Laiali Jurdi El Chaar

# Hipertensão arterial e disfunção autonômica induzidas por dieta hiperlipídica: papel do CART e de fatores inflamatórios em núcleos autonômicos do sistema nervoso central

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo 2016

# Laiali Jurdi El Chaar

# Hipertensão arterial e disfunção autonômica induzidas por dieta hiperlipídica: papel do CART e de fatores inflamatórios em núcleos autonômicos do sistema nervoso central

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes

Co-orientador: Prof. Dr. William L. Festuccia

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na biblioteca digital de teses e dissertações da USP (BDTD).

#### DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Chaar, Laiali Jurdi El.

Hipertensão arterial e disfunção autonômica induzidas por dieta hiperlipídica:papel do CART e de fatores inflamatórios em núcleos autonômicos do sistema nervoso central / Laiali Jurdi El Chaar. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Mecanismos envolvidos no desenvolvimento e manutenção da hipertenção neurogênica secundária à obesidade.

Versão do título para o inglês: High blood pressure and autonomic dysfunction induced by high-fat diet: role of CART and inflammatory factors in central autonomic network.

1. Hipertensão 2. Obesidade 3. Sistema nervoso autônomo 4. Neuropeptídeos 5. Inflamação 6. Hipotálamo I. Antunes, Prof. Dr. Vagner Roberto II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisilogia e Biofísica III. Título.

ICB/SBIB056/2016

## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Laiali Jurdi El Chaar.			
Título da Tese:	Hipertensão arterial e disfunção autonômica induzidas por dieta hiperlipídica: papel do CART e de fatores inflamatórios em núcleos autonômicos do sistema nervoso central.			
Orientador(a):	Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes.			
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão				
paone	( ) A provado(a) $( ) Peprovado(a)$			
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:			
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:			



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil Telefone :(55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

# CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 026 nas fls. 126 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) Vagner Roberto Antunes, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "Dieta obesogênica e processos inflamatórios no tronco encefálico e sua interação com o sistema nervoso autônomo e pressão arterial" do qual participam o(s) aluno(s) Laiali Jurdi El Chaar e o pesquisador William Tadeu Festuccia, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em 22.06.2012, com validade de 4 anos.

São Paulo, 25 de junho de 2012.

Prof. Dr.Wothan Tavares de Lima Coordenador CEUA - ICB/USP

An

Prof. Dr. Ariel Mariano Silber Secretário CEUA – ICB/USP

Dedico esta tese a todos aqueles que, com esperança, esperam, pela cura ou tratamento de suas doenças crônicas e seu sofrimento.

"

## AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo que deu suporte a meus estudos desde a graduação e me proporcionou experiências únicas de intercâmbio entre pessoas e Institutos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro desde os tempos de Iniciação Científica, o que permitiu que minhas idéias se transformassem em experimentos.

Ao Professor Vagner Roberto Antunes, meu orientador, a minha gratidão pela oportunidade de realizar esse trabalho e de quem recebi ensinamentos que vão muito além da teoria, como a ética que levarei comigo para sempre.

Ao Professor<sup>-</sup> William Festuccia, meu co-orientador, de quem recebi sempre total apoio e tenho profunda admiração pelo seu dom na ciência. Seus ensinamentos foram fundamentais para a conclusão dessa tese.

A meus pais, Rajaa e Moufid, e irmãos, Maiassa, Chady e Omar, que desde sempre - me incentivaram a seguir com a cabeça erguida mesmo com os obstáculos durante o tempo que me dediquei aos estudos.

Aos meus amigos: Sahar El Malt, Juliana Magdalon, Fernanda Reimberg e Élcio Pantaleão Ribeiro Junior, que sempre me incentivaram a seguir em frente apesar das adversidades do mundo da pesquisa.

A meus colegas e amigos de ICB pelas trocas de experiência nas disciplinas cursadas, congressos e experimentos.

"Sem um fim social, o saber será a maior das futilidades." Gilberto Freyre

#### RESUMO

CHAAR, L. J. Hipertensão arterial e disfunção autonômica induzidas por dieta hiperlipídica: papel do CART e de fatores inflamatórios em núcleos autonômicos do sistema nervoso central. 2016, 144 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2016.

A obesidade é atualmente uma pandemia e fator de risco para diversas doenças, como a hipertensão arterial (HA). Os mecanismos pelos quais o acúmulo de gordura resulta em HA ainda não estão totalmente esclarecidos. Evidências associam a obesidade com hiperativação simpática para diferentes tecidos, o que pode estar envolvido na gênese e manutenção da HA associada à obesidade. Não há estudos que reportam como a dieta hiperlipídica poderia alterar a neurobiologia dos neuropeptídeos em núcleos autonômicos no hipotálamo e tronco encefálico e influenciar a pressão arterial. Além disso, a obesidade é caracterizada por uma inflamação crônica de baixa intensidade sistêmica e central que pode também estar associada à gênese e manutenção da HA.

Assim, a hipótese desta tese é que a obesidade por ingestão de dieta hiperlipídica estaria associada à alteração em neuropeptídeos envolvidos com o equilíbrio energético e fatores inflamatórios em núcleos hipotalâmicos e do tronco encefálico, alterando a atividade do sistema nervoso autônomo e os níveis de pressão arterial após a ingestão de dieta hiperlipídica.

Camundongos C57BL/6J machos foram submetidos a diferentes dietas: controle Nuvilab® (C, 4% lipídeos), hiperlipídica (HL, 60% lipídeos) e hiperlipídica associada à sacarose (HL+HS, 20% sacarose na água) por 8 (HL8) ou 15 semanas (HL15). Peso corporal, adiposidade e parâmetros metabólicos foram avaliados. Pressão arterial média e frequência cardíaca foram registradas por cateter arterial femoral nos animais acordados e com livre movimentação. Foi realizado o estudo da variabilidade cardiovascular por meio da análise espectral para avaliação da atividade do sistema nervoso autônomo. O RNAm de mediadores inflamatórios e neuropeptídeos no hipotálamo e no tronco encefálico foi quantificado por qPCR. A seguir, foi feita imunohistoquímica para os neuropeptídeos ou fatores inflamatórios alterados. Foram utilizados animais transgênicos com deleção seletiva apenas em neurônios e células da glia de um gene da via inflamatória do receptor *toll-like* (TLR)-NFκB (Myd88<sup>lox</sup>NestinCre<sup>+/+</sup>), os quais receberam dieta hiperlipídica por 15 semanas e tiveram a pressão arterial, frequência cardíaca e a atividade do sistema nervoso autônomo analisadas.

alterações Camundongos HL8 e HL15 apresentaram metabólicas características da obesidade como: aumento de peso, adiposidade, glicemia e intolerância à glicose. A dieta hiperlipídica desenvolveu dois fenótipos cardiovasculares: parte dos camundongos desenvolveu hipertensão e parte apresentou resistência à hipertensão. A hipertensão foi tempo-dependente, pois os animais HL15 apresentaram maior prevalência de hipertensão que HL8. A hipertensão arterial em HL-H8 e HL-H15 foi acompanhada por aumento da variabilidade da pressão arterial sistólica e dos componentes hormonal e simpático para os vasos, da variabilidade do intervalo de pulso e índice simpato-vagal para o coração.

Apenas os animais hipertensos apresentaram aumento da expressão gênica de transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) e de neurônios CARTpositivos no núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH). Por sua vez, os animais que receberam HL+HS por 8 semanas não desenvolveram hipertensão ou alterações na expressão gênica de CART. Após 15 semanas de dieta HL+HS os animais desenvolveram menor prevalência de hipertensão que os HL15 acompanhada por aumento da variabilidade do intervalo de pulso e do índice simpato-vagal cardíaco.

HL8 aumentou o RNAm de quimiocina-C-C-ligante-5 (CCL5) no hipotálamo e de CD86 no tronco-encefálico. Nos camundongos HL8 houve maior densidade de microglia no NTS caudal. Os animais transgênicos Myd88<sup>lox</sup>NestinCre<sup>+/+</sup> desenvolveram obesidade e alterações metabólicas quando submetidos à dieta hiperlipídica, porém nenhum deles desenvolveu hipertensão arterial, tampouco alterações no equilíbrio simpato-vagal cardiovascular.

Assim, os resultados mostraram o papel do CART no DMH e da via inflamatória do TLR-NFκB em neurônios e glia na gênese da hipertensão e disfunção autonômica secundárias à ingestão de dieta hiperlipídica, sugerindo novos mecanismos para a inflamação central na hipertensão arterial e alterações autonômicas secundárias à obesidade.

**Palavras chave:** Hipertensão arterial. Obesidade. Dieta hiperlipídica. Inflamação. Hipotálamo. Tronco encefálico. Sistema nervoso autônomo. Sistema nervoso simpático. Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART). Grupo de diferenciação 86 (CD86). Microglia. Fator mielóide de diferenciação 88 (Myd88). Receptor *Toll-like*. fator nuclear kappa B (NFκB).

#### ABSTRACT

CHAAR, L. J. **High blood pressure and autonomic dysfunction induced by highfat diet: role of CART and inflammatory factors in central autonomic network.** 2016, 144 p. Thesis (PhD in Human Physiology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Obesity is a pandemic and a risk factor for several diseases, such as hypertension. The mechanisms by which the fat accumulation results in hypertension are not well understood. Several evidences associate diet-induced obesity with sympathetic overactivation to different tissues, which may be involved in the genesis and maintenance of hypertension associated with obesity. There are no studies reporting how high-fat diet could change the neurobiology of neuropeptides in autonomic nuclei at the hypothalamus and brainstem level and change arterial pressure. In addition, obesity is characterized by low intensity and chronic systemic and central inflammation that may be associated with hypertension secondary to obesity.

Thus, the hypothesis of this thesis is that high-fat diet-induced obesity would be associated with changes in neuropeptides, involved in energy balance, and inflammatory factors at the hipothalamic and brainstem nuclei levels, which induce changes in the autonomic nervous system circuitry, and consequ changes in blood pressure levels secondary to high-fat intake.

Male C57BL/6J mice were fed with distinct diets: Nuvilab ® (C, 4% lipids), highfat (HL, 60% lipids) and high-fat associated with sucrose (HL+HS, 20% sucrose in the drinking water) for 8 (HL8) or 15 weeks (HL15). Body weight, adiposity and metabolic parameters were evaluated. Mean arterial pressure and heart rate were monitored by femoral artery catheterization in conscious freely moving mice. The cardiovascular variability and autonomic function were evaluated by spectral analysis. Neuropeptides and inflammatory factors gene expression was quantified by qPCR at the hypothalamus and brainstem level. Immunohistochemistry was performed to identify neuropeptides or inflammatory factors that has been changed by high-fat diet. Trangenic mice model was used for deletion in neurons and glial cells of a gene related to the inflammatory pathway of toll-like receptor (TLR)-NFKB (Myd88<sup>lox</sup>NestinCre <sup>+/+</sup>). These animals received high-fat diet for 15 weeks and had blood pressure, heart rate and activity of the autonomic nervous system evaluated. HL8 mice and HL15 have shown significant metabolic changes typical of obesity such as: weight gain, adiposity, glucose intolerance and hyperglycemia. HL8 developed two cardiovascular phenotypes: hypertensive-prone and resistant-hypertensive mice. Hypertension was time-dependent, because HL15 had a higher hypertension prevalence than HL8. Hypertension in HL-H8 and HL-H15 were followed by increased systolic blood pressure and pulse interval variabilities, hormonal and sympathetic components to vessels and sympathovagal balance to heart.

Only HL-H8 animals showed Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) gene expression and CART-positive neurons increase in DMH. Besides, the animals that received HL+HS during 8 weeks did not developed hypertension, or even had changed the gene expression of CART. After 15 weeks of HL+HS, mice presented lesser hypertension prevalence that was followed by increased pulse interval variability and sympathovagal balance to the heart.

HL8 group had an increase in the Chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5) mRNA in hypothalamus, and cluster of differentiation 86 (CD86) in brainstem. In HL8, an increase in the microglia density at the caudal NTS level was observed. Transgenic mice Myd88<sup>lox</sup>NestinCre<sup>+/+</sup> fed with hight-fat diet for 15 weeks, developed obesity with changes in metabolic parameters, however, none of them developed hypertension nor changes in sympathovagal balance to the heart.

Taking together, our findings show that hight fat diet-induced hypertension and autonomic imbalance was associated to an upregulation of gene expression and content of CART in the DMH of diet mice. In addition, we can conclude that the TLR-NFkB inflammatory pathway of neurons and glia is involved in autonomic imbalance and hypertension secondary to obesity.

**Keywords:** Neurogenic hypertension. Obesity. High-fat diet. Inflammation. Hypothalamus. Brainstem. Autonomic nervous system. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART). Cluster of differentiation 86 (CD86). Microglia. Myeloid differentiation primary response gene 88 (Myd88). Toll-like receptor. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFκB).

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Controle da homeostase energética pelos neurônios do núcleo arqueado25				
Figura 2 - Esquema exemplificando a ação da enzima Cre-recombinase apenas em neurô-				
nios e células da glia por estar acoplada ao gene Nestin41				
Figura 3 - Peso dos camundongos ao longo das 8 semanas de exposição à dieta				
hiperlipídica (HL) e controle (C)44				
Figura 4 - Peso dos camundongos ao longo das 15 semanas de exposição à dieta				
hiperlipídica (HL) e controle (C)46				
Figura 5 - Parâmetros metabólicos nos camundongos que receberam dieta hiperlipídica por				
8 semanas48				
Figura 6 - Parâmetros metabólicos nos camundongos que receberam dieta por 15				
semanas49				
Figura 7 - Pressão arterial e frequência cardíaca em animais alimentados com dieta controle				
Nuvilab®, dieta hiperlipídica ou dieta hiperlipídica associada à sacarose por 8				
semanas				
Figura 8 - Pressão arterial e frequência cardíaca em animais alimentados com dieta controle				
Nuvilab®, dieta hiperlipídica ou dieta hiperlipídica associada à sacarose por 8				
semanas51				
Figura 9 - Pressão arterial e frequência cardíaca em animais alimentados com dieta controle				
Nuvilab®, dieta hiperlipídica ou dieta hiperlipídica associada à sacarose por 15				
semanas53				
Figura 10 - Análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) e do				
intervalo de pulso (IP) de animais que receberam dieta durante 8 semanas55				
Figura 11 - Análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) e do inter-				
valo de pulso (IP) de animais que receberam dieta durante 15 semanas58				
Figura 12 - Expressão gênica de neuropeptídeos hipotalâmicos em camundongos C57BL/6J				
J alimentados por 8 semanas com dieta controle (C), dieta hiperlipídica resistentes à				
hipertensão (HL-R), dieta hiperlipídica hipertensos (HL-H) ou dieta hiperlipídica associada à				
sacarose (HL+HS)61				
Figura 13 - Expressão gênica de neuropeptídeos do tronco encefálico em camundongos				
C57BL/6J J alimentados por 8 semanas com dieta controle (C), dieta hiperlipídica				
resistentes à hipertensão (HL-R), dieta hiperlipídica hipertensos (HL-H) ou dietahiperlipídica				
associada à sacarose (HL+HS)62				
Figura 14 - Imunohistoquímica para CART no núcleo dorsomedial do hipotálamo64				
Figura 15 - Imunohistoquímica para CART em núcleos do hipotálamo e tronco encefálico.65				

Figura 20 - Estudos de Imunohistoquímica......73

## LISTA DE TABELAS

<b>Fabela 1 -</b> Componentes das dietas controle e hiperlipídica	33
<b>Fabela 2 -</b> Sequência dos primers utilizados neste estudo para qPCR do bloco hipotalâmi	со
e do tronco encefálico	37
<b>Fabela 3 -</b> Peso dos tecidos, em gramas, dos camundongos C57BL/6J J alimentados co	m
dieta Nuvilab ${ m I\!R}$ ou controle balanceada por 8 semanas ou 15 semanas4	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgRP	peptídeo relacionado ao gene agouti
ANOVA	Análise de variância
ARC	núcleo arqueado
С	dieta controle Nuvilab®
CART	transcrito regulado pela cocaína e anfetamina
CCL5	quimiocina-C-C-ligante-5
CD86	grupo de diferenciação 86
Cre neg	Myd88 <sup>lox</sup> Nestin <sup>Cre-/-</sup>
Cre pos	Myd88 <sup>lox</sup> Nestin <sup>Cre+/+</sup>
COX-1	ciclooxigenase-1
COX-2	ciclooxigenase-2
DAB	diaminobenzidina
DAMPs	padrões moleculares associados à lesão endógena
DMH	dorsomedial do hipotálamo
DMV	núcleo dorsal motor do vago
FC	frequência cardíaca
GTT	teste de tolerância à glicose
HF	alta frequência
HL	dieta hiperlipídica
HL+HS	dieta hiperlipídica associada a sacarose 20%
lba-1	proteína adaptadora ligante de cálcio ionizado-1
IL-1β	interleucina-1β
IL-6	interleucina-6
IML	coluna intermédio lateral
iNOS	óxido-nitrico sintase induzível

IP	intervalo de pulso	
JAM-1	molécula de adesão leucócito/plaqueta-1	
KPBS	tampão fosfato de potássio	
LDL	lipoproteína de baixa densidade	
LF	baixa frequência	
LHA	área hipotalâmica lateral	
M1	macrófagos pró-inflamatórios	
MCH	hormônio concentrador de melanina	
MCP-1	proteína quimioatrativa de monócito-1	
MIPs	proteínas inflamatórias de macrófagos	
MSH	hormônio estimulador de melanócito	
Myd88	fator mielóide de diferenciação 88	
NA	núcleo ambíguo	
NEFA	ácidos graxos livres não-estereficados	
NF-кВ	fator nuclear kappa B	
NPY	neuropeptídeo Y	
NTS	núcleo do trato solitário	
PA	pressão arterial	
PAD	pressão arterial diastólica	
PAM	pressão arterial média	
PAMPs	padrões moleculares associados à patógenos	
PAS	pressão arterial sistólica	
PFA	paraformaldeído	
PRRs	receptores de reconhecimento de padrões	
PVN	núcleo paraventricular do hipotálamo	

qPCR PCR quantitativo em tempo real

RMSSD raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças entre sucessivos valores de intervalo de pulso

- RVLM bulbo rostroventrolateral
- SDNN desvio padrão de valores sucessivos
- SNA sistema nervoso autônomo
- SNS Sistema Nervoso Simpático
- TF tampão fosfato
- TLR receptores toll-like
- TNF fator de necrose tumoral
- VLF muito baixa frequência
- VMH núcleo ventromedial do hipotálamo

## SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	.20
1.1 Panorama da obesidade no Brasil e no mundo	.20
1.2 Controle da pressão arterial	.21
1.3 Integração de núcleos hipotalâmicos e tronco-encefálicos envolvidos no contr	role
do sistema nervoso autônomo e da pressão arterial em relação à obesidade	.22
1.4 Integração neuronal envolvida no controle da ingestão alimentar, equilíl	orio
energético e obesidade	.24
1.5 Obesidade e Inflamação central	.28
2 OBJETIVOS	.32
2.1 Objetivos específicos	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	.33
3.1 Animais experimentais	.33
3.2 Avaliação do peso corporal e ingestão alimentar	.34
3.3 Índice de adiposidade	34
3.4 Teste de tolerância à glicose	.34
3.5 Medida de parâmetros bioquímicos plasmáticos	.34
3.6 Monitoramento da pressão arterial e frequência cardíaca e análise	da
variabilidade cardiovascular	.34
3.7 Medida dos níveis de RNA mensageiro por PCR quantitativo em tempo i	real
(qPCR)	36
3.8 Imunohistoquímica	.37
3.9 Animais transgênicos Myd88loxNestinCre+/+	.39
3.10 Análise estatística	41
4 RESULTADOS	.42
4.1 Validação do modelo animal experimental de obesidade	.42
4.1.1 Medida do peso corporal e massa de tecidos periféricos	.42
4.1.2 Parâmetros metabólicos	.47
4.2 Parâmetros cardiovasculares e índice da atividade do sistema nerve	oso
autônomo	50
4.3 Medida dos níveis de RNA mensageiro por PCR quantitativo em tempo i	real
(qPCR) de neuropeptídeos no hipotálamo e tronco-encefálico	60

4.4 Identificação dos neurônios CART-positivos por Imunohistoquímica63
4.5 Correlações66
4.6 Medida dos níveis de RNA mensageiro de citocinas e quimiocinas no hipotálamo
e tronco-encefálico por qPCR67
4.7 Concentração da microglia72
4.8 Os animais transgênicos Myd88loxNestinCre+/+ desenvolveram obesidade e
intolerância à glicose quando submetidos à dieta hiperlipídica74
4.9 Os animais transgênicos Myd88loxNestinCre+/+ não desenvolveram hipertensão
secundária à obesidade75
4.10 Animais transgênicos Myd88loxNestinCre+/+ submetidos à dieta hiperlipídica
não apresentaram disfunção autonômica77
5 DISCUSSÃO80
<b>5 DISCUSSÃO80</b> 5.1 Padronização do modelo animal experimental de obesidade81
<ul> <li>5 DISCUSSÃO</li></ul>
<ul> <li>5 DISCUSSÃO</li></ul>
5 DISCUSSÃO
5 DISCUSSÃO
5 DISCUSSÃO
5 DISCUSSÃO.       80         5.1 Padronização do modelo animal experimental de obesidade
5 DISCUSSÃO
5 DISCUSSÃO       80         5.1 Padronização do modelo animal experimental de obesidade       81         5.2 Alterações na pressão arterial no modelo animal experimental de obesidade       82         5.3 Papel do CART no DMH na hipertensão e disfunção autonômica secundária à       85         5.4 Papel de fatores inflamatórios e da via TLR-NFκB em núcleos autonômicos do       87         6 CONCLUSÃO       91         REFERÊNCIAS       93         ANEXO       91

## 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Panorama da obesidade no Brasil e no mundo

A obesidade é definida como o acúmulo excessivo de gordura corporal resultante do desequilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto energético total (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011). O mundo está vivendo uma epidemia de obesidade, que é altamente prevalente tanto nos países desenvolvidos como nos subdesenvolvidos e está crescendo em ritmos alarmantes no Brasil (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010) e no mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011, NG et al., 2014). Nos últimos 33 anos, houve um aumento mundial de 28% nas taxas de obesidade e excesso de peso em adultos e 47% em crianças (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011). Assim, o número de pessoas com sobrepeso e obesidade estava em torno de 857 milhões em 1980 passando para 2,1 bilhões em 2013 de acordo com um grande novo estudo de carga global de doença da Organização Mundial de Saúde (NG et al., 2014). No Brasil, o excesso de peso atinge 33% das crianças de 5 a 9 anos, 20% dos adolescentes e 51% dos adultos, sendo que destes 17% são obesos. A obesidade cresce em ritmo alarmante em nosso país, sendo que de 1974 a 2008, o excesso de peso na população de homens adultos saltou de 18,5% para 50,1% e de mulheres adultas foi de 28,7% para 48% (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2013). Além disso, aproximadamente 2,6 milhões de pessoas morrem anualmente devido ao excesso de peso (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011).

A população brasileira possui diversos hábitos alimentares inapropriados, visto que 12,6% dos homens e 19,7% das mulheres tem o hábito de substituir o almoço ou o jantar por um lanche de baixo valor nutritivo, como pizzas, sanduíches ou salgados. Além disso, há consumo excessivo de gordura saturada de origem animal: 31% da população não dispensa a carne gordurosa, 53,5% consome leite integral regularmente e 23,3% da população ingere refrigerante no mínimo cinco dias por semana (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2013).

Como consequência ao aumento da obesidade e dos hábitos alimentares inadequados, ocorre o aumento exponencial da incidência de doenças crônicas para as quais ela é importante fator de risco, dentre elas estão as doenças

cardiovasculares neurodegenerativas, respiratórias, е metabólicas como: dislipidemia (KRAUSS; SIRI, 2004), insuficiência cardíaca (DESPRÉS, 2003), aterosclerose (MONTAGUE; O'RAHILLY, 2000), hipertensão arterial (ROCCHINI et al., 2004) e diabetes tipo 2 (CHAN et al., 1994; COLDITZ et al., 1995) acompanhada de resistência à insulina (MEIGS et al., 1997). Assim, faz-se necessário compreender os mecanismos responsáveis por desencadear estas doenças associadas à excessiva deposição de gordura. Apesar de vários estudos nesta área, os mecanismos pelos quais o acúmulo excessivo de gordura resulta em aumento da incidência de hipertensão ainda não foram totalmente esclarecidos. Isto seria de fundamental importância para a geração de novos alvos terapêuticos eficazes no tratamento e prevenção da hipertensão arterial.

#### 1.2 Controle da pressão arterial

A pressão arterial é resultante da resistência vascular e débito cardíaco, duas variáveis que são controladas por componentes não-neurais locais e hormonais e componentes neurais através do sistema nervoso autônomo. Por sua vez, o débito cardíaco é dependente de três variáveis: volume diastólico final, contratilidade miocárdica e frequência cardíaca. O volume diastólico final é o volume alcançado pela câmara ventricular antes da contração. Ele é determinado pela pressão venosa central (retorno venoso) que está relacionada com o volume de sangue que está sob controle do sistema nervoso simpático. Por sua vez, a contratilidade miocárdica e a frequência cardíaca são controladas pelo sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático, respectivamente (GUYENET, 2006).

A hipertensão é uma doença multifatorial, poligênica e complexa com diversas alterações no organismo. A teoria "guytoniana" de controle da pressão arterial postula que o controle a longo prazo desta variável cardiovascular depende exclusivamente de mecanismos fisiológicos renais, os quais seriam os principais responsáveis para gênese da hipertensão arterial (GUYTON, 1990). Por outro lado, existe também a teoria "neurogênica" que afirma que o desenvolvimento da hipertensão arterial depende de alterações na neurobiologia do sistema nervoso autônomo (ESLER, 1995). Porém, não se pode dizer que uma ou outra teoria esteja completamente certa ou errada, visto que a hipertensão essencial é multifatorial e envolve diferentes e complexos mecanismos periféricos e centrais de ajuste de pressão arterial.

### 1.3 Integração de núcleos hipotalâmicos e tronco-encefálicos envolvidos no controle do sistema nervoso autônomo e da pressão arterial em relação à obesidade

A hiperatividade do sistema nervoso simpático (SNS) é uma característica encontrada na obesidade, hipertensão arterial e outras doenças associadas à obesidade tanto em humanos quanto em modelos animais (BERGMAN, 2007; GRASSI et al. 2004).

A insuficiência cardíaca crônica, outra doença que tem a obesidade como fator de risco, também apresenta como característica fisiopatológica a hipertonia simpática (ZUCKER et al.,1995) que contribui grandemente com a morbidade e mortalidade desta doença (FELDER et al., 2003; FELDER, 2010). Várias observações indicam que o aumento da atividade do SNS contribui também para a hipertensão de indivíduos e animais obesos (ESLER, 1995; HALL, 2003; HALL et al., 2010; REAVEN, 2002). Estudos clínicos e com modelos animais confirmaram a forte correlação entre obesidade e hipertensão (HALL, 2003), sendo a obesidade visceral o fator de risco mais importante para hipertensão e doenças cardiovasculares (SIRONI et al., 2004).

A hiperativação simpática pode aumentar a pressão arterial (PA) por causar vasoconstrição, aumentando a resistência vascular periférica, e aumento da reabsorção tubular de sódio no rim à longo prazo. Já foi demonstrada uma hipertonia simpática em outros tecidos de obesos, tais como músculo esquelético (ALVAREZ et al., 2002), medula adrenal (KRUG; EHRHART-BORNSTEIN, 2008), vasos (EGAN et al., 1989) e tecido adiposo (COLLINS; SURWITT, 2001; SMITH, 1980; WEISS; MAICKEL, 1968; YOUNG et al., 1982).

O sistema nervoso autônomo (SNA) é dividido anatômicamente e funcionalmente em simpático e parassimpático, e participa do controle de diversas funções orgânicas, dentre elas a pressão arterial, osmolaridade, temperatura, respiração, digestão, reprodução, dentre outras. A atividade do sistema nervoso simpático é controlada por meio de uma complexa integração de diversos núcleos no sistema nervoso central incluindo áreas suprabulbares de integração vegetativa e comportamental como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e o dorsomedial do hipotálamo (DMH), áreas do tronco encefálico como o núcleo do trato solitário (NTS) e o bulbo rostroventrolateral (RVLM) e medulares como a coluna intermédio lateral (IML), que coordenam uma série de respostas fisiológicas integrativas para manter a homeostase.

No hipotálamo, destaca-se o PVN que integra mecanismos neuroendócrinos, comportamentais e neurovegetativos (DAMPNEY, 1994; SAWCHENCKO; SWANSON, 1982), modulando o reflexo barorreceptor arterial, um dos reflexos cardiovasculares, e a gênese e manutenção do tônus simpático (PATEL; SCHIMID, 1988). O PVN possui duas subdivisões: neurônios parvocelulares e magnocelulares. Estudos com traçadores neuronais mostraram que os neurônios parvocelulares do hipotálamo são uma importante fonte de inervação pré-simpática de diversos territórios periféricos. Além disso, os neurônios paravocelulares são uma fonte importante dos neurônios que influenciam a atividade cardíaca e da medula adrenal (STRACK et al., 1989). Populações distintas e topograficamente organizadas de neurônios parvocelulares no PVN, chamados de pré-autonômicos, projetam-se ao NTS, núcleo dorsal motor do vago (DMV), núcleo ambíguo (NA), RVLM e IML na medula espinhal toraco-lombar que possui neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso simpático (BUIJS et al., 1978; SWANSON; KUYPERS, 1980). Os neurônios destes núcleos encefálicos e medulares estão envolvidos na modulação do controle autônomo do coração e vasos, os efetores do sistema cardiovascular.

Por sua vez, o DMH é classicamente considerado parte da área de defesa do hipotálamo, mediando respostas simpáticas e neuroendócrinas agudas em resposta ao estresse cardiovascular (DIMICCO et al., 2002; YARDLEY; HILTON, 1986; ZARETSKAIA et al., 2002). A ativação ou desinibição de neurônios no DMH aumenta a temperatura corporal, frequência cardíaca, frequência respiratória, atividade locomotora, atividade simpática cardíaca e pressão arterial (BANDLER et al., 2000; BERNARDIS; BELLINGER, 1998; CAO et al., 2004; DIMICCO et al., 2002; 2006; FONTES et al., 2001; HILTON, 1982; MCDOWALL et al., 2007). Há algumas evidências eletrofisiológicas e anatômicas de que existam projeções diretas do DMH ao RVLM, que influenciariam o controle simpático do sistema cardiovascular (HORIUCHI et al., 2004; WANG et al., 2010; WINTERS, 1991). Trabalhos anteriores mostraram que o RVLM contém neurônios pré-simpáticos que se projetam aos neurônios pré-ganglionares na IML e destes aos pós-ganglionares, os quais são

responsáveis pela atividade simpática ao coração e vasos (SPYER, 1994; SUN, 1995). Mas, isso ainda é controverso, pois outro estudo não identificou estas projeções DMH-RVLM (THOMPSON et al., 1996). Além disso, o papel do DMH no controle cardiovascular em situações crônicas ainda foi pouco demonstrado.

Diante disso, mais estudos tornam-se necessários para explicar o efetivo papel de núcleos autônomicos localizados no hipotálamo e tronco-encefálico no controle neural da circulação e seus mecanismos relacionados à obesidade.

# 1.4 Integração neuronal envolvida no controle da ingestão alimentar, equilíbrio energético e obesidade

O sistema nervoso central, em especial os núcleos hipotalâmicos, está diretamente envolvido no desenvolvimento da obesidade e patologias associadas. Um importante mecanismo no desenvolvimento de obesidade é a disfunção em núcleos hipotalâmicos envolvidos no controle alimentar como o núcleo arqueado (ARC), DMH, PVN e a área hipotalâmica lateral (LHA) (SCHWARTZ et al., 2000). Dentre os diversos núcleos hipotalâmicos, o ARC é considerado um dos centros mais importantes de controle do equilíbrio energético, pois recebe e integra informações referentes à disponibilidade de nutrientes e fatores circulantes como glicose, insulina, leptina, grelina, adiponectina, citocinas dentre outros (Figura 1).

Há duas principais subpopulações de neurônios no ARC que influenciam o equilíbrio energético através do controle da ingestão alimentar e do gasto energético. Essas subpopulações de neurônios são classificadas como orexígenos, ou seja, que estimulam a ingestão alimentar e inibem o gasto energético ou anorexígenos que, por sua vez, inibem a ingestão alimentar e estimulam o gasto energético. Essas duas subpopulações de neurônios secretam neuropeptídeos diferentes. Os neurônios orexígenos possuem fenótipo de peptídeo relacionado ao gene agouti (AgRP) e/ou neuropeptídeo Y (NPY). Por outro lado, os neurônios anorexígenos possuem fenótipo de hormônio estimulador de melanócito (MSH) e/ou transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) (BARSH; SCHWARTZ, 2002, Figura 1). Os neurônios orexígenos e anorexígenos do ARC projetam-se principalmente para neurônios de segunda ordem localizados em outros núcleos hipotalâmicos. Um local de ampla projeção dos neurônios orexígenos é o PVN, enquanto que os neurônios anorexígenos projetam-se amplamente para o DMH, PVN e LHA. A LHA por sua vez possui neurônios que expressam orexina e

hormônio concentrador de melanina (MCH). Além disso, na porção dorsal do ARC está localizado o núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH), que recebe projeções principalmente dos neurônios AgRP/NPY e CART/POMC do ARC. Os axônios dos neurônios do VMH projetam-se para o ARC, DMH e LHA e também para regiões bulbares, como o NTS. Assim, uma alteração da neurobiologia desses grupamentos de neurônios do ARC, alterando a ingestão alimentar e gasto energético pode levar à obesidade (BARSH; SCHWARTZ, 2002).



**Figura 1** - **Controle da homeostase energética pelos neurônios do núcleo arqueado.** Há duas subpopulações de neurônios do núcleo arqueado - AgRP/NPY e POMC/CART que são reguladas por hormônios circulantes. AgRP (peptídeo relacionado ao gene agouti) e NPY (neuropeptídeo Y) são neuropeptídeos que estimulam a ingestão alimentar e reduzem o gasto energético, enquanto que hormônio estimulador de melanócito (MSH), um derivado pós- translacional de pro-opiomelanocortina, POMC) e CART (transcrito regulado pela cocaína e anfetamina) inibem a ingestão alimentar e aumentam o gasto energético. A insulina e leptina são hormônios que circulam na proporção dos depósitos adiposos do organismo e inibem neurônios AGRP/NPY enquanto estimulam neurônios adjacentes POMC/CART. Por outro lado, baixos níveis de insulina e leptina ativam os

neurônios AgRP/NPY enquanto inibem neurônios POMC/CART. A grelina é um peptídeo secretado pelo estômago e pode ativar os neurônios AgRP/NPY, estimulando assim a ingestão alimentar. Isto proporciona um mecanismo molecular para a integração de sinais do padrão da refeição de curto prazo com o equilíbrio energético de longo prazo. Adaptado de BARSH; SCHWARTZ, 2002.

Além do ARC, estudos recentes sugerem um papel importante também do PVN na obesidade, devido à sua participação no controle do apetite e gasto energético (WILLIAMS, et al., 2000). Além disso, o PVN está envolvido na ativação de neurônios pré-simpáticos que se projetam para o RVLM e para a IML modulando a atividade simpática autônoma (SWANSON; SAWCHENKO, 1983) que por sua vez participa do controle neural da pressão arterial. Alterações na integração neuronal no PVN podem contribuir para o desenvolvimento da hipertensão arterial, insuficiência cardíaca e outras doenças cardiovasculares, além das doenças relacionadas à obesidade (BENARROCH, 2005).

Diversos estudos sugerem um papel importante do tronco encefálico caudal no controle do equilíbrio energético (BJORBAEK; KAHN, 2004; GOLDSTONE et al.,1997; GRILL; KAPLAN, 2002; SCHWARTZ; MORAN, 2002) realizando uma complexa integração neuronal com o hipotálamo semelhante à que acontece no controle da pressão arterial. Por exemplo, são encontrados no NTS neurônios sensíveis à leptina (BJORBAEK; KAHN, 2004; GOLDSTONE et al.,1997; GRASSI et al., 2004; SCHWARTZ; MORAN, 2002) e glicose (GRILL; KAPLAN, 2002).

Outra região do tronco encefálico envolvida no equilíbrio energético é o bulbo ventrolateral, da qual faz parte, por exemplo, a área A1, em que neurônios responsivos ao estado alimentar, co-expressam noradrenalina e adrenalina como neurotransmissor (RITTER et al., 2001). Circuitos do tronco cerebral independem do hipotálamo no controle motor da mastigação e deglutição (GRILL; NORGREN, 1978; KAPLAN et al., 2000) e na alteração da quantidade de alimento ingerida em resposta ao tamanho da refeição (GRILL; KAPLAN, 1992; GRILL; SMITH, 1988; SEELEY et al., 1994). Porém, a integração hipotálamo-tronco encefálica é fundamental no controle dos circuitos motores do trato gastrointestinal em resposta ao jejum (SEELEY et al., 2004).

O CART é um dos neuropeptídeos anorexígenos envolvidos no equilíbrio energético, inibindo a ingestão alimentar e estimulando o gasto energético por meio da termogênese. Além disso, foi descrito seu envolvimento em diferentes comportamentos, como recompensa e a ativação do eixo hipotálamo-hipófiseadrenal em resposta ao estresse (ROGGE et al., 2008). Estudos prévios sugerem que o CART pode também estar envolvido no controle cardiovascular pela sua presença em áreas de controle do sistema nervoso autônomo como IML, RVLM, DMV e nos gânglios intracardíacos em ratos (BURMAN, 2004; DUN et al., 2002; FENWICK, 2006; HWANG et al., 2004; KOYLU, 1997; MATSUMURA et al., 2001; RICHARDSON, 2006).

Trabalhos anteriores evidenciaram que a injeção intracerebroventricular aguda de CART leva ao aumento da pressão arterial, freguência cardíaca e da atividade do nervo simpático renal em coelhos não-anestesiados (MATSUMURA et al., 2001). Além disso, a injeção intratecal de CART promove um efeito aditivo na resposta pressora de glutamato em ratos anestesiados (SCRUGGS et al., 2005). O CART é colocalizado com neurônios catecolaminérgicos e não-catecolaminérgicos do RVLM (BURMAN et al., 2004). Estudos de imunohistoquímica revelaram que existe uma rede neural estabelecida de neurônios CART positivos ao longo do eixo simpato-adrenal. Neurônios pré-ganglionares simpáticos são CART positivos, enquanto os parassimpáticos não são. Na medula supra-renal, a população de células cromafins é CART-positiva, enquanto que os neurônios pós-ganglionares não são. Estudos recentes sugerem que o CART pode excitar neurônios ao longo do eixo do sistema nervoso simpático, direta ou indiretamente, através da potenciação de ação de glutamato, por ativação de receptores NMDA (CHIU et al., 2009; 2010; HSUN LIN et al., 2005). Essas observações sugerem que o CART pode estar relacionado com a hiperatividade do sistema nervoso simpático na hipertensão associada à obesidade.

Como a dieta rica em gordura pode alterar a neurotransmissão no hipotálamo (GUYENET et al., 2013), neste trabalho postulamos a hipótese de que a obesidade provocaria alterações na expressão de neuropeptídeos em núcleos autonômicos hipotalâmicos e do tronco encefálico, que poderiam estar envolvidos na disfunção autonômica com hiperatonia simpática e hipertensão secundária à obesidade. Assim, o presente estudo teve como um dos objetivos verificar a expressão e o papel do CART e outros neuropeptídeos no sistema nervoso central sobre a hipertensão induzida pela obesidade em camundongos.

Dieta rica em gordura promove em roedores diversas alterações metabolicas encontradas na obesidade humana, tais como: aumento da massa corporal, aumento da adiposidade, intolerância à glicose e hipertrigliceridemia, sendo, portanto, um modelo adequado para investigar os mecanismos relacionados ao desenvolvimento da obesidade e doenças associadas (BUETTNER et al., 2007). Além da ingestão elevada de gordura, a elevada ingestão de açúcares, como sacarose e frutose, abundantes nos refrigerantes, é associada a um aumento da prevalência de obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares (KANAREK et al., 1987; MALIK et al., 2010; SANTURÉ et al., 2002). A sacarose é um dissacarídeo composto por glicose e frutose. Camundongos com uma dieta com alta ingestão de gordura e sacarose (HL+HS) é um modelo que se assemelha à dieta ocidental. Também foi demostrado que a ingestão de uma dieta HL+HS é capaz de promover obesidade (CHOI et al., 2014; NAKAJIMA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2014; SURWIT et al., 1995), intolerância à glicose, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia (BLACK et al., 1998; CHOI et al., 2014; NAKAJIMA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2014; SURWIT et al., 1995,) em camundongos e ratos. Por outro lado, a elevada ingestão de sacarose, promove dois diferentes fenótipos cardiovasculares: hipertensão (REIL et al., 1999; ROBERTS et al., 2001) ou normotensão (CONTRERAS; WILLIAMS, 1989) em ratos. Então, ainda permanece controverso se alto teor de gordura e sacarose pode levar à hipertensão em camundongos.

#### 1.5 Obesidade e Inflamação central

Estudos prévios demonstraram uma forte associação entre o processo inflamatório e o desenvolvimento de obesidade (GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011), hipertensão (GRANJER, 2006) e diabetes (DINARELLO et al., 2010; DONATH; MANDRUP-POULSEN, 2008). A obesidade geralmente está associada a um estado inflamatório crônico e sistêmico de baixa intensidade que afeta diversos tecidos, como o tecido adiposo, fígado, músculo esquelético, vasos sanguíneos, pâncreas e até mesmo o hipotálamo como evidenciado por uma expressão gênica exacerbada de diversos mediadores inflamatórios (CHEN; HESS, 2008; DE SOUZA et al., 2005; EMILSSON et al., 2008; TAPIA-GONZÁLEZ et al., 2011).

O aumento de fatores inflamatórios no hipotálamo, levando à resistência local à leptina/insulina que é um mecanismo importante observado na obesidade experimental. Na indução de um processo inflamatório há alteração de neurotransmissores envolvidos no controle alimentar e equilíbrio energético com aumento da termogênese no tecido adiposo marrom por meio do estímulo de eferentes adrenérgicos (ARRUDA et al., 2010; 2011). Além das alterações nos neurotransmissores, a inflamação pode levar a morte neuronal local (ARRUDA et al. 2011). Apesar de estar bem estabelecido o envolvimento da inflamação hipotalâmica na modulação da ingestão alimentar, hiperfagia e resistência local à leptina/insulina, ainda não foi esclarecido a contribuição da inflamação para a disfunção autônomica com hiperativação simpática associada à obesidade.

Outro aspecto importante que não possui evidências claras na literatura é a ocorrência de processos inflamatórios em diferentes núcleos além do hipotálamo, tais como os núcleos do tronco encefálico, que estão diretamente envolvidos no controle do tônus simpático e parassimpático. Há alguns indícios de envolvimento da inflamação em núcleos do tronco encefálico no desenvolvimento e/ou manutenção de outras doenças que tem a obesidade como fator de risco com aumento da atividade simpática. Na hipertensão neurogênica, por exemplo, há aumento da expressão gênica e protéica de moléculas pró-inflamatórias como a molécula de adesão leucócito/plaqueta-1 (JAM-1) (WAKI et al., 2008), correlacionada com o acúmulo de leucócitos nos capilares do NTS de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (WAKI et al., 2007). Há também aumento de expressão gênica de proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1), uma quimiocina, no NTS de SHR, sugerindo uma condição de inflamação em outros núcleos no sistema nervoso central além do hipotálamo. Além disso, a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e o fator de necrose tumoral (TNF) injetados por via intravenosa ou pela artéria carótida são capazes de causar ativação de neurônios do PVN, RVLM e NTS (WAKI et al., 2008) e levar à uma simpatoexcitação renal e cardíaca, aumentando a frequência cardíaca e a pressão arterial (KANNAN et al., 1996; ZHANG et al., 2003), indicando que algumas citocinas teriam um papel crucial no desenvolvimento de hipertensão neurogênica. O aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias no NTS de ratos hipertensos e no PVN de ratos com insuficiência cardíaca leva à simpatoexcitação de núcleos relacionados

ao controle autônomo, nestas doenças relacionadas à obesidade (KANG et al., 2008a; 2008b).

Vários potenciais mediadores envolvidos na ativação do SNS pela inflamação têm sido propostos (AMARAL et al., 2006; PURKAYASTHA et al., 2011; ROMANATTO et al., 2007). Independentemente do mediador, a inflamação associada à obesidade é caracterizada pelo recrutamento e infiltração de células imunes como macrófagos, células dendríticas e células T em diversos tecidos, especialmente no tecido adiposo. Adipócitos de indivíduos obesos produzem MCP-1, proteínas inflamatórias de macrófagos (MIPs), interleucina-6 (IL-6), IL-1β e TNF que estimulam o recrutamento de monócitos no tecido adiposo e ativam sua diferenciação a macrófagos pró-inflamatórios (M1) (WEISBERG et al., 2003; XU et al., 2003), tornando o tecido adiposo de obesos rico em macrófagos M1 quando comparado ao tecido adiposo de camundongos magros (LUMENG et al., 2007a; 2007b; WEISBERG et al., 2003).

Outro mediados inflamatório são os receptores *toll-like* (TLR) que pertencem à família dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Os subtipos TLR2 e TLR4 são expressos em muitos tipos celulares do encéfalo (HANISCH et al., 2008). Os TLRs desempenham um papel essencial na resposta imune inata e nas funções do sistema imunológico aos desafios por patógenos (BEUTER, 2004). A ativação dos TLR pode levar à produção de citocinas e quimiocinas, como por exemplo, TNF, interferon, pro-IL-1β, IL-6, pro-interleucina-18, dentre outras pela ativação do fator de transcrição pro-inflamatório fator nuclear kappa B (NF-κB). A ativação de TLR e a progressão da inflamação pode ocorrer não só por patógenos ou por padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), mas também em resposta a padrões moleculares associados à lesão endógena (DAMPs), componentes da dieta como ácidos graxos saturados, ceramidas, lipoproteína de baixa densidade (LDL) modificada, altos níveis de glicose, depósitos de proteínas amilóides ou em resposta ao estresse metabólico da obesidade (JIN et al., 2013).

Os TLRs ativados por DAMPs tem sido propostos como sendo um elo entre inflamação e hipertensão (MCCARTHY et al., 2014). Alguns estudos mostraram que na hipertensão há ativação do TLR em células apresentadoras de antígeno atraindo linfócitos para órgãos chaves para o controle cardiovascular como o rim (HARWANI et al., 2011) ou o coração (ABBOUD et al., 2012).

O fator mielóide de diferenciação 88 (Myd88) é uma das proteínas adaptadoras conhecidas dos TLRs, ou seja, participa da ativação do sinal downstream destes receptores. O Myd88 é comum a todos os TLR exceto o TLR-3 (MIAN et al., 2014; WATTERS et al., 2007). Apesar de alguns estudos sobre a associação entre hipertensão e NF-κB e inflamação em órgãos que controlam a pressão arterial, o papel do TLR, seus mecanismos no sistema nervoso central e seu envolvimento na hipertensão e na disfunção autonômica no modelo experimental de obesidade ainda são pouco conhecidos. Nos animais transgênicos utilizados no presente estudo, foi deletada a proteína Myd88 especificamente em neurônios e glia e consequentemente a via de ativação do receptor toll-like. Esse protocolo foi fundamental para verificar se a ausência da via inflamatória TLR-NF-κB no sistema nervoso central impede o desenvolvimento de hipertensão nos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e estudar o papel da inflamação na hipertensão neurogênica secundária à dieta hiperlipídica.

### 2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi investigar novos mecanismos centrais relacionados a neuropeptídeos e inflamação da hipertensão secundária à obesidade pela ingestão de dieta hiperlipídica e dieta hiperlipídica associada à sacarose. Além disso, foi estudado se esses mecanismos estão relacionados com a disfunção autonômica hipertensão secundária à obesidade.

#### 2.1 Objetivos específicos

Foram utilizados animais submetidos a dois diferentes períodos (8 e 15 semanas) de exposição à dieta hiperlipídica (HL) e dieta hiperlipídica associada à sacarose 20% (HL+HS) para avaliar:

- Parâmetros metabólicos para caracterização do modelo de obesidade;

 Parâmetros cardiovasculares (pressão arterial e frequência cardíaca) e a modulação autonômica por meio de análise da variabilidade e do espectro da frequência cardíaca e pressão arterial sistólica;

- As alterações na expressão gênica de neuropeptídeos no hipotálamo e troncoencefálico;

- A distribuição rostro-caudal de neurônios CART-positivos no hipotálamo;

 As alterações na expressão gênica e localização de fatores relacionados à inflamação no hipotálamo e tronco-encefálico;

 O papel da via inflamatória TLR-NFκB em núcleos autonômicos do sistema nervoso central na hipertensão secundária à obesidade utilizando camundongos transgênicos Myd88<sup>lox</sup>Nestin<sup>Cre</sup> a fim de deletar a proteína Myd88 de neurônios e glia e consequentemente a via de ativação dos receptores *toll-like*.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### 3.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos C57BL/6J J, machos, provenientes do Biotério de Experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciência Biomédicas-USP, com 10 semanas de idade no início dos protocolos. Todos os protocolos utilizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB-USP nº 026 nas fls.126 do livro 02.

Os camundongos foram mantidos em gaiolas individuais com ciclo de claro/escuro 12h/12h, em temperatura controlada (21-22 °C) e alimentados com dieta controle Nuvilab® (C, Rhoster, 4% lipídeos), controle balanceada (10% lipídeos), hiperlipídica rica em ácidos graxos (HL, 60% kcal lipídeos) ou hiperlipídica associada à sacarose simulando o consumo humano de dieta rica em gordura animal associado a bebidas ricas em açúcar (HL+HS, 60% kcal como lipídeos + 20% sacarose na água de beber) *ad libitum* (veja composição das dietas abaixo na Tabela 1) por 8 ou 15 semanas. As dietas controle balanceada e hiperlipídica tiveram suas composições adaptadas de um trabalho anterior (REEVES, 1997). Os componentes estão descritos na tabela abaixo:

Ingredientes (g/Kg)	Controle Balanceada	Hiperlipídica (HL)
Caseína	189,57	258,44
Sacarose	88,9	88,9
Amido de milho	413,06	0
Amido dextrinizado	161,5	161,5
Gordura de origem animal	18,95	316,6
Óleo de soja	23,69	32,3
Celulose	54,6	74,1
Mix de minerais (AIN-93)	35	47,95
Mix de vitamina	10	13,75
L-cisteína	2,84	3,87
Colina	1,89	2.6
Kcal/g	3,84	5,23

Tabela 1 - Componentes das dietas controle balanceada e hiperlipídica

#### 3.2 Avaliação do peso corporal e ingestão alimentar

O peso corporal dos camundongos foi avaliado uma vez por semana com medida em balança semi-analítica (Acrimet, Brasil). Foi calculada também a ingestão alimentar cumulativa obtida pela soma das calorias totais (kcal) ingeridas pelos animais ao longo de todo o protocolo.

## 3.3 Índice de adiposidade

Os animais foram deixados em jejum durante a noite e em seguida realimentados por duas horas com livre acesso à dieta para padronizar a ingestão alimentar de todosos animais. Entre as 8:00 h e 10:00 h da manhã os camundongos foram eutanizados sob anestesia com isoflurano (5% em O<sub>2</sub> no ar inspirado) e os tecidos foram retirados e pesados. A soma da massa do tecido adiposo epididimal, retroperitoneal e inguinal foi considerada como índice de adiposidade.

#### 3.4 Teste de tolerância à glicose

No fim da 8<sup>a</sup> ou 15<sup>a</sup> semana de alimentação com as dietas foi realizado o teste de tolerância à glicose (GTT). Após 6 horas de jejum, os camundongos receberam injeção intraperitoneal de glicose (2g/ kg/ 5 ml) de peso corporal, resultando assim em um volume injetado de 120 a 200 µl. Sangue foi retirado por incisão da cauda dos camundongos para a medida da glicemia (glicosímetro) nos tempos 0, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de glicose.

#### 3.5 Medida de parâmetros bioquímicos plasmáticos

O plasma foi separado de amostras de sangue coletadas por centrifugação (1100 rpm) por 15 min em 4 °C e armazenado em −80 °C. Os índices lipidêmicos para triacilglicerol e ácidos graxos livres foram quantificados com *kits* da Labteste e Wako, respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante. A insulina plasmática foi dosada por ELISA com *kit* da Millipore. Os níveis séricos de IL-6 foram quantificados por ELISA com o *kit* DuoSet da R&D.

# 3.6 Monitoramento da pressão arterial e frequência cardíaca e análise da variabilidade cardiovascular

Após o período de exposição às dietas por 8 ou 15 semanas, os camundongos foram anestesiados com anestésico volátil (isoflurano 5% no ar

inspirado de oxigênio medicinal) e um cateter de microrenatane (0,025 mm de diâmetro externo e 0,012 mm de diâmetro interno) foi implantado na artéria femoral. O cateter foi exteriorizado na região escapular do animal por via subcutânea e ao final da cirurgia os animais foram colocados em gaiolas individuais. Foi respeitado um dia de recuperação e em seguida foram registradas a pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) nos animais acordado e com livre movimentação (RODRIGUES et al., 2011).

Os registros da PA e FC foram feitos conectando-se a cânula arterial, previamente heparinizada, a um transdutor de pressão (Modelo CDX III, Cobe Labs, USA), o qual estava acoplado a um amplificador (ML224 Quad Bridge Amp, ADInstruments, Austrália) que, por sua vez, é conectado a um sistema de aquisição de dados digital (PowerLab, ADInstruments, Austrália). A frequência de amostragem utilizada para os registros hemodinâmicos foi de 4000 Hz. Após estabilização dos parâmetros observados, foram registrados os valores basais da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) e FC por um período de 30 minutos a 1 hora. A temperatura dentro da sala de registro foi mantida entre 22 e 24 °C. Foram analisados apenas os registros de animais que apresentaram um diferencial de pressão pulsátil maior que 20 mmHg para garantir que a aquisição dos dados fosse fidedigna e representativa dos valores de pressão arterial sem interferência do amortecimento do pulso de pressão, fato que poderia ter ocorrido por obstrução parcial do cateter causada por dobras ou proximidade a bifurcações arteriais.

Os índices de atividade simpática e parassimpática foram obtidos por análise da variabilidade da pressão arterial sistólica e intervalo de pulso através da análise espectral dos registros. Para isto, os registros foram analisados por um programa computacional (Cardioseries, v. 2.4 Brasil – http://sites.google.com/site/cardioseries) desenvolvido por Daniel Penteado Martins Dias (OLIVEIRA et al., 2012; SANTOS et al., 2012; TEZINI et al., 2013) que detecta pontos de inflexão em sinais periódicos gerando séries temporais da PA sistólica, batimento a batimento. Séries temporais de intervalo de pulso (IP) também foram calculadas pelos intervalos entre consecutivos valores de pressão sistólica. Para cada registro foram calculados índices de variabilidade da PA e IP no domínio do tempo. A variabilidade da PA foi quantificada pelo SDNN e pela raiz quadrada da média da
soma dos quadrados das diferenças entre sucessivos valores de IP (RMSSD). A variabilidade da PA e IP também foram avaliadas no domínio da frequência, por meio da análise espectral. As séries temporais da PA sistólica e IP foram interpoladas em 20 Hz e divididas em segmentos contínuos de 512 batimentos, sobrepostos em 50%. Cada segmento foi submetido a um "janelamento" do tipo *Hanning* e a análise espectral foi realizada pela transformada rápida de Fourier (FFT). Os componentes oscilatórios encontrados foram quantificados em faixas de muito baixa (VLF: 0,0-0,15 Hz), baixa (LF: 0,15 a 1,5 Hz) e alta frequência (HF: 1,5 a 5,0 Hz) em valores absolutos e o índice normalizado LF/ HF (GEHRMANN et al., 2000; THIREAU et al., 2007) que representa a atividade simpato-vagal ao coração. Após o registro dos dados hemodinâmicos, os camundongos foram sacrificados para coleta dos tecidos e núcleos encefálicos.

# 3.7 Medida dos níveis de RNA mensageiro por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Os mesmos camundongos que tiveram os parâmetros cardiovasculares avaliados foram anestesiados com anestésico volátil (isoflurano 5% no ar inspirado de oxigênio medicinal) e sacrificados por decapitação para retirada e coleta do bloco hipotalâmico e do bloco do tronco encefálico. Todos os animais foram sacrificados no mesmo período do dia pela manhã para evitar alterações circadianas na expressão gênica. Após a remoção do encéfalo do crânio, um bloco de tecido hipotalâmico foi dissecado no nível de +0,26 a -2,30 mm do bregma entre o quiasma óptico e o pedúnculo cerebellar superior. O bloco de tronco encefálico foi dissecado no nível de -5,80 a -8,00 mm do bregma entre o pedúnculo cerebellar inferior e o óbex. Foram coletados rapidamente o bloco hipotalâmico e o tronco encefálico e imediatamente armazenados em freezer -80 °C.

O RNA total destas amostras foi extraído com o kit Illustra RNAspin Mini Kit da General Electrics seguindo as instruções do fabricante. As amostras tiveram o RNAtotal quantificado em espectrofotômetro ("Nanodrop 3300" - Thermo scientific, Bremen, Alemanha). A síntese de cDNA foi realizada com o kit da SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen<sup>™</sup>) a partir de 1 ug de RNA total. A reação de amplificação foi realizada como previamente descrito (FESTUCCIA et al., 2008) no aparelho Rotor Gene Q (Qiagen<sup>®</sup>) utilizando-se o kit SYBR Green Jump Start Taq Ready Mix without MgCl2 # S5193 400 RXN (Sigma- Aldrich Co.<sup>®</sup>).

Os níveis de RNA mensageiro de diversas citocinas (TNF, IL-1β), quimiocinas (CCL5 e MCP-1) neurotransmissores (AgRP, CART, POMC e NPY) e proteínas relacionadas com a via inflamatória (ciclooxigenase-1 (COX-1), ciclooxigenase-2 (COX-2), óxido-nitrico sintase induzível (iNOS), *cluster* de diferenciação (CD86)) foram quantificados, utilizando o gene 36B4 (NM\_022402) como gene de referência (FESTUCCIA et al., 2008), pois foi o gene que apresentou menor variação entre os grupos controle e dieta hiperlipídica dentre os genes de referência testados (Tabela 2). Para análise da quantificação dos resultados do qPCR em tempo real, foi utilizado o software do próprio equipamento de qPCR (Rotor Gene Q, Qiagen<sup>®</sup>) sendo determinado o *threshold* (RAMAKERS et al., 2003). Com estes valores foi determinado o Ef<sup>ΔΔCT</sup> (SCHEFE et al., 2006).

	Sense (5'→3')	Antisense (5'→3')
36B4	TAAAGACTGGAGACAAGG	TAAAGACTGGAGACAAGGTG
CART	GTCCCACGAGAAGGAGCTGCCAA	GCCCATCCGCTCTCTGAGGGG
AgRP	ACCTTAGGGAGGCACCTCATGCC	GCGGAGAACGAGACTCGCGG
POMC	GCCTTTCCGCGACAGGGGTC	AAACACGGGCGTTCCAGCG
NPY	AGCCTTGTTCTGGGGGGCGTT	CCCGCCACGATGCTAGGTAA
TNF	AGCCCACGTCGTAGCAAACCA	GCAGGGGCTCTTGACGGCAG
IL-1β	CCCTGCAGCTGGAGA?TGTGGA	CTG?GCCACCTGTCTTGGCCG
COX1	AGGCCACGGGGTAGACCTTG	GGCTCGGAACAGCAGCTC
COX2	AGGGCCCTTCCTCCCGTAGC	AAGTCCACTCCATGGCCCAGTCC
iNOS	AAGTCCAGCCGