

Alterações Cardiometabólicas em Ratos Wistar Alimentados com Dieta Hiperlipídica e Hipercolesterolêmica por Seis Semanas

Cardiometabolic Alterations in Wistar Rats on a Six-Week Hyperlipidic, Hypercholesterolemic Diet

Danilo Roberto Xavier de Oliveira Crege, Alexandre Marcucci Miotto, Filipy Borghi, Valéria Wolf-Nunes, Dora Maria Grassi Kassis

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP – Brasil

Resumo

Fundamento: Alta ingestão de lipídeos e colesterol compõe a dieta da sociedade moderna e está envolvida com o desenvolvimento de doenças cardiometabólicas. Entretanto, há lacunas na literatura quanto à existência de modelos de dislipidemias em ratos Wistar.

Objetivos: Analisar o perfil cardiometabólico de ratos Wistar alimentados com dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica por seis semanas.

Métodos: Ratos Wistar jovens foram alimentados com dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica por seis semanas para induzir a hiperlipidemia. Os ratos foram submetidos à cateterização da artéria carótida para determinar a pressão arterial. Após jejum, amostras de sangue foram coletadas por meio do cateter, e as concentrações de colesterol total, colesterol HDL, triglicérides e glicose foram determinadas. Amostras do tecido cardíaco foram removidas para análise histológica, a fim de se verificar a hipertrofia ventricular.

Resultados: A ingestão da dieta por seis semanas foi eficaz em induzir alterações cardiometabólicas. O perfil dislipidêmico apresentado pelos ratos Wistar foi acompanhado de hiperinsulinemia, hipertensão moderada e hipertrofia ventricular do coração. Não houve alterações na glicemia.

Conclusões: A administração de dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica em ratos Wistar jovens por seis semanas induziram alterações cardiometabólicas tornando-se um modelo eficaz para distúrbios dessa natureza. (Int J Cardiovasc Sci. 2016;29(5):362-369)

Palavras-chave: Ratos, Dieta Hiperlipídica, Restrição Calórica, Hipercolesterolemia, Hipertensão, Hipertrofia Ventricular Esquerda.

Abstract

Background: The diet of modern society is composed by large intakes of lipids and cholesterol, involved in the development of cardiometabolic diseases. However, there are gaps in the literature regarding the existence of dyslipidemia models in Wistar rats.

Objectives: To analyze the cardiometabolic profile of Wistar rats on a six-week hyperlipidic, hypercholesterolemic diet.

Methods: Young Wistar rats were kept on a hyperlipidic, hypercholesterolemic diet for six weeks to induce hyperlipidemia. The rats underwent catheterization of the carotid artery to determine blood pressure. After fasting, blood samples were drawn through the catheter, and concentrations of total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides and glucose were determined. Cardiac tissue samples were taken for a histological analysis to check for ventricular hypertrophy.

Results: The six-week diet was effective in inducing cardiometabolic alterations. The dyslipidemic profile presented by the Wistar rats was accompanied by hyperinsulinemia, moderate hypertension and cardiac ventricular hypertrophy. There were no alterations in glycemia.

Conclusion: The six-week hyperlipidic, hypercholesterolemic diet in young Wistar rats induced cardiometabolic alterations, becoming an effective model for disorders of this nature. (Int J Cardiovasc Sci. 2016;29(5):362-369)

Keywords: Rats; Diet-High-Fat; Caloric Restriction; Hypercholesterolemia; Hypertension, Hypertrophy, Left Ventricular.

(Full texts in English - <http://www.onlinejcs.org>)

Correspondência: Dora Maria Grassi Kassis

Rua Monteiro Lobato, n.255. CEP: 13083-862, Barão Geraldo, Campinas, SP – Brasil

E-mail: doramgk@unicamp.br; doramgk@gmail.com

Introdução

Obesidade, aterosclerose e hipertensão, quando associadas em um único paciente, constituem uma série de fatores metabólicos de risco conhecidos como síndrome metabólica. Esta síndrome está relacionada a distúrbios no metabolismo de insulina e de lipídeos, como a hiperinsulinemia, diabetes mellitus tipo II e dislipidemias caracterizadas por concentrações plasmáticas elevadas de triglicerídeos e LDL, associado a reduções das concentrações de HDL.¹⁻³

Condições verificadas principalmente em países ocidentais ricos como, por exemplo, estilo de vida social, tendência a uma alimentação com dietas ricas em lipídeos, sedentarismo e trabalho excessivo contribuem com o aumento da incidência dessa doença em pessoas de todas as idades, principalmente trabalhadores ativos.⁴⁻⁶

O início dessa complexa síndrome ainda não está totalmente claro, e uma importante questão a ser respondida é: Qual o fator desencadeador dessa doença? Estudos mostram que existe uma relação próxima entre essa síndrome e a resistência à insulina^{7,8} e dietas ricas em gordura.^{1,4}

Um ponto diferencial nesse estudo é que a maioria dos trabalhos encontrados na literatura envolvendo a administração de dietas hiperlipídicas e as alterações cardiovasculares são desenvolvidas com camundongos. Estudos divulgados em ratos Wistar apresentam longos protocolos de tratamento como 20 semanas^{9,10} ou 30 semanas¹¹ acarretando altos custos para a manutenção dos ratos. Assim, propusemos nesse estudo avaliar a eficácia do tratamento dietético de curta duração para instalação de distúrbios cardiovasculares e metabólicos em ratos Wistar.

