MICHELLA SOARES COELHO

**OBESIDADE INDUZIDA POR RESTRIÇÃO
CRÔNICA NO CONSUMO DE SAL NA DIETA:
AVALIAÇÃO DO PERFIL HORMONAL E DO
APETITE EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências na área de Farmacologia.

São Paulo - SP
2001

MICHELLA SOARES COELHO

**OBESIDADE INDUZIDA POR RESTRIÇÃO CRÔNICA
NO CONSUMO DE SAL NA DIETA: AVALIAÇÃO DO
PERFIL HORMONAL E DO APETITE EM RATOS
WISTAR**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências na área de Farmacologia.

Área de concentração: **Farmacologia**

Orientador: **Prof. Dr. Joel C. Heimann**

São Paulo - SP
2001

Candidata: Michella Soares Coelho.

Título da Dissertação: Obesidade induzida por restrição crônica no consumo de sal na dieta: Avaliação do perfil hormonal e do apetite em ratos Wistar.

A Comissão dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a 10/04/2001, considerou a candidata:

☒ (X) Aprovada ☐ () Reprovada

1) Examinador(a): Maria Tereza Nunes

2) Examinador(a): Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia

3) Presidente: Joel Claudio Heimann

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do

Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Coelho, Michella Soares.

Obesidade induzida por restrição crônica no consumo de sal na dieta: Avaliação do perfil hormonal e do apetite em ratos Wistar / Michella Soares Coelho. -- São Paulo, 2001.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia.

Linha de pesquisa: Pressão arterial, obesidade e variação do consumo de sal na dieta.

Orientador: Heimann, Joel Claudio.

Versão do título para o inglês: Obesity induced by chronic salt restriction: evaluation of hormonal profile and appetite in Wistar rats.

Descritores: 1. Pressão arterial 2. Sal 3. Sódio 4. Ingestão alimentar 5. Perfil hormonal.

ICB/SBIB007/2001

Com amor,

Aos meus pais José de Arimatéia e Maria de Jesus,

Ao querido Waltinho,

Aos irmãos Michell e Maurício,

As amigas Wilma e Carla,

Pelo incentivo, apoio, compreensão, confiança e amor durante esses anos de estudo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Joel C. Heimann pela acolhida no Laboratório de Hipertensão Experimental da FMUSP, pela confiança e orientação exemplar neste projeto de pesquisa.

À Dra. Luzia Naôko Shinohara Furukawa pela co-orientação, disponibilidade e apoio constante que enriqueceram este trabalho.

À Farmacêutica Rosa T. Fukui pela colaboração na padronização e execução do estudo do decaimento de insulina.

À Dra. Miriam Stermán Dolnikoff pela colaboração no desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

Ao Walter Campestre e a Janice das Graças Pião da Silva pelo auxílio no cuidado diário dos animais de experimentação e dos materiais utilizados neste estudo.

À todos os amigos do Laboratório de Hipertensão Experimental da FMUSP.

Aos professores do curso de Ciências Biológicas da Fundação Universidade do Estado do Tocantins - UNITINS.

À FAPESP pela concessão de bolsa e financiamento deste projeto de pesquisa.

ÍNDICE

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

Resumo

1.INTRODUÇÃO	01
2.OBJETIVOS	07
3.MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1 Animais e tratamento	09
3.2 Procedimento cirúrgico: implantação de cateteres	09
3.3 Medida de pressão arterial direta	10
3.4 Medida de pressão arterial caudal - PAc	11
3.5 Consumo de ração e peso corpóreo	11
3.6 Avaliação hormonal	11
3.6.1 Dosagem de leptina	12
3.6.2 Dosagem de GH	12
3.6.3 Dosagem de insulina - INSh	12
3.6.4 Dosagem de tiroxina - T4	12
3.6.4.1 Método de remoção dos hormônios tiroideanos	13
3.6.4.2 Curva padrão de T4	14
3.6.5 Dosagem de triiodotironina - T3	14
3.6.5.1 Curva padrão de T3	15
3.6.6 Dosagem de tirotrofina - TSH	15
3.6.7 Decaimento da ¹²⁵ I-insulina - DEC-INS	15
3.6.7.1 Marcação da ¹²⁵ I-insulina	15

3.6.7.2 Procedimentos para o decaimento da ^{125}I -insulina	16
3.6.7.3 Determinação da ^{125}I -insulina	17
3.6.7.4 Insulinemia e glicemia basais	18
3.7 Análise estatística	19
4.RESULTADOS	
4.1 Pressão arterial e frequência cardíaca	26
4.2 Consumo de ração e peso corpóreo	29
4.3 Avaliação hormonal	32
4.4 Decaimento da ^{125}I -insulina	36
5.DISCUSSÃO	
5.1 Peso corpóreo e consumo de ração	46
5.2 Avaliação hormonal	47
5.3 Decaimento da ^{125}I -insulina	49
5.4 Pressão arterial e frequência cardíaca	51
6.CONCLUSÕES	55
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
8.ABSTRACT	67
9.ANEXOS	70

LISTA DE FIGURAS

01: Protocolo experimental geral	20
02A: Ratos Wistar no pós-operatório de implantação de cateteres	21
02B: Aparelhagem para medida de pressão arterial direta	21
03: Método de avaliação da pressão arterial caudal	22
04: Avaliação do consumo de ração e do peso corpóreo	23
05: Estudo do decaimento da ^{125}I -insulina	24
06A: Pressão arterial sistólica (PAS)	26
07A: Pressão arterial diastólica (PAD)	27
07B: Pressão arterial média (PAM)	27
08A: Pressão arterial caudal (PAc)	28
08B: Frequência cardíaca (FC)	28
09A: Peso corpóreo em ratos acondicionados 1 por gaiola de plástico (1G)	29
09B: Consumo de ração em ratos acondicionados em 1G	29
10A: Peso corpóreo em ratos acondicionados 4 por gaiola de plástico (4G)	30
10B: Consumo de ração em ratos acondicionados em 4G	30
11A: Peso corpóreo em ratos acondicionados 1 por gaiola metabólica (1GM)	31
11B: Consumo de ração em ratos acondicionados em 1GM	31
12A: Leptinemia (LEP)	33
12B: Hormônio de crescimento (GH)	33
13A: Insulinemia (INSh)	34
13B: T3 total plasmático	34
14A: T4 total plasmático	35
14B: TSH plasmático	35
15A: Hematócrito basal	37
16A: Glicemia basal (GLI)	38
16B: Insulinemia basal (INSr)	38
17A: Decaimento da ^{125}I insulina imunorreativa - DEC-INS-Ac (2 min curva)	39
17B: DEC-INS-Ac (6 min da curva)	39
18A: Meia-vida da ^{125}I -insulina imunorreativa (6 min da curva)	40
18B: Platô da ^{125}I -insulina imunorreativa (6 min da curva)	40

LISTA DE TABELAS

01: Efeito da variação no consumo de sal sobre as pressões arteriais sistólica (PAS), diastólica (PAD), média (PAM), caudal (PAC) e frequência cardíaca (FC). Variáveis medidas em ratos adultos alimentados com dieta HR, NO ou HO desde o desmame.	38
02: Consumo de ração e peso corpóreo de ratos adultos acondicionados 1 (1G) ou 4 (4G) por gaiola de plástico e 1 rato por gaiola metabólica (1GM). Variáveis medidas em ratos alimentados com dieta HR, NO ou HO desde o desmame.	38
03: Perfis dos hormônios leptina (LEP), GH, insulina (INSh), T4 total, T3 total e TSH. Variáveis medidas em ratos com 13 semanas de idade alimentados com dieta HR, NO ou HO desde o desmame.	39
04: Peso corpóreo (PC), hematócrito (Ht), Glicemia (GLI), insulinemia (INSr) basais. Variáveis medidas antes do decaimento da DEC-INS-Ac em ratos adultos alimentados com dieta HR, NO ou HO desde o desmame.	39
05: Decaimento da ^{125}I -insulina imunorreativa (DEC-INS-Ac). Variável medida em ratos adultos alimentados com dieta HR, NO ou HO desde o desmame.	40
06: Meia-vida da ^{125}I -insulina imunorreativa. Variável medida em ratos adultos alimentados com dieta HR, NO ou HO desde o desmame.	40
07: Platô da ^{125}I -insulina imunorreativa. Variável medida em ratos adultos alimentados com dieta HR, NO ou HO desde o desmame.	41

LISTA DE ABREVIATURAS

- 1G** - Um rato por gaiola de plástico
- 4G** - Quatro ratos por gaiola de plástico
- 1GM** - Um rato por gaiola metabólica
- CPM** - Contagem por minuto
- DEC-INS** - Decaimento da ^{125}I -insulina
- FC** - Frequência cardíaca
- GH** - Hormônio de crescimento
- HR** - Dieta hipersódica ou hiper
- HO** - Dieta hipossódica ou hipo
- INS-Ac** - ^{125}I -Insulina imunorreativa
- INSr** - Insulina (dosada com anticorpo anti-insulina de rato)
- INSh** - Insulina (dosada com anticorpo não específico para rato)
- i.p.** - Intra-peritonal
- LEP** - Leptina
- NO** - Dieta normossódica ou normo
- PA** - Pressão arterial
- PAS** - Pressão arterial sistólica
- PAc** - Pressão arterial caudal
- PAD** - Pressão arterial diastólica
- PAM** - Pressão arterial média
- PC** - Peso corpóreo
- RADIO-TOTAL** - Radioatividade total
- TSH** - Tirotrófina
- T3** - Triiodotironina total
- T4** - Tiroxina total

RESUMO

RESUMO

Em nosso laboratório foi demonstrado que ratos submetidos à restrição crônica de sal na dieta apresentaram maior peso corpóreo (PC), menor sensibilidade à insulina e alterações pressóricas em comparação com ratos submetidos à sobrecarga crônica de sal na dieta. No presente estudo, o objetivo foi avaliar alguns mecanismos de obesidade e alterações hormonais associados à dieta hipossódica. Foram utilizados ratos Wistar machos submetidos à dieta hipo (HO: 0,15% NaCl), normo (NO: 1,27% NaCl) ou hipersódica (HR: 7,94% NaCl) desde o desmame até 12 semanas de idade. Nestes animais foram realizadas medidas de pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC), consumo de ração, PC, perfil dos hormônios [leptina (LEP), GH, insulina (INSh - anticorpo anti-insulina humana), T3, T4 e TSH] e decaimento da ^{125}I -insulina (DEC-INS). O consumo de ração foi avaliado durante sete dias consecutivos com um (1G) ou quatro (4G) ratos por gaiola de plástico e com um rato por gaiola metabólica (1GM). O PC também foi medido neste período. Glicemia (GLI) e insulinemia (INSr - anticorpo anti-insulina de rato) basais foram quantificadas antes da realização do estudo do DEC-INS. Para avaliar o DEC-INS, foi injetado $1\mu\text{Ci}$ de ^{125}I -insulina humana pelo cateter implantado na veia jugular, após 6 a 8 horas de jejum fisiológico. As amostras de sangue foram coletadas pelo cateter implantado na carótida a cada 30 segundos durante 2 minutos e depois a cada 1 minuto até 10 minutos de experimento. Os resultados obtidos demonstraram que ratos submetidos à dieta HR apresentaram maior PA em comparação a ratos em dieta NO e HO. Os ratos submetidos à dieta HO apresentaram menor FC cardíaca em relação ao grupo NO. A

avaliação de ingestão alimentar revelou que ratos em dieta HR consumiram maiores quantidades de ração (1G e 4G) em comparação com ratos em dieta NO e HO. O grupo HO apresentou maior PC em comparação com os grupos de ratos NO e HR. Os ratos em dieta HR ou HO apresentaram níveis diminuídos de LEP em comparação com ratos submetidos à dieta NO. Os ratos que receberam dieta HO apresentaram níveis elevados de INSr em comparação com ratos em dieta HR e NO. Os ratos em dieta HR apresentaram níveis elevados de T4 total e níveis reduzidos de TSH em comparação com animais em dieta NO e HO. INSr e GLI basais foram maiores nos ratos em dieta HO do que nos ratos que receberam dieta HR e NO. O DEC-INS (decaimento exponencial) foi mais rápido no grupo HR demonstrado por meio de menor meia-vida da ^{125}I -insulina. Os resultados sugerem que maior PC nos ratos sob restrição salina crônica é devido a maior eficiência metabólica (maior PC e menor consumo de dieta) que pode estar relacionada com alterações hormonais e com a dieta HO.

Palavras-chave: Pressão arterial, sal, sódio, ingestão alimentar e perfil hormonal.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Inúmeros estudos demonstraram a existência de uma associação entre hiperinsulinemia e aumento da pressão arterial (Ferrannini et alii, 1987; Ferrari et alii, 1990; Lind et alii, 1995). Esta associação foi descrita pela primeira vez por Welborn e colaboradores em 1966. Seguiram-se a estes estudos, outros que verificaram um vínculo entre obesidade, resistência à insulina e hipertensão arterial (Weisser et alii, 1993; Toft et alii, 1998; Heise et alii, 1998). A hipertensão arterial essencial é aproximadamente duas vezes mais frequente nos indivíduos com alterações no metabolismo de carboidratos em comparação com a população dita normal (Fuller, 1985).

Atualmente, sabe-se que cerca de 50% dos pacientes portadores de hipertensão arterial essencial apresentam algum grau de resistência à insulina (Zavaroni et alii, 1992).

A resistência à insulina pode ser um fenômeno de origem genética ou adquirida, no qual concentrações fisiológicas de insulina provocam resposta subnormal no que se refere à captação de glicose pelas células musculares, adiposas e hepáticas (Ferrari et alii, 1990). A menor captação de glicose pelos tecidos está associada a uma maior produção de insulina pelo pâncreas, o que pode manter os níveis glicêmicos normais (Qiao et alii, 1998). Essa hiperinsulinemia aumenta a lipogênese acarretando sobrepeso e posterior obesidade (Modan et alii, 1985).

