3: Efeito do tratamento crônico com anti-hipertensivos de ação central sobre a glicemia de jejum (A), a insulina (B), Área sob a Curva (AUC) do teste oral de tolerância a glicose (C) e o HOMA-IR (D).

Os valores representam a média $\pm$ EPM de 10 animais.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. CON + VEI.

$p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ vs. HFD + VEI.

Metabolismo Lipídico

Não foram observadas diferenças entre estes grupos controle no colesterol total e no LDL-c (Figura 4.4, A e C). Todavia, a Figura 4.4 (B) demonstra que os níveis de HDL-c estavam aumentados no grupo HFD + VEI (74 ± 8 mg/dL) em relação ao grupo CON + VEI (51 ± 4 mg/dL). Os níveis de triglicerídeos dos animais HFD + VEI (55 ± 7

mg/dL) se apresentaram elevados ao final do tratamento, quando comparados com os animais do grupo CON + VEI (28 ± 4 mg/dL) (Figura 4.4, D).

Nos grupos de tratamento, não foram observadas diferenças significativas nos valores de HDL-c e triglicerídeos (Figura 4.4, B e D). No entanto, os animais tratados com rilmenidina apresentaram uma redução do colesterol total (160 ± 5 mg/dL) e do LDL-c (109 ± 8 mg/dL) quando comparado com o grupo HFD + VEI (199 ± 8 e 137 ± 8 mg/dL, respectivamente) (Figura 4.4, A e C).

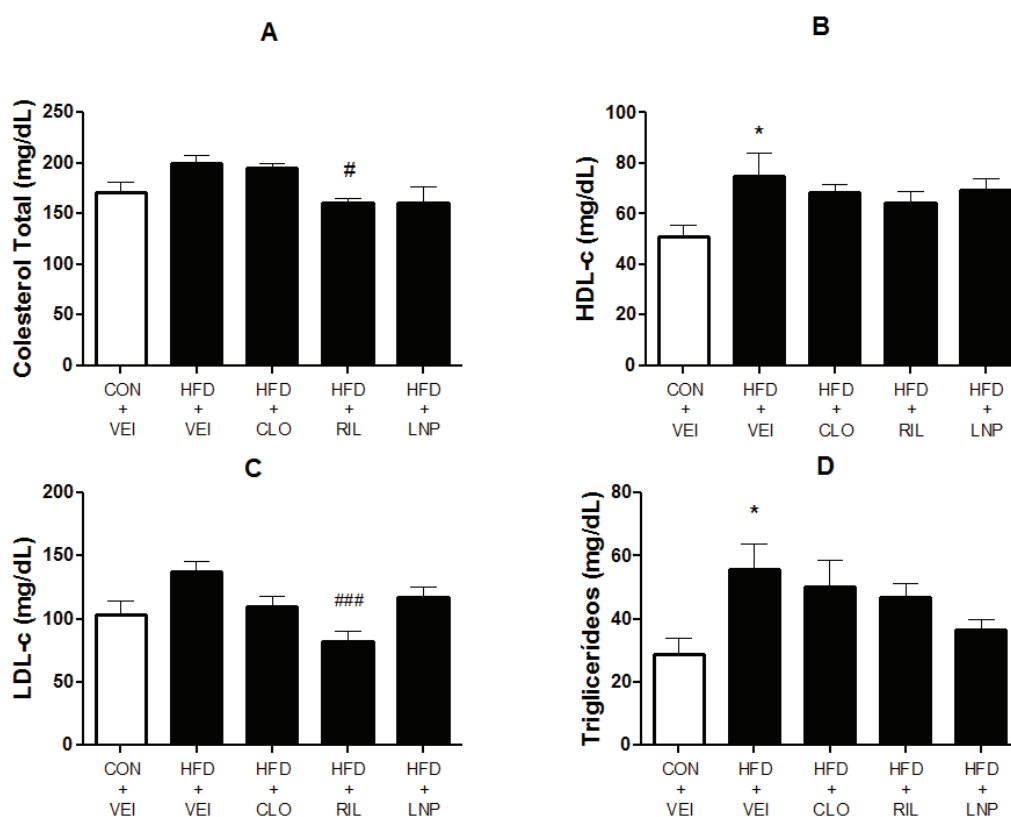


Figura 4.4: Efeitos do tratamento crônico com anti-hipertensivos de ação central sobre o colesterol total (A), HDL-c (colesterol HDL, B), LDL-c (colesterol LDL, C) e sobre os triglicerídeos (D).

Os valores representam a média $\pm$ EPM de 10 animais.

* $p < 0,05$ vs. CON + VEI.

$p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ vs. HFD + VEI.

Parâmetros Microcirculatórios

DENSIDADE CAPILAR FUNCIONAL

Através da videomicroscopia intravital, foi possível a visualização da rede de capilares no tecido muscular esquelético e na pele da orelha. Apesar de uma aparente redução na densidade capilar funcional cutânea dos animais do grupo que ingeriu dieta HFD, HFD + VEI (19%, quando comparados ao grupo CON + VEI), nenhuma diferença estatisticamente significativa foi constatada na pele da orelha ($p > 0,05$) (Figura 4.5), onde, os grupos tratados com clonidina e LNP599 aumentaram o número de capilares espontaneamente perfundidos (296 ± 11 e 290 ± 12 capilares/mm², respectivamente).

A rarefação capilar funcional foi constatada apenas no músculo grácil (cerca de 39 % quando comparados ao grupo CON + VEI, $p < 0,001$, Figura 4.5). Todos os grupos de tratamento foram capazes de reverter a rarefação capilar funcional presente no músculo grácil (229 ± 13 , CLO; 255 ± 16 , RIL e 241 ± 10 capilares/mm², LNP) em relação ao grupo controle que recebeu dieta normal (253 ± 16 capilares/mm², CON + VEI).

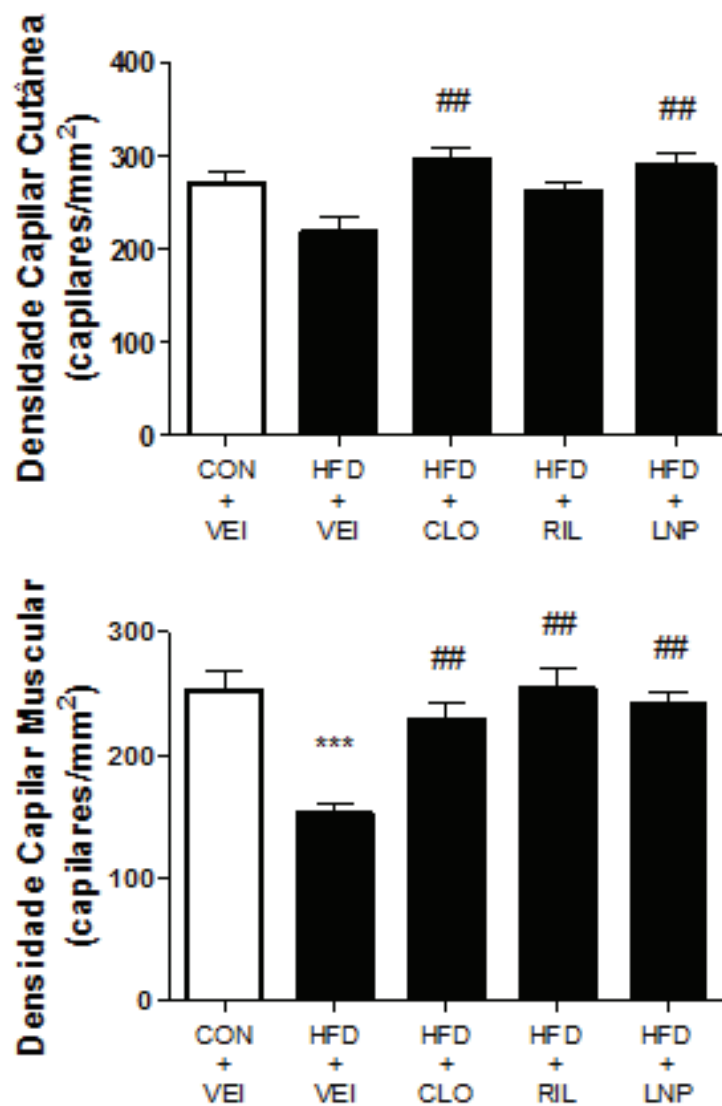


Figura 4.5: Efeitos do tratamento crônico com anti-hipertensivos de ação central sobre a densidade capilar funcional no músculo grácil e na pele da orelha.

Os valores representam a média $\pm$ EPM de 10 animais.

*** $p < 0,0001$ vs. CON + VEI.

$p < 0,001$ vs. HFD + VEI.

DENSIDADE CAPILAR ESTRUTURAL

Os valores apresentados na Figura 4.6 confirmam que animais do grupo HFD + VEI, que receberam dieta HFD, apresentaram rarefação capilar estrutural no músculo esquelético ($1,5 \pm 0,08$ capilar/fibra) e no VE ($0,18 \pm 0,01$ $V_{v[cap]}/V_{v[fib]}$) quando comparados com os respectivos valores apresentados após a análise do grupo CON + VEI ($1,8 \pm 0,04$ capilar/fibra e $0,33 \pm 0,01$ $V_{v[cap]}/V_{v[fib]}$) ao final dos experimentos.

A rarefação capilar estrutural do músculo esquelético de ratos com SM foi revertida após tratamento crônico com todos os tratamentos ($1,9 \pm 0,06$, CLO; $2,8 \pm 0,04$, RIL e $1,7 \pm 0,03$ capilares/fibra, LNP). Entretanto, apenas o grupo tratado com rilmenidina apresentou um aumento significativo do número de capilares totais no VE ($0,31 \pm 0,01$ $V_{v[cap]}/V_{v[fib]}$) (Figura 4.6).

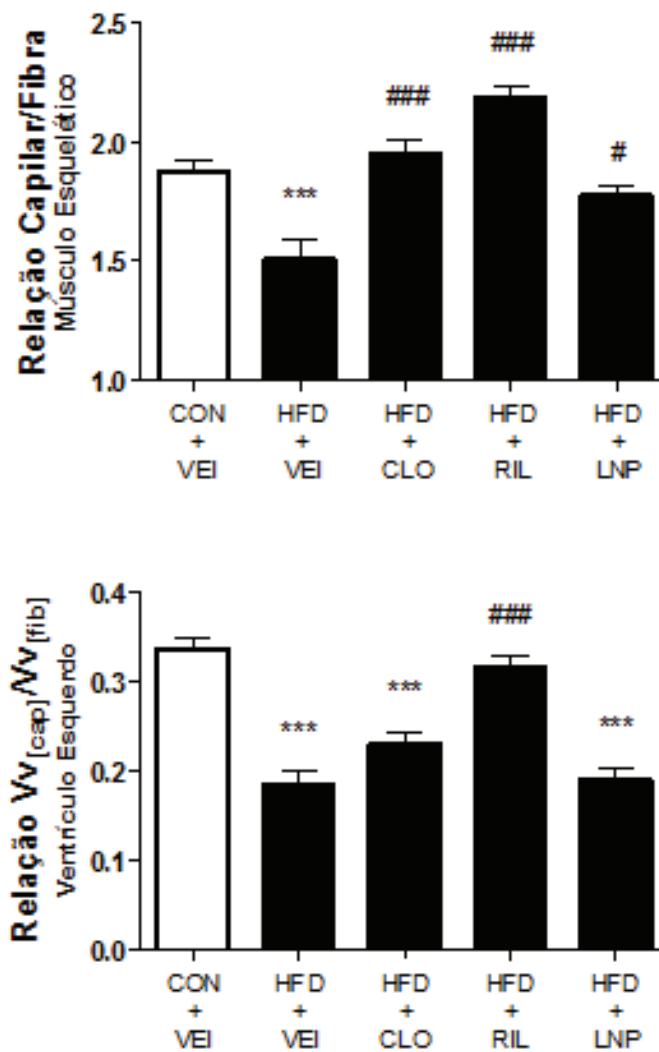


Figura 4.6: Efeitos do tratamento crônico com anti-hipertensivos de ação central sobre a densidade capilar estrutural no músculo grácil e no ventrículo esquerdo.

Os valores representam a média $\pm$ EPM de 10 animais.

*** $p < 0,001$ vs. CON + VEI.

$p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ vs. HFD + VEI.

Diâmetro do cardiomiócito e deposição de colágeno

A figura 4.7 demonstra que a HFD promoveu hipertrofia nos cardiomiócitos do grupo HFD + VEI ($268 \pm 4 \mu\text{m}$, $p < 0,001$) quando comparados ao CON + VEI ($228 \pm 3 \mu\text{m}$). O tratamento farmacológico por sua vez reverteu a hipertrofia do cardiomiócito nos grupos HFD + CLO ($226 \pm 6 \mu\text{m}$), HFD + RIL ($233 \pm 4 \mu\text{m}$) e HFD + LNP ($229 \pm 5 \mu\text{m}$). O grupo HFD + VEI apresentou um aumento na área total de colágeno presente no VE ($2,1 \pm 0,07 \mu\text{m}$) em relação ao grupo CON + VEI ($0,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$). No entanto, esse aumento de colágeno ventricular não sofreu alteração significativa nos grupos de animais tratados ($1,8 \pm 0,1$, CLO; $1,9 \pm 0,1$, RIL e $1,9 \pm 0,1 \mu\text{m}$, LNP; Figura 4.7).

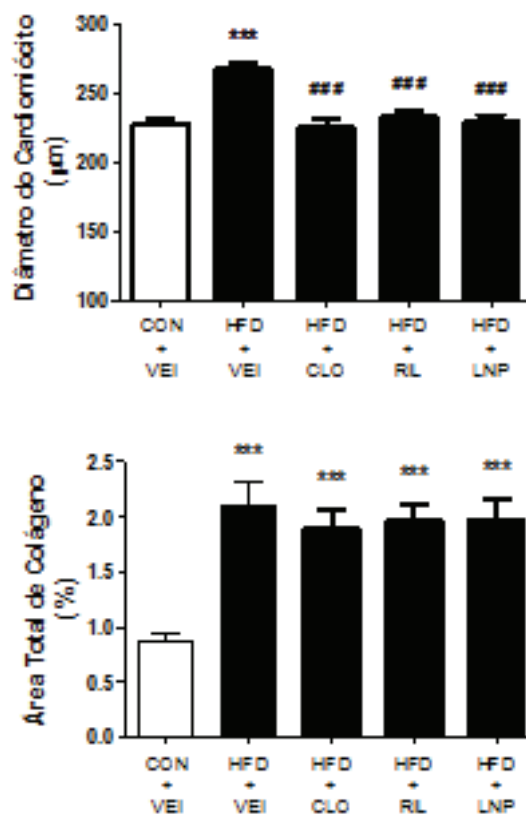


Figura 4.7: Efeitos do tratamento crônico com anti-hipertensivos de ação central sobre o diâmetro de cardiomiócito e a deposição de colágeno no ventrículo esquerdo.