Métodos

Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar pesando 150 g (4 semanas de idade) no início dos experimentos. Os animais foram mantidos em sala com temperatura controlada (22±2°C), com ciclo claro escuro de 12 horas (luzes acendendo às 6h30). Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios adotados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) para utilização de animais em pesquisa e educação, sob os números 226-1, 2561-1, consoantes à Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 2008.

Tratamentos

Os ratos Wistar jovens (n=9), com quatro semanas de idade, foram aleatoriamente distribuídos em grupos: normolipidêmico (n=4) e hiperlipidêmico (n=5). Os normolipidêmicos foram alimentados *ad libitum*, por seis semanas, com ração padrão de laboratório (4% gordura, 0% colesterol e 23% de proteína; Labina-Purina, Brasil). Os animais do grupo hiperlipidêmico foram alimentados com dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica, contendo 15% de gordura de manteiga de cacau, 1,25% de colesterol, 0,5% de ácido fólico, 27,9% proteína.^{12,13}

Cateterização dos vasos sanguíneos

Os ratos foram anestesiados com xilazina (50 mg/Kg de peso, i.m.) e hidrocloreto de ketamina (0,01 mg/kg de peso, i.m.), e a artéria carótida esquerda foi cateterizada com uma cânula de polietileno (PE 20) siliconizada e preenchida com 5 mM de citrato de sódio. O cateter foi conectado a um tubo PE 50 (com 25 cm de comprimento, preenchido com solução de NaCl 0,9%), exteriorizado na região interescapular, fixado na pele do animal.¹⁴ Esse método permite coletar amostras de sangue de ratos não anestesiados e com liberdade de movimento. Todos os ratos, antes da realização do experimento, tiveram 48 horas de recuperação da cirurgia em gaiolas individuais.

Determinação da pressão arterial

Após terem se recuperado da cirurgia, os ratos cateterizados foram mantidos na gaiola, conscientes, sem restrição de movimento e em ambiente silencioso. A pressão arterial foi registrada a cada batimento, utilizando-se um transdutor de pressão (Gould-Strain Gauge) conectado a um pré-amplificador acoplado a um cateter intra-arterial. As medições foram registradas em computador, para posterior análise com o WINDAQ-PRO Data Acquisition software (DI220 AT CODAS data acquisition system, Data Instruments Co). A pressão arterial sistólica, diastólica e média e a frequência cardíaca em condições basais foram calculadas utilizando-se o *software* Advanced CODAS.

Amostras sanguíneas

Após jejum de 16 horas, mostras de sangue foram coletadas utilizando-se um cateter. Colesterol total, colesterol HDL, triglicerídeos (TAG) e concentrações de glicose foram determinadas no soro, utilizando-se método colorimétrico com *kits* de diagnóstico (Laborlab; Barueri, SP, Brazil). Um método indireto foi utilizado para determinar as concentrações de LDL e VLDL

colesterol.¹⁵ Ácidos graxos livres (AGL) também foram determinados por método colorimétrico, utilizando-se kit específico de diagnóstico (Wako Chemicals GmbH; Neuss, Germany). As concentrações de insulina foram determinadas por radioimunoensaio (RIE), conforme descrito na literatura.¹⁶ O índice aterogênico (IA), medida que indica a tendência do organismo em desenvolver aterosclerose, foi determinado pelo cálculo: $IA = [(Colesterol\ total - HDL) / HDL]$.

Análise histológica

Os ratos foram eutanaziados por aprofundamento da anestesia, e amostras do tecido cardíaco foram removidas para realização de análise histológica e verificação da hipertrofia ventricular. O ventrículo foi lavado em solução fisiológica, pesado e imediatamente colocado em recipiente contendo formaldeído. Fatias do ventrículo foram desidratadas em álcool com concentrações crescentes (70% até absoluto), seguido por diafanização em xilol, imersão de Bouin e inclusão em parafina (58°C - 60°C). Os blocos foram cortados com 5 µm de espessura e corados com Tricômio Masson. O diâmetro da câmara, área e a espessura da parede ventricular foram determinadas com o software Scion Image (NIH Image software).