Um papel para hiperinsulinemia na gênese da hipertensão arterial encontra apoio, por exemplo, em demonstrações de que pacientes obesos submetidos ao treinamento físico, melhoram a sensibilidade à insulina e

também têm reduzida a sua pressão arterial. No entanto, presença de obesidade ou diabetes melito não são obrigatórias para que a resistência à insulina se associe com a hipertensão arterial (Ferrari et alii, 1990).

Nos últimos anos tem sido grande o interesse em verificar se resistência à insulina, hiperinsulinemia e obesidade contribuem para a patogênese da hipertensão arterial (Swislocki et alii, 1989; Agata et alii, 1996).

Em modelos animais de hipertensão arterial genética, como os ratos espontaneamente hipertensos (SHR), foi observada resistência à insulina e hiperinsulinemia quando comparados aos ratos normotensos Wistar Kyoto (Horl et alii, 1988). No entanto, esta resistência não é uma característica uniforme entre os SHR provenientes de diferentes fornecedores (Furukawa et alii, 1998).

Trabalhos recentes tem mostrado que a hiperinsulinemia em ratos SHR é devido a um "clearance" diminuído da insulina plasmática, principalmente pelos músculos esqueléticos e pelos rins, os quais são os principais locais onde a insulina é removida (Mondon et alii, 1989).

Diante do exposto, a hipertensão arterial essencial, obesidade e diabetes melito do tipo 2 são patologias que podem estar associadas à resistência à insulina e/ou hiperinsulinemia.

Estudos em indivíduos normotensos, hipertensos e em grandes populações mostraram que o cloreto de sódio exerce um papel importante na regulação da pressão arterial (Neneely et alii, 1958; McGregor et alii, 1989; Cutler et alii, 1991; Mascioli et alii, 1991; Law et alii, 1991). A partir deste conhecimento, tem sido recomendado a diminuição do consumo de NaCl na dieta como um dos tratamentos não medicamentosos para a hipertensão arterial (WHL, 1993; JNC VI 1997). No entanto, alguns estudos têm

mostrado também que esta restrição salina pode levar a uma diminuição na sensibilidade à insulina. Este fenômeno pode contribuir para uma piora na sensibilidade à insulina nos hipertensos, uma vez que eles, às vezes, já apresentam esta alteração. Resultados de estudos sobre esta temática não são uniformes. Em indivíduos normais, alguns demonstram que a restrição salina leva a uma diminuição da sensibilidade à insulina (Fliser et alii, 1995) e outros encontram o oposto (Donovan et alii, 1993), ou ainda, dieta hipossódica moderada à curto prazo parece não afetar a sensibilidade à insulina em indivíduos não obesos e normotensos (Grey et alii, 1996).

A recomendação de dieta hipossódica para tratamento não medicamentoso de pacientes com hipertensão arterial ainda gera discussões, apesar de não haver mais dúvidas que níveis elevados cronicamente de pressão arterial estão associados a uma maior incidência de riscos cardiovasculares e complicações renais. Talvez o ponto central destas discussões esteja associado aos diversos métodos utilizados para avaliar os efeitos desencadeados pelo consumo de sal na dieta. Estas divergências de resultados, para muitos autores ainda dificultam a recomendação da diminuição no consumo de sal pela população como prevenção ou para tratamento totalmente benéfico em pacientes hipertensos. Alguns trabalhos têm mostrado aspectos positivos referentes à diminuição do consumo de sal na dieta, entre eles: diminuição da pressão arterial e possível redução na incidência de câncer gástrico, de asma e osteoporose (MacGregor et alii, 1989). Por outro lado, aspectos negativos têm sido relatados, tais como, resistência à insulina, aumento da atividade da renina plasmática, aumento da aldosterona plasmática, diminuição da função sexual e aumento da atividade do sistema nervoso simpático (Kaplan et alii, 2000). Diante de tais fatos, uma questão que surge é se a diminuição

do consumo de sal na dieta apresenta benefício ou não sobre a morbimortalidade associada à hipertensão arterial. Uma revisão sistemática da literatura referente à restrição de sal na dieta e pressão arterial, realizada por John Swales (2000) sugere que em termos populacionais não existem dados suficientes na literatura para recomendação da diminuição do consumo de sal na dieta como tratamento totalmente benéfico à saúde de pacientes hipertensos. No entanto, Norman Kaplan (2000) analisando dados também da literatura incluindo trabalhos epidemiológicos, observacionais e intervencionistas concluiu que a redução do consumo de sal na dieta apresenta mais efeitos positivos (regressão de hipertrofia ventricular esquerda, redução de proteinúria, redução na perda urinária de cálcio, maior proteção contra infarto do miocárdio entre outras) do que negativos para saúde.

Em nosso Laboratório foi demonstrado previamente que ratos submetidos cronicamente à restrição ou sobrecarga de sal na dieta, desenvolveram alterações nos níveis de pressão arterial e no metabolismo de glicose. Foi observado maior insulinemia durante o teste de tolerância à glicose no grupo sob dieta hipossódica enquanto a glicemia não diferiu entre os grupos de dieta. Em adipócitos isolados, foi constatada menor captação de glicose nas células de animais previamente submetidos à restrição crônica de sal. No entanto, o EC_{50} da captação de glicose pelos adipócitos destes animais não foi diferente entre os grupos estudados (da Costa et alii, 1997) o que significa ausência de diferenças na sensibilidade à insulina neste modelo.

Recentemente foi realizado um outro estudo no nosso Laboratório para avaliar a sensibilidade à insulina nestes mesmos modelos de ratos submetidos à restrição ou à sobrecarga salina crônica na dieta. Por meio do

"clamp" euglicêmico hiperinsulinêmico foi observado que o grupo com restrição salina apresentou uma menor sensibilidade à insulina em comparação com ratos alimentados com dieta normo ou hipersódica. Observou-se também alteração do "clearance" metabólico calculado da insulina em ratos com restrição salina crônica em comparação com ratos em dieta normo ou hipossódica. Uma outra verificação observada nestes estudos é um peso corpóreo maior nos ratos que consomem dieta pobre em sal (Prada et alii, 2000). Estes resultados obtidos em nosso laboratório levaram a determinadas questões que necessitam de esclarecimentos adicionais:

- 1) A diferença de peso corpóreo entre os grupos de dieta hipersódica, normossódica e hipossódica é decorrente do consumo variável de dieta?
- 2) Os perfis dos hormônios leptina, GH, insulina, T3, T4 e TSH não são semelhantes nos três grupos de dieta, podendo então explicar as diferenças de peso corpóreo e ingestão de alimentos nestes animais?
- 3) A medida direta do decaimento da insulina marcada com ^{125}I confirma ou não os resultados obtidos no "clearance" metabólico de insulina calculado?

OBJETIVOS

2.OBJETIVOS

1. Os objetivos do presente estudo foram avaliar alguns mecanismos de obesidade e alterações hormonais associados à variação crônica no consumo de sal na dieta em ratos Wistar. Os animais tratados com dieta hipossódica, normossódica ou hipersódica desde o desmame até a vida adulta foram submetidos as seguintes avaliações:

- Quantificação do consumo de ração e peso corpóreo;
- Medidas de pressão arterial direta, caudal e frequência cardíaca;
- Perfil dos hormônios insulina, leptina, hormônio do crescimento, tiroxina total, triiodotironina total e tirotrofina;
- Estudo do decaimento da ^{125}I insulina plasmática e
- Determinação da glicemia e hematócrito basais.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos realizados neste projeto de pesquisa estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - USP.

3.1 ANIMAIS E TRATAMENTO

Foram utilizados ratos Wistar machos provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP, que logo após o desmame foram divididos em três grupos e receberam dieta (ração modificada AIN93G, Harlan Teklad-TD, Madison-WI/EUA) hipossódica - HO (0,15% NaCl ou 0,06% Na⁺ e 25% de proteínas, TD 92141), normossódica - NO (1,27% NaCl ou 0,5% de Na⁺ e 25% de proteínas, TD 92140) ou hipersódica - HR (7,94% NaCl ou 3,12% de Na⁺ e 25% de proteínas, TD 92142) ad libitum até 12 semanas de idade. Água potável também foi fornecida ad libitum.

Os ratos foram acondicionados em gaiolas de plástico (40x33cm) com 5 animais por gaiola em ambiente mantido a 25°C, com ciclos claro-escuros (12/12 horas).

Pressão arterial, peso corpóreo, ingestão alimentar, perfil hormonal, decaimento de insulina plasmática foram avaliados em ratos nos três grupos de dieta ao completarem 12 semanas de idade (Figura 1).

3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO: implantação de cateteres

Os animais com 12 semanas de idade foram anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol 3% - 40mg/kg/peso, i.p.) e submetidos a

cirurgia para implante de cateteres de polietileno (tubos PE 50, Intramedic Inc, Becton Dickinson, Sparks, MD - EUA) na artéria carótida e veia jugular esquerdas. Os cateteres foram exteriorizados na face dorsal do pescoço do animal (Figura 2A) e preenchidos com solução de heparina sódica (500U/mL) diluída em solução fisiológica. Durante o procedimento cirúrgico os animais foram mantidos aquecidos (37°C).

Após a cirurgia os ratos foram colocados em gaiolas de plástico individuais. O período de recuperação dos animais foram no mínimo de quatro dias. O cateter implantado na artéria carótida foi utilizado para a medida de pressão arterial direta e coleta de amostras de sangue e o da veia jugular para infusão de ^{125}I -insulina.

3.3 MEDIDA DE PRESSÃO ARTERIAL DIRETA

Após recuperação da cirurgia de implantação dos cateteres, os ratos foram colocados em sala apropriada pela manhã para a medida da pressão arterial direta sem restrição a movimentação. Esta aferição foi realizada conectando-se o cateter implantado na artéria carotídea a um transdutor de pressão (Gould Statham Instruments Inc, modelo P23DP, Hato Rey, Puerto Rico - EUA), que estava acoplado à um conversor de dados e a um amplificador (Stemtech Inc, GPA-4 modelo 2, Wisconsin - EUA) e que por sua vez estavam ligados a um computador. Após um período de estabilização da pressão arterial do animal foi realizado um registro de 30 minutos para cada rato (Figura 2B). Um sistema de aquisição de dados (DATAQ Instruments Inc, Ohio - USA) foi utilizado para calcular as medidas de pressões arteriais sistólica (PAS), diastólica (PAD), média (PAM) e frequência cardíaca (FC). Estas medidas foram realizadas nos animais destinados ao estudo do decaimento da ^{125}I -insulina.

3.4 MEDIDA DE PRESSÃO ARTERIAL CAUDAL – PAc

Pela manhã os ratos foram colocados em sala apropriada (período de adaptação) e a PAc foi medida por método auscultatório-oscilométrico (Zatz et alii, 1990). Estas medidas foram realizadas em animais acordados, considerando apenas as obtidas na ausência de movimentação espontânea da cauda do animal. Para estas medidas de PAc foi considerada a média de 4 aferições consecutivas e o valor encontrado corresponde a pressão arterial média. Antes da obtenção de tais medidas os ratos foram treinados durante uma semana para se acostumarem a tal procedimento. Estas medidas foram realizadas nos animais destinados a avaliação do consumo de ração e do peso corpóreo (Figura 3).

3.5 CONSUMO DE RAÇÃO E PESO CORPÓREO

Para avaliação da quantidade de ração ingerida os ratos antes de completarem 12 semanas de idade foram subdivididos e acondicionados da seguinte forma: 4 ratos por gaiola de plástico (4G), 1 rato por gaiola de plástico (1G) e 1 rato por gaiola metabólica (1GM). Após um período de adaptação às novas condições de acondicionamento, com 12 semanas de idade, todos os ratos foram pesados e iniciou-se o oferecimento de quantidade conhecida de dieta (50 a 200g/dia/gaiola). No dia seguinte, era pesado o que sobrou da ração fornecida e também era medido o peso corpóreo dos ratos. Esse procedimento foi repetido durante 7 dias consecutivos e observando sempre o mesmo horário de avaliação (Figura 4).

3.6 AVALIAÇÃO HORMONAL

Os hormônios leptina, GH, insulina, tiroxina total, triiodotironina total e tirotrófina foram determinados em ratos com 13 semanas de idade.

As amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados e obtidas por decapitação dos ratos após jejum noturno, sem restrição à ingestão de água. Após centrifugação do sangue e separação do plasma, as amostras foram aliquotadas e armazenadas adequadamente (freezer -20°C) para posteriores dosagens.

3.6.1 Dosagem de Leptina - LEP

A LEP plasmática foi determinada pelo método de radioimunoensaio utilizando "kit" comercial específico para LEP de rato (Linco Research Inc, St. Louis, MO - EUA). O teste é considerado completamente homólogo, pois o anticorpo, o antígeno marcado com ^{125}I e os padrões são preparados com leptina de rato altamente purificada.

3.6.2 Dosagem de Hormônio do Crescimento - GH

O GH plasmático foi determinado pelo método de radioimunoensaio utilizando "kit" comercial específico para GH de rato (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Arlington Heights, IL - EUA).

3.6.3 Dosagem de Insulina - INSh

A insulina plasmática foi determinada também pelo método de radioimunoensaio utilizando "kit" comercial não específico para rato (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA - EUA).

3.6.4 Dosagem de Tiroxina - T4

O T4 total plasmático foi determinado pelo método de radioimunoensaio utilizando "kit" comercial (CIS Bio International, Bedford, MA - EUA) específico para teste de T4 total humano. Para realização das

dosagens de T4 total em ratos, a curva padrão foi realizada em duplicidade, a que vem no "kit" e uma outra, modificada adequadamente para rato por meio do método descrito por Samuels e colaboradores (1979) utilizando-se em substituição ao soro humano, soro de rato submetido a remoção de hormônios tiroideanos (descrito sumariamente a seguir).