Os valores representam a média $\pm$ EPM de 10 animais.

*** $p < 0,001$ vs. CON + VEI.

$p < 0,001$ vs. HFD + VEI.

4.3. Detecção e função dos receptores periféricos I_1 das imidazolininas.

Ensaio de competição (binding)

Os ensaios de competição no equilíbrio com período de incubação de 60 minutos permitiram a avaliação do grau de ligação específica de algumas drogas de interesse sobre os receptores I_1 -imidazolinínicos.

A figura 4.8 apresenta uma comparação da competição exercida por dois agonistas (ligantes frios) seletivos para os receptores α_2 -adrenérgicos em frações de membranas previamente marcadas com isótopo radioativo [125 I] PIC (ligante quente) que não apresenta especificidade, seja para o receptor α_2 -adrenérgico, ou I_1 -imidazolinínico. Tanto a rauwolscina, quanto o UK 14304, foram capazes de deslocar cerca de 40% da ligação do ligante quente ao seu receptor, confirmando assim, a presença dos receptores α_2 -adrenérgicos em membranas celulares de adipócitos de ratos WKY.

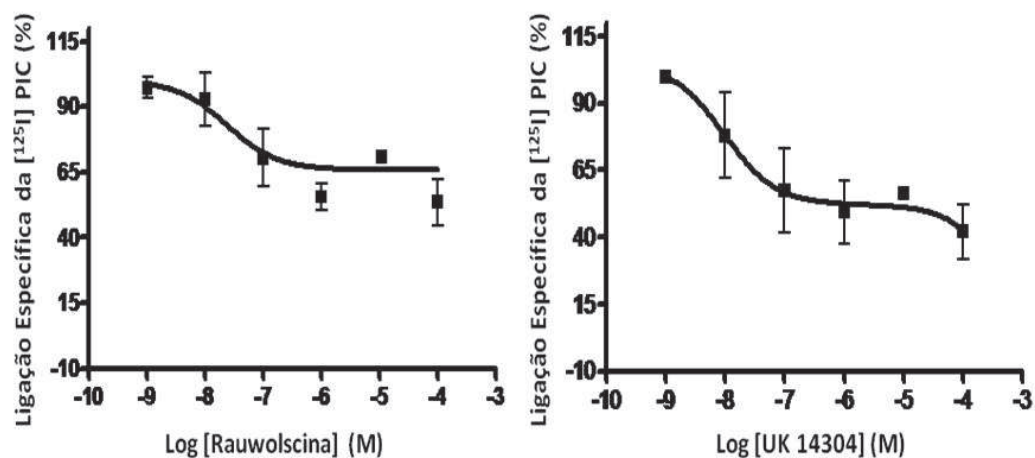


Figura 4.8: Ensaio de competição da [125 I] Paraiodoclonidina (PIC) na presença de concentrações crescentes de diferentes ligantes seletivos dos receptores α_2 -adrenérgicos (rauwolscina e UK 14304) em células do tecido adiposo de ratos WKY.

Os valores representam a média $\pm$ EPM de 5 experimentos.

Desta vez, utilizando-se da concentração estabelecida no experimento anterior (10^{-5} M do antagonista dos receptores α_2 -adrenérgicos, a rauwolscina), o ensaio de ligação específica com [125 I] PIC foi exposto a concentrações crescentes do ligante seletivo dos RI₁, o LNP599 (Figura 4.9). Os resultados apresentados pela figura 4.8, apontam pela primeira vez, para a presença de RI₁ em células do tecido adiposo de ratos. O gráfico aponta para uma alteração da curva de cerca de 20%, já, a partir da concentração de 10^{-8} M de LNP599. Essa mesma alteração se torna evidente a partir de 10^{-7} M de ligante frio, indicando alta afinidade do agonista, em escala nM.

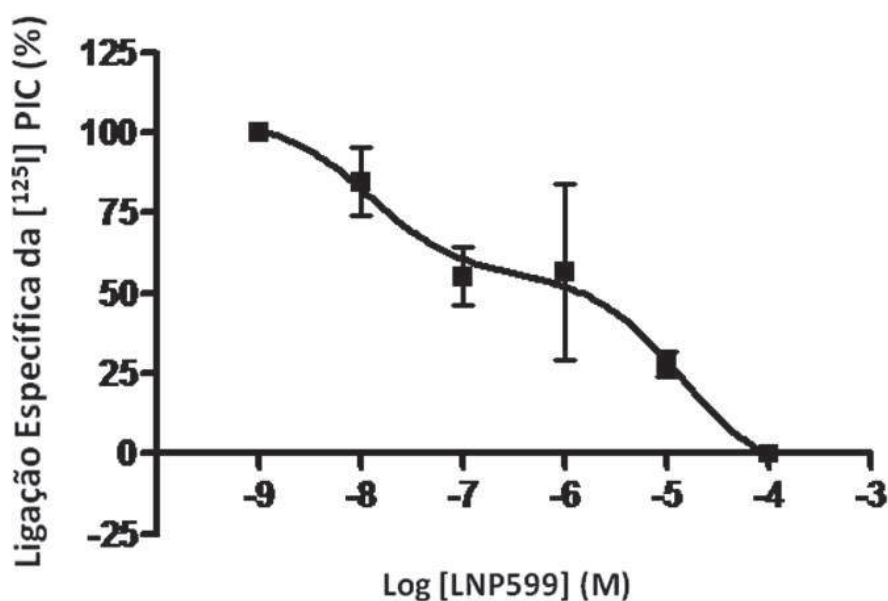


Figura 4.9: Curva de competição da [125 I] Paraiodoclonidina (PIC) na presença de concentrações crescentes do agonista seletivo dos RI₁ (LNP599) em células do tecido adiposo de ratos WKY após bloqueio dos receptores α_2 -adrenérgicos.

Os valores representam a média $\pm$ EPM de 5 experimentos.

Ensaio lipolítico

A taxa de lipólise em adipócitos não é muito elevada. Consequentemente, uma pequena quantidade de glicerol é liberada para o meio extracelular e, portanto, difícil de detectar. Por esta razão, a lipólise dos adipócitos é ativada quimicamente para que a quantidade de glicerol extracelular seja maior. Para fazer isso, usamos a forskolina,

capaz de estimular a guanilato ciclase, levando assim, à ativação da lipólise. Esta etapa se faz ainda mais necessária, pois o foco desta parte do estudo é investigar o efeito antilipolítico de alguns fármacos. Portanto, precisamos obter resultados utilizáveis de forma significativa, trabalhando em níveis detectáveis de glicerol e assim, detectar o efeito de redução do glicerol.

Através da dosagem de glicerol, o ensaio de lipólise mostrou que as células do tecido adiposo visceral de ratos WKY sofrem uma influência dose-dependente da ação de agonistas α_2 -adrenérgico, como o UK 14304 (%) (Figura 4.10, A). Além disso, foi possível confirmar, conforme demonstrado na Figura 4.10 (B), que a função celular desses adipócitos é igualmente reduzida por agonistas seletivos dos RI_1 .

Estes resultados sugerem que o receptor I_1 , assim como o receptor α_2 , está ligado a uma regulação negativa da lipólise.

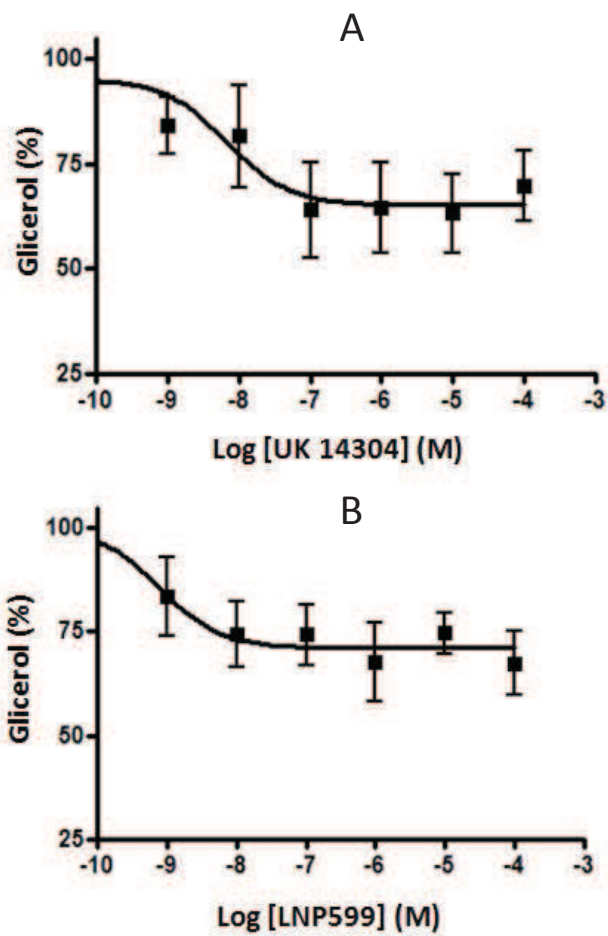


Figura 4.10: Ensaio lipolítico com forskolina em presença do UK 14304 ou LNP599 para avaliação da função adipocitária.

Os valores representam a média $\pm$ EPM de 5 experimentos.

4.4. Desenvolvimento de um modelo farmacológico de hiperatividade simpática em camundongos.

Peso corporal e ingestão alimentar

Durante as 16 semanas de tratamento, conforme mostra a Figura 4.11, podemos observar que não houve nenhuma alteração significativa no peso corporal dos camundongos ApoE^{-/-} tratados com desipramina em relação ao grupo CON. Contudo, o grupo DES apresentou aumento da ingestão apenas nas medidas realizadas na 8ª e 12ª semana de tratamento. No entanto, ao final das 16 semanas de tratamento essa diferença não foi mantida (Figura 4.11).

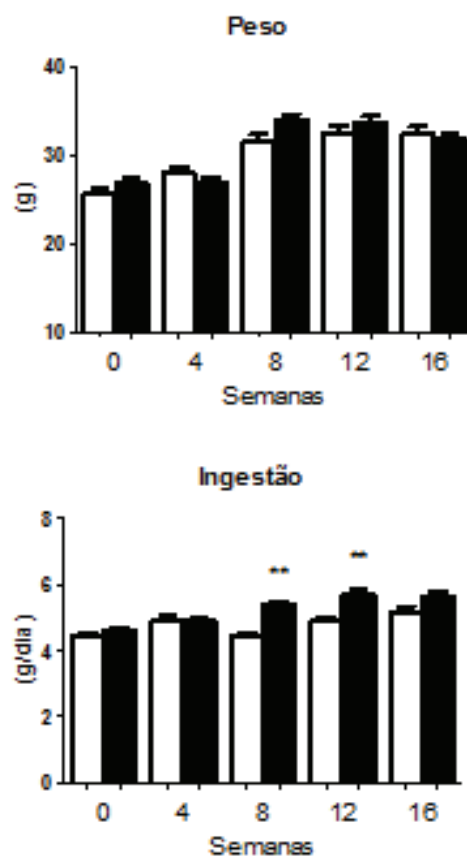


Figura 4.11: Efeitos do tratamento crônico com desipramina (DES, barras fechadas) ou veículo (CON, barras abertas) sobre o peso corporal e a ingestão alimentar em camundongos ApoE^{-/-} durante 16 semanas.

Os valores representam a média $\pm$ EPM de 10 experimentos.

** $p < 0,01$ vs. CON.

Glicemia de jejum

O tratamento crônico com desipramina reduziu significativamente a glicemia de jejum ($8,9 \pm 0,7$ nmol/ml, $p < 0,05$) quando comparada com o grupo controle ($11,5 \pm 0,7$ nmol/ml) ao final das 16 semanas (Figura 4.12).

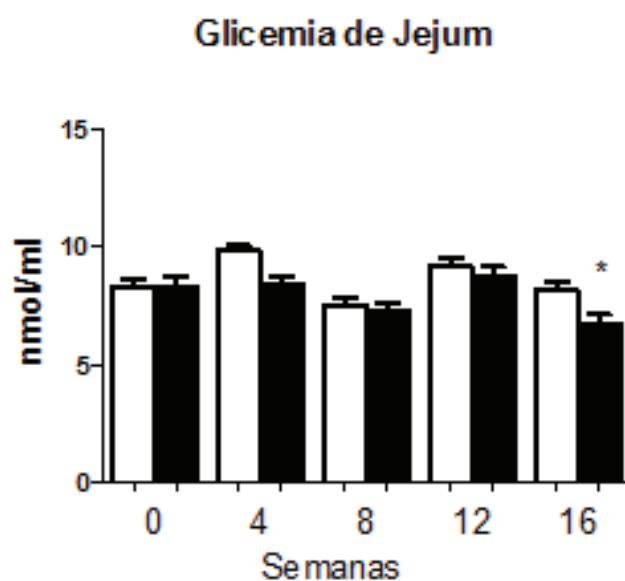


Figura 4.12: Efeitos do tratamento crônico com desipramina (DES, barras fechadas) ou veículo (CON, barras abertas) sobre a glicemia de jejum em camundongos ApoE^{-/-} durante 16 semanas.

Os valores representam a média $\pm$ EPM de 10 experimentos.

* $p < 0,01$ vs. CON.

Parâmetros hemodinâmicos

O tratamento com desipramina não foi capaz de alterar os níveis pressóricos dos camundongos ApoE^{-/-} ao longo das 16 semanas. Entretanto, a partir da 12^a semana de experimento, o grupo DES apresentou taquicardia em repouso, indicando uma atividade simpática aumentada (Figura 4.13).

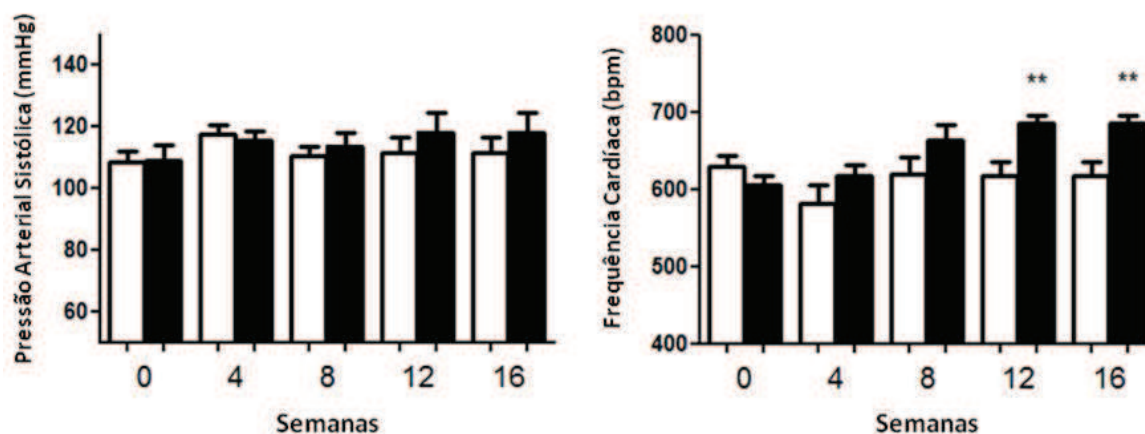


Figura 4.13: Efeitos do tratamento crônico com desipramina (barras fechadas) ou veículo (barras abertas) sobre a pressão arterial sistólica e frequência cardíaca em camundongos ApoE^{-/-} durante 16 semanas.