Análise estatística

O cálculo do número amostral de experimentos para cada uma das condições diferentes foi realizado de acordo com Lenth,¹⁷ utilizando-se o programa: Statistica 7.0 (Stat Soft, Inc. 2004: version 7. www.statsoft.com). Esse cálculo foi realizado de forma a garantir os seguintes parâmetros: poder do teste mínimo de 0,80 e alpha pré-fixado em 0,05. Os animais foram retirados do Biotério Central

da Universidade Estadual de Campinas e, ao chegar ao Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, quatro animais foram aleatoriamente separados para compor o grupo normolipidêmico. Os cinco animais que restaram foram designados para constituir o grupo dislipidêmico. Após indicação da distribuição normal dos dados pela análise de Kolmogorov Smirnov, os resultados foram analisados por teste *t* de Student não pareado, conforme indicado nas legendas. O nível de significância estatística adotado foi de 5%. Os resultados estão apresentados em média ± erro padrão da média (EPM). O estudo estatístico foi realizado utilizando-se o software Prisma.

Resultados

Concentrações séricas de colesterol total, LDL, VLDL e TAG

Os ratos que fizeram ingestão de dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica durante seis semanas (da 4ª até a 10ª semana de vida) apresentaram aumento significativo das concentrações séricas de colesterol total, LDL, VLDL colesterol e triglicerídeos (Tabela 1). Não foram observadas diferenças significativas para as concentrações de HDL colesterol. Além disso, nos ratos alimentados com a dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica, o IA foi maior que nos animais do grupo controle (Tabela 1).

Concentrações plasmáticas de glicose

As concentrações plasmáticas de glicose não foram alteradas para os ratos que fizeram ingestão de dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica. Por outro lado, as concentrações de insulina foram significativamente maiores, comparado aos ratos que fizeram ingestão de ração convencional (Tabela 2).

Tabela 1

Concentrações séricas de colesterol total, HDL-, LDL-, VLDL-colesterol, triglicerídeos, AGL e IA em ratos que fizeram ingestão de dieta padrão ou hiperlipídica e hipercolesterolêmica por seis semanas

Dieta	CT (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	VLDL (mg/dL)	TAG (mg/dL)	AGL (mmol/L)	IA
Padrão (4)	36,2 ± 4,2	5,2 ± 1,2	24,2 ± 5,5	6,7 ± 0,8	20,9 ± 1,2	0,65 ± 0,06	7,1 ± 1,8
Hiperlipídica e Hipercolesterolêmica (5)	95,7 ± 9,5*	6,6 ± 0,4	83,2 ± 9,4*	10,5 ± 0,5*	51,3 ± 1,7*	1,02 ± 0,14	15,3 ± 1,3*

CT: Colesterol total; HDL: Lipoproteína de alta densidade; LDL: Lipoproteína de baixa densidade; VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade; TAG: Triglicerídeos; AGL: Ácidos graxos livres; IA: Índice aterogênico; Amostras de sangue foram coletadas após 16 horas de jejum, de ratos conscientes, sem restrição de movimento; $IA = [(colesterol\ total - HDL) / HDL]$. Os resultados estão apresentados com média ± EPM. O número de animais está indicado entre parênteses; * média significativamente diferente do grupo controle; ($p < 0,05$; Teste *t* de Student, não pareado).

Tabela 2**Concentrações séricas de glicose e plasmáticas de insulina em ratos que fizeram ingestão de dieta padrão ou hiperlipídica e hipercolesterolêmica por seis semanas**

Dieta	Glicose (mg/dL)	Insulina (ng/mL)
Padrão (4)	112,9 ± 11,9	0,75 ± 0,02
Hiperlipídica e Hipercolesterolêmica (5)	110,5 ± 4,9	1,30 ± 0,12*

Amostras de sangue foram coletadas após 16 horas de jejum, de ratos conscientes, sem restrição de movimento. Os resultados estão apresentados com média ± EPM. O número de animais está indicado entre parênteses; * média significativamente diferente do grupo controle; ($p < 0,05$; Teste t de Student, não pareado).

Pressão arterial

A pressão arterial média, sistólica e diastólica, assim como a frequência cardíaca, foi significativamente maior em ratos que ingeriram a dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica por seis semanas (Tabela 3).

Análise histológica do coração

A massa do ventrículo esquerdo foi significativamente maior em ratos alimentados com dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica. Resultados similares foram encontrados para o índice de massa ventricular e

para a espessura da parede do ventrículo esquerdo ($p < 0,0001$), diâmetro interno ($p < 0,0001$) e razão da espessura da parede com o diâmetro interno ($p < 0,0001$). A área da câmara ventricular esquerda, por outro lado, não mostrou alteração (Tabela 4). As alterações morfológicas estão demonstradas na Figura 1: Coluna A: imagens da área de secção transversa de metade do órgão, obtidas por microscópio analítico (coloração Tricômio de Masson); Coluna B: área da superfície dos cardiomiócitos, Coluna C: visão longitudinal dos cardiomiócitos; Coluna D: fibrose do miocárdio; e Coluna E: fibrose perivascular.