3.6.4.1 Método de remoção dos hormônios tiroideanos

Para remoção dos hormônios tiroideanos do soro dos animais foi escolhido um método alternativo e eficiente usando resina trocadora de ânions básicos. A resina escolhida é usada para separações analíticas de alta resolução. Além disso, esse processo de remoção dos hormônios tiroideanos não modifica o conteúdo de proteínas das amostras utilizadas. Foi demonstrado que o soro tratado por esse procedimento é semelhante ao soro de animais tireoidectomizados.

Para remoção dos hormônios tiroideanos do soro de rato foi utilizada resina aniônica AG-1X-8 forma clorídrica de 200-400 poros (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA - EUA). As amostras de soro foram obtidas de ratos Wistar macho em jejum fisiológico diurno e misturadas com a resina na proporção de 50mg de resina para cada mL de soro.

A resina foi pesada e adicionada a um tubo de ensaio contendo 10mL de água destilada que, após homogeneização, foi centrifugado por 10 minutos a 3.000g. Após centrifugação foi descartado o sobrenadante e novamente são acrescentados 10mL de água. Esse processo de lavagem da resina foi repetido três vezes. Para a remoção dos hormônios tiroideanos, o soro de rato foi adicionado a resina em tubos de 50mL e incubado a temperatura ambiente num forno de hibridização por 15-18h (Amersham Life Science, UK - England) para manter a resina suspensa. Após a

incubação, a resina foi removida por duas centrifugações a 1.000g durante 10 minutos. Ao sobrenadante separado foi adicionada uma nova resina para uma nova remoção dos hormônios tiroideanos (todo o processo de incubação foi repetido e no final a resina é removida por centrifugação a 30.000g durante 20 minutos em temperatura ambiente). O soro livre dos hormônios tiroideanos foi esterilizado em filtro para seringa de 0,25µm (Millex®-Millipore, Bedford, MA - EUA). Desta forma o soro de rato estava pronto para ser utilizado na preparação da curva padrão dos hormônios tiroideanos de rato.

3.6.4.2 Curva padrão de T4

O soro de rato livre dos hormônios tiroideanos foi utilizado na preparação da curva padrão de T4 de ratos em paralelo com curva padrão para humano. O T4 (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO - EUA) foi pesado e diluído em 20µL de solução de NaOH 2N num balão volumétrico de 10mL que foi acertado com solução fisiológica 0,9% (solução mãe). O T4 foi diluído em solução de NaOH pois só é solúvel em soluções álcalis e salina. Por isso não deve ser adicionado diretamente nas amostras de soro do rato. A partir dessa solução mãe foram realizadas as diluições necessárias para preparação da curva padrão nas concentrações desejadas (400, 200, 100, 50, 25 e 12,5 ng de T4 por mL de soro).

3.6.5 Dosagem de triiodotironina - T3

A dosagem de T3 total plasmático foi realizada pelo método de radioimunoensaio utilizando "kit" comercial (CIS Bio International, Bedford, MA - EUA) específico para teste de T3 humano.

Para realização das dosagens de T3 total em ratos, a curva padrão foi

modificada adequadamente através de método descrito por Samuels e colaboradores (1979) e detalhado no item 3.6.4.1.

3.6.5.1 Curva padrão de T3

O soro de rato livre dos hormônios tiroideanos foi utilizado na preparação de uma nova curva no kit de T3 em paralelo com curva padrão para humano. Para preparação da curva padrão de T3 de ratos foram utilizadas as concentrações de 300; 10; 5; 2,5; 1,25; e 0,62 ng de T3 por mL de soro (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO - EUA). A curva padrão foi preparada conforme descrito no item 3.6.4.2.

3.6.6 Dosagem de tirotrofina - TSH

O TSH plasmático foi determinado pelo método de radioimunoensaio utilizando "kit" comercial específico para TSH de rato (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Arlington Heights, IL - EUA).

3.6.7 Decaimento da ^{125}I -insulina - (DEC-INS)

Este protocolo foi montado para determinar o DEC-INS in vivo utilizando insulina marcada com iodo 125. Tal marcação não altera a atividade biológica desse hormônio e é altamente reconhecida por anticorpo anti-insulina específico.

3.6.7.1 Marcação da ^{125}I -insulina

A insulina cristalina humana recombinante é marcada com iodo 125 no aminoácido tirosina A¹⁴ com alta atividade específica de 2000Ci/mmol (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL - EUA). Esta marcação com ^{125}I foi realizada pela Amersham por iodação de insulina sintética

utilizando iodeto de sódio ^{125}I e cloramina T, sendo purificada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). O produto vem liofilizado e foi diluído para sua utilização.

A eficiência dessa marcação foi verificada no laboratório de Endocrinologia FMUSP por meio de:

- porcentagem de precipitação da insulina marcada com TCA 10%. Aceitou-se somente uma precipitação maior que 95%.
- porcentagem de insulina marcada reconhecida pelo anticorpo específico. Aceitou-se somente um reconhecimento da insulina maior que 80%.

3.6.7.2 Procedimentos para o decaimento da ^{125}I -insulina

O conteúdo da ampola da ^{125}I -insulina liofilizada foi reconstituída em 110 μL de água Milli-Q e dividido em 8 frações de 12 μL em microtubos apropriados (uma ampola de ^{125}I -insulina corresponde a 10 $\mu\text{Ci}/100\mu\text{L}$). Para sua utilização, cada fração de 12 μL da ^{125}I -insulina reconstituída foi diluída em 350 μL de solução salina contendo 0,25% de albumina sérica bovina (BSA - Sigma Chemical CO, St. Louis, MO - EUA) devidamente esterilizada em filtro para seringa de 0,25 μm (Millex®-Millipore, Bedford, MA - EUA). Esta solução da ^{125}I -insulina diluída foi posteriormente injetada nos ratos.

A determinação do decaimento da ^{125}I -insulina foi avaliado em ratos adultos após aferição da pressão arterial direta na condição de jejum fisiológico diurno de seis a oito horas. Foram coletadas amostras de sangue para determinações basais de hematócrito, insulinemia e glicemia antes da administração da ^{125}I -insulina.

Após a administração em dose única de 200 μL da solução de ^{125}I -insulina (cerca de 1 μCi) pelo cateter implantado na jugular, este cateter foi lavado com 200 μL de solução salina contendo BSA 0,25%. Em seguida foram

coletadas amostras de 100 μ L de sangue arterial pelo cateter implantado na carótida em tubos eppendorf contendo 0,1 μ L de heparina pura, a cada 30 segundos até os primeiros 2 minutos e em seguida a cada 1 minuto até 10 minutos de experimento. Entre as coletas de amostras foi desprezado o volume morto de sangue contido no cateter implantado na carótida. As amostras de sangue coletadas permaneceram em gelo fundente (0°C) até o procedimento seguinte para evitar qualquer desnaturação (ação de proteases séricas) no material colhido.

Após o término do experimento todos os ratos foram sacrificados com uma dose letal de anestésico e descartados adequadamente.

3.6.7.3 Determinação da 125 I-insulina

Cada uma das amostras de sangue colhidas durante o estudo do decaimento da 125 I-insulina foi centrifugada rapidamente por 1 minuto a 3.000-7.000g (Centrimicro, modelo 212, Fanem, São Paulo, SP - Brasil) e a porção plasmática foi dividida em 2 alíquotas. Uma alíquota de 40 μ L de plasma foi colocada em tubos de 12x75mm para determinação da radioatividade total das amostras (RADIO-TOTAL). A segunda alíquota também de 40 μ L foi utilizada para a determinação da 125 I-insulina imunorreativa (INS-Ac), ou seja, reconhecida pelo anticorpo anti-insulina específico.

A segunda fração plasmática foi transferida para tubos de 12x75mm descartáveis mantidos em gelo fundente e contendo 150 μ L de tampão Tris (Hydroximetil) 0,1moles/L pH 7,5 e com 0,25% de BSA. Estas amostras foram incubadas durante 20 a 24 horas a 4°C com 100 μ L de anticorpo anti-insulina específico em excesso - diluição 1/1000 (anticorpo I8510, lote

024H815, Sigma Chemical CO, St. Louis, MO - EUA). Este anticorpo anti-insulina reconhece até 100% de insulina humana recombinante.

Em seguida os tubos foram agitados (Vortex Mixer, modelo R51, Fanem, São Paulo, SP - Brasil) por cinco segundos. Para incubação as amostras foram cobertas com papel alumínio e acondicionadas em geladeira a 4°C.

Após o período de incubação o complexo antígeno-anticorpo formado foi precipitado com 500µL de solução gelada de polietilenoglicol a 16% (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO - EUA) diluído em tampão TRIS 0,1moles/L de pH 7,5 com Tween 20 (Sigma Chemical CO, St. Louis - MO/USA) a 0,1%. O Tween 20 é um detergente usado para diminuir as ligações inespecíficas do complexo antígeno-anticorpo. Os tubos foram homogeneizados com auxílio de um agitador por cinco segundos. Em seguida procedeu-se a centrifugação a 2.000g durante 20 minutos a 4°C (centrífuga refrigerada IEC Centra-8R, International Equipment CO, Needham Heights, MA - EUA) e posterior aspiração do sobrenadante com ajuda de uma bomba compressora adaptada para coleta de material radioativo.

As duas alíquotas de plasma, a primeira destinada à determinação da RADIO-TOTAL e a segunda da INS-Ac foram medidas por cinco minutos num contador automático de radiação gama (modelo Cobra 500 - Packard, Meriden, CT - EUA) - (figura 5).

3.6.7.4 Insulinemia e glicemia basais

Tais variáveis foram avaliadas como medidas basais antes do início do decaimento da ¹²⁵I-insulina. A concentração basal da insulina (INSr) foi determinada pelo método de radioimunoensaio com anticorpo anti-insulina específico para ratos (Linco Research, St. Louis, MO - EUA).

A glicemia basal (GLI) foi determinada por meio de tiras reativas analisadas em glicosímetro (Advantage Boehringer Mannheim, EUA) com limite de detecção de 10-600mg/dL.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos estão expressos como média e desvio padrão da média. Foi utilizada análise de variância de 1 fator (One-Way ANOVA) seguida do teste de Tuckey para comparação de três ou mais médias.

Regressão não linear para decaimento exponencial de uma fase foi calculada nos resultados do decaimento da ^{125}I -insulina expressos em porcentagem por minuto. Meia-vida e o platô da ^{125}I -insulina obtidos na regressão não linear foram comparados entre os grupos de dieta estudados.

Foi adotado nível de significância menor que 5%.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL GERAL

Figura 1: Protocolo experimental geral - Avaliação da pressão arterial, peso corpóreo, consumo de ração, perfil hormonal e decaimento da insulina em ratos adultos submetidos à dieta HR, NO ou HO desde o desmame.

A)

B)

Figuras 2: A) Ratos Wistar no pós-operatório de implantação de cateteres na veia jugular e artéria carótida e B) Aparelhagem para medida de pressão arterial direta.

Pressão arterial caudal

Método osciloscópio-oscilométrico

Figura 3: Método de avaliação da pressão arterial caudal em ratos adultos submetidos à dieta hiper (HR) , normo (NO) ou hipossódica (HO) desde o desmame.

Peso corpóreo e consumo de ração

Figura 4: Avaliação do consumo de ração e do peso corpóreo em ratos Wistar adultos submetidos à dieta hiper (HR) , normo (NO) ou hipossódica (HO) desde o desmame.

Decaimento da ^{125}I -insulina

- 1) Jejum fisiológico: 6 a 8 horas.
- 2) Coleta de amostras de sangue basais: INS, GLI, Ht.
- 3) Injeção em dose única: $1\mu\text{Ci}$ de ^{125}I -insulina.
- 4) Coleta de sangue: 30 sec até 2 min e depois a cada 1 min até 10 min.

Figura 5: Estudo do decaimento da ^{125}I -insulina em ratos adultos submetidos à dieta hiper (HR), normo (NO) ou hipossódica (HO) desde o desmame.

RESULTADOS

4.RESULTADOS

As tabelas ora referidas no texto encontram-se no final deste capítulo.

4.1 PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA

O grupo de animais que foi submetido à sobrecarga salina crônica desde o desmame até 12 semanas de idade apresentaram maiores pressões arteriais sistólica (PAS - $p<0,001$), diastólica (PAD - $p<0,001$), média (PAM - $p<0,01$) e caudal (PAC - $p<0,001$) quando comparados com ratos em dieta normo ou hipossódica (Figuras 6, 7A, 7B e 8A - Tabela 1). Os resultados obtidos de PAC foram concordantes com os encontrados nas medidas de PAM. Os ratos alimentados com dieta hipossódica apresentaram menor ($p<0,05$) frequência cardíaca quando comparados com ratos que receberam dieta normossódica (Figura 8B - Tabela 1).

Figura 6: Pressão arterial sistólica (PAS) medida em ratos com 12 semanas de idade alimentados com dieta hiper (HR), normo (NO) ou hipossódica (HO) desde o desmame.

Figuras 7: A) Pressão arterial diastólica (PAD) e **B)** pressão arterial média (PAM) medidas em ratos com 12 semanas de idade alimentados com dieta hiper (HR), normo (NO) ou hipossódica (HO) desde o desmame.

Figuras 8: A) Pressão arterial caudal (PAC) e **B)** frequência cardíaca (FC) medidas em ratos com 12 semanas de idade alimentados com dieta hiper (HR), normo (NO) ou hipossódica (HO) desde o desmame.

4.2 CONSUMO DE RAÇÃO E PESO CORPÓREO

O peso corpóreo dos ratos hipossódicos acondicionados na forma de 1G foi maior ($p < 0,001$) em comparação com ratos submetidos à dieta normo ou hipersódica (Figura 9A - Tabela 2). No entanto, quando neste mesmo período foi avaliada a quantidade de ração ingerida, os ratos em dieta hipersódica apresentaram maior ($p < 0,01$) consumo de ração em comparação com ratos submetidos à dieta normo ou hipossódica (Figura 9B - Tabela 2).