Os valores representam a média $\pm$ EPM de 10 experimentos.

** $p < 0,01$ vs. CON.

Catecolaminas plasmáticas

De maneira esperada, de acordo com a Figura 4.14 (A), o tratamento crônico com a desipramina foi capaz de induzir um aumento significativo nos níveis plasmáticos de noradrenalina do grupo DES (20825 ± 6003 pmol/L) quando comparados com os valores encontrados no grupo CON (10346 ± 2653 pmol/L). As concentrações de adrenalina plasmática não foram alteradas de forma significativa após tratamento crônico (Figura 4.14, B).

Quanto à dosagem de dopamina plasmática o grupo DES apresentou aumento significativo (4170 ± 675 pmol/L) em relação ao grupo CON (1532 ± 170 pmol/L) (Figura 4.14, C).

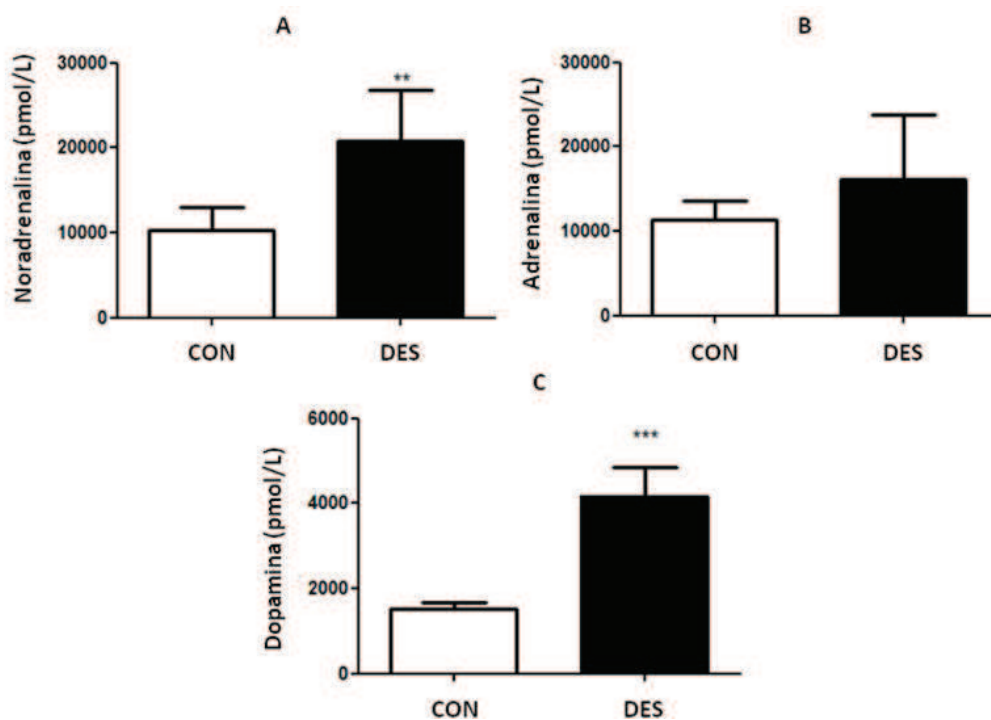


Figura 4.14: Efeitos do tratamento crônico com desipramina (DES) ou veículo (CON) sobre os níveis plasmáticos de noradrenalina (A), adrenalina (B) e dopamina (C) em camundongos ApoE^{-/-}.

Os valores representam a média $\pm$ EPM de 10 experimentos.

** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. CON.

5. Discussão

Os resultados do presente estudo demonstraram que a modulação do sistema nervoso simpático, através do tratamento crônico com anti-hipertensivos de ação central, é capaz de reverter alterações: i) hemodinâmicas (pressão arterial e frequência cardíaca; ii) metabólicas (glicídicas e lipídicas) e iii) microcirculatórias (rarefação capilar) presentes no modelo de SM baseado em dieta rica em lipídeos. Esses resultados constituem uma importante demonstração da importância do sistema nervoso simpático sobre as alterações metabólicas e cardiovasculares da SM.

MODELO DE SM BASEADO EM UM REGIME HFD

As dietas ricas em gordura são reconhecidas como um método para gerar um modelo válido de SM em animais (167), mesmo se dietas com diferentes composições de lipídeos descritas na literatura apresentem resultados diferentes em relação aos seus efeitos metabólicos. Em geral, os modelos de roedores de SM induzidos por dietas ricas em gordura são caracterizados por obesidade central, RI e alterações nos perfis de lipídeos no plasma (168, 169) e, portanto, essas dietas reproduzem as principais características da SM humana. Além disso, como a SM em humanos é em grande parte causada por fatores referentes ao estilo de vida, incluindo a ingestão calórica excessiva e inatividade física, o modelo animal que mais reflete essa situação é o modelo baseado em uma dieta HFD.

Os regimes hiperlipídicos são capazes de reproduzir este fenômeno em alguns roedores. A energia fornecida pelos lipídeos pode variar entre 20 e 60%. Esses lipídeos podem ser de origem animal: banha, gordura do leite, ou vegetal: óleo de coco, azeite de oliva. Estas dietas induzem:

- Obesidade
- Dislipidemia
- Esteatose hepática
- Hipertrofia cardíaca
- Distúrbios renais
- Hipertensão arterial leve a moderada

- A hiperglicemia moderada e a intolerância à glicose podem ocorrer no longo prazo.

O presente estudo mostrou que uma dieta HFD em longo prazo pode expandir a adiposidade central em ratos WKY, como mostrado pelo aumento acentuado do armazenamento de gordura visceral e epididimal. A adiposidade visceral desempenha um papel chave no desenvolvimento da SM humana, e está associada a todos os critérios de SM independentemente da sensibilidade à insulina (170, 171). Desta forma, o nosso modelo experimental de SM induzido por dieta reproduz as características principais da doença. Por outro lado, o peso corporal e a ingestão de alimentos total dos animais não foram diferentes entre os grupos controle (CON *vs.* HFD), no final do período experimental. Na verdade, o peso total do corpo ou ganho de peso nem sempre são correlacionados com a deposição de gordura central. Por exemplo, Bonomo e cols. mostraram que um pequeno aumento no peso corporal (cerca de 10%) é acompanhado por um aumento acentuado (2 vezes) na deposição de tecido adiposo central num modelo experimental murino de hipoprolactinemia materna no fim da lactação (172). Noutro estudo, ratos WKY que receberam HFD durante sete semanas tinham peso corporal total e ganho de peso semelhante no final do tratamento, em comparação com os ratos que receberam uma dieta com baixo teor de gordura (173).

Demonstramos ainda que o aumento da deposição de gordura visceral foi acompanhado por hipertrigliceridemia, alteração dependente do consumo de gordura das dietas (174). Além disso, o aumento da ingestão de sal aumenta os níveis de AGLs no plasma, o que contribui para alterações no perfil lipídico dos animais (175). O aumento de AGLs e os elevados níveis circulantes de triglicerídios provavelmente participam também na indução da hiperglicemia, intolerância à glicose e RI nesses animais (175), que são características importantes da SM. Neste contexto, uma dieta rica em sal aumenta a sinalização da insulina e induz a RI em ratos Dahl sensíveis ao sal (176).

Algumas características adicionais e importantes do modelo experimental utilizado no presente estudo são as alterações cardiovasculares acompanhadas da estimulação do SNS. Na verdade, as elevações na pressão arterial e frequência cardíaca são achados consistentes em pacientes com SM (177) e constituem marcadores robustos de alto risco cardiovascular e da hiperatividade do SNS (178, 179). Interessantemente,

no presente estudo mostramos que os níveis plasmáticos de noradrenalina foram marcadamente elevados no grupo HFD, confirmando o envolvimento do aumento da atividade simpática no desenvolvimento da SM. Na verdade, vários componentes da SM são associados com marcadores diretos e indiretos da estimulação adrenérgica (144). Além disso, o nosso modelo de SM com aumento da adiposidade visceral associada à hipertensão moderada sugere um papel das alterações metabólicas, incluindo dislipidemia e disglícemia, no desenvolvimento de hipertensão. Mesmo que nós não tenhamos usado uma dieta rica em sal, no presente estudo, o aumento crônico da ingestão de sal em nosso modelo experimental provavelmente também contribuiu para as elevações da pressão arterial. Os efeitos vasoconstritores de uma dieta de elevado teor de sal são, pelo menos em parte, independentes dos efeitos vasopressores diretos e hipertrofia vascular, que são uma consequência do aumento crônico da pressão arterial (180). Uma contribuição importante para a hipertensão em modelos animais sensíveis ao sal em seres humanos é a disfunção endotelial e, em particular, reatividade vascular, alterada devido ao aumento do estresse oxidativo e da consequente redução da biodisponibilidade do NO (181-183).

No grupo que recebeu dieta HFD, nossos resultados mostraram uma tendência ao aumento dos níveis plasmáticos de leptina, um elemento-chave no desenvolvimento da obesidade. A leptina, produto do gene *ob*, é um hormônio secretado por adipócitos e que age no SNC promovendo menor ingestão alimentar e incrementando o metabolismo energético, além de afetar eixos hipotalâmico-hipofisários e regular mecanismos neuroendócrinos (184). Em seres humanos obesos, quanto maior a quantidade de tecido adiposo, maiores os níveis de leptina circulantes (185). Esse achado é paradoxal, já que níveis elevados de leptina deveriam diminuir o apetite e aumentar o gasto energético. Assim, de forma similar ao que ocorre em alguns indivíduos com DM2, em que os níveis de insulina estão aumentados, é provável a ocorrência de um aumento da resistência periférica à leptina em seres humanos com obesidade (186), que agiria sobre o hipotálamo aumentando a atividade simpática e favorecendo o surgimento da hipertensão arterial (187-189).

Igualmente, o desenvolvimento de disfunção endotelial na SM está envolvido na fisiopatologia da hipertensão arterial e desempenha um papel importante no dano microvascular, devido aos elevados níveis de glicose no plasma (182, 190). Nessa direção, o presente estudo mostrou que o número de capilares espontaneamente

perfundidos no músculo esquelético de ratos alimentados com uma HFD foi significativamente reduzido quando comparado com os animais controles (CON). Por outro lado, a densidade capilar da pele, um leito microvascular que não está diretamente envolvido na regulação da resistência vascular periférica, não foi alterada pela dieta. Esta redução da densidade capilar funcional está também presente em ratos espontaneamente hipertensos e pode ser revertido pelo tratamento anti-hipertensivo crônico (74, 159).

A escolha da pele se deu em virtude de sua ampla utilização em pesquisa clínica, na determinação da existência de rarefação e disfunção microvascular sistêmica, devido ao fácil acesso e caráter não-invasivo a este leito microvascular através de técnicas de vídeo-microscopia intravital e de fluxometria microvascular (191-193). Além disso, já foi demonstrado em humanos que as alterações microvasculares cutâneas, tais como a vasodilatação dependente de endotélio e o recrutamento capilar alterados, estão relacionadas com o aumento do risco cardiovascular, avaliado através do risco de desenvolvimento de doença coronariana (194).

Já o tecido muscular esquelético foi investigado em virtude de sua importante participação na determinação da resistência vascular periférica e no metabolismo periférico. O uso do músculo grácil ocorreu pelo extenso uso do mesmo em diversos trabalhos descritos na literatura (195-197) a fim de determinar a densidade microcirculatória e em função da facilidade de acesso ao mesmo para a visualização sob o microscópio.

As alterações funcionais da microcirculação, como o recrutamento capilar diminuído e a rarefação capilar, em resultado da perfusão reduzida do tecido podem contribuir para o desenvolvimento da hipertensão e da RI (191, 198). Em um modelo genético de obesidade, ratos Zucker obesos, a RI muscular é acompanhada por respostas hemodinâmicas inadequadas à insulina, incluindo o recrutamento capilar reduzido (199). Na verdade, a insulina recruta capilares do músculo esquelético através de um mecanismo dependente de NO, e o aumento no recrutamento capilar pode contribuir para a utilização de glicose subsequente (200).

No músculo esquelético, em virtude da orientação dos capilares paralelos às fibras musculares, foi possível a realização de cortes histológicos em sentido transversal para a contagem dos capilares e das fibras musculares neste tecido. Assim, a relação

entre o número de capilares por fibra em um determinado campo microscópico foi tida como sendo a densidade capilar estrutural (ou anatômica) deste leito vascular. Este parâmetro foi utilizado ao invés do número de capilares totais em um campo microscópico, já que este último está sujeito a variações relacionadas ao tamanho das fibras musculares observadas no campo, ou seja, fibras musculares grandes podem levar a uma diminuição artificial no número total de capilares que, não necessariamente, corresponde ao que realmente está ocorrendo no tecido.

No coração (ventrículo esquerdo), em virtude da orientação anisotrópica deste tecido, os cortes transversais realizados no mesmo não foram capazes de reproduzir uma orientação definida de capilares e fibras musculares. Assim, estes cortes produziam padrões de imagens com capilares orientados transversalmente e longitudinalmente ao eixo de corte, não permitindo uma comparação em relação a uma análise morfológica quantitativa de capilares e fibras musculares. Optamos então por utilizar o método *orientator* que permite a obtenção de seções aleatórias uniformemente isotrópicas, ou seja, seções que apresentam as mesmas características em todas as direções, já descrito na literatura (201). A relação entre a densidade de volume de capilares e a densidade de volume de fibras musculares neste tecido foi tomada como sendo o parâmetro de densidade capilar estrutural no ventrículo esquerdo. Novamente, este parâmetro foi preferido em relação à densidade de volume de capilares isoladamente, já que é bem conhecida a existência de hipertrofia das fibras cardíacas no ventrículo esquerdo em hipertensos, o que poderia resultar em variações na densidade capilar estrutural não relacionadas ao tratamento farmacológico.

Através dos resultados obtidos pela análise histológica das amostras do músculo grácil e do VE foi possível demonstrar que a dieta HFD induziu uma rarefação microvascular estrutural no músculo esquelético e miocárdio dos animais, o que está de acordo com os nossos estudos anteriores que mostraram esta mesma alteração em ratos espontaneamente hipertensos (74, 159). Em contraste com a rarefação funcional, que representa o fechamento de capilares e arteríolas, a degeneração estrutural dos microvasos resulta da apoptose das células endoteliais, o que já foi demonstrado em vários modelos experimentais de hipertensão (202, 203). A rarefação microvascular estrutural pode ter consequências fisiológicas importantes porque contribui para a elevação da resistência periférica total e afeta negativamente o aporte de oxigênio, de glicose e de insulina para os tecidos, o que contribui ainda mais para o desenvolvimento

de RI e a intolerância à glicose (78), independentemente das elevações na pressão arterial (75).