Tabela 3**Pressão arterial média, pressão sistólica, pressão diastólica e frequência cardíaca de ratos conscientes que fizeram ingestão de dieta padrão ou hiperlipídica e hipercolesterolêmica por seis semanas**

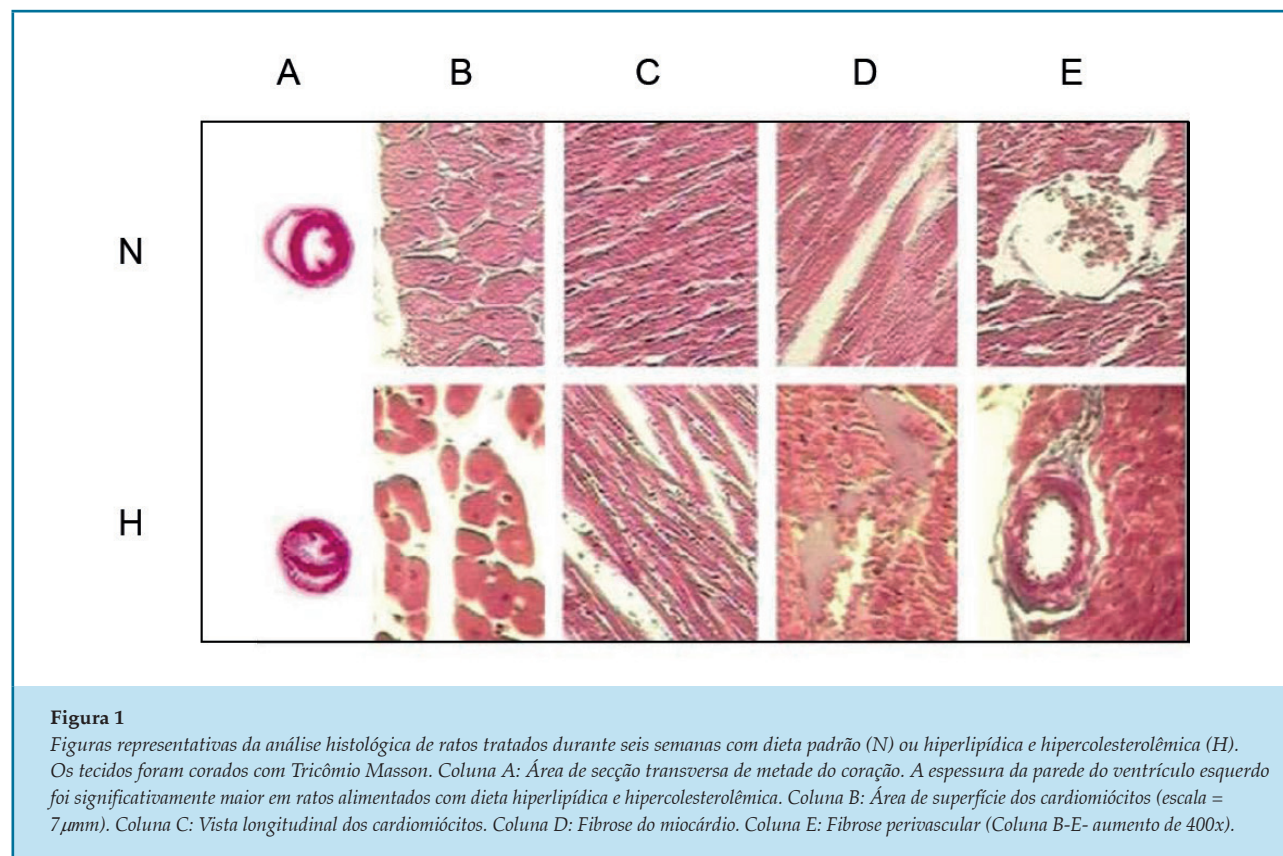
Dieta	PAM (mmHg)	PS (mmHg)	PD (mmHg)	FC (bpm)
Padrão (3)	105 ± 2	120 ± 2	91 ± 1	346 ± 7
Hiperlipídica e Hipercolesterolêmica (4)	112 ± 1*	130 ± 1*	98 ± 2*	368 ± 4*

PAM: Pressão arterial média; PS: Pressão sistólica; PD: Pressão diastólica; FC: Frequência cardíaca. Os resultados estão apresentados com média ± EPM. O número de animais está indicado entre parênteses; * média significativamente diferente do grupo controle; ($p < 0,05$; Teste t de Student, não pareado).