A)

B)

Figuras 9: A) Peso corpóreo e B) consumo de ração avaliados em ratos com 12 semanas de idade acondicionados em 1G e alimentados com dieta hiper (HR), normo (NO) ou hipossódica (HO) desde o desmame.

O peso corpóreo de ratos acondicionados 4 por gaiola de plástico (4G) foi semelhante ao padrão encontrado no grupo 1G, ou seja, o grupo hipossódico apresentou maior ($p<0,001$) peso corpóreo em comparação aos outros dois grupos de dieta, enquanto os ratos hipersódicos consumiram maior ($p<0,01$) quantidade de ração em comparação aos ratos normo ou hipossódico (Figuras 10A e 10B - Tabela 2).

Figuras 10: A) Peso corpóreo e **B)** consumo de ração avaliados em ratos com 12 semanas de idade acondicionados na forma de 4G e alimentados com dieta hiper (HR), normo (NO) ou hipossódica (HO) desde o desmame.

Os ratos acondicionados na forma de 16M e submetidos à dieta hipossódica apresentaram maior ($p<0,001$) peso corpóreo em comparação aos outros dois grupos de dieta. No entanto, o consumo de ração no grupo hipossódico foi menor ($p<0,05$) em comparação aos grupos hiper ou normossódico (Figuras 11A e 11B - Tabela 2).

A)

B)

Figuras 11: **A)** Peso corpóreo e **B)** consumo de ração avaliados em ratos com 12 semanas de idade acondicionados 16M e alimentados com dieta hiper (HR), normo (NO) ou hipossódica (HO) desde o desmame.

4.3 AVALIAÇÃO HORMONAL

Os valores basais de leptina (LEP), hormônio de crescimento (GH), insulina (INSh), tiroxina total (T4), triiodotironina total (T3) e tirotrofina (TSH) foram determinados em ratos adultos com 13 semanas de idade em jejum alimentar e água potável foi fornecida ad libitum.

Os ratos submetidos à dieta hipersódica ou hipossódica apresentaram níveis menores ($p < 0,05$) de leptina em comparação com os ratos alimentados com dieta normossódica (Figura 12A - Tabela 3).

Tal perfil foi mantido para os valores de GH plasmático, ou seja, ratos submetidos à dieta hipersódica ou hipossódica apresentaram níveis menores ($p < 0,001$) de GH plasmático em comparação com animais submetidos à dieta normossódica (Figura 12B - Tabela 3).

Os ratos que foram alimentados cronicamente com dieta hipossódica apresentaram níveis elevados ($p < 0,05$) de insulina basal em comparação com os resultados obtidos de ratos submetidos à dieta hipersódica ou normossódica (Figura 13A - Tabela 3).

Não houve diferença significativa de T3 total plasmático entre os três grupos de dieta estudados (Figura 13B - Tabela 3).

O grupo de ratos que recebeu sobrecarga crônica de sal apresentou níveis aumentados ($p < 0,01$) de T4 total plasmático em comparação com ratos em dieta normossódica (Figura 14A - Tabela 3).

O grupo de rato que recebeu dieta hipersódica apresentou níveis reduzidos ($p < 0,001$) de TSH plasmático em comparação com os ratos submetidos à dieta normossódica (Figura 14B - Tabela 3).

Figuras 12: A) Leptinemia e **B)** GH plasmático dosados em ratos com 13 semanas de idade alimentados com dieta hiper (HR), normo (NO) ou hipossódica (HO) desde o desmame.

Figuras 13: A) Insulinemia (INS) e **B)** T3 total plasmático dosados em ratos de 13 semanas de idade alimentados com dieta hiper (HR), normo (NO) ou hipossódica (HO) desde o desmame.

Figuras 14: A) T4 total e **B)** TSH plasmático dosados em ratos com 13 semanas de idade alimentados com dieta hiper (HR), normo (NO) ou hipossódica (HO) desde o desmame.

4.4 DECAIMENTO DA ^{125}I -INSULINA - DEC-INS

Antes da avaliação do DEC-INS foram medidos peso corpóreo, hematócrito, glicemia e insulinemia em ratos adultos submetidos a jejum de 6 a 8 horas diurno e sem restrição a água.

O peso corpóreo foi utilizado como parâmetro de verificação da repercussão do procedimento cirúrgico sobre a saúde dos animais. Os valores de peso corpóreo não apresentaram diferenças significativas entre o pré e pós-cirúrgico dos ratos submetidos ao implante de cateteres. No entanto, quando foi realizada uma análise do peso corpóreo entre os grupos de dieta estudados, observou-se que o grupo hipossódico apresentou maior ($p < 0,001$) peso corpóreo em comparação com os outros dois grupos de dieta no pré-cirúrgico dos animais. Esta diferença significativa manteve-se no pós-cirúrgico, sugerindo que não houve influências do procedimento cirúrgico sobre o peso corpóreo destes ratos (Tabela 4).

Os valores obtidos de hematócrito no pré e pós-cirúrgico dos ratos não mostraram diferenças significativas entre os três grupos de dieta estudados (Figura 15A e Tabela 4).

A glicemia nos três grupos de dieta permaneceu dentro de uma faixa que é considerada normal para os seres humanos. O grupo de ratos submetidos à dieta hipossódica apresentou maior ($p < 0,01$) glicemia basal em comparação aos grupos tratados com dieta hipersódica ou normossódica (Figura 16A - Tabela 4).

Os ratos submetidos à dieta hipossódica apresentaram níveis elevados ($p < 0,001$) de insulinemia (INSr) em comparação com os outros dois grupos de dieta estudados (Figura 16B - Tabela 4).

Os resultados obtidos para o estudo do RADIO-TOTAL e INS-Ac são expressos em cpm (Anexos A e B, respectivamente). Estes valores foram transformados para porcentagem por minuto (Anexos C e D, respectivamente). Regressão não linear para decaimento exponencial de 1 fase foi calculada somente para os valores da INS-Ac expressos em porcentagem por minuto (Anexos E, F e G, respectivamente). Na figura 17A está demonstrado o decaimento da INS-Ac nos 2 primeiros minutos do experimento e na figura 17B nos 6 primeiros minutos do experimento. O grupo de ratos submetidos à sobrecarga crônica de sal na dieta apresentou menor ($p=0,05$) meia-vida da INS-Ac em comparação com ratos alimentados com dieta hipo ou normossódica, sugerindo maior velocidade de decaimento e menor permanência INS-Ac no sangue circulante destes animais (Figura 18A - Tabela 4). O platô INS-Ac não foi diferente entre os três grupos de dieta estudados (Figura 18B - Tabela 4).

Figura 15: A) Hematócrito basal medido em ratos com 12 semanas de idade em jejum fisiológico diurno. Ratos submetidos à dieta hiper (HR), normo (NO) ou hipossódica (HO) desde o desmame.

Figuras 16: A) Glicemia e B) Insulinemia (INSr) basais medidas em ratos com 12 semanas de idade em jejum fisiológico diurno. Ratos submetidos à dieta hiper (HR), normo (NO) ou hipossódica (HO) desde o desmame.

Figuras 17: A) Decaimento da ^{125}I -insulina imunorreativa (DEC-INS-Ac) calculada considerando os resultados obtidos nos 2 primeiros minutos e **B)** DEC-INS-Ac considerando os resultados obtidos nos 6 primeiros minutos das curvas. Resultados obtidos em ratos com 12 semanas de idade e alimentados com dieta HR, NO ou HO desde o desmame.

Figuras 18: A) Meia-vida e **B)** Platô da ^{125}I -insulina imunorreativa (INS-Ac) considerando os valores obtidos nos 6 primeiros minutos das curvas. Resultados obtidos em ratos com 12 semanas de idade e alimentados com dieta HR, NO ou HO desde o desmame.

Tabela 01: Efeito da variação no consumo de sal sobre as pressões arteriais sistólica (PAS), diastólica (PAD), média (PAM), caudal (PAC) e frequência cardíaca (FC). Variáveis medidas em ratos adultos alimentados com dieta HR, NO ou HO desde o desmame.

	DIETA HR	n	DIETA NO	n	DIETA HO	n
PAS (mmHg)	151±11,7 *	8	124±4,9	9	125±4,8	7
PAD (mmHg)	129±7,1*	8	99±12,1	9	98±5,4	7
PAM (mmHg)	139±12,3 *	8	111±4,3	9	112±4,8	7
PAC (mmHg)	136±2,7 *	4	123±2,2	4	121±1,7	4
FC (bpm)	349±15,6	8	371±18,7	9	345±26,2 **	7

Os resultados obtidos estão expressos como média e desvio padrão da média. *p<0,001 vs. NO e HO, **p<0,05 vs. NO.

Tabela 02: Consumo de ração e peso corpóreo de ratos adultos acondicionados 1 (1G) ou 4 (4G) ratos por gaiola de plástico e 1 rato por gaiola metabólica (1GM). Variáveis medidas em ratos alimentados com dieta HR, NO ou HO desde o desmame.

	DIETA HR	n	DIETA NO	n	DIETA HO	n
CONSUMO DE RAÇÃO						
1G (g/rato/dia)	25,62±2,1 *	7	20,1±1	5	19,78±2,1	9
4G (g/rato/dia)	22,66±2,7 *	8	19,32±1,9	4	18,14±1,2	8
1GM (g/rato/dia)	18,85±1,1	5	18,38±1,3	5	16,49±1,2 **	6
PESO CORPÓREO						
1G (g/rato/dia)	391,3±4,8	7	378,9±2,6	5	424,4±5,6 ***	9
4G (g/rato/dia)	386,8±3,6	8	374,4±3,2	4	403,9±6,2 ***	8
1GM (g/rato/dia)	379±1,9	5	385,3±2,1	5	406,6±1,7 ***	6

Os resultados estão expressos como média e desvio padrão da média. *p<0,01 vs. NO e HO, **p<0,05 vs. HR e NO, ***p<0,001 vs. HR e NO.

Tabela 03: Perfil dos hormônios leptina (LEP), GH, insulina (INSh), T4 total, T3 total e TSH plasmáticos. Variáveis medidas em ratos com 13 semanas de idade alimentados com dieta HR, NO ou HO desde o desmame.

	DIETA HR	n	DIETA NO	n	DIETA HO	n
LEP (ng/mL)	2,26±1,8	11	5,01±1,8 *	9	2,61±1,51	8
GH (ng/mL)	9,29±2,46	17	33,29±19,60+	8	11,27±3,82	7
INSh (μU/mL)	8,9±2,5	8	8,33±2,15	11	13,45±4,97++	13
T4 (ng/mL)	34,75±4,9 **	10	21,92±9,6	9	27,55±7	11
T3 (ng/mL)	0,74±0,11	10	0,79±0,16	12	0,76±0,18	14
TSH (ng/mL)	4,93±1,61***	12	7,41±3,31	11	5,51±1,18	13

Os resultados estão expressos como média e desvio padrão da média. *p<0,05 vs. HR e HO, +p<0,001 vs. HR e HO, ++p<0,05 vs. HR e NO, **p<0,01 vs. NO, ***p<0,05 vs. NO.

Tabela 04: Peso corpóreo (PC) hematócrito (Ht), glicemia (GLI) e insulinemia (INSr) basais. Variáveis medidas antes do DEC-INS em ratos adultos alimentados com dieta HR, NO ou HO desde o desmame.

	DIETA HR	n	DIETA NO	n	DIETA HO	n
PC (g) Pré-cirurgia	399,1±7,66	8	390,1±5,82	9	421±19,56*	7
PC (g) Pós-cirurgia	398,4±6,54	8	388,7±7,58	9	419±18,09*	7
Ht (%) Pré-cirurgia	50±1,3	8	49,29±1,4	9	50,7±2,4	7
Ht (%) Pós-cirurgia	49,63±0,9	8	48,44±1	9	48,37±1,3	7
GLI (ng/mL)	90,4±6,3	8	85,9±7,2	9	103,6±6,6 **	7
INSr (μU/mL)	47±13,1	8	37,0±14,6	5	102,6±23,4 **	7

Os resultados estão expressos como média e desvio padrão da média. *p<0,01 vs. HR e NO, **p<0,05 vs. HR e NO.

Tabela 05: Decaimento da ^{125}I -insulina imunorreativa (DEC-INS-Ac). Variável medida em ratos adultos alimentados com dieta HR, NO ou HO desde o desmame.

DEC-INS-Ac (%)						
Tempo (min)	DIETA HR	n	DIETA NO	n	DIETA HO	n
0.50	100±0	8	100±0	9	100±0	7
1.0	52,28±11,30	7	66,37±8,53	9	68,74±8,88	7
1.50	34,51±6,39	7	40,82±6,71	7	42,50±4,77	7
2.0	25,06±6,87	8	28,41±5,59	9	28,97±3,83	7
2.50	-	-	18,77±3,43	7	-	-
3.0	15,91±4,99	8	16,33±4,44	9	19,42±3,63	7
4.0	11,02±3,10	8	12,52±4,12	9	13,48±1,92	7
5.0	8,88±3,19	8	9,88±4,25	9	10,99±1,73	7
6.0	7,78±2,48	8	9,28±2,67	9	9,86±1,95	7

Os resultados estão expressos como média e desvio padrão da média. Valores obtidos considerando apenas os 6 primeiros minutos da curva de decaimento da insulina.

Tabela 06: Meia-vida da ^{125}I -insulina imunorreativa (INS-Ac). Variável medida em ratos adultos alimentados com dieta HR, NO ou HO desde o desmame.