Em nosso estudo, os animais alimentados com a dieta HFD desenvolveram um aumento significativo no diâmetro dos cardiomiócitos e na deposição de colágeno do VE. O remodelamento cardiovascular foi ainda confirmado por estudos anteriores em roedores (173). O tônus simpático aumentado, o que também foi identificado no nosso modelo experimental, contribui para o desenvolvimento de HVE concêntrica através de fatores hemodinâmicos, isto é, a pressão sanguínea elevada e o aumento da contractilidade cardíaca, em adição aos efeitos cardíacos hipertróficos diretos das catecolaminas (204).

Em resumo, foram caracterizadas as alterações funcionais e estruturais da microcirculação, bem como o remodelamento do VE, associados com componentes metabólicos e hemodinâmicos em um modelo de SM induzido por dieta. Tomados em conjunto, estes resultados se tornam relevantes no estudo da patologia humana e indicam que um aumento moderado na ingestão de sal associado a uma dieta rica em gordura pode levar não só a alterações cardiovasculares e metabólicas sistêmicas, mas também à rarefação microvascular e uma aceleração das lesões em órgãos-alvo.

ANTI-HIPERTENSIVOS DE AÇÃO CENTRAL E SEUS EFEITOS SOBRE A SM

Os resultados do presente trabalho demonstraram que o tratamento crônico com anti-hipertensivos de ação central reverte as alterações microcirculatórias neste modelo de SM baseado em uma dieta HFD, além de trazer benefícios metabólicos que parecem ser particulares ao tipo de fármaco utilizado. Esses resultados constituem a primeira demonstração dos efeitos da inibição simpática central sobre alterações microvasculares da SM. Além disso, vale destacar que este estudo propõe a utilização de um ligante exógeno seletivo para o sítio de ligação específico das imidazolíνας, uma molécula LNP que é composta por uma estrutura aminopirrolina, no tratamento da hiperatividade simpática presente neste modelo de SM.

No presente estudo, conforme esperado, foi visto que todas as drogas foram capazes de normalizar os níveis pressóricos dos animais obesos com SM quando comparados com o grupo controle (CON + VEI) que tiveram mantidos seus valores de pressão arterial ao fim do tratamento com veículo (água destilada) ao término das 4 semanas de tratamento. Este efeito foi, possivelmente, influenciado pela redução nos

níveis plasmáticos de noradrenalina e adrenalina plasmáticas, ainda que, de maneira não esperada, o grupo tratado com clonidina tenha apresentado uma redução não significativa de noradrenalina plasmática. De acordo com dados da literatura, a clonidina apresenta uma maior ação periférica em relação às outras drogas devido à inibição do influxo simpático ao coração através da ativação de receptores α_2 pré-sinápticos e I_1 -imidazolínicos responsáveis pela diminuição da liberação de noradrenalina nas fendas sinápticas (117, 205, 206). Contudo, um trabalho publicado em 1997 por Meana e cols. apontou também um efeito paradoxal da clonidina ao induzir a liberação de noradrenalina através de um mecanismo extra-cortical indireto. Esse estudo demonstrou que a modulação indireta dos níveis de noradrenalina por drogas imidazolínicas é principalmente devido a uma atividade funcional dos RI_1 (206).

Outro efeito similar apresentado pelos diferentes tipos de tratamento pode ser observado na quantidade de ração ingerida, que foi diminuída ao final do tratamento, indicando uma possível alteração do comportamento alimentar desses animais. No entanto, este efeito não refletiu na redução do peso corporal dos grupos tratados com clonidina ou LNP599, mesmo que haja certa tendência, todavia, um efeito significativo foi visto apenas no grupo tratado com rilmenidina, o qual também apresentou uma redução significativa na quantidade de gordura visceral e epididimal. Os animais tratados com LNP599 também apresentaram uma redução na quantidade de gordura visceral. Uma diminuição no ganho de peso já foi também descrito em diferentes modelos de SM tratados com moxonidina, anti-hipertensivo de ação central de 2ª geração (207-209). Porém, esta diminuição não poderia, por si só, explicar os efeitos de inibidores centrais simpáticos como a moxonidina.

Apesar da semelhança em alguns dos resultados citados anteriormente, em relação às alterações metabólicas presentes neste modelo de SM e hiperatividade simpática, apenas os animais tratados com rilmenidina e LNP599 mostraram uma melhora na intolerância à glicose apresentada pelos animais do grupo controle que receberam veículo ou clonidina, além de promoverem uma aparente diminuição da RI, mesmo que os valores apresentados não sejam estatisticamente significativos. Nossos resultados estão de acordo com estudos que investigaram os efeitos de drogas mistas de segunda geração que atuam sobre os receptores α_2 -adrenérgicos e imidazolínicos do tipo 1, como a rilmenidina e a moxonidina, na tolerância à glicose, na sensibilidade à insulina e no metabolismo de lipídeos de seres humanos e em diferentes modelos de

SM. Estes estudos concluíram, através da utilização de antagonistas, que a maioria dos efeitos metabólicos benéfico eram devidos à ação de fármacos sobre o RI_1 (207-214). Estes estudos fortalecem a hipótese de que estas drogas são eficazes na melhora da tolerância à glicose, e na dislipidemia.

O grupo tratado com clonidina não apresentou qualquer efeito benéfico sobre as alterações do metabolismo glicídico nestes animais hiperinsulinêmicos e resistentes à insulina, pelo contrário, a clonidina apresentou valores de glicemia de jejum maiores que o próprio grupo controle com SM. May e cols. confirmaram que o efeito hiperglicêmico depende tanto de mecanismos centrais como periféricos (215), sendo este último mediado por receptores α_2 -adrenérgicos pós-sinápticos localizados nas células β -pancreáticas via inibição da secreção de insulina (216).

Em um estudo do LNPCV, Fellmann e cols. mostraram que a inibição do SNS era acompanhada pelo aumento a concentração plasmática de adiponectina, e sugeriram que ela desempenharia um papel fundamental nos efeitos metabólicos da hiperatividade simpática (217). A adiponectina é um hormônio peptídeo de 244 aminoácidos (30 kDa) secretado principalmente pelos adipócitos que aumenta a sensibilidade à insulina e reduz a intolerância à glicose através da oxidação dos AGLs no músculo esquelético e diminuição na gliconeogênese devido a uma diminuição do nível de expressão da fosfoenolpiruvato carboxiquinase e glicose-6-fosfatase e um aumento da oxidação dos AGLs no fígado (218-220).

O perfil lipídico alterado do modelo de SM utilizado no presente estudo apresentou melhoras apenas após tratamento crônico com rilmenidina (diminuição do colesterol total e do LDL-c), indicando que os agonistas seletivos dos RI_1 não teriam um efeito particular sobre o metabolismo de lipídeos. Não existem estudos que demonstrem os efeitos de drogas anti-hipertensivas de segunda geração sobre o LDL-c e o HDL-c em modelos de SM. No entanto, estudos em seres humanos mostraram que a rilmenidina ou a moxonidina conduzem a um aumento no colesterol HDL plasmático (211, 221, 222), em contraponto a um estudo realizado em 1999 por Elisaf e cols. que não detectou qualquer influência da moxonidina no perfil lipídico de pacientes hipertensos (223). Ernsberger e cols. demonstraram que a injeção de moxonidina na veia porta de ratos obesos resulta em diminuição da produção e secreção de triglicerídeos (213). Ainda nesse mesmo contexto, através de ensaios de ligação

específica em preparações de membrana de hepatócitos de rato, foi possível mostrar a presença de um sítio de ligação I_1 em células do fígado (213). A diminuição nos níveis de lipídeos induzida por moxonidina pode ser relacionada, pelo menos em parte, a uma ação direta sobre o fígado, no entanto, nossos resultados não nos permitem extrapolar os mecanismos pelos quais os agonistas de segunda geração provocam uma diminuição nos níveis de lipídios plasmáticos, porém uma ação central adicional não pode ser descartada.

O tratamento com diferentes fármacos anti-hipertensivos promoveu modificações semelhantes na densidade microvascular dos animais com SM na pele e no músculo grácil. Foi visto que as drogas utilizadas aumentaram o número de capilares espontaneamente perfundidos em ambos os leitos. Esse efeito já foi demonstrado em ratos SHR tratados com anti-hipertensivos de ação central pelo nosso grupo em 2010 (74) e deve-se provavelmente à inibição simpática central e redução do tônus simpático para a periferia, resultando em vasodilatação ao nível de arteríolas e esfíncter pré-capilares e o consequente aumento no recrutamento capilar. Confirmando que este efeito periférico está ligado a modulação simpática central, outro estudo realizado em nosso laboratório demonstrou que a administração de rilmenidina ou clonidina diretamente no SNC promove dilatação da microcirculação mesentérica de SHR em doses que não induzem efeitos cardiovasculares quando administradas por via sistêmica (224). Apesar da semelhança dos resultados encontrados na densidade capilar funcional muscular e cutânea dos diferentes grupos de tratamento, o aumento da densidade capilar funcional cutânea apresentado por animais tratados com rilmenidina não foi significativo em relação ao grupo de animais controle com SM, ainda que uma possível tendência possa ser percebida. Além disso, mesmo a rilmenidina sendo uma droga da mesma classe farmacológica das imidazolininas, ainda cabem estudos para investigar uma possível influência intrínseca de sua estrutura molecular, tendo em vista esta ser a única oxazolina da classe estudada.

A análise histológica do músculo grácil e do VE, que permitiu constatar as alterações microcirculatórias estruturais do modelo de SM utilizado neste estudo, também evidenciou que a modulação do SNS com anti-hipertensivos de ação central é capaz de beneficiar esses mesmos parâmetros microvasculares através reversão da rarefação capilar estrutural em ambos os leitos vasculares. Essa reversão pode ser explicada pelo aumento do fluxo sanguíneo para o músculo esquelético, que antes se

encontrava reduzido devido ao fechamento crônico de capilares, estado característico da hiperatividade simpática presente nesses animais, estimularia o crescimento de novos vasos através do aumento do estresse de cisalhamento na parede do vaso devido à vasodilatação causada pelos fármacos, aumentando a rede de capilares para uma maior perfusão no músculo grácil, tecido adaptado a uma baixa perfusão (225, 226).

No presente estudo, comprovamos por análise histológica que a modulação do SNS é capaz de promover significativa diminuição no diâmetro dos cardiomiócitos, mesmo que o mesmo resultado não tenha sido visto sobre a deposição de colágeno. A literatura cita o efeito benéfico do tratamento com rilmenidina sobre a deposição de colágeno em ratos uni-nefrectomizados com hipertrofia do VE (227), ou após tratamento com a moxonidina, sobre o remodelamento vascular de SHR, onde ocorreu redução na deposição de colágeno e regressão na hipertrofia do VE (228). Além disso, um trabalho publicado por Stabile e cols. em 2011 confirmou que esses mesmos efeitos cardiovasculares adicionais são acompanhados pela “*upregulation*”, ou seja, aumento do número de receptores imidazolínicos cardíacos, sugerindo assim, uma ação periférica direta (229).

Importância dos receptores imidazolínicos na função adipocitária

Para melhor compreender os mecanismos envolvidos no melhoramento da SM nos animais tratados com os compostos de segunda e terceira geração e quaisquer efeitos periféricos do nosso ligante, investigou-se a presença de receptores de membrana I₁ em adipócitos de ratos WKY. Assim, demonstramos a presença dos receptores I₁ em adipócitos do tecido adiposo de ratos, através da alteração da curva de ligação ([¹²⁵I] PIC) pelos derivados pirrolínicos, neste caso o LNP599. Este resultado sugere que as drogas imidazolínicas e derivados pirrolínicos podem ter efeitos periféricos ligados ao tecido adiposo. Finalmente, estudamos os efeitos de imidazolinas e dos derivados pirrolínicos sobre a lipólise nos adipócitos. Este estudo sugere que o efeito antilipolítico desses ligantes envolve os receptores I₁.

Os ensaios de ligação específica realizados com [¹²⁵I] PIC, ligante de referência dos RI₁ em adipócitos, permitiram detectar uma ligação específica em membranas de adipócitos. A ligação nos adipócitos foi alterada na presença LNP599 sobre dois sítios de ligação, sendo um de alta afinidade (7,6 nM, 45% das ligações). Este resultado é

comparável com os obtidos nos adipócitos anteriormente (8,9 nM, 59%) e em células PC12 (6,0 nM, 41% das ligações) (137). Este ensaio de ligação específica nos permite sugerir a presença de RI₁ em adipócitos como já foi observado por Mory e colaboradores em 1995 (129).

A lipólise é uma das principais funções dos adipócitos. Esta função é modulada pelos níveis celulares de AMPc, que é um regulador de vias de transdução dos receptores α_2 -adrenérgicos e I₁-imidazolinicos (165). Desta maneira, para determinar o envolvimento dos RI₁ nesta função, testamos duas drogas distintas nos adipócitos de rato: o LNP599 e o UK14304. A utilização do UK14304 teve como objetivo, saber se o fato de agir sobre os dois tipos de receptores (α_2 -adrenérgicos e I₁-imidazolinicos) conduziria a um efeito adicional. O que foi de certa forma confirmada, já que o efeito do LNP599 não acompanhou a mesma redução da concentração de glicerol a partir da dose de 10^{-7} M. Embora os efeitos observados sejam baixos em intensidade, todas as moléculas tendem a reduzir a lipólise (10 a 20%). Estes resultados são preliminares e não são estatisticamente significativos. Por estas razões, a EC₅₀ não foi calculada. Deve notar-se que estes pequenos efeitos podem estar relacionados com a baixa intensidade dos efeitos observados sobre a adenilato-ciclase em ensaios de transdução celular com o AMPc (165).

Além disso, os receptores imidazolinicos do tipo I₁ e os receptores α_2 -adrenérgicos estão presentes na superfície dos adipócitos e apresentam, em ambos os casos, uma ligação negativa a adenilato-ciclase e, portanto, parecem estar envolvidos na regulação negativa da lipólise (165, 230, 231). Drogas que se ligam simultaneamente a ambos os receptores, tais como UK14304, presumivelmente tem um efeito adicional sobre a inibição da lipólise, como visto em nossos resultados.

Deve notar-se que alguns resultados obtidos no nosso laboratório, ainda não publicados, demonstram que os efeitos celulares dos ligantes seletivos dos RI₁ (LNP599) não parecem ser limitados ao efeito antilipolítico (232). Estes ligantes também agem de maneira dependente da dose na diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos e sobre a secreção de adiponectina em linhagens de adipócitos 3T3 (aumento da secreção e do conteúdo celular de adiponectina) (232). Os efeitos celulares observados com LNP599, lipólise, diferenciação celular e secreção de adiponectina podem ser potencialmente relacionados com os RI₁:

- A lipólise pode evidenciar a participação dos RI₁ através do acoplamento da adenilato ciclase (165, 231).
- A diferenciação celular poderia ser modulada por ligantes da proteína SET, uma proteína envolvida na regulação do ciclo celular e processos de diferenciação (233). A proteína SET tem uma estrutura alongada e não globular, com peso aparente em torno de 39 kDa, o que está muito próximo das observações feitas para as proteínas de 40 e 42 kD que se ligam ao [¹²⁵I] LNP906 (233, 234).
- Finalmente, a adiponectina é conhecida por ser modulada por AMPc e assim, pode estar relacionada com os RI₁ (235, 236).