Tabela 4**Peso corporal, massa do ventrículo esquerdo, índice de massa ventricular, espessura da parede do ventrículo esquerdo, diâmetro interno, área da câmara e razão da espessura do ventrículo e diâmetro interno do ventrículo esquerdo de ratos que fizeram, por seis semanas, ingestão de dieta padrão ou hiperlipídica e hipercolesterolêmica**

Dieta	PC (g)	MV (mg)	IMV (mg/g)	EV (mm)	DI (mm)	EV / D	AC (mm)
Padrão (4)	292,4 ± 13,2	546,6 ± 23,9	1,89 ± 0,15	11,5 ± 0,12	28,8 ± 0,2	0,40 ± 0,004	218,1 ± 4,4
Hiperlipídica e Hipercolesterolêmica (4)	307,8 ± 7,5	653,8 ± 28,2*	2,22 ± 0,10	15,1 ± 0,51*	20,6 ± 0,3*	0,64 ± 0,010*	220,1 ± 4,7

PC: Peso corporal; MV: Massa do ventrículo esquerdo; IMV: Índice de massa ventricular; EV: Espessura da parede do ventrículo esquerdo; DI: Diâmetro interno; AC: Área da câmara; EV/DI: Razão da espessura do ventrículo e diâmetro interno do ventrículo esquerdo. Os resultados estão apresentados com média ± EPM. Índice de massa ventricular = peso do ventrículo / peso corporal. O número de animais está indicado entre parênteses; * média significativamente diferente do grupo controle; ($p < 0,05$; Teste t de Student, não pareado).

**Figura 1**

Figuras representativas da análise histológica de ratos tratados durante seis semanas com dieta padrão (N) ou hiperlipídica e hipercolesterolêmica (H). Os tecidos foram corados com Tricômio Masson. Coluna A: Área de seção transversa de metade do coração. A espessura da parede do ventrículo esquerdo foi significativamente maior em ratos alimentados com dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica. Coluna B: Área de superfície dos cardiomiócitos (escala = 7 μ m). Coluna C: Vista longitudinal dos cardiomiócitos. Coluna D: Fibrose do miocárdio. Coluna E: Fibrose perivascular (Coluna B-E- aumento de 400x).

Discussão

Estudos experimentais e epidemiológicos confirmaram que a dislipidemia primária (genética) e secundária (alterações hormonais e/ou metabólicas resultantes de fatores ambientais) são aterogênicas, e o principal fator de risco para aterosclerose e doenças coronarianas.¹⁸⁻²⁰ Depois de seis semanas de ingestão de dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica, os ratos apresentaram dislipidemia associada à hiperinsulinemia e hipertensão moderada. Elevações nas concentrações séricas de triglicerídeos, colesterol total, LDL e VLDL caracterizaram a dislipidemia aterogênica. O IA foi maior nos ratos que fizeram ingestão de dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica. As concentrações séricas de HDL e AGL não foram afetadas pela dieta.

As elevadas concentrações de lipídeos podem ser o fator que desencadeia outras alterações metabólicas. Foi proposto que o acúmulo intracelular de triglicerídeos,²¹ que aumenta a produção de glicose, precede os efeitos dos lipídeos na ação periférica da insulina.²²⁻²⁴

O excesso de ingestão de nutrientes, principalmente glicose e lipídeos, podem causar resistência à insulina nos músculos e tecido adiposo, assim como compromete a

produção endógena de glicose. Modelos experimentais com animais alimentados com dietas hiperlipídica mostraram redução na tolerância à glicose, associada a menor captação de glicose basal e estimulada pela insulina.²⁵ Os resultados aqui apresentados mostraram que ratos alimentados com dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica estavam hiperinsulinêmicos e euglicêmicos, o que, provavelmente, indica redução de tolerância à glicose. A captação da 2-deoxi-glicose pelos adipócitos, assim como o *clamp* euglicêmico-hiperinsulinêmico, está sendo avaliada em nosso laboratório, para confirmar essa condição nesse modelo experimental.