Meia-vida da INS-Ac (min)					
DIETA HR	n	DIETA NO	n	DIETA HO	n
0,4884	8	0,7745	9	0,6008	7
0,8479	7	0,6364	9	0,7747	7
0,4629	7	0,5425	7	0,6611	7
0,3153	8	0,9928	9	0,6646	7
0,5982	8	0,7118	7	0,9207	7
0,6482	8	0,6297	9	0,6646	7
0,4949	8	0,6131	9	0,6944	7
0,5864	8	0,5996	9		
		0,7561	9		
0,55±0,16 *		0,69±0,13		0,73±0,16	

Valores expressos em média e desvio padrão da média. *p=0,05 vs. NO e HO.

Tabela 07: Platô da ^{125}I -insulina imunorreativa (INS-Ac). Variável medida em ratos adultos alimentados com dieta HR, NO ou HO desde o desmame.

Platô da INS-Ac (%)					
DIETA HR	n	DIETA NO	n	DIETA HO	n
13,970	8	14,720	9	6,932	7
11,300	7	15,410	9	9,304	7
6,457	7	8,966	7	11,840	7
9,310	8	3,820	9	10,620	7
8,379	7	5,707	7	11,840	7
8,015	8	7,550	9	8,382	7
8,765	8	8,187	9		
9,261	8	7,990	9		
		5,767	9		
9,4 $\pm$ 2,3		8,7 $\pm$ 3,9		8,9 $\pm$ 2	

Valores expressos em média e desvio padrão da média.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1 PESO CORPÓREO E CONSUMO DE RAÇÃO

O peso corpóreo na 12^a semana de vida dos ratos que consumiram dieta hipossódica desde o desmame foi maior do que o peso dos ratos alimentados com dieta normo ou hipersódica independentemente da forma de acondicionamento (1G, 4G e 1GM). Esta verificação confirma resultados anteriores obtidos em outros estudos realizados em nosso laboratório (da Costa et alii, 1997; Prada et alii, 2000). No estudo de Prada e colaboradores foi verificado que ratos submetidos à dieta hipossódica desde o desmame até a vida adulta tem maior peso corpóreo acompanhado de maior massa de tecido adiposo (epididimal e retroperitoneal) e maior conteúdo de gordura na carcaça do que ratos que receberam dieta normo ou hipersódica.

Os mecanismos que mantêm o peso corpóreo dentro de limites considerados normais ainda não estão totalmente compreendidos. Um destes mecanismos é a regulação do apetite. Alguns estudos consideram que na gênese da obesidade, mecanismos que regulam o apetite podem estar alterados, fazendo com que o consumo de alimentos seja maior do que as necessidades metabólicas (Iossa et alii, 1999). Na tentativa de verificar se uma regulação alterada do apetite é um dos possíveis mecanismos pelos quais os ratos alimentados com dieta hipossódica apresentaram maior peso corpóreo, a ingestão alimentar destes ratos foi quantificada. Esta quantificação mostrou que as diferenças de peso corpóreo associadas à variação no consumo de sal não são diretamente decorrentes de modificações no apetite. Em outras palavras, os animais com peso maior ou menor não ingerem, respectivamente, mais ou menos ração, o que poderia

ser uma explicação para as diferenças encontradas de peso corpóreo. Um possível mecanismo responsável por maior peso corpóreo concomitante com menor consumo de ração ou vice-versa é uma alteração no metabolismo energético. Obesidade pode ser gerada na vigência de menor consumo de alimentos desde que ocorra uma redução proporcionalmente maior nas necessidades energéticas do organismo. Esta possível redução nas necessidades energéticas pode ser decorrente de vários mecanismos entre os quais alterações nos níveis e função de hormônios anabólicos e/ou catabólicos, além de modificações na atividade física e na termogênese.

É descrito na literatura que ratos jovens com maior ingestão calórica do que a requerida, aumentam a taxa metabólica e o excesso energético é liberado na forma de calor (termogênese), funcionando como um mecanismo de compensação que o organismo lança mão na tentativa de manter o peso corpóreo (Iossa et alii, 1995; Lionetti et alii, 1996). Este mecanismo talvez esteja ativado no grupo de ratos submetidos à sobrecarga crônica de sal, uma vez que estes animais consomem mais ração e tem peso corpóreo menor do que o observado no grupo sob restrição de sal na dieta. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a quantidade de sal na dieta exerce influências sobre o ganho de peso corpóreo em ratos Wistar. No entanto, outros estudos são necessários para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na associação entre peso corpóreo e ingestão alimentar de sal.

5.2 AVALIAÇÃO HORMONAL

Na tentativa de entender melhor os mecanismos responsáveis pela concomitância de maior peso corpóreo e menor ingestão de ração em ratos sob restrição crônica de sal, ou menor peso corpóreo e maior consumo de

ração em ratos submetidos à dieta hipersódica, as concentrações plasmáticas de alguns hormônios foram avaliadas em ratos adultos.

Os ratos submetidos à dieta hipersódica apresentaram níveis elevados de T4 total plasmático e níveis reduzidos de TSH plasmático em comparação com os ratos alimentados com dieta normo ou hipossódica. O T3 total no plasma foi semelhante entre os três grupos de dieta estudados. A maior concentração de T4 total no plasma dos ratos em dieta hipersódica pode ser uma explicação para um gasto energético maior nestes animais (tem menor peso mesmo consumindo maior quantidade de ração). Por que o T4 total plasmático está elevado nestes animais? A resposta a esta questão importante necessita de estudos adicionais. Os resultados sugerem que o T4 total plasmático que está sendo produzido pela glândula tireóide dos ratos sob sobrecarga de sal deve ser hormônio funcionalmente ativo, uma vez que o TSH plasmático é menor neste grupo. Um outro aspecto merecedor de comentário é a concomitância de T3 total plasmático semelhante nos três grupos de ratos estudados. Níveis aumentados T4 total em conjunto com T3 total plasmático normal sugerem fortemente um alteração funcional da enzima 5'-desiodase ou uma maior taxa de degradação de T3 total. A desiodase do tipo I encontrada principalmente no fígado, rins e musculatura esquelética é responsável pela produção de aproximadamente dois terços de todo o T3 do organismo (Barry et alii, 1992). De que maneira uma sobrecarga de sal na dieta pode explicar estas alterações permanece uma incógnita. No entanto, entre os vários estudos adicionais que se fazem necessários para melhor compreender este fenômeno, deve ser considerada a possibilidade de um efeito direto do NaCl ou indireto, mediado pelas alterações decorrentes do maior consumo de sal

sobre vias hormonais e/ou neurais, a saber: menor atividade do sistema renina-angiotensina, menor atividade do sistema nervoso simpático, maior atividade da via L-arginina-óxido nítrico, etc.

A leptina é um hormônio descoberto recentemente (Zhang et alii, 1994) e que entre outros efeitos, reduz o consumo de alimentos. Em virtude deste efeito, variações de leptina circulante podem ser uma explicação para os diferentes consumos de ração nos três grupos de ratos estudados.

Os ratos submetidos à dieta hipersódica ou hipossódica apresentaram níveis reduzidos de leptina em comparação com ratos alimentados com dieta normossódica. Este é um resultado intrigante, uma vez que a leptina secretada pelo tecido adiposo (proporcionalmente ao número e volume dos adipócitos) exerce um potente efeito redutor da gordura corporal (Golden et alii, 1997). No entanto, os ratos em dieta hipossódica que tem maior peso corpóreo, maior massa de tecido adiposo e maior conteúdo de gordura na carcaça não apresentaram maior leptinemia. O presente estudo não fornece informações que permitam uma explicação para este fato. Um aspecto merecedor de investigação adicional é a verificação do mecanismo pelo qual o tecido adiposo dos ratos hipossódicos não libera ou sintetiza leptina conforme o esperado. Alternativamente deve ser considerada a possibilidade de um catabolismo aumentado da leptina neste grupo. Nos ratos alimentados com dieta rica em sal, a menor leptina plasmática pode ser um resultado esperado, pois neste grupo o peso corpóreo é menor. No entanto, o consumo de ração deveria ser menor, mas pelo contrário, ele é significativamente maior. Uma possibilidade a ser examinada é uma resistência ao efeito da leptina nestes animais induzida pelo maior consumo de cloreto de sódio na dieta.

Outro hormônio estudado foi o GH plasmático em decorrência de dados da literatura demonstrarem que obesidade e resistência à insulina são fatores que podem modificar a concentração plasmática deste hormônio.

Neste trabalho, os ratos alimentados com dieta hipersódica ou hipossódica apresentaram níveis reduzidos de GH plasmático em comparação com ratos submetidos à dieta normossódica. GH plasmático menor em ratos alimentados com dieta hipossódica pode ser consequência do aumento do peso corpóreo, menor sensibilidade à insulina e maior glicemia nestes animais. É demonstrado na literatura que alguns tipos de obesidade induzida pela dieta em humanos e também em ratos, tem sido associada a uma diminuição da secreção de GH espontaneamente ou em resposta a estímulos (Renier et alii, 1990; Cattaneo et alii, 1996; De Schepper et alii, 1997). A diminuição da síntese e/ou liberação de GH pela hipófise bem como um maior "clearance" de GH podem explicar a diminuição de GH plasmático em ratos obesos (Dublely et alii, 1988; Ahamad et alii, 1989). Experimentos em ratos Wistar com obesidade induzida por dieta "cafeteria" mostraram diminuição na expressão do gene do GH e modificação na liberação de GH in vitro (Zhou et alii, 1998). GH plasmático menor no grupo de ratos que consomem dieta hipersódica do que naqueles sob dieta normossódica é de explicação difícil e necessita, portanto de estudos adicionais para seu esclarecimento.

5.3 DECAIMENTO DA ^{125}I -INSULINA - DEC-INS

Os resultados de glicemia e insulinemia basais avaliados antes do estudo do decaimento da ^{125}I -insulina mostraram diferenças significativas entre os grupos de dieta estudados. O grupo hipossódico apresentou maior

glicemia e níveis elevados de insulinemia em comparação com os ratos alimentados com dieta normossódica ou hipersódica, sugerindo a existência de uma menor sensibilidade à insulina neste grupo de ratos. A avaliação da sensibilidade à insulina em resposta a variação no consumo de sal na dieta já foi realizada em outros estudos, inclusive no nosso Laboratório, mostrando que ratos alimentados com dieta hipossódica apresentaram menor sensibilidade à insulina (Prada et alii, 2000). Os níveis elevados de insulina no grupo hipossódico pode ser devido a um "clearance" menor deste hormônio. Com objetivo de testar esta hipótese, o estudo do decaimento da INS foi avaliado em ratos submetidos às três dietas. Os ratos alimentados com dieta hipersódica apresentaram menor meia-vida da insulina em comparação com ratos alimentados com dieta normossódica ou hipossódica. A degradação (remoção e inativação) da insulina é um processo importante no controle da sua própria ação na corrente sanguínea. Anormalidades no "clearance" e na degradação de insulina estão presentes em várias condições patológicas, incluindo diabetes melito do tipo 2 e obesidade (Duckworth et alii, 1998), a qual está presente nos ratos hipossódicos.

5.4 PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA

Os ratos que receberam sobrecarga crônica de sal na dieta apresentaram maiores pressões arteriais (PAS, PAD, PAM e PAc) do que os ratos alimentados com dieta normossódica ou hipossódica. A pressão arterial média foi 27 mmHg maior nos ratos em dieta hipersódica em comparação com ratos submetidos à dieta normossódica e 26mmHg maior em comparação com ratos alimentados com dieta hipossódica. Esta diferença observada em ratos submetidos à sobrecarga crônica de sal é

biologicamente relevante. Estudos epidemiológicos mostraram que o aumento dos níveis pressóricos em função do consumo de sal na dieta está relacionado com maior morbi-mortalidade como acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio (Kuller, 1997), sendo esse incremento pressórico menor nesses estudos do que o detectado no presente trabalho.

Evidências epidemiológicas também mostraram que populações indígenas que consomem habitualmente uma dieta com conteúdo de sal muito baixo apresentaram ausência de hipertensão arterial (Denton, 1997), enquanto tribos nômades do sudoeste do Irã, que consomem em média 180mmol de sódio por dia tem grande prevalência de hipertensão arterial (Page et alii, 1981). Estudos experimentais em chimpanzés forneceram evidências diretas do efeito do excesso de sal na dieta sobre a pressão arterial (PA). Nestes animais, seus hábitos alimentares foram observados (dieta rica em potássio e pobre em sódio) no seu meio ambiente natural. Após um ano de observação sem interferência dos pesquisadores, metade dos animais em estudo receberam uma adição de sal na dieta em quantidades crescentes por vinte meses de 5, 10 e 15g de sódio por dia. Os chimpanzés apresentaram um aumento progressivo da PA em relação aos valores basais prévios e quando foi interrompida a adição de sal na dieta, os níveis pressóricos diminuíram significativamente, retornando aos valores basais encontrados no início do estudo. Essas alterações de PA não foram observadas nos animais controle (Denton et alii, 1995). Em alguns estudos intervencionistas os resultados encontrados são favoráveis a diminuição do consumo de sal na dieta como fator importante para redução dos níveis pressóricos (Kaplan, 2000). Nos estudos observacionais em grandes populações, os resultados mostraram uma correlação significativa entre

níveis de ingestão de sal na dieta e níveis de pressão arterial na maioria dos trabalhos, porém nem todos os estudos observacionais encontraram esta correlação significativa (Smith et alii, 1988; Elliott 1991; Beard et alii, 1997).

Em estudos anteriores no nosso Laboratório (da Costa et alii, 1997; Prada et alii, 2000) foi observado que ratos submetidos à dieta hipersódica apresentaram maior PA em comparação com ratos submetidos à dieta hipossódica, havendo concordância com os resultados obtidos neste trabalho.