Ressaltamos então, que os efeitos benéficos do LNP599 observados sobre a SM podem ser potencialmente tanto o resultado dos efeitos locais (direto nos adipócitos) em diferentes alvos (proteína SET e/ou RI₁), mas também, podem estar relacionados com efeitos sobre os receptores I₁ centrais.

Modelo de hiperatividade simpática farmacológica em camundongos ApoE^{-/-}

O presente estudo investigou o desenvolvimento da hiperatividade simpática em camundongos ApoE^{-/-} a fim de colaborar com um projeto iniciado em 2010, no LNPCV, cujo principal objetivo é avaliar a participação do SNS no desenvolvimento das placas de ateroma sob o contexto, ou não, da SM. Assim como a SM, a aterosclerose é uma doença multifatorial complexa, cujo desenvolvimento segue uma cascata de eventos intimamente intrincados. Esta doença apresenta fatores de risco semelhantes àqueles que envolvem a SM (obesidade, hipertensão arterial, hiperglicemia, dislipidemia, estado pró-inflamatório e pró-trombótico, além do estresse oxidativo). Na população, os indivíduos com quadro aterosclerótico que não apresentam SM são relativamente poucos, a maior parte da população tem um ou dois elementos da SM, em especial os descendentes de pacientes com SM (144). A etiologia da doença ainda não está claramente definida, mas sabe-se que a aterosclerose é uma doença inflamatória crônica das artérias de médio e grande calibre, caracterizada pelo acúmulo de lipídios no espaço subintimal, contidos em uma cápsula fibromuscular (237-239). Juntos, os lipídeos depositados e sua cápsula formam uma placa estenótica de maior ou menor importância na luz do vaso.

A apolipoproteína E (ApoE) é sintetizada principalmente pelo fígado, cérebro e também pelos monócitos e macrófagos nos vasos sanguíneos. Ela está envolvida no transporte de lipídeos no sangue para os tecidos de armazenamento periféricos e hepáticos. Ela participa da ligação dos resíduos de quilomícrons e VLDL nos seus receptores hepáticos (240) e, conseqüentemente, pode promover a liberação de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado onde ele é excretado na bile (241). A ApoE apresenta igualmente um papel anti-aterosclerótico não lipídico, via efeitos antioxidantes, anti-proliferativo (linfócitos) e anti-inflamatórios (242, 243).

A invalidação do gene ApoE para criar camundongos KO ApoE^{-/-} favorece o desenvolvimento de hiperlipidemia a VLDL e aterosclerose sob dieta normal (244). A concentração de colesterol total destes animais atinge 11 mM (vs 1,6-2,8 mM) (244, 245). Em oito semanas, os camundongos ApoE^{-/-} exibem adesão de monócitos endotelial, um dos primeiros eventos celulares na aterogênese. Entre 10 e 30 semanas, as lesões contêm células espumosas e uma cápsula fibrosa entre 25 e 45 semanas (246). Finalmente, os camundongos ApoE^{-/-} desenvolvem o espectro completo de lesões observadas na aterogênese humana (246). Não há nenhum dado conhecido sobre o estado da atividade nervosa simpática de camundongos ApoE^{-/-}. Provavelmente a atividade simpática desses animais sob uma dieta padrão é, dentro dos padrões estabelecidos atualmente, normal. E, inibindo a atividade de um sistema cujo funcionamento se encontra normal pode, por fim, ser ineficaz. Por isso, desenvolvemos um protocolo em que camundongos ApoE^{-/-} alimentados com uma dieta normal são submetidos a um tratamento crônico com um antidepressivo tricíclico capaz de incrementar a concentração sináptica de Nad no SNC através da inibição desse neurotransmissor pela membrana pré-sináptica, a desipramina (119).

Em camundongos ApoE^{-/-}, nosso estudo demonstrou que a desipramina induz sinais claros de ativação simpática, como o aumento dos níveis plasmáticos de catecolaminas e o aumento significativo da frequência cardíaca, enquanto que a PAS não é alterada. Entretanto, a desipramina pode provocar outros efeitos como dessensibilização da adenilato ciclase e inibição dos receptores β -adrenérgicos e serotoninérgicos. A hiperatividade simpática avaliada pelo aumento das catecolaminas não pode ser associada com o aumento da pressão arterial e frequência cardíaca. Mas em outros casos, um aumento ou diminuição da PAS pode ser entendido com um marcador da estimulação simpática ou inibição. No entanto, os nossos resultados

mostram que não existe uma correlação direta entre a pressão arterial e o aumento dos níveis de catecolaminas plasmáticas neste modelo de aterosclerose. A principal explicação está na complexidade dos mecanismos de regulação da pressão arterial (ver introdução) que se mostram, de certa forma, muito eficientes na correção dos valores pressóricos ao longo das 16 semanas de tratamento. Além disso, vale ressaltar que a desipramina é um fármaco de segurança conhecida e cujos efeitos colaterais não envolvem o aumento da pressão arterial em pacientes normotensos. Este fato se deve pela ativação dos mecanismos de retroalimentação negativa mediados pelos receptores α_2 -adrenérgicos pré-sinápticos que tendem a manter a homeostasia funcional (119). Este resultado é comumente encontrado na literatura, pelo menos em animais. Nenhum modelo de aterosclerose demonstrou um mecanismo causal entre a aterosclerose e a hipertensão (247).

Citamos como exemplo dois estudos sobre a relação pressão arterial /aterosclerose:

O NO é sintetizado a partir da L-arginina pelas enzimas NO sintases (incluindo as isoformas, NO sintase induzível e eNOS). O NO mantém o tônus vasodilatador vascular.

- Nos camundongos ApoE^{-/-}, Makaritis et al. mostraram que o tratamento com um inibidor não-seletivo de NO sintase, o L-NAME, leva ao aparecimento de hipertensão, mas não piora aterosclerose (248).

- Os camundongos duplo knockout (DKO) ApoE/eNOS desenvolvem hipertensão arterial e aterosclerose exacerbada em comparação ao ApoE. A normalização da pressão em camundongos DKO ApoE/eNOS não reduz os danos ateroscleróticos. Chen e colaboradores mostraram, assim, que a hipertensão não está envolvida neste modelo de aterosclerose (249).

Contudo, em seres humanos, estudos epidemiológicos mostram uma associação entre o risco coronariano e a gravidade da hipertensão. De fato, esta relação segue uma curva em "J" ou em "U". Quando a pressão arterial é normalizada, a incidência de infarto agudo do miocárdio diminui, mas abaixo de certo valor da pressão arterial diastólica (PAD <70-80 mmHg), a relação é invertida. As artérias coronárias são perfundidas principalmente durante a diástole, e uma redução excessiva da pressão

diastólica pode alterar significativamente a perfusão coronária e explicar o agravamento da cardiopatia isquêmica (250, 251).

A desipramina provoca alguns efeitos secundários mediados pelos receptores serotoninérgicos, e neste estudo a ativação simpática induzida farmacologicamente foi responsável pela alteração do comportamento alimentar, no sentido de inibir a fome (primeira etapa do ato alimentar) ou de estimular a saciedade (última etapa da alimentação). Efeito parecido foi visto em pacientes com bulimia em 1990, quando Mccann & Agras confirmaram a indicação do tratamento crônico com a desipramina em casos de distúrbios alimentares (252).

O envolvimento do SNS é mencionado com frequência em muitas patologias tais como câncer, doenças cardiovasculares ou, a própria, SM. Se a hipótese de uma hiperatividade basal em pacientes ainda necessita ser confirmada, o estresse psicossocial associado com o aumento da atividade nervosa simpática é uma realidade cotidiana para muitos indivíduos. Nesse sentido, nosso trabalho demonstra então, que a hiperatividade do SNS, através do excesso de catecolaminas, especialmente a noradrenalina, exacerba efeitos adrenérgicos na frequência cardíaca, sem interferir na pressão arterial, confirmando assim, a eficácia desta ferramenta farmacológica no estabelecimento de um modelo de aterosclerose com hiperatividade simpática. Desta maneira, para a continuação do presente estudo, torna-se necessário estudar os efeitos de inibição do SNS em modelos de hiperatividade simpática e aterosclerose. Nesse contexto, camundongos KO NET^{-/-} (knockout para o transportador de noradrenalina) submetidos à dieta aterogênica são um modelo de aterosclerose e hiperatividade simpática que o laboratório já dispõe. Esses camundongos serão tratados inicialmente com reserpina, inibidor simpático central, para, desta forma, completar os dados do presente trabalho, em especial o estado da atividade simpática, e a influência da dieta HFD sobre catecolaminas nesta linhagem de camundongos. Além disso, seria particularmente interessante gerar um DKO ApoE^{-/-} NET^{-/-} e comparar o grau de lesão aterosclerótica em camundongos ApoE^{-/-} NET^{+/+}.

6. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que:

- Ratos submetidos à dieta rica em lipídeos por 20 semanas apresentam alterações metabólicas e microcirculatórias, características da síndrome metabólica, acompanhadas do aumento da atividade simpática.
- A modulação do sistema nervoso simpático de ratos com síndrome metabólica, através da utilização de anti-hipertensivos de ação central, principalmente os fármacos de segunda e terceira geração, contribui para a melhora dos perfis glicídicos e lipídicos, além do restabelecimento dos parâmetros microcirculatórios e do remodelamento cardíaco.
- A regulação da função adipocitária sofre influência direta da ativação dos receptores imidazolínicos do tipo I₁ locais, que podem estar diretamente ligados aos efeitos benéficos do tratamento crônico com anti-hipertensivos de segunda e terceira geração.
- A desipramina, é capaz, por si só, de desenvolver uma hiperatividade do sistema nervoso simpático em camundongos ApoE^{-/-}.

Esse conjunto de dados sugere que, mesmo em modelo animal, distúrbios do sistema nervoso autônomo estão relacionados com o desenvolvimento e agravamento da síndrome metabólica. Além disso, podemos concluir que moduladores do sistema nervoso simpático proporcionam melhorias em diversos parâmetros metabólicos e microcirculatórios, tendo os receptores imidazolínicos como importante mediador desse efeito benéfico.

7. Trabalhos apresentados em congresso

- Nascimento AR, Lessa MA, Machado MV, Antunes B, Bonomo I, Bousquet P, Tibiriçá E. *Improvement of structural and functional microvascular abnormalities after central sympathetic nervous system modulation in a rat model of metabolic syndrome*. Joint Meeting 27th European Microcirculation Society and 7th European Vascular Biology Organisation, Birmingham, UK. 2013.
- Nascimento AR, Lessa MA, Machado MV, Antunes B, Bonomo I, Bousquet P, Tibiriçá E. *Improvement of microvascular alterations and arterial hypertension after central sympathetic nervous system modulation in a rat model of metabolic syndrome*. The 23rd European Meeting On Hypertension & Cardiovascular Protection, Cardiology Medical Congress, Italy, Milan. 2013.
- Nascimento A R, Doras C, Greney H, Niederhoffer N, Tibiriçá E, Bousquet P. *Pharmacological induced sympathetic overactivity in ApoE deficient mice: relationship between sympathetic hyperactivity, metabolic syndrome and atherosclerosis*. 44^o Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. Foz de Iguaçu, Paraná, 2012.
- Nascimento AR, de Jesus N, Machado MV, Gomes F, Bonomo I, Bousquet P, Tibiriçá E. *Metabolic disorders in a rat model of metabolic syndrome and hypertension can be reversed by centrally-acting antihypertensive drugs*. 7^{ème} Congrès de Physiologie de Pharmacologie et de Thérapeutique. Dijon, 2012.
- **(Prêmio Pôster Nikon)** Nascimento AR, Machado M, Jotha P, de Jesus N, Gomes F, Lessa MA, Bonomo IT, Bousquet P, Tibiriçá E. *Structural and functional microvascular abnormalities in a rat model of metabolic syndrome and hypertension can be reversed by centrally-acting antihypertensive drugs*. Joint Meeting European Society of Microcirculation (ESM) and German Society of Microcirculation and Vascular Biology (GfMVB). Munich, 2011.
- Machado M, Nascimento AR, Jotha P, de Jesus N, Gomes F, Lessa MA, Bonomo IT, Bousquet P, Tibiriçá E. *Microvascular rarefaction in the skeletal muscle of rats under long-term high-fat diet*. 9th World Congress for Microcirculation. Paris, 2010.

8. Referências

1. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. World Health Organ Tech Rep Ser. 2003;916:i-viii, 1-149, backcover.
2. Ford ES, Li C, Zhao G. Prevalence and correlates of metabolic syndrome based on a harmonious definition among adults in the US. *J Diabetes*. 2010 Sep;2(3):180-93.
3. Dunstan DW, Zimmet PZ, Welborn TA, De Courten MP, Cameron AJ, Sicree RA, et al. The rising prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance: the Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study. *Diabetes Care*. 2002 May;25(5):829-34.
4. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2001 Apr;24(4):683-9.
5. Daniels SR, Arnett DK, Eckel RH, Gidding SS, Hayman LL, Kumanyika S, et al. Overweight in children and adolescents: pathophysiology, consequences, prevention, and treatment. *Circulation*. 2005 Apr 19;111(15):1999-2012.
6. Lottenberg SA, Glezer A, Turatti LA. Metabolic syndrome: identifying the risk factors. *J Pediatr (Rio J)*. 2007 Nov;83(5 Suppl):S204-8.
7. Rodrigues AN, Perez AJ, Pires JG, Carletti L, Araujo MT, Moyses MR, et al. Cardiovascular risk factors, their associations and presence of metabolic syndrome in adolescents. *J Pediatr (Rio J)*. 2009 Jan-Feb;85(1):55-60.
8. Haffner SM, Valdez RA, Hazuda HP, Mitchell BD, Morales PA, Stern MP. Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes*. 1992 Jun;41(6):715-22.
9. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988 Dec;37(12):1595-607.
10. Batsis JA, Nieto-Martinez RE, Lopez-Jimenez F. Metabolic syndrome: from global epidemiology to individualized medicine. *Clin Pharmacol Ther*. 2007 Nov;82(5):509-24.
11. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005 Apr 16-22;365(9468):1415-28.
12. Fodor GJ. Le syndrome métabolique. Bulletin - Association canadienne de réadaptation cardiaque. 2006;14(2):1-4.