Comprometimento da sensibilidade à insulina e/ou do transporte de glicose foram relacionados a mudanças nas composições de ácidos graxos de membrana plasmática induzidos por dieta com lipídeos. As gorduras saturadas, presentes na dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica, parecem ser mais deletérias que as gorduras monossaturadas e polissaturadas²⁶⁻²⁸ no tocante aos lipídeos induzirem redução da sensibilidade à insulina. Estudos em coelhos demonstraram que a hipercolesterolemia induzida por dieta resultou

em depressão da função sistólica e diastólica como consequência do aumento da quantidade de colesterol no sarcolema cardíaco, alterações na permeabilidade ao cálcio e/ou atividade da SERCA-2.¹⁸ Portanto, o consumo de gordura animal, associado ao estilo de vida sedentário, predispõe tanto a elevação de lipoproteínas aterogênicas quanto a síndrome metabólica.^{1,4}

Os ratos alimentados com dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica, comparados aos ratos controle, mostraram, também, aumento significativo da FC e da PAM com moderado, porém significativo, aumento da PS e PD. O aumento da FC é um indicador da hiperatividade do sistema nervoso simpático (SNS),^{29,30} e é descrito que essa atividade do SNS aumenta com a ingestão de calorias.^{22,31} As concentrações elevadas de insulina parecem ser o link entre a absorção dos nutrientes e a atividade simpática. O aumento da frequência cardíaca, associado ao quadro dislipidêmico, é um fator envolvido na gênese da hipertensão e da aterosclerose.

A resistência à insulina e hiperinsulinemia também foram descritas como mecanismos importantes na fisiopatologia da dislipidemia e aterosclerose.^{32,33} Foi sugerido que a insulina regula a resistência vascular periférica levando à vasoconstrição pela ativação do SNS. Na situação de resistência à insulina, as terminações nervosas do simpático não são significativamente afetadas, assim, o estímulo simpático é contínuo.³³ Por outro lado, a insulina aumenta a síntese do óxido nítrico (NO),^{34,35} reduzindo a vasoconstrição mediada por catecolaminas e potencializando a vasodilatação mediada por acetilcolina nos vasos sanguíneos. Essas ações parecem ser protetoras contra o desenvolvimento da hipertensão arterial. Entretanto, na condição de resistência à insulina, tais efeitos são diminuídos^{32,36} levando à hipertensão. Além disso, a estimulação do crescimento e da migração das células musculares lisas na parede do vaso está diretamente associada à iniciação e progressão desse processo,³⁷ no qual a síntese de NO está reduzida. Evidência que a hiperinsulinemia precede o desenvolvimento de distúrbios vasculares foi descrita anteriormente.³⁸

Foi demonstrado que o óxido nítrico é um efetivo anti-hipertrofico e inibidor do remodelamento cardíaco.³⁹ Entretanto, as elevadas concentrações plasmáticas de LDL observadas em ratos alimentados com dieta hiperlipídica podem promover aumento do estresse oxidativo através da peroxidação de lipídeos, reduzindo a disponibilidade de NO⁴⁰ e aumentando as concentrações de nitrito e nitrato.⁴¹ Somado a isso, moléculas como o

fator de necrose tumoral (TNF- α), o qual é secretado pelo tecido adiposo e é um fator que contribui com a resistência à insulina e dislipidemia,⁴² também são indutoras adicionais de apoptose de miócitos. Apesar de não verificarmos apoptose nos corações avaliados, essa condição é associada à redução progressiva da função ventricular ou lesão do miocárdio⁴³ e hipertrofia concêntrica, devido à sobrecarga de pressão, conforme demonstrado em nossos resultados.

Rosen et al.,⁴⁴ em estudo com pacientes com falência cardíaca crônica e cardiopatia hipertrófica, confirmaram ativação anormal do SNS com redução na densidade dos adrenoreceptores beta(β) do miocárdio. Em estudos preliminares, identificamos que ratos alimentados com dieta hiperlipídica, por seis semanas, apresentaram subsensibilidade à agonistas β -adrenérgicos no átrio direito.⁴⁵

A principal limitação do estudo é a ausência de investigação dos mecanismos envolvidos na indução dos distúrbios apresentados. Entretanto, como é um modelo de indução de dislipidemia pela dieta em apenas 6 semanas, novos trabalhos podem ser desenvolvidos, a fim de se desvendar os mecanismos relacionados com essa síndrome.

Conclusões

Os resultados mostraram que a ingestão de dieta hiperlipídica e hipercolesterolêmica por seis semanas induziram dislipidemia associada à hiperinsulinemia, hipertensão e hipertrofia ventricular esquerda. Esse quadro está associado a doenças cardiometabólicas. Portanto, esse pode ser um modelo experimental de curta duração para indução de distúrbios cardiometabólicos por meio da dieta em ratos Wistar, que pode contribuir para elucidar os mecanismos dessa complexa condição patológica.

Agradecimentos

Esse trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp). Os pesquisadores também querem agradecer à professora Dra. Helena C. F. de Oliveira e ao professor Antônio Carlos Boschero pela ajuda na análise das concentrações de ácidos graxos livres e insulina plasmática.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Crege DRXO, Miotto AM, Kassisse DMG. Obtenção de dados: Crege DRXO, Miotto AM, Wolf-Nunes V, Kassisse DMG. Análise e interpretação dos dados: Crege DRXO, Miotto AM, Borghi F, Wolf-Nunes V, Kassisse DMG. Análise estatística: Crege DRXO, Miotto AM, Kassisse DMG. Obtenção de financiamento: Kassisse DMG. Redação do manuscrito: Crege DRXO, Borghi F, Kassisse DMG. Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Crege DRXO, Miotto AM, Borghi F, Wolf-Nunes V, Kassisse DMG. Orientação das duas teses de doutorado (Drs Danilo Roberto Xavier de Oliveira Crege e Alexandre Marcucci Miotto): Kassisse DMG.

Potencial Conflito de Interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi parcialmente financiado por Cnpq e Fapesp – processos: 96/4041-6, 02-00695-4 e 14/17538-6.

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Danilo Roberto Xavier de Oliveira Crege e Alexandre Marcucci Miotto pela Programa de Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp.

Referências

1. Grundy SM. Hypertriglyceridemia, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol.* 1999;83(9B):25F-9F.
2. Firneisz G. Non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus: the liver disease of our age? *World J Gastroenterol.* 2014;20(27):9072-89.
3. Stachowiak G, Pertyński T, Pertyńska-Marczewska M. Metabolic disorders in menopause. *Prz Menopauzalny.* 2015;14(1):59-64.
4. Roberts CK, Barnard RJ. Effects of exercise and diet on chronic disease. *J Appl Physiol* (1985). 2005;98(1):3-30.
5. Leblanc ES, O'Connor E, Whitlock EP, Patnode CD, Kapka T. Effectiveness of primary care-relevant treatments for obesity in adults: a systematic evidence review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2011;155(7):434-47.
6. Liu YL, Lu CW, Shi L, Liou YM, Lee LT, Huang KC. Low intensive lifestyle modification in young adults with metabolic syndrome: a community-based interventional study in Taiwan. *Medicine (Baltimore).* 2015;94(22):e916.
7. Alibasic E, Ramic E, Bajraktarevic A, Ljuca F, Batic-Mujanovic O, Zildzic M. Atherogenic dyslipidemia and residual vascular risk in practice of family doctor. *Med Arch.* 2015;69(5):339-41.
8. Chen JS, Wu CZ, Chu NF, Chang LC, Pei D, Lin YF. Association among fibrinolytic proteins, metabolic syndrome components, insulin secretion, and resistance in schoolchildren. *Int J Endocrinol.* 2015;2015:170987.
9. Martins F, Campos DH, Pagan LU, Martinez PF, Okoshi K, Okoshi MP, et al. High-fat diet promotes cardiac remodeling in an experimental model of obesity. *Arq Bras Cardiol.* 2015;105(5):479-86.
10. Oliveira Junior SA, Padovani CR, Rodrigues SA, Silva NR, Martinez PF, Campos DH, et al. Extensive impact of saturated fatty acids on metabolic and cardiovascular profile in rats with diet-induced obesity: a canonical analysis. *Cardiovasc Diabetol.* 2013;12:65.
11. Nascimento TB, Baptista Rde F, Pereira PC, Campos DH, Leopoldo AS, Leopoldo AP, et al. Vascular alterations in high-fat diet-obese rats: role of endothelial L-arginine/NO pathway. *Arq Bras Cardiol.* 2011;97(1):40-5.
12. Miotto AM. Cardiovascular and metabolic alterations in rat model high-fat diet-fed. Campinas (SP): Unicamp; 2006.
13. Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis.* 1987;68(3):231-40.
14. Popovic V, Popovic P. Permanent cannulation of aorta and vena cava in rats and ground squirrels. *J Appl Physiol.* 1960;15:727-8.
15. 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;18(6):499-502.
16. Scott AM, Atwater I, Rojas E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia.* 1981;21(5):470-5.
17. Lenth RV. Some practical guidelines for effective sample size determination. *The American Statistician.* 2001;55(3):187-93.
18. Huang Y, Walker KE, Hanley F, Narula J, Houser SR, Tulenko TN. Cardiac systolic and diastolic dysfunction after a cholesterol-rich diet. *Circulation.* 2004;109(1):97-102.
19. Schuett KA, Lehrke M, Marx N, Burgmaier M. High-risk cardiovascular patients: clinical features, comorbidities, and interconnecting mechanisms. *Front Immunol.* 2015;6:591.
20. Park KH, Park WJ. Endothelial dysfunction: clinical implications in cardiovascular disease and therapeutic approaches. *J Korean Med Sci.* 2015;30(9):1213-25.
21. Pan DA, Lillioja S, Kriketos AD, Milner MR, Baur LA, Bogardus C, et al. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes.* 1997;46(6):983-8.
22. Bergman RN, Ader M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab.* 2000;11(9):351-6.
23. Boden G. Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: significance for insulin resistance and type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2003;111(3):121-4.
24. Ni Y, Zhao L, Yu H, Ma X, Bao Y, Rajani C, et al. Circulating unsaturated fatty acids delineate the metabolic status of obese individuals. *EBioMedicine.* 2015;2(10):1513-22.
25. Proietto J, Filippis A, Nakhla C, Clark S. Nutrient-induced insulin resistance. *Mol Cell Endocrinol.* 1999;151(1-2):143-9.
26. Lichtenstein AH, Schwab US. Relationship of dietary fat to glucose metabolism. *Atherosclerosis.* 2000;150(2):227-43.
27. Gollisch KS, Brandauer J, Jessen N, Toyoda T, Nayer A, Hirshman MF, et al. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;297(2):E495-504.
28. van Haare J, Kooi ME, Vink H, Post MJ, van Teeffelen JW, Slenker J, et al. Early impairment of coronary microvascular perfusion capacity in rats on a high fat diet. *Cardiovasc Diabetol.* 2015;14:150.