Contudo, existem trabalhos na literatura que mostraram haver mínima ou nenhuma diferença de PA induzida por dieta rica em sal (Intersalt, 1988, Watt et alii, 1983; Midgley et alii, 1996). Há que se salientar que no presente estudo e em trabalhos anteriores do nosso Laboratório, a quantidade de sal na dieta hipersódica é muito elevada e iniciada desde o desmame dos ratos e mantida por um período longo, ou seja, até a vida adulta.

É descrito na literatura que restrição de sal na dieta aumenta atividade do sistema nervoso simpático (Campese et alii, 1980). Em função disso, pode ser esperado um aumento da frequência cardíaca em ratos submetidos à dieta hipossódica. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho mostraram menor frequência cardíaca em ratos alimentados cronicamente com dieta hipossódica em comparação com os ratos que receberam dieta normossódica. Este achado também necessita de outros estudos para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na associação entre menor frequência cardíaca e reduzida ingestão alimentar de sal na dieta em ratos Wistar.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1) Modificação no consumo crônico de sal na dieta exerceu influências sobre a regulação do peso corpóreo em ratos Wistar.

2) A quantificação do consumo de ração mostrou que as diferenças de peso corpóreo associado à variação no consumo de sal na dieta não são decorrentes de modificações diretas no apetite em ratos Wistar. Animais com maior ou menor peso corpóreo não ingerem, respectivamente, maior ou menor quantidade de ração. Uma explicação para maior peso corpóreo concomitante com menor consumo de ração ou vice-versa são alterações no metabolismo energético destes animais.

3) Alterações na concentração plasmática dos hormônios tiroideanos, leptina, GH e insulina estão associadas a variações no consumo de sal na dieta em ratos Wistar.

- Os níveis elevados de T4 total plasmático e níveis reduzidos de TSH plasmático pode ser uma das explicações para o maior gasto energético (menor peso corpóreo e maior consumo de ração) observado nos ratos sob sobrecarga salina crônica. No entanto, de que maneira essa sobrecarga de sal pode explicar essas alterações permanece uma incógnita.
- Sobrecarga e restrição crônica de sal na dieta estão associados a menor leptinemia plasmática. No entanto, este resultado não explica as

diferenças de peso corpóreo e de consumo de ração observadas nestes dois grupos de animais.

- Alterações de insulinemia e glicemia em ratos submetidos à restrição de sal na dieta e que tem maior peso corpóreo sugerem menor sensibilidade à insulina. Dados da literatura sugerem que níveis menores de GH plasmático em ratos submetidos à dieta hipossódica pode ser devido a consequências da menor sensibilidade à insulina relatada nestes animais. No entanto, os resultados de GH plasmático em ratos submetidos à sobrecarga crônica de sal na dieta são de explicação difícil e necessitam, portanto de estudos adicionais para seu esclarecimento.

4) Variação no consumo de sal na dieta alterou a pressão arterial (PAS, PAD, PAM) e a frequência cardíaca em ratos Wistar na vida adulta.

- O aumento dos níveis pressóricos em função do maior consumo de sal na dieta observado neste trabalho em ratos Wistar é biologicamente relevante, confirmando resultados anteriores do nosso Laboratório.
- Frequência cardíaca menor nos ratos Wistar em dieta hipossódica pode ser decorrente a uma menor atividade do sistema nervoso simpático. No entanto, dados da literatura mostraram que restrição de sal na dieta aumenta atividade do sistema nervoso simpático, pelo menos no ser humano. Para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na associação entre menor frequência cardíaca e menor ingestão alimentar de sal na dieta neste modelo experimental outros estudos são necessários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (*)

1. Agata J, Miyazaki Y, Takada M, Murakami H, Masuda A, Miura T, Ura N, Shimamoto K. Association of insulin resistance and hyperinsulinemia with disturbed lipid metabolism in patients with essential hypertension. **Hypertens Res**, 21:57-62, 1998.
2. Ahmad I, Steggles AW, Carrillo AJ, Finkelstein JA. Obesity and Sex-related alterations in growth hormone messenger RNA levels. **Mol Cell Endocrinol**, 65:103-109, 1989.
3. Beard TC, Blizzard L, O'Brien DJ, Dwyer T. Association between blood pressure and dietary factors in the dietary and nutritional survey of British adults. **Arch Intern Med**, 157:234-238, 1997.
4. Berry MJ, Larsen PR. The role of selenium in thyroid hormone action. **Endocrine Rev**, 13:207-219, 1992.
5. Campese VM, Romoff M, Telfer N, Weidmann P, Massry SG. Role of sympathetic nerve inhibition and body sodium-volume state in the antihypertensive action of clonidine in essential hypertension. **Kidney Int**, 18:351-357, 1980.
6. Cattaneo L, De Gennaro Colonna V, Zoli M, Müller EE, Cocchi D. Characterization of the hypothalamo-pituitary-IGF-I axis in rats made obese by overfeeding. **J Endocrinol**, 148:347-353, 1996.

.....
(*) De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Referências Bibliográficas: NB-6023. Rio de Janeiro: ABNT, 1989.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of Journals Indexed in Index Medicus. Bethesda: NLM, 1997.

- 7.Cutler JA, Follmann D, Elliott P, Suh I. An overview of randomized trials of sodium reduction and blood pressure. **Hypertension**, 17 (suppl I):I27-I33, 1991.
- 8.da Costa Lima NK, Lima FB, dos Santos EA, Okamoto MM, Matsushita DH, Hell NS, Heimann JC. Chronic salt overload increases blood pressure and improves glucose metabolism without changing insulin sensitivity. **Am J Hypertens**, 10:720-727, 1997.
- 9.De Shepper JA, Smitz JP, Shou X, Louis O, Velkeniers BE, Vanhaelst L. Cafeteria diet-induced obesity is associated with a low spontaneous growth hormone secretion and normal plasma insulin-like growth factor-I concentrations. **Growth Horm IFG Res**, 8:397-401,1998.
- 10.Denton D, Weisinger R, Mundy NI, Wickings EJ, Dixson A, Moisson P, Pingard AM, Shade R, Carey D, Ardaillou R. The effect of increased salt intake on blood pressure of chimpanzees. **Nature Med**, 1:1009-1016, 1995.
- 11.Denton D. Can hypertension be prevented? **J Human Hypertension**, 11:563-569, 1997.
- 12.Donovan DS, Solomon CG, Seely EW, Williams GH, Simonson DC. Effect of sodium intake on insulin sensitivity. **Am J Physiol**, 264:E730-E734, 1993.
- 13.Dubley AK, Hanukoglu A, Hansen BC, Kowarski AA. Metabolic clearance rates of synthetic human growth hormone in lean and obese male rhesus monkeys. **J Clin Endocrinol Metab**, 67:1064-1067, 1988.

14. Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG. Insulin degradation: progress and potential. **Endocrine Rev**, 19:608-624, 1998.
15. Elliott P. Observational studies of salt and blood pressure. **Hypertension**, 17:I3-I8, 1991.
16. Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R, Giorico MA, Oleggini M, Graziadei L, Pedrinelli R, Brandi L, Bevilacqua S. Insulin resistance in essential hypertension. **N Engl J Med**, 317:350-357, 1987.
17. Ferrannini E, Natali A. Essential hypertension, metabolic disorders, and insulin resistance. **Am Heart J**, 121:1274-1282, 1991.
18. Ferrari P, Weidmann P. Insulin, insulin sensitivity and hypertension. **J Hypertension**, 8:491-500, 1990.
19. Fliser D, Fode P, Arnold U, Nowicki M, Kohl B, Ritz E. The effect of dietary salt on insulin sensitivity. **Eur J Clin Invest**, 25:39-43, 1995.
20. Fuller JH. Epidemiology of hypertension associated with diabetes mellitus. **Hypertension**, 7:II3-II7, 1985.
21. Furukawa LN, Kushiro T, Asagami T, Takahashi A, Kanmatsuse K, Ishikawa K. Variations in insulin sensitivity in spontaneously hypertensive rats from different sources. **Metabolism**, 47:493-496, 1998.
22. Grey A, Braatvedt G, Holdaway I. Moderate dietary salt restriction does not alter insulin resistance or serum lipids in normal men. **Am J Hypertens**, 9:317-322, 1996.
23. Golden PL, Maccagnan TJ, Pardridge WM. Human blood-brain leptin receptor. **J Clin Invest**, 99:14-18, 1997.

- 24.Heise T, Magnusson K, Heinemann L, Sawicki PT. Insulin resistance and the effect of insulin on blood pressure in essential hypertension. **Hypertension**, 32: 243-248, 1998.
- 25.Horl WH, Schaefer RM, Heidland A. Abnormalities of carbohydrate metabolism in spontaneously hypertensive rats. **Klin Wochenschr**, 66:924-927, 1988.
- 26.INTERSALT Cooperative Research Group. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hours urinary sodium and potassium excretion. **BMJ**, 297:319-328, 1988.
- 27.Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Barletta A, Liverini G. Energy intake and utilization vary during development in rats. **J Nutr**, 129:1593-1596, 1999.
- 28.Iossa S, Lionetti I, Mollica MP, Barletta A, Liverini G. Hepatic mitochondrial respiration and transport of reducing equivalents in rats fed an energy dense diet. **Int J Obes Relat Metab Disord**, 19:539-543, 1995.
29. JOINT NATIONAL COMMITTEE ON PREVENTION, DETECTION, EVALUATION, AND TREATMENT OF HIGH BLOOD PRESSURE (JNC VI). The sixth report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Arch Intern Med**, 157:2413-2445, 1997.
- 30.Kaplan NM. Evidence in favor of moderate dietary sodium reduction. **Am J Hypertension**, 13:8-13, 2000.
- 31.Kuller LH. Salt and blood pressure: population and individual perspectives. **Am J Hypertension**, 10:295-365, 1997.

- 32.Law MR, Frost CD, Wald NJ. III-analysis of data from trials of salt reduction. **BMJ**, 302:819-824, 1991.
- 33.Lind L, Berne C, Lithell H. Prevalence of insulin resistance in essential hypertension. **J Hypertension**, 13:1457-1462, 1995.
- 34.Lionetti L, Iossa S, Brand MD, Liverini G. The mechanism of stimulation of respiration on isolated hepatocytes from rats fed an energy dense diet. **Nutr Biochem**, 7:571-576, 1996.
- 35.MacGregor GA, Markandu ND, Sagnella GA, Singer DR, Cappuccio FP. Double-blind study of three sodium intakes and long-term effects of sodium restriction on essential hypertension. **Lancet**, 2 (8674):1244-1247, 1989.
- 36.Mascioli S, Grimm Jr, Launer C, Svendsen K, Flack J, Gonzalez N, Elmer P, Neaton J. Sodium chloride raises blood pressure in normotensive subjects. The study of sodium and blood pressure. **Hypertension**, 17 (suppl 1):I21-I26, 1991.
- 37.Midgley JP, Matthew AG, Greenwood CM, Logan AG. Effect of reduced dietary sodium on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. **JAMA**, 275: 1590-1597, 1996.
- 38.Modan M, Halkin H, Almog S, Lusky A, Eshkol A, Shefi M, Shirtrit A, Fuchs Z. Hyperinsulinemia. A link between hypertension, obesity and glucose intolerance. **J Clin Invest**, 75:809-817, 1985.
- 39.Mondon CE, Reaven GM, Azhar S, Lee CM, Rabkin R. Abnormal insulin metabolism by specific organs from rats with spontaneous hypertension. **Am J Physiol**, 257:E491-E498, 1989.

- 40.Neneely GR, Ball COT. Experimental epidemiology of chronic sodium chloride toxicity and the protective effect of potassium chloride. **Am J Med**, 25:713-725, 1958.
- 41.Page LB, Vandever DE, Nader K, Lubin NK, Page Jr. Pressure of Qash'qai pastoral nomads in Iran in relation to culture, diet and body form. **Am J Clin Nutr**, 34:527-538, 1981.
- 42.Prada PO, Okamoto MM, Furukawa LNS, Machado UF, Heimann JC, Dolnikoff MS. High or low-salt diet from weaning to adulthood effect on insulin sensitivity in Wistar rats. **Hypertension**, 35:424-429, 2000.
- 43.Qiao Q, Rajala U, Keinonen-Kiukaanniemi S. Hypertension, Hyperinsulinemia and obesity in middle-aged Finns with impaired glucose tolerance. **J Hum Hypertens**, 12:265-269, 1998.
- 44.Renier G, Gaudreau P, Hajjad H, Deslauriers N, Houde-Nadeau M, Brazeau P. Decreased pituitary growth hormone response to growth hormone-releasing factor in cafeteria-fed rats: dietary and obesity effects. **Neuroendocrinology**, 52:284-290, 1990.
- 45.Samuels HH, Stanley F, Casanova J. Depletion of L-3,5,3'-Triiodothyronine and L-Thyroxine in euthyroid calf serum for use in cell culture studies of the action of thyroid hormone. **Endocrinology**, 105:80-85, 1979.
- 46.Smith WC, Crombie IK, Tavendale RT, Gulland SK, Tunstall-Pedoe HD. Urinary electrolyte excretion, alcohol consumption and blood pressure in the Scottish heart study. **Br Med J**, 297:329-330, 1988.

- 47.Swales J. Population advice on salt restriction: The social issues. **Am J Hypertens**, 13:2-7, 2000.
- 48.Swislocki ALM, Hoffman BB, Reaven GM. Insulin resistance, glucose intolerance and Hyperinsulinemia in patients with hypertension. **Am J Hypertens**, 2:419-423, 1989.
- 49.Toft I, Bonaa KH, Jenssen T. Insulin resistance in hypertension is associated with body fat rather than blood pressure. **Hypertension**, 32:115-122, 1998.
- 50.Watt GC, Edwards C, Hart JT, Hart M, Walton P, Foy CJ. Dietary sodium restriction for mild hypertension in general practice. **Br Med J**, 5: 432- 436, 1983.
- 51.Weisser B, Grüne S, Spühler T, Kistler T, Vetter W. Plasma insulin is correlated with blood pressure only in subjects with a family history of hypertension or diabetes mellitus: results from 11,001 participants in the Heureka study. **J Hypertens Suppl**, 11 [Suppl 5]:S308-309, 1993.
- 52.Welborn TA, Breckenridge A, Rubinstein AH, Dollery CT, Fraser TR. Serum-insulin in essential hypertension and in peripheral vascular disease. **Lancet**, 18:1336-1337, 1966.
- 53.World Hypertension League. Nonpharmacological interventions as and adjunct to the pharmacological treatment of hypertension: a statement by WHL. **J Hum Hypertens**, 7:159-164, 1993.
- 54.Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Freidman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, 372:425-432, 1994.