13. Kaplan NM. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med*. 1989 Jul;149(7):1514-20.
14. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA*. 2002 Dec 4;288(21):2709-16.
15. Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal. Joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia*. 2005 Sep;48(9):1684-99.
16. Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Gomez-Perez FJ, Mehta R, Franco A, Olaiz G, et al. The metabolic syndrome: a concept hard to define. *Arch Med Res*. 2005 May-Jun;36(3):223-31.
17. WHO WHO. Definition, Diagnosis, and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications.
Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of a WHO consultation. World Health Department of Noncommunicable Disease Surveillance. 1999:1-59.
18. National Heart LaBI. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001(285):2486-97.
19. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*. 2005 Sep 24-30;366(9491):1059-62.
20. Saltiel AR. Series introduction: the molecular and physiological basis of insulin resistance: emerging implications for metabolic and cardiovascular diseases. *J Clin Invest*. 2000 Jul;106(2):163-4.
21. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 1996 Feb 2;271(5249):665-8.
22. Arner P. Not all fat is alike. *Lancet*. 1998 May 2;351(9112):1301-2.
23. Boden G, Chen X, Ruiz J, White JV, Rossetti L. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest*. 1994 Jun;93(6):2438-46.
24. Lam TK, van de Werve G, Giacca A. Free fatty acids increase basal hepatic glucose production and induce hepatic insulin resistance at different sites. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 Feb;284(2):E281-90.

25. Krebs M, Krssak M, Nowotny P, Weghuber D, Gruber S, Mlynarik V, et al. Free fatty acids inhibit the glucose-stimulated increase of intramuscular glucose-6-phosphate concentration in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 May;86(5):2153-60.
26. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, et al. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C θ and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes*. 1999 Jun;48(6):1270-4.
27. Ellmerer M, Kim SP, Hamilton-Wessler M, Huecking K, Kirkman E, Bergman RN. Physiological hyperinsulinemia in dogs augments access of macromolecules to insulin-sensitive tissues. *Diabetes*. 2004 Nov;53(11):2741-7.
28. Ellmerer M, Hamilton-Wessler M, Kim SP, Huecking K, Kirkman E, Chiu J, et al. Reduced access to insulin-sensitive tissues in dogs with obesity secondary to increased fat intake. *Diabetes*. 2006 Jun;55(6):1769-75.
29. Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, et al. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest*. 1999 Jan;103(2):253-9.
30. Steinberg HO, Tarshoby M, Monestel R, Hook G, Cronin J, Johnson A, et al. Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation. *J Clin Invest*. 1997 Sep 1;100(5):1230-9.
31. Pickup JC, Crook MA. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia*. 1998 Oct;41(10):1241-8.
32. Yudkin JS. Adipose tissue, insulin action and vascular disease: inflammatory signals. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003 Dec;27 Suppl 3:S25-8.
33. Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1998 Dec;22(12):1145-58.
34. Giorgino F, Laviola L, Eriksson JW. Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from in vivo and in vitro studies. *Acta Physiol Scand*. 2005 Jan;183(1):13-30.
35. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest*. 1995 May;95(5):2111-9.
36. Barroso SG, Abreu VG, Francischetti EA. [The adipose tissue in the genesis of hypertension and atherosclerotic cardiovascular disease. An emerging concept]. *Arq Bras Cardiol*. 2002 Jun;78(6):618-30.

37. Desouza C, Gilling L, Fonseca V. Management of the insulin resistance syndrome. *Curr Diab Rep*. 2001 Oct;1(2):140-7.
38. Mozaffarian D, Pischon T, Hankinson SE, Rifai N, Joshipura K, Willett WC, et al. Dietary intake of trans fatty acids and systemic inflammation in women. *Am J Clin Nutr*. 2004 Apr;79(4):606-12.
39. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(12):1796-808.
40. Tsigos C, Kyrou I, Chala E, Tsapogas P, Stavridis JC, Raptis SA, et al. Circulating tumor necrosis factor alpha concentrations are higher in abdominal versus peripheral obesity. *Metabolism*. 1999 Oct;48(10):1332-5.
41. Hermsdorff HH, Monteiro JB. [Visceral, subcutaneous or intramuscular fat: where is the problem?]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004 Dec;48(6):803-11.
42. Poli G, Schaur RJ, Siems WG, Leonarduzzi G. 4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Rev*. 2008 Jul;28(4):569-631.
43. Santos CX, Tanaka LY, Wosniak J, Laurindo FR. Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Oct;11(10):2409-27.
44. Aldini G, Dalle-Donne I, Facino RM, Milzani A, Carini M. Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls. *Med Res Rev*. 2007 Nov;27(6):817-68.
45. Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol*. 2004 Oct;122(4):339-52.
46. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007 Jan;87(1):315-424.
47. Ferrannini E. Insulin resistance, iron, and the liver. *Lancet*. 2000 Jun 24;355(9222):2181-2.
48. Jehn M, Clark JM, Guallar E. Serum ferritin and risk of the metabolic syndrome in U.S. adults. *Diabetes Care*. 2004 Oct;27(10):2422-8.
49. Chi Q, Wang T, Huang K. Effect of insulin nitration by peroxynitrite on its biological activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 May 13;330(3):791-6.
50. Sobrevia L, Mann GE. Dysfunction of the endothelial nitric oxide signalling pathway in diabetes and hyperglycaemia. *Exp Physiol*. 1997 May;82(3):423-52.

51. Fagan TC, Deedwania PC. The cardiovascular dysmetabolic syndrome. *Am J Med.* 1998 Jul 6;105(1A):77S-82S.
52. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000 Mar 17;86(5):494-501.
53. Shinozaki K, Nishio Y, Okamura T, Yoshida Y, Maegawa H, Kojima H, et al. Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in the aortas of insulin-resistant rats. *Circ Res.* 2000 Sep 29;87(7):566-73.
54. Bahia L, de Aguiar LG, Villela NR, Bottino D, Bouskela E. [The endothelium in the metabolic syndrome]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006 Apr;50(2):291-303.
55. Gomes MB, Affonso FS, Cailleaux S, Almeida AL, Pinto LF, Tibirica E. Glucose levels observed in daily clinical practice induce endothelial dysfunction in the rabbit macro- and microcirculation. *Fundam Clin Pharmacol.* 2004 Jun;18(3):339-46.
56. Hong HJ, Hsiao G, Cheng TH, Yen MH. Supplementation with tetrahydrobiopterin suppresses the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2001 Nov;38(5):1044-8.
57. Kagota S, Yamaguchi Y, Tanaka N, Kubota Y, Kobayashi K, Nejime N, et al. Disturbances in nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate system in SHR/NDmcr-cp rats, a model of metabolic syndrome. *Life Sci.* 2006 Feb 9;78(11):1187-96.
58. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000 Jul;106(2):165-9.
59. Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, et al. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest.* 2000 Feb;105(3):311-20.
60. Pirart J. [Diabetes mellitus and its degenerative complications: a prospective study of 4,400 patients observed between 1947 and 1973 (3rd and last part) (author's transl)]. *Diabete Metab.* 1977 Dec;3(4):245-56.
61. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet.* 1998 Sep 12;352(9131):837-53.
62. Nathan DM. Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993 Jun 10;328(23):1676-85.

63. GUYTON AC, HALL, J.E, editor. Tratado De Fisiologia Médica. RJ: Guanabara Koogan; 2002.
64. Berne RM, Levy MN, Koeppen BM. Fisiologia. Rio de Janeiro: ELSEVIER; 2004.
65. Guyton AC, Hall JE, Lohmeier TE, Jackson TE, Kastner PR. Blood pressure regulation: basic concepts. Fed Proc. 1981 Jun;40(8):2252-6.
66. Schiffrin EL. Reactivity of small blood vessels in hypertension: relation with structural changes. State of the art lecture. Hypertension. 1992 Feb;19(2 Suppl):II1-9.
67. Mulvany MJ. Resistance vessel structure and the pathogenesis of hypertension. J Hypertens Suppl. 1993 Dec;11(5):S7-12.
68. Bohlen HG. Localization of vascular resistance changes during hypertension. Hypertension. 1986 Mar;8(3):181-3.
69. Iriuchijima J, Mizogami S, Sokabe H. Sympathetic nervous activity in renal and DOC hypertensive rats. Jpn Heart J. 1975 Jan;16(1):36-43.
70. Judy WV, Watanabe AM, Henry DP, Besch HR, Jr., Murphy WR, Hockel GM. Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. Circ Res. 1976 Jun;38(6 Suppl 2):21-9.
71. Serne EH, Gans RO, ter Maaten JC, ter Wee PM, Donker AJ, Stehouwer CD. Capillary recruitment is impaired in essential hypertension and relates to insulin's metabolic and vascular actions. Cardiovasc Res. 2001 Jan;49(1):161-8.
72. Feldstein C, Julius S. The complex interaction between overweight, hypertension, and sympathetic overactivity. J Am Soc Hypertens. 2009 Nov-Dec;3(6):353-65.
73. Folkow B. Physiological aspects of primary hypertension. Physiol Rev. 1982 Apr;62(2):347-504.
74. Nascimento AR, Lessa MA, Sabino B, Bousquet P, Tibirica E. Microvascular effects of centrally acting antihypertensive drugs in spontaneously hypertensive rats. J Cardiovasc Pharmacol. 2010 Mar;55(3):240-7.
75. Frisbee JC. Hypertension-independent microvascular rarefaction in the obese Zucker rat model of the metabolic syndrome. Microcirculation. 2005 Jul-Aug;12(5):383-92.
76. de Jongh RT, Serne EH, RG IJ, de Vries G, Stehouwer CD. Impaired microvascular function in obesity: implications for obesity-associated microangiopathy, hypertension, and insulin resistance. Circulation. 2004 Jun 1;109(21):2529-35.

77. Clerk LH, Vincent MA, Jahn LA, Liu Z, Lindner JR, Barrett EJ. Obesity blunts insulin-mediated microvascular recruitment in human forearm muscle. *Diabetes*. 2006 May;55(5):1436-42.
78. Frisbee JC. Obesity, insulin resistance, and microvessel density. *Microcirculation*. 2007 Jun-Jul;14(4-5):289-98.
79. Kingwell BA, Formosa M, Muhlmann M, Bradley SJ, McConell GK. Type 2 diabetic individuals have impaired leg blood flow responses to exercise: role of endothelium-dependent vasodilation. *Diabetes Care*. 2003 Mar;26(3):899-904.
80. Bitar MS, Wahid S, Mustafa S, Al-Saleh E, Dhaunsi GS, Al-Mulla F. Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes. *Eur J Pharmacol*. 2005 Mar 21;511(1):53-64.
81. Gudbjornsdottir S, Sjostrand M, Strindberg L, Lonnroth P. Decreased muscle capillary permeability surface area in type 2 diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Feb;90(2):1078-82.
82. Marin P, Andersson B, Krotkiewski M, Bjorntorp P. Muscle fiber composition and capillary density in women and men with NIDDM. *Diabetes Care*. 1994 May;17(5):382-6.
83. Chung TW, Liu AG, Yu JH. Increased red cell rigidity might affect retinal capillary blood flow velocity and oxygen transport efficiency in type II diabetes. *Diabetes Res*. 1993;23(2):75-82.
84. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*. 2006 Aug 8;114(6):597-605.
85. Wiernsperger N, Nivoit P, De Aguiar LG, Bouskela E. Microcirculation and the metabolic syndrome. *Microcirculation*. 2007 Jun-Jul;14(4-5):403-38.
86. Dusserre E, Moulin P, Vidal H. Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Jan 3;1500(1):88-96.
87. Van Harmelen V, Ariapart P, Hoffstedt J, Lundkvist I, Bringman S, Arner P. Increased adipose angiotensinogen gene expression in human obesity. *Obes Res*. 2000 Jul;8(4):337-41.
88. Massiera F, Bloch-Faure M, Ceiler D, Murakami K, Fukamizu A, Gasc JM, et al. Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB J*. 2001 Dec;15(14):2727-9.

89. Folli F, Saad MJ, Velloso L, Hansen H, Carandente O, Feener EP, et al. Crosstalk between insulin and angiotensin II signalling systems. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1999;107(2):133-9.
90. Katovich MJ, Pachori A. Effects of inhibition of the renin-angiotensin system on the cardiovascular actions of insulin. *Diabetes Obes Metab*. 2000 Jan;2(1):3-14.
91. Hall JE. Pathophysiology of obesity hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2000 Apr;2(2):139-47.
92. Piatti PM, Monti LD, Galli L, Fragasso G, Valsecchi G, Conti M, et al. Relationship between endothelin-1 concentration and metabolic alterations typical of the insulin resistance syndrome. *Metabolism*. 2000 Jun;49(6):748-52.
93. Verma S, Bhanot S, McNeill JH. Effect of chronic endothelin blockade in hyperinsulinemic hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1995 Dec;269(6 Pt 2):H2017-21.
94. Rocchini AP, Mao HZ, Babu K, Marker P, Rocchini AJ. Clonidine prevents insulin resistance and hypertension in obese dogs. *Hypertension*. 1999 Jan;33(1 Pt 2):548-53.
95. Landsberg L. Role of the sympathetic adrenal system in the pathogenesis of the insulin resistance syndrome. *Ann N Y Acad Sci*. 1999 Nov 18;892:84-90.
96. Carvalheira JB, Torsoni MA, Ueno M, Amaral ME, Araujo EP, Velloso LA, et al. Cross-talk between the insulin and leptin signaling systems in rat hypothalamus. *Obes Res*. 2005 Jan;13(1):48-57.
97. Hall JE, Hildebrandt DA, Kuo J. Obesity hypertension: role of leptin and sympathetic nervous system. *Am J Hypertens*. 2001 Jun;14(6 Pt 2):103S-15S.
98. Riccardi G, Rivellese AA. Dietary treatment of the metabolic syndrome--the optimal diet. *Br J Nutr*. 2000 Mar;83 Suppl 1:S143-8.
99. Reaven GM. Do high carbohydrate diets prevent the development or attenuate the manifestations (or both) of syndrome X? A viewpoint strongly against. *Curr Opin Lipidol*. 1997 Feb;8(1):23-7.
100. Sartorio A, Agosti F, Resnik M, Lafortuna CL. Effects of a 3-week integrated body weight reduction program on leptin levels and body composition in severe obese subjects. *J Endocrinol Invest*. 2003 Mar;26(3):250-6.
101. Slentz CA, Houmard JA, Kraus WE. Exercise, abdominal obesity, skeletal muscle, and metabolic risk: evidence for a dose response. *Obesity (Silver Spring)*. 2009 Dec;17 Suppl 3:S27-33.