29. Danev S, Nikolova R, Kerekovska M, Svetoslavov S. Relationship between heart rate variability and hypercholesterolaemia. *Cent Eur J Public Health*. 1997;5(3):143-6.
30. Ruffini N, D'Alessandro G, Mariani N, Pollastrelli A, Cardinali L, Cerritelli F. Variations of high frequency parameter of heart rate variability following osteopathic manipulative treatment in healthy subjects compared to control group and sham therapy: randomized controlled trial. *Front Neurosci*. 2015;9:272.
31. Kaufman LN, Peterson MM, Smith SM. Hypertension and sympathetic hyperactivity induced in rats by high-fat or glucose diets. *Am J Physiol*. 1991;260(1 Pt 1):E95-100.
32. Linz D, Hohl M, Schütze J, Mahfoud F, Speer T, Linz B, et al. Progression of kidney injury and cardiac remodeling in obese spontaneously hypertensive rats: the role of renal sympathetic innervation. *Am J Hypertens*. 2015;28(2):256-65.
33. Rafiq K, Fujisawa Y, Sherajee SJ, Rahman A, Sufiun A, Kobori H, et al. Role of the renal sympathetic nerve in renal glucose metabolism during the development of type 2 diabetes in rats. *Diabetologia*. 2015;58(12):2885-98.
34. Chi TC, Liu IM, Cheng JT. Less of insulin desensitization in sympathetic nerve terminals from wistar rats with insulin resistance. *J Auton Nerv Syst*. 2000;80(1-2):80-4.
35. Sansbury BE, Hill BG. Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 2014;73:383-99.
36. Raji A, Williams GH, Xavier PN, Hopkins PN, Hunt SC, Hollenberg NK, et al. Insulin resistance is affected by sodium intake in nonmodulating subset of essential hypertension. *Am J Hypertens*. 2000;13(4 Pt 2):8A.
37. González-Timón B, González-Muñoz M, Zaragoza C, Lamas S, Melián EM. Native and oxidized low density lipoproteins oppositely modulate the effects of insulin-like growth factor I on VSMC. *Cardiovasc Res*. 2004;61(2):247-55.
38. Li F, Xia K, Sheikh MS, Cheng J, Li C, Yang T. Retinol binding protein 4 promotes hyperinsulinism-induced proliferation of rat aortic smooth muscle cells. *Mol Med Rep*. 2014;9(5):1634-40.
39. Liao Y, Asakura M, Takashima S, Ogai A, Asano Y, Shintani Y, et al. Celiprolol, a vasodilatory beta-blocker, inhibits pressure overload-induced cardiac hypertrophy and prevents the transition to heart failure via nitric oxide-dependent mechanisms in mice. *Circulation*. 2004;110(6):692-9.
40. Yamada Y, Eto M, Ito Y, Mochizuki S, Son BK, Ogawa S, et al. Suppressive role of PPAR γ -regulated endothelial nitric oxide synthase in adipocyte lipolysis. *PLoS One*. 2015;10(8):e0136597.
41. Choi JW. Enhanced nitric oxide production is closely associated with serum lipid concentrations in adolescents. *Clin Chim Acta*. 2004;347(1-2):151-6.
42. Moller DE. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11(6):212-7.
43. Olivetti G, Cigola E, Maestri R, Lagrasta C, Corradi D, Quaini F. Recent advances in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2000;45(1):68-75.
44. Rosen SD, Boyd H, Rhodes CG, Kaski JC, Camici PG. Myocardial beta-adrenoceptor density and plasma catecholamines in syndrome X. *Am J Cardiol*. 1996;78(1):37-42.
45. Miotto AM. Lipidic profile and adrenergic sensitivity in right atrium isolated from normo and hyperlipidemic rats treated or not with *Croton cajucara* Benth infuse. *Campinas (SP): Unicamp*; 2001.