55. Zhou X, De Schepper J, De Craemer D, Delhase M, Gys G. Pituitary growth hormone release and gene expression in cafeteria-diet-induced obese rats. **J Endocrinol**, 159:165-172, 1998.
56. Zatz R. A low cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats. **Lab Anim Sci**, 40:198-201, 1990.
57. Zavaroni I, Mazza S, Dall'Aglio E, Gasparini P, Passeri M, Reaven GM. Prevalence of hyperinsulinemia in patients with high blood pressure. **J Intern Med**, 231:235-240, 1992.

ABSTRACT

8. ABSTRACT

Previous studies from our laboratory have shown that chronic salt restriction decreases blood pressure, increases insulin resistance, and body weight (BW) in Wistar rats. The aim of this study was to evaluate some mechanisms of obesity and hormonal alterations associated with chronic salt restriction. Male Wistar rats were fed a low (LSD: 0,15% NaCl), normal (NSD: 1,27% NaCl), or high salt diet (HSD: 7,94% NaCl) from weaning. At the 12th week of age, tail-cuff blood pressure (TCBP), intra arterial blood pressure (BP), heart rate ((HR), food intake, BW, hormonal levels [leptin (LEP), growth hormone (GH), insulin (INSh - antibody anti-human insulin), T3, T4 and TSH] and ¹²⁵I insulin decay study (DECAY-INS) were measured. To evaluate the food intake and body weight, each dietary group was divided in 3 subgroups, according to housing conditions: one (1C) or four (4C) rats per cage and one rat per metabolic cage (1MC) for daily food consumption and BW determinations during 7 days. Fasting plasma glucose (GLU) and insulin (INSr - antibody anti-rat insulin) were measured before the DECAY-INS. To evaluate the DECAY-INS, 1 μ Ci human ¹²⁵I-insulin was injected through the jugular catheter after 6-8 hours of food restriction. Blood samples were withdrawn through the carotid catheter every 30 sec during 2min, and in sequence, every 1 min for additional 10 minutes. ¹²⁵I-insulin was determined by RIA for human insulin. Rats on HSD had higher intra arterial BP and TCBP compared to rats on NSD and LSD. Heart rate was lower on LSD than on NSD. In all housing conditions, BW was higher on LSD than on NSD and HSD. Food intake was higher on HSD (1C and 4C) than on NSD and LSD. Plasma GH and LEP were higher on NSD than on the

other two groups. Plasma INSh was higher in LSD compared to HSD and NSD rats. Plasma total T4 was higher on HSD than on the NSD and LSD, TSH was lower on HSD than on NSD and HSD, and T3 was not different among all groups. Fasting GLU and INSr were higher on LSD compared to HSD and NSD rats. The exponential insulin decay was faster on HSD demonstrated by a lower ^{125}I -INS half-life. These results suggest that obesity in rats on chronic LSD is due to a higher metabolic efficiency (higher body weight and lower diet consumption), that may be related to the hormonal consequences of LSD.

Key Words: blood pressure, salt, sodium, food intake and hormonal profile.

ANEXOS

RADIO-TOTAL (cpm)

Tempo	DIETAS							
(min)	HR1	HR2	HR3	HR4	HR5	HR6	HR7	HR8
0.500	1172.00	716.00	1373.00	1156.00	1565.92	1487.72	724.12	1053.52
1.000	638.00	571.00	588.00	516.00	863.72	866.32	503.32	612.92
1.500	-	304.00	413.00	322.00	659.72	346.32	433.72	408.12
2.000	372.00	290.00	268.00	228.00	428.72	267.12	355.72	268.52
3.000	288.00	200.00	159.00	176.00	319.92	190.52	235.92	221.72
4.000	295.00	193.00	142.00	114.00	278.72	200.52	196.32	204.12
5.000	287.00	203.00	163.00	207.00	301.72	181.72	217.32	198.92
6.000	319.00	238.00	183.00	231.00	296.72	203.32	239.12	199.52
7.000	302.00	187.00	207.00	239.00	317.72	216.52	258.32	215.12
8.000	321.00	243.00	211.00	236.00	317.32	233.72	268.72	214.52
9.000	347.00	243.00	223.00	270.00	329.52	-	-	209.52
10.000	360.00	232.00	230.00	271.00	328.92	224.32	276.92	239.32

(min)	NO1	NO2	NO3	NO4	NO5	NO6	NO7	NO8	NO9
0.500	1065.00	1119.00	1854.14	1194.90	1600.54	2038.34	1460.54	1877.74	1408.74
1.000	790.00	728.00	1022.34	941.30	1171.74	1262.14	1015.94	1214.74	1019.54
1.500	-	-	666.14	611.70	691.14	826.54	555.14	730.54	640.14
2.000	417.00	433.00	461.54	428.30	445.74	501.34	382.74	529.34	394.94
2.500	-	-	341.94	325.70	312.74	392.34	288.54	365.94	311.34
3.000	322.00	329.00	299.14	280.10	259.94	325.14	252.14	316.14	216.74
4.000	319.00	296.00	278.74	287.30	243.94	327.94	208.34	286.34	209.14
5.000	335.00	307.00	315.54	303.50	284.34	351.14	231.74	296.74	275.54
6.000	355.00	325.00	350.34	361.30	271.14	357.34	289.94	337.74	315.54
7.000	371.00	322.00	345.14	-	337.74	425.14	338.54	329.14	336.34
8.000	340.00	310.00	373.94	-	348.94	478.94	338.94	382.74	341.74
9.000	344.00	381.00	415.34	-	355.34	478.54	351.14	375.74	367.14
10.000	310.00	370.00	-	-	-	-	-	-	-

(min)	HO1	HO2	HO3	HO4	HO5	HO6	HO7
0.500	1239.000	901.000	1250.000	1240.12	1019.72	1007.52	1094.12
1.000	726.000	605.000	725.000	663.32	796.52	608.72	678.52
1.500	515.000	364.000	511.000	435.12	524.72	427.72	429.72
2.000	364.000	233.000	344.000	309.32	426.52	308.52	305.72
3.000	261.000	165.000	238.000	210.52	301.52	252.72	228.12
4.000	273.000	172.000	200.000	205.12	268.32	237.32	236.12
5.000	256.000	172.000	200.000	228.72	245.32	265.32	252.92
6.000	267.000	196.000	211.000	258.72	295.52	274.92	253.72
7.000	308.000	190.000	244.000	244.52	253.32	279.92	277.52
8.000	275.000	200.000	234.000	283.32	279.52	282.92	287.72
9.000	277.000	220.000	239.000	295.72	273.92	273.92	282.92
10.000	309.000	194.000	257.000	315.32	287.12	287.12	296.92

ANEXO A: Decaimento da radioatividade total (RADIO-TOTAL) plasmática expressa em cpm. Resultados obtidos em ratos adultos submetidos a dieta HR, NO ou HO desde o desmame.

INSULINA IMUNORREATIVA (cpm)

Tempo	DIETAS							
(min)	HR1	HR2	HR3	HR4	HR5	HR6	HR7	HR8
0.500	1001.00	605.00	1115.00	1066.00	1534.310	963.320	1409.720	1037.120
1.000	544.00	-	497.00	354.00	838.120	672.120	732.120	596.120
1.500	-	273.00	345.00	274.00	603.720	323.920	431.720	375.320
2.000	258.00	239.00	201.00	184.00	382.120	258.320	314.320	268.720
3.000	182.00	162.00	123.00	125.00	223.320	150.320	184.920	168.720
4.000	143.00	97.00	79.00	79.00	170.920	110.120	132.320	118.120
5.000	139.00	77.00	45.00	67.00	127.720	86.720	112.320	91.120
6.000	122.00	65.00	53.00	64.00	96.720	71.320	103.520	77.520
7.000	104.00	68.00	57.00	72.00	102.120	70.320	104.720	72.520
8.000	102.00	52.00	42.00	61.00	76.120	65.520	82.120	55.720
9.000	88.00	47.00	31.00	52.00	73.720	53.120	74.920	60.920
10.000	70.00	38.00	35.00	43.00	72.120	50.920	78.520	54.320

(min)	NO1	NO2	NO3	NO4	NO5	NO6	NO7	NO8	NO9
0.500	934.00	960.000	1766.90	1089.140	1636.740	1926.340	1463.9400	1879.740	1316.940
1.000	657.00	600.000	959.30	895.940	1160.140	1128.340	933.7400	1160.740	960.740
1.500	-	-	615.30	566.540	677.940	774.540	528.5400	639.740	620.540
2.000	340.00	310.000	409.50	412.540	415.340	493.540	355.9400	490.940	322.740
2.500	-	-	297.10	275.540	287.940	330.740	256.5400	290.540	283.540
3.000	216.00	211.000	238.90	230.740	216.340	235.940	211.3400	281.940	161.540
4.000	183.00	185.000	76.70	149.740	164.540	206.940	149.1400	179.940	124.940
5.000	157.00	162.000	158.10	43.540	136.540	147.140	122.9400	179.340	110.740
6.000	136.00	116.000	133.10	113.740	106.540	150.540	130.1400	124.740	119.340
7.000	135.00	94.000	109.90	-	120.140	130.940	104.7400	100.340	92.140
8.000	104.00	106.000	102.90	-	104.140	132.740	99.5400	79.140	77.140
9.000	94.00	95.000	84.70	-	101.540	131.940	99.5400	89.140	79.540
10.000	88.00	88.000	-	-	-	-	-	-	-

(min)	HO1	HO2	HO3	HO4	HO5	HO6	HO7
0.500	1077.00	704.0	965.0	967.320	959.320	967.320	1055.520
1.000	603.00	518.0	652.0	621.720	768.920	621.720	795.320
1.500	412.00	303.0	395.0	412.520	500.520	412.520	398.920
2.000	306.00	211.0	225.0	284.720	343.920	284.720	278.120
3.000	177.00	117.0	188.0	192.320	257.520	192.320	177.320
4.000	137.00	80.0	119.0	142.520	159.520	142.520	125.120
5.000	109.00	67.0	89.0	117.920	132.520	117.920	104.920
6.000	78.00	55.0	91.0	109.320	120.520	109.320	99.120
7.000	78.00	53.0	70.0	83.320	107.720	83.320	83.320
8.000	61.00	53.0	63.0	73.320	82.720	73.320	73.320
9.000	60.00	39.0	57.0	70.120	83.120	70.120	52.320
10.000	47.00	35.0	43.0	66.520	82.320	66.520	60.920

ANEXO B: Decaimento da ^{125}I -insulina imunorreativa (INS-Ac) expressa em cpm. Resultados obtidos em ratos adultos submetidos a dieta HR, NO ou HO desde o desmame.

RADIO-TOTAL (%)

Tempo	DIETAS							
(min)	HR1	HR2	HR3	HR4	HR5	HR6	HR7	HR8
0.500	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
1.000	54.43686	79.7486	42.82593	44.63668	55.15734	58.23139	69.50782	58.1783
1.500	-	42.4581	30.08012	27.85467	42.12986	23.27857	59.89615	38.7387
2.000	31.74061	40.50279	19.5193	19.72318	27.37815	17.95499	49.12445	25.48789
3.000	24.57338	27.93296	11.58048	15.22491	20.43016	12.80617	32.58023	21.04564
4.000	25.17065	26.95531	10.34232	9.861591	17.79912	13.47834	27.11153	19.37505
5.000	24.48805	28.35196	11.87181	17.90657	19.26791	12.21466	30.0116	18.88146
6.000	27.21843	33.24022	13.32848	19.9827	18.9486	13.66655	33.02215	18.93842
7.000	25.76792	26.11732	15.07648	20.67474	20.28967	14.55381	35.67365	20.41916
8.000	27.38908	33.93855	15.36781	20.41523	20.26413	15.70995	37.10987	20.36222
9.000	29.60751	33.93855	16.24181	23.3564	21.04322	-	-	19.88762
10.000	30.71672	32.40224	16.75164	23.44291	21.00491	15.07811	38.24228	22.71623
11.000	30.20478	-	-	-	-	-	-	-

(min)	NO1	NO2	NO3	NO4	NO5	NO6	NO7	NO8	NO9
0.500	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
1.000	74.17841	65.05809	55.13823	78.77647	73.20904	61.91999	69.5592	64.6916	72.37247
1.500	-	-	35.92717	51.19257	43.18167	40.54966	38.00923	38.90528	45.44061
2.000	39.15493	38.69526	24.8924	35.844	27.84935	24.5955	26.20538	28.19027	28.03498
2.500	-	-	18.44197	27.25751	19.53965	19.24802	19.75571	19.48832	22.1006
3.000	30.23474	29.40125	16.13363	23.44129	16.24077	15.95122	17.26348	16.8362	15.38538
4.000	29.95305	26.45219	15.03338	24.04385	15.24111	16.08858	14.26459	15.24918	14.84589
5.000	31.4554	27.43521	17.01813	25.39961	17.76525	17.22676	15.86673	15.80304	19.55932
6.000	33.33334	29.04379	18.89501	30.23684	16.94053	17.53093	19.85156	17.98652	22.39874
7.000	34.83568	28.77569	18.61456	-	21.10163	20.85717	23.1791	17.52852	23.87524
8.000	31.92488	27.70331	20.16784	-	21.80139	23.49657	23.20648	20.38301	24.25856
9.000	32.30047	34.04826	22.40068	-	22.20126	23.47695	24.04179	20.01022	26.06159
10.000	29.10798	33.06524	-	-	-	-	-	-	-

(min)	HO1	HO2	HO3	HO4	HO5	HO6	HO7
0.500	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
1.000	58.59564	67.14761	58.000	53.48837	78.11164	60.41766	62.01514
1.500	41.56578	40.39956	40.880	35.08693	51.45726	42.45275	39.2754
2.000	29.37853	25.86016	27.520	24.94275	41.82717	30.62172	27.94209
3.000	21.06537	18.31299	19.040	16.97578	29.5689	25.08337	20.84963
4.000	22.0339	19.0899	16.000	16.54033	26.31311	23.55487	21.58081
4.500	-	-	16.000	-	-	-	-
5.000	20.66182	19.0899	16.880	18.44338	24.05759	26.33397	23.11629
6.000	21.54964	21.75361	19.520	20.8625	28.9805	27.2868	23.18941
7.000	24.85876	21.08768	18.720	19.71745	24.84212	27.78307	25.36468
8.000	22.19532	22.19756	19.120	22.84618	27.41145	28.08083	26.29693
9.000	22.35674	24.41731	20.560	23.84608	26.86228	27.18755	25.85823
10.000	24.93947	21.53163	-	25.42657	28.15675	28.4977	27.13779

ANEXO C: Decaimento da radioatividade total (RADIO-TOTAL) plasmática expressa em porcentagem por minuto. Resultados obtidos em ratos adultos submetidos a dieta HR, NO ou HO desde o desmame.

INSULINA IMUNORREATIVA (%)

Tempo	DIETAS								
(min)	HR1	HR2	HR3	HR4	HR5	HR6	HR7	HR8	
0.500	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	
1.000	54.34565	-	44.57399	33.20826	54.62521	69.77121	51.93372	57.4784	
1.500	-	45.12397	30.94171	25.70357	39.34798	33.62538	30.62452	36.18868	
2.000	25.77423	39.50413	18.02691	17.26079	24.90501	26.8156	22.29663	25.91021	
3.000	18.18182	26.77686	11.03139	11.72608	14.55508	15.60437	13.1175	16.26813	
4.000	14.28571	16.03306	7.085202	7.410882	11.13986	11.4313	9.386261	11.38923	
4.500	13.88611	12.72727	4.035874	6.285178	8.324264	9.002201	7.967539	8.78587	
5.000	12.18781	10.7438	4.753364	6.003752	6.303811	7.403563	7.343302	7.474545	
6.000	10.38961	11.23967	5.112108	6.754221	6.655761	7.299755	7.428425	6.992441	
7.000	10.18981	8.595041	3.766816	5.722327	4.961188	6.801478	5.82527	5.372571	
8.000	8.791208	7.768595	2.780269	4.878049	4.804766	5.514263	5.31453	5.873959	
9.000	6.993007	6.280992	3.139014	4.033771	4.700485	5.285886	5.5699	5.237581	
10.000	7.292707								

(min)	NO1	NO2	NO3	NO4	NO5	NO6	NO7	NO8	NO9
0.500	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
1.000	70.34261	62.500	54.29283	82.26123	70.88115	58.57429	63.78267	61.75003	72.95245
1.500	-	-	34.8237	52.01719	41.42014	40.20786	36.10394	34.03343	47.11983
2.000	36.40257	32.29166	23.17618	37.87759	25.37605	25.62061	24.31384	26.11744	24.50681
2.500	-	-	16.81476	25.29886	17.59229	17.16935	17.52394	15.45639	21.53021
3.000	23.12634	21.97917	13.52085	21.18552	13.21774	12.2481	14.43638	14.99888	12.26631
4.000	19.59315	19.27083	10.00057	13.74846	10.05291	10.74265	10.18758	9.5726	9.487144
4.500	16.80942	16.875	8.947875	3.997649	8.342193	7.638319	8.397885	9.540681	8.408887
5.000	14.56103	12.08333	7.532968	10.4431	6.509281	7.81482	8.889709	6.636024	9.061915
6.000	14.45396	9.791666	6.219933		7.340201	6.797347	7.154665	5.337972	6.996522
7.000	11.1349	11.04167	5.823759		6.362648	6.890788	6.799459	4.210157	5.857518
8.000	10.06424	9.895833	4.793706		6.203796	6.849258	6.799459	4.742145	6.039759
9.000	9.421842	9.166666							
10.000	8.88651	7.916667							

(min)	HO1	HO2	HO3	HO4	HO5	HO6	HO7
0.500	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
1.000	55.98886	73.57954	67.56477	64.27242	80.15261	64.27242	75.34865
1.500	38.25441	43.03977	40.93264	42.64566	52.17446	42.64566	37.7937
2.000	28.41225	29.97159	23.31606	29.4339	35.8504	29.4339	26.3491
3.000	16.43454	16.61932	19.48187	19.88173	26.84401	19.88173	16.7993
4.000	12.72052	11.36364	12.33161	14.73349	6.62845	14.73349	11.85387
4.500	10.12071	9.517046	9.222798	12.19038	13.81395	12.19038	9.940125
5.000	7.24234	7.8125	9.430052	11.30133	12.56307	11.30133	9.390633
6.000	7.24234	7.528409	7.253886	8.613488	11.22879	8.613488	7.89374
7.000	5.663881	7.528409	6.528498	7.579704	8.622775	7.579704	6.94634
8.000	5.571031	5.539773	5.906736	7.248894	8.664472	7.248894	4.956799
9.000	4.363974	4.971591	4.455959	6.876731	8.581079	6.876731	5.771563

ANEXO D: Decaimento da ¹²⁵I-insulina imunorreativa (INS-Ac) expressa em porcentagem por minuto. Resultados obtidos em ratos adultos submetidos a dieta HR, NO ou HO desde o desmame.

REGRESSÃO NÃO LINEAR DE DECAIMENTO EXPONENCIAL DE 1 FASE

DEITA HIPERSÓDICA								
Parâmetros	HR1	HR2	HR3	HR4	HR5	HR6	HR7	HR8
Equation 1								
Variables								
SPAN	173.8	132.0	194.7	269.0	161.1	160.1	182.5	162.5
K	1.419	0.8175	1.497	2.199	1.159	1.069	1.401	1.182
PLATEAU	13.97	11.30	6.457	9.311	8.379	8.015	8.765	9.261
HALF-LIFE	0.4884	0.8479	0.4629	0.3153	0.5982	0.6482	0.4949	0.5864
Std. Error								
SPAN	8.640	8.082	16.90	48.56	8.836	13.14	7.475	6.013
K	0.08538	0.09387	0.1454	0.3352	0.08556	0.1257	0.06728	0.05798
PLATEAU	0.9475	2.709	1.912	2.412	1.578	2.694	0.9564	1.038
95% Confidence Intervals								
SPAN	149.8 to 197.8	109.6 to 154.5	151.2 to 238.1	144.2 to 393.9	138.3 to 183.8	126.3 to 193.9	163.2 to 201.7	147.1 to 178.0
K	1.182 to 1.656	0.5569 to 1.078	1.123 to 1.871	1.337 to 3.060	0.9387 to 1.379	0.7462 to 1.393	1.228 to 1.574	1.033 to 1.331
PLATEAU	11.34 to 16.60	3.783 to 18.83	1.541 to 11.37	3.110 to 15.51	4.321 to 12.44	1.088 to 14.94	6.306 to 11.22	6.593 to 11.93
half-life	0.5863 to 0.4185	1.245 to 0.6430	0.6170 to 0.3705	0.5185 to 0.2265	0.7384 to 0.5028	0.9289 to 0.4978	0.5646 to 0.4405	0.6710 to 0.5207
Goodness of Fit								
Degrees of Freedom	4	4	5	5	5	5	5	5
R ²	0.9981	0.9913	0.9912	0.9816	0.9950	0.9877	0.9978	0.9978
Absolute Sum of Squares	12.25	51.11	65.26	127.8	36.04	96.41	15.58	15.88
Sy.x	1.750	3.575	3.613	5.055	2.685	4.391	1.765	1.782
Data								
Number of values	15	15	15	15	15	15	15	15
Number of Y replicates	1	1	1	1	1	1	1	1
Total number of values	7	7	8	8	8	8	8	8
Number of missing values	8	8	7	7	7	7	7	7

ANEXO E: Regressão não linear calculada nos resultados obtidos da ¹²⁵I-insulina imunorreativa expressa em porcentagem por minuto.

REGRESSÃO NÃO LINEAR DE DECAIMENTO EXPONENCIAL DE 1 FASE

DIETA NORMOSSÓDICA									
Parâmetros	NO1	NO2	NO3	NO4	NO5	NO6	NO7	NO8	NO9
Equation 1									
Variables									
SPAN	134.0	144.6	171.0	141.7	157.2	159.4	163.1	164.7	153.6
K	0.8950	1.089	1.278	0.6982	0.9738	1.101	1.131	1.156	0.9167
PLATEAU	14.72	15.41	8.966	3.820	5.707	7.550	8.187	7.990	5.767
HALF-LIFE	0.7745	0.6364	0.5425	0.9928	0.7118	0.6297	0.6131	0.5996	0.7561
Std. Error									
SPAN	2.655	7.820	4.984	8.593	7.856	4.290	4.948	6.654	9.945
K	0.03248	0.08958	0.04721	0.09016	0.07611	0.04202	0.04766	0.06382	0.09765
PLATEAU	0.7248	1.437	0.7498	4.015	1.964	0.8554	0.9387	1.211	2.780
95% Confidence Intervals									
SPAN	126.6 to 141.3	122.9 to 166.3	158.8 to 183.2	120.6 to 162.7	138.0 to 176.5	148.9 to 169.9	151.0 to 175.2	148.4 to 181.0	129.3 to 178.0
K	0.8048 to 0.9851	0.8405 to 1.338	1.162 to 1.393	0.4776 to 0.9188	0.7876 to 1.160	0.9979 to 1.204	1.014 to 1.247	0.9998 to 1.312	0.6778 to 1.156
PLATEAU	12.71 to 16.74	11.42 to 19.40	7.131 to 10.80	-6.005 to 13.64	0.9003 to 10.51	5.457 to 9.643	5.890 to 10.48	5.027 to 10.95	-1.035 to 12.57
half-life	0.8613 to 0.7036	0.8247 to 0.5181	0.5964 to 0.4975	1.451 to 0.7544	0.8801 to 0.5975	0.6946 to 0.5759	0.6836 to 0.5558	0.6933 to 0.5282	1.023 to 0.5998
Goodness of Fit									
Degrees of Freedom	4	4	6	6	6	6	6	6	6
R ²	0.9994	0.9965	0.9985	0.9855	0.9935	0.9984	0.9980	0.9966	0.9883
Absolute Sum of Squares	4.137	21.59	11.17	130.0	55.20	12.29	15.28	26.10	101.2
Sy.x	1.017	2.323	1.364	4.655	3.033	1.431	1.596	2.086	4.107
Data									
Number of X values	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Number of Y replicates	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Total number of values	7	7	9	9	9	9	9	9	9
Number of missing values	8	8	6	6	6	6	6	6	6

ANEXO F: Regressão não linear calculada nos resultados obtidos da ¹²⁵I-insulina imunorreativa expressa em porcentagem por minuto.

REGRESSÃO NÃO LINEAR DE DECAIMENTO EXPONENCIAL DE 1 FASE

DIETA HIPOSSÓDICA							
Parâmetros	HO1	HO2	HO3	HO4	HO5	HO6	HO7
Equation 1							
Variables							
SPAN	157.7	148.8	155.3	148.4	133.9	148.4	156.0
K	1.154	0.8947	1.048	1.043	0.7528	1.043	0.9982
PLATEAU	10.01	6.932	9.304	11.84	10.62	11.84	8.381
HALF-LIFE	0.6008	0.7747	0.6611	0.6646	0.9207	0.6646	0.6944
Std. Error							
SPAN	8.762	7.817	9.766	2.735	8.112	2.735	14.71
K	0.08659	0.07843	0.09594	0.02809	0.09053	0.02809	0.1427
PLATEAU	1.577	2.190	2.072	0.5854	3.138	0.5854	3.398
95% Confidence Intervals							
SPAN	135.1 to 180.2	128.7 to 168.9	130.2 to 180.4	141.4 to 155.4	113.0 to 154.7	141.4 to 155.4	118.2 to 193.8
K	0.9311 to 1.376	0.6931 to 1.096	0.8018 to 1.295	0.9707 to 1.115	0.5201 to 0.9856	0.9707 to 1.115	0.6314 to 1.365
PLATEAU	5.960 to 14.07	1.301 to 12.56	3.978 to 14.63	10.33 to 13.34	2.553 to 18.69	10.33 to 13.34	-0.3536 to 17.12
half-life	0.7444 to 0.5036	1.000 to 0.6323	0.8645 to 0.5352	0.7141 to 0.6216	1.333 to 0.7033	0.7141 to 0.6216	1.098 to 0.5078
Goodness of Fit							
Degrees of Freedom	5	5	5	5	5	5	5
R ²	0.9948	0.9938	0.9926	0.9994	0.9898	0.9994	0.9825
Absolute Sum of Squares	35.82	50.36	55.73	4.423	76.70	4.423	141.2
Sy.x	2.677	3.174	3.339	0.9405	3.917	0.9405	5.313
Data							
Number of X values	15	15	15	15	15	15	15
Number of Y replicates	1	1	1	1	1	1	1
Total number of values	8	8	8	8	8	8	8
Number of missing values	7	7	7	7	7	7	7

ANEXO G: Regressão não linear calculada nos resultados obtidos da ¹²⁵I-insulina imunorreativa expressa em porcentagem por minuto.