102. Irwin ML, Yasui Y, Ulrich CM, Bowen D, Rudolph RE, Schwartz RS, et al. Effect of exercise on total and intra-abdominal body fat in postmenopausal women: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2003 Jan 15;289(3):323-30.
103. Frisbee JC, Samora JB, Peterson J, Bryner R. Exercise training blunts microvascular rarefaction in the metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Nov;291(5):H2483-92.
104. Kang HS, Gutin B, Barbeau P, Owens S, Lemmon CR, Allison J, et al. Physical training improves insulin resistance syndrome markers in obese adolescents. *Med Sci Sports Exerc*. 2002 Dec;34(12):1920-7.
105. Redon J, Cifkova R, Laurent S, Nilsson P, Narkiewicz K, Erdine S, et al. The metabolic syndrome in hypertension: European society of hypertension position statement. *J Hypertens*. 2008 Oct;26(10):1891-900.
106. Granberry MC, Fonseca VA. Insulin resistance syndrome: options for treatment. *South Med J*. 1999 Jan;92(1):2-15.
107. SBC SBdC. I DIRETRIZ BRASILEIRA DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA SÍNDROME METABÓLICA. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2005;8.
108. SBC SBdC. III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da SBC. . *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2001;77(III):1-48.
109. Davies A, BLAKLEY AG, KIDD C, editors. *Fisiologia Humana*. SP: Artmed; 2002.
110. Aicher SA, Milner TA, Pickel VM, Reis DJ. Anatomical substrates for baroreflex sympathoinhibition in the rat. *Brain Res Bull*. 2000 Jan 15;51(2):107-10.
111. Kumada M, Terui N, Kuwaki T. Arterial baroreceptor reflex: its central and peripheral neural mechanisms. *Prog Neurobiol*. 1990;35(5):331-61.
112. Sun MK. Central neural organization and control of sympathetic nervous system in mammals. *Prog Neurobiol*. 1995 Oct;47(3):157-233.
113. Dampney RA, Coleman MJ, Fontes MA, Hirooka Y, Horiuchi J, Li YW, et al. Central mechanisms underlying short- and long-term regulation of the cardiovascular system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002 Apr;29(4):261-8.
114. Landry Y, Gies J-P, editors. *Pharmacologie: des cibles vers l'indication thérapeutique*. Paris: Dunod; 2009.

115. Sun MK. Pharmacology of reticulospinal vasomotor neurons in cardiovascular regulation. *Pharmacol Rev.* 1996 Dec;48(4):465-94.
116. Tibirica E, Feldman J, Mermet C, Gonon F, Bousquet P. An imidazoline-specific mechanism for the hypotensive effect of clonidine: a study with yohimbine and idazoxan. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991 Feb;256(2):606-13.
117. Szabo B. Imidazoline antihypertensive drugs: a critical review on their mechanism of action. *Pharmacol Ther.* 2002 Jan;93(1):1-35.
118. Isaac L. Clonidine in the central nervous system: site and mechanism of hypotensive action. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1980;2 Suppl 1:S5-19.
119. GOODMAN LS, GILMAN A, editors. *As bases farmacológicas da terapêutica.* PA: MAC GRAW HILL; 2005.
120. Bousquet P, Feldman J, Schwartz J. Central cardiovascular effects of alpha adrenergic drugs: differences between catecholamines and imidazolines. *J Pharmacol Exp Ther.* 1984 Jul;230(1):232-6.
121. Tibirica E, Feldman J, Mermet C, Monassier L, Gonon F, Bousquet P. Selectivity of rilmenidine for the nucleus reticularis lateralis, a ventrolateral medullary structure containing imidazoline-preferring receptors. *Eur J Pharmacol.* 1991 Dec 17;209(3):213-21.
122. Bousquet P. Imidazoline receptors. *Neurochem Int.* 1997 Jan;30(1):3-7.
123. Bricca G, Dontenwill M, Molines A, Feldman J, Tibirica E, Belcourt A, et al. Rilmenidine selectivity for imidazoline receptors in human brain. *Eur J Pharmacol.* 1989 Apr 25;163(2-3):373-7.
124. Bousquet P, Grenay H, Bennai F, Feldman J, Stutzmann J, Belcourt A, et al. Imidazoline receptors and cardiovascular regulations. A statement. *Ann N Y Acad Sci.* 1995 Jul 12;763:526-30.
125. Reis DJ, Li G, Regunathan S. Endogenous ligands of imidazoline receptors: classic and immunoreactive clonidine-displacing substance and agmatine. *Ann N Y Acad Sci.* 1995 Jul 12;763:295-313.
126. Coupry I, Limon I, Tesson F, Lachaud V, Gargalidis-Moudanos C, Parini A. [Imidazoline-guanidine site: a subtype of imidazoline receptors]. *Thérapie.* 1992 Nov;47(6):519-24.
127. Morgan NG, Chan SL. Imidazoline binding sites in the endocrine pancreas: can they fulfil their potential as targets for the development of new insulin secretagogues? *Curr Pharm Des.* 2001 Sep;7(14):1413-31.

128. Bousquet P, Feldman J, Tibirica E, Bricca G, Greney H, Dontenwill M, et al. Imidazoline receptors. A new concept in central regulation of the arterial blood pressure. *Am J Hypertens*. 1992 Apr;5(4 Pt 2):47S-50S.
129. Mory G, Tesson F, Combes-George M, Nechad M, Parini A. Evidence for a role for imidazoline I1 binding site in rat brown adipocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 1995 Jul 12;763:398-400.
130. Separovic D, Kester M, Ernsberger P. Coupling of I1-imidazoline receptors to diacylglyceride accumulation in PC12 rat pheochromocytoma cells. *Mol Pharmacol*. 1996 Apr;49(4):668-75.
131. Ernsberger P, Damon TH, Graff LM, Schafer SG, Christen MO. Moxonidine, a centrally acting antihypertensive agent, is a selective ligand for I1-imidazoline sites. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993 Jan;264(1):172-82.
132. Rupp H, Jacob R. Excess catecholamines and the metabolic syndrome: should central imidazoline receptors be a therapeutic target? *Med Hypotheses*. 1995 Mar;44(3):217-25.
133. Ernsberger P, Graves ME, Graff LM, Zakieh N, Nguyen P, Collins LA, et al. I1-imidazoline receptors. Definition, characterization, distribution, and transmembrane signaling. *Ann N Y Acad Sci*. 1995 Jul 12;763:22-42.
134. Schann S, Bruban V, Pompermayer K, Feldman J, Pfeiffer B, Renard P, et al. Synthesis and biological evaluation of pyrrolinic isosteres of rilmenidine. Discovery of cis/trans-dicyclopropylmethyl-(4,5-dimethyl-4,5-dihydro-3H-pyrrol-2-yl)-amine (LNP 509), an I1 imidazoline receptor selective ligand with hypotensive activity. *J Med Chem*. 2001 May 10;44(10):1588-93.
135. Bruban V, Estado V, Schann S, Ehrhardt JD, Monassier L, Renard P, et al. Evidence for synergy between alpha(2)-adrenergic and nonadrenergic mechanisms in central blood pressure regulation. *Circulation*. 2002 Mar 5;105(9):1116-21.
136. Greney H, Urosevic D, Schann S, Dupuy L, Bruban V, Ehrhardt JD, et al. [125I]2-(2-chloro-4-iodo-phenylamino)-5-methyl-pyrroline (LNP 911), a high-affinity radioligand selective for I1 imidazoline receptors. *Mol Pharmacol*. 2002 Jul;62(1):181-91.
137. Urosevic D, Schann S, Ehrhardt JD, Bousquet P, Greney H. LNP 906, the first high-affinity photoaffinity ligand selective for I1 imidazoline receptors. *Br J Pharmacol*. 2004 Jun;142(3):609-17.

138. Carroll JF, Huang M, Hester RL, Cockrell K, Mizelle HL. Hemodynamic alterations in hypertensive obese rabbits. *Hypertension*. 1995 Sep;26(3):465-70.
139. Young JB, Landsberg L. Suppression of sympathetic nervous system during fasting. *Science*. 1977 Jun 24;196(4297):1473-5.
140. Young JB, Landsberg L. Stimulation of the sympathetic nervous system during sucrose feeding. *Nature*. 1977 Oct 13;269(5629):615-7.
141. Schwartz JH, Young JB, Landsberg L. Effect of dietary fat on sympathetic nervous system activity in the rat. *J Clin Invest*. 1983 Jul;72(1):361-70.
142. Kaufman LN, Young JB, Landsberg L. Effect of protein on sympathetic nervous system activity in the rat. Evidence for nutrient-specific responses. *J Clin Invest*. 1986 Feb;77(2):551-8.
143. Mark AL, Correia M, Morgan DA, Shaffer RA, Haynes WG. State-of-the-art-lecture: Obesity-induced hypertension: new concepts from the emerging biology of obesity. *Hypertension*. 1999 Jan;33(1 Pt 2):537-41.
144. Mancia G, Bousquet P, Elghozi JL, Esler M, Grassi G, Julius S, et al. The sympathetic nervous system and the metabolic syndrome. *J Hypertens*. 2007 May;25(5):909-20.
145. Landsberg L. Hyperinsulinemia: possible role in obesity-induced hypertension. *Hypertension*. 1992 Jan;19(1 Suppl):I61-6.
146. Tuck ML. Obesity, the sympathetic nervous system, and essential hypertension. *Hypertension*. 1992 Jan;19(1 Suppl):I67-77.
147. Mancia G, Bombelli M, Corrao G, Facchetti R, Madotto F, Giannattasio C, et al. Metabolic syndrome in the Pressioni Arteriose Monitorate E Loro Associazioni (PAMELA) study: daily life blood pressure, cardiac damage, and prognosis. *Hypertension*. 2007 Jan;49(1):40-7.
148. Greenland P, Daviglus ML, Dyer AR, Liu K, Huang CF, Goldberger JJ, et al. Resting heart rate is a risk factor for cardiovascular and noncardiovascular mortality: the Chicago Heart Association Detection Project in Industry. *Am J Epidemiol*. 1999 May 1;149(9):853-62.
149. Grassi G, Esler M. How to assess sympathetic activity in humans. *J Hypertens*. 1999 Jun;17(6):719-34.
150. Grassi G, Dell'Oro R, Quarti-Trevano F, Scopelliti F, Seravalle G, Paleari F, et al. Neuroadrenergic and reflex abnormalities in patients with metabolic syndrome. *Diabetologia*. 2005 Jul;48(7):1359-65.

151. HABIB. S, VAN DE BORNE. P, MOKNI. W, SAULEAU. E, FRICK. V, SIMON. A, et al. Sympathetic overactivity as an early manifestation of metabolic syndrome. Artigo em preparação.
152. Grassi G, Dell'Oro R, Facchini A, Quarti Trevano F, Bolla GB, Mancia G. Effect of central and peripheral body fat distribution on sympathetic and baroreflex function in obese normotensives. *J Hypertens*. 2004 Dec;22(12):2363-9.
153. Grassi G, Seravalle G, Dell'Oro R, Turri C, Bolla GB, Mancia G. Adrenergic and reflex abnormalities in obesity-related hypertension. *Hypertension*. 2000 Oct;36(4):538-42.
154. Mather KJ, Lteif A, Steinberg HO, Baron AD. Interactions between endothelin and nitric oxide in the regulation of vascular tone in obesity and diabetes. *Diabetes*. 2004 Aug;53(8):2060-6.
155. Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest*. 1996 Jun 1;97(11):2601-10.
156. Watanabe T, Nomura M, Nakayasu K, Kawano T, Ito S, Nakaya Y. Relationships between thermic effect of food, insulin resistance and autonomic nervous activity. *J Med Invest*. 2006 Feb;53(1-2):153-8.
157. Nascimento AR, Machado M, de Jesus N, Gomes F, Lessa MA, Bonomo IT, et al. Structural and functional microvascular alterations in a rat model of metabolic syndrome induced by a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)*. 2013 Mar 20.
158. Mikus CR, Rector RS, Arce-Esquivel AA, Libla JL, Booth FW, Ibdah JA, et al. Daily physical activity enhances reactivity to insulin in skeletal muscle arterioles of hyperphagic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *J Appl Physiol*. 2010 Oct;109(4):1203-10.
159. Sabino B, Lessa MA, Nascimento AR, Rodrigues CA, Henriques M, Garzoni LR, et al. Effects of antihypertensive drugs on capillary rarefaction in spontaneously hypertensive rats: intravital microscopy and histologic analysis. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008 Apr;51(4):402-9.
160. Henrich HA, Romen W, Heimgartner W, Hartung E, Baumer F. Capillary rarefaction characteristic of the skeletal muscle of hypertensive patients. *Klin Wochenschr*. 1988 Jan 15;66(2):54-60.

161. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972 Jun;18(6):499-502.
162. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985 Jul;28(7):412-9.
163. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979 Jul;11(4):447-55.
164. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.
165. Greney H, Ronde P, Magnier C, Maranca F, Rascente C, Quaglia W, et al. Coupling of I(1) imidazoline receptors to the cAMP pathway: studies with a highly selective ligand, benazoline. *Mol Pharmacol*. 2000 Jun;57(6):1142-51.
166. Kou YR, Ernsberger P, Cragg PA, Cherniack NS, Prabhakar NR. Role of alpha 2-adrenergic receptors in the carotid body response to isocapnic hypoxia. *Respir Physiol*. 1991 Mar;83(3):353-64.
167. Young GS, Kirkland JB. Rat models of caloric intake and activity: relationships to animal physiology and human health. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2007 Apr;32(2):161-76.
168. Masek J, Fabry P. High-fat diet and the development of obesity in albino rats. *Experientia*. 1959 Nov 15;15:444-5.
169. Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Scholmerich J, et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol*. 2006 Jun;36(3):485-501.
170. Carr DB, Utzschneider KM, Hull RL, Kodama K, Retzlaff BM, Brunzell JD, et al. Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2004 Aug;53(8):2087-94.
171. Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY, et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2007 Jul 3;116(1):39-48.

172. Bonomo IT, Lisboa PC, Pereira AR, Passos MC, de Moura EG. Prolactin inhibition in dams during lactation programs for overweight and leptin resistance in adult offspring. *J Endocrinol*. 2007 Feb;192(2):339-44.
173. Ouwens DM, Boer C, Fodor M, de Galan P, Heine RJ, Maassen JA, et al. Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. *Diabetologia*. 2005 Jun;48(6):1229-37.
174. Yaqoob P, Sherrington EJ, Jeffery NM, Sanderson P, Harvey DJ, Newsholme EA, et al. Comparison of the effects of a range of dietary lipids upon serum and tissue lipid composition in the rat. *Int J Biochem Cell Biol*. 1995 Mar;27(3):297-310.
175. Goodfriend TL, Ball DL, Weinberger MH, Moore TJ, Weder AB, Egan BM. Salt loads raise plasma fatty acids and lower insulin. *Hypertension*. 1991 Jun;17(6 Pt 2):958-64.
176. Ogihara T, Asano T, Ando K, Sakoda H, Anai M, Shojima N, et al. High-salt diet enhances insulin signaling and induces insulin resistance in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension*. 2002 Jul;40(1):83-9.
177. 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. *Circulation*. 2004 Jan 27;109(3):433-8.
178. Quilliot D, Fluckiger L, Zannad F, Drouin P, Ziegler O. Impaired autonomic control of heart rate and blood pressure in obesity: role of age and of insulin-resistance. *Clin Auton Res*. 2001 Apr;11(2):79-86.
179. Sowers JR, Nyby M, Stern N, Beck F, Baron S, Catania R, et al. Blood pressure and hormone changes associated with weight reduction in the obese. *Hypertension*. 1982 Sep-Oct;4(5):686-91.
180. Dobrian AD, Schriver SD, Lynch T, Prewitt RL. Effect of salt on hypertension and oxidative stress in a rat model of diet-induced obesity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 Oct;285(4):F619-28.
181. Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):875-80.
182. Hayakawa H, Coffee K, Raij L. Endothelial dysfunction and cardiorenal injury in experimental salt-sensitive hypertension: effects of antihypertensive therapy. *Circulation*. 1997 Oct 7;96(7):2407-13.

183. Luscher TF, Raij L, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent vascular responses in normotensive and hypertensive Dahl rats. *Hypertension*. 1987 Feb;9(2):157-63.
184. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 1995 Jul 28;269(5223):543-6.
185. Ostlund RE, Jr., Yang JW, Klein S, Gingerich R. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Nov;81(11):3909-13.
186. El-Atat F, Aneja A, McFarlane S, Sowers J. Obesity and hypertension. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2003 Dec;32(4):823-54.
187. Haynes WG, Morgan DA, Djalali A, Sivitz WI, Mark AL. Interactions between the melanocortin system and leptin in control of sympathetic nerve traffic. *Hypertension*. 1999 Jan;33(1 Pt 2):542-7.
188. Alvarez-Aguilar C, Mondragon-Jimenez LI, Ramirez-Enriquez J, Gomez-Garcia A, Paniagua-Sierra R, Amato D. [Hyperleptinemia as a risk factor in obesity-related hypertension]. *Med Clin (Barc)*. 2004 Dec 4;123(20):766-9.
189. Corry DB, Tuck ML. Obesity, hypertension, and sympathetic nervous system activity. *Curr Hypertens Rep*. 1999 Apr-May;1(2):119-26.
190. Arcaro G, Cretti A, Balzano S, Lechi A, Muggeo M, Bonora E, et al. Insulin causes endothelial dysfunction in humans: sites and mechanisms. *Circulation*. 2002 Feb 5;105(5):576-82.
191. Debbabi H, Uzan L, Mourad JJ, Safar M, Levy BI, Tibirica E. Increased skin capillary density in treated essential hypertensive patients. *Am J Hypertens*. 2006 May;19(5):477-83.
192. Meyer MF, Pfohl M, Schatz H. [Assessment of diabetic alterations of microcirculation by means of capillaroscopy and laser-Doppler anemometry]. *Med Klin (Munich)*. 2001 Feb 15;96(2):71-7.
193. Pangratis N. Diagnostic investigation using vital capillary microscopy and dynamic capillaroscopy. *Clin Hemorheol Microcirc*. 1997 Sep-Oct;17(5):371-83.
194. RG IJ, de Jongh RT, Beijl MA, van Weissenbruch MM, Delemarre-van de Waal HA, Serne EH, et al. Individuals at increased coronary heart disease risk are characterized by an impaired microvascular function in skin. *Eur J Clin Invest*. 2003 Jul;33(7):536-42.

195. Prewitt RL, Chen, II, Dowell R. Development of microvascular rarefaction in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol.* 1982 Aug;243(2):H243-51.
196. Melo RM, Martinho E, Jr., Michelini LC. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. *Hypertension.* 2003 Oct;42(4):851-7.
197. Amaral SL, Zorn TM, Michelini LC. Exercise training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2000 Nov;18(11):1563-72.
198. Serne EH, Gans RO, ter Maaten JC, Tangelder GJ, Donker AJ, Stehouwer CD. Impaired skin capillary recruitment in essential hypertension is caused by both functional and structural capillary rarefaction. *Hypertension.* 2001 Aug;38(2):238-42.
199. Wallis MG, Wheatley CM, Rattigan S, Barrett EJ, Clark AD, Clark MG. Insulin-mediated hemodynamic changes are impaired in muscle of Zucker obese rats. *Diabetes.* 2002 Dec;51(12):3492-8.
200. Vincent MA, Clerk LH, Lindner JR, Klibanov AL, Clark MG, Rattigan S, et al. Microvascular recruitment is an early insulin effect that regulates skeletal muscle glucose uptake in vivo. *Diabetes.* 2004 Jun;53(6):1418-23.
201. Mattfeldt T, Mall G, Gharehbaghi H, Moller P. Estimation of surface area and length with the orientator. *J Microsc.* 1990 Sep;159(Pt 3):301-17.
202. Gobe G, Browning J, Howard T, Hogg N, Winterford C, Cross R. Apoptosis occurs in endothelial cells during hypertension-induced microvascular rarefaction. *J Struct Biol.* 1997 Feb;118(1):63-72.
203. Vega F, Panizo A, Pardo-Mindan J, Diez J. Susceptibility to apoptosis measured by MYC, BCL-2, and BAX expression in arterioles and capillaries of adult spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 1999 Aug;12(8 Pt 1):815-20.
204. Bongartz LG, Cramer MJ, Doevendans PA, Joles JA, Braam B. The severe cardiorenal syndrome: 'Guyton revisited'. *Eur Heart J.* 2005 Jan;26(1):11-7.
205. van Zwieten PA, Thoolen MJ, Timmermans PB. The hypotensive activity and side effects of methyldopa, clonidine, and guanfacine. *Hypertension.* 1984 Sep-Oct;6(5 Pt 2):II28-33.
206. Meana JJ, Herrera-Marschitz M, Goiny M, Silveira R. Modulation of catecholamine release by alpha 2-adrenoceptors and I1-imidazoline receptors in rat brain. *Brain Res.* 1997 Jan 9;744(2):216-26.

207. Henriksen EJ, Jacob S, Fogt DL, Youngblood EB, Godicke J. Antihypertensive agent moxonidine enhances muscle glucose transport in insulin-resistant rats. *Hypertension*. 1997 Dec;30(6):1560-5.
208. Ernsberger P, Ishizuka T, Liu S, Farrell CJ, Bedol D, Koletsky RJ, et al. Mechanisms of antihyperglycemic effects of moxonidine in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat (SHROB). *J Pharmacol Exp Ther*. 1999 Jan;288(1):139-47.
209. Velliquette RA, Ernsberger P. Contrasting metabolic effects of antihypertensive agents. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Dec;307(3):1104-11.
210. Berthault MF, Morin J, Dubar M, Ktorza A, Ferre P, Penicaud L. [Effects of rilmenidine on rats made insulin resistant and hypertensive by a high fructose diet]. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 1996 Aug;89(8):1103-6.
211. De Luca N, Izzo R, Fontana D, Iovino G, Argenziano L, Vecchione C, et al. Haemodynamic and metabolic effects of rilmenidine in hypertensive patients with metabolic syndrome X. A double-blind parallel study versus amlodipine. *J Hypertens*. 2000 Oct;18(10):1515-22.
212. Penicaud L, Berthault MF, Morin J, Dubar M, Ktorza A, Ferre P. Rilmenidine normalizes fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *J Hypertens Suppl*. 1998 Aug;16(3):S45-9.
213. Velliquette RA, Kossover R, Previs SF, Ernsberger P. Lipid-lowering actions of imidazoline antihypertensive agents in metabolic syndrome X. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2006 Jan;372(4):300-12.
214. Velliquette RA, Ernsberger P. The role of I(1)-imidazoline and alpha(2)-adrenergic receptors in the modulation of glucose metabolism in the spontaneously hypertensive obese rat model of metabolic syndrome X. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Aug;306(2):646-57.
215. May CN, Dashwood MR, Whitehead CJ, Mathias CJ. Functional and autoradiographic studies to locate the sites at which clonidine acts to cause hyperglycaemia and inhibition of opiate-induced sympathetic outflow. *Neuropharmacology*. 1990 Jun;29(6):545-53.
216. Angel I, Bidet S, Langer SZ. Pharmacological characterization of the hyperglycemia induced by alpha-2 adrenoceptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988 Sep;246(3):1098-103.

217. Fellmann L. Rôle du système nerveux sympathique dans la physiopathologie du syndrome métabolique : approche expérimentale. Strasbourg: Université de Strasbourg; 2009.
218. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 2003 Jun 12;423(6941):762-9.
219. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*. 2002 Nov;8(11):1288-95.
220. Deepa SS, Dong LQ. APPL1: role in adiponectin signaling and beyond. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Jan;296(1):E22-36.
221. Lumb PJ, McMahon Z, Chik G, Wierzbicki AS. Effect of moxonidine on lipid subfractions in patients with hypertension. *Int J Clin Pract*. 2004 May;58(5):465-8.
222. Derosa G, Cicero AF, D'Angelo A, Fogari E, Salvadeo S, Gravina A, et al. Metabolic and antihypertensive effects of moxonidine and moxonidine plus irbesartan in patients with type 2 diabetes mellitus and mild hypertension: a sequential, randomized, double-blind clinical trial. *Clin Ther*. 2007 Apr;29(4):602-10.
223. Elisaf MS, Petris C, Bairaktari E, Karabina SA, Tzallas C, Tselepis A, et al. The effect of moxonidine on plasma lipid profile and on LDL subclass distribution. *J Hum Hypertens*. 1999 Nov;13(11):781-5.
224. Estado V, Araujo CV, Bousquet P, Tibirica E. Effects of centrally acting antihypertensive drugs on the microcirculation of spontaneously hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Oct;37(10):1541-9.
225. Zhou A, Egginton S, Hudlicka O, Brown MD. Internal division of capillaries in rat skeletal muscle in response to chronic vasodilator treatment with alpha1-antagonist prazosin. *Cell Tissue Res*. 1998 Aug;293(2):293-303.
226. Fulgenzi G, Graciotti L, Collis MG, Hudlicka O. The effect of alpha 1 adrenoceptor antagonist prazosin on capillary supply, blood flow and performance in a rat model of chronic muscle ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1998 Jul;16(1):71-7.
227. Callens-el Amrani F, Paolaggi F, Swynghedauw B. [The heart in patients with hypertension: effects of rilmenidine on experimental cardiac hypertrophy of hypertensive origin in rats]. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 1989 Dec;82 Spec No 5:53-7.

228. Aceros H, Farah G, Cobos-Puc L, Stabile AM, Noiseux N, Mukaddam-Daher S. Moxonidine improves cardiac structure and performance in SHR through inhibition of cytokines, p38 MAPK and Akt. *Br J Pharmacol*. 2011 Oct;164(3):946-57.
229. Stabile AM, Aceros H, Stockmeyer K, Abdel Rahman AA, Noiseux N, Mukaddam-Daher S. Functional and molecular effects of imidazoline receptor activation in heart failure. *Life Sci*. 2011 Mar 14;88(11-12):493-503.
230. Michel T, Hoffman BB, Lefkowitz RJ. Differential regulation of the alpha 2-adrenergic receptor by Na⁺ and guanine nucleotides. *Nature*. 1980 Dec 25;288(5792):709-11.
231. Kather H, Simon B. Adrenoceptor of the alpha 2-subtype mediating inhibition of the human fat cell adenylate cyclase. *Eur J Clin Invest*. 1981 Apr;11(2 Suppl 1):111-4.
232. Gigou L. Identification de protéines de liaison des imidazolines dans des modèles cellulaires de phéochromocytome de rat et d'adipocytes murins. Strasbourg: Université de Strasbourg; 2011.
233. Adachi Y, Pavlakis GN, Copeland TD. Identification and characterization of SET, a nuclear phosphoprotein encoded by the translocation break point in acute undifferentiated leukemia. *J Biol Chem*. 1994 Jan 21;269(3):2258-62.
234. Xu Z, Yang W, Shi N, Gao Y, Teng M, Niu L. Cloning, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of SET/TAF-Iss deltaN from Homo sapiens. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2010 Aug 1;66(Pt 8):926-8.
235. Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care*. 2003 Aug;26(8):2442-50.
236. Lafontan M, Viguerie N. Role of adipokines in the control of energy metabolism: focus on adiponectin. *Curr Opin Pharmacol*. 2006 Dec;6(6):580-5.
237. Spieker LE, Luscher TF, Noll G. Current strategies and perspectives for correcting endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2001 Nov;38 Suppl 2:S35-41.
238. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993 Apr 29;362(6423):801-9.
239. Perrins CJ, Bobryshev YV. Current advances in understanding of immunopathology of atherosclerosis. *Virchows Arch*. 2011 Feb;458(2):117-23.

240. Franz WM, Mueller OJ, Hartong R, Frey N, Katus HA. Transgenic animal models: new avenues in cardiovascular physiology. *J Mol Med (Berl)*. 1997 Feb;75(2):115-29.
241. Davignon J, Roy M. Familial hypercholesterolemia in French-Canadians: taking advantage of the presence of a "founder effect". *Am J Cardiol*. 1993 Sep 30;72(10):6D-10D.
242. Meir KS, Leitersdorf E. Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Jun;24(6):1006-14.
243. Tangirala RK, Pratico D, FitzGerald GA, Chun S, Tsukamoto K, Maugeais C, et al. Reduction of isoprostanes and regression of advanced atherosclerosis by apolipoprotein E. *J Biol Chem*. 2001 Jan 5;276(1):261-6.
244. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*. 1992 Oct 16;258(5081):468-71.
245. Hayek T, Oiknine J, Brook JG, Aviram M. Increased plasma and lipoprotein lipid peroxidation in apo E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Jun 30;201(3):1567-74.
246. Daugherty A. Mouse models of atherosclerosis. *Am J Med Sci*. 2002 Jan;323(1):3-10.
247. Herrera VL, Makrides SC, Xie HX, Adari H, Krauss RM, Ryan US, et al. Spontaneous combined hyperlipidemia, coronary heart disease and decreased survival in Dahl salt-sensitive hypertensive rats transgenic for human cholesteryl ester transfer protein. *Nat Med*. 1999 Dec;5(12):1383-9.
248. Makaritsis KP, Gavras H, Du Y, Chobanian AV, Brecher P. Alpha1-adrenergic plus angiotensin receptor blockade reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Hypertension*. 1998 Dec;32(6):1044-8.
249. Chen J, Kuhlencordt PJ, Astern J, Gyurko R, Huang PL. Hypertension does not account for the accelerated atherosclerosis and development of aneurysms in male apolipoprotein e/endothelial nitric oxide synthase double knockout mice. *Circulation*. 2001 Nov 13;104(20):2391-4.
250. Chrysant SG, Chrysant GS. Effectiveness of lowering blood pressure to prevent stroke versus to prevent coronary events. *Am J Cardiol*. 2010 Sep 15;106(6):825-9.

251. Messerli FH, Panjath GS. The J-curve between blood pressure and coronary artery disease or essential hypertension: exactly how essential? *J Am Coll Cardiol*. 2009 Nov 10;54(20):1827-34.
252. McCann UD, Agras WS. Successful treatment of nonpurging bulimia nervosa with desipramine: a double-blind, placebo-controlled study. *Am J Psychiatry*. 1990 Nov;147(11):1509-13.

9. Anexos (Artigos Publicados)

Anexo I - Structural and functional microvascular alterations in a rat model of metabolic syndrome induced by a high-fat diet.

Anexo II - Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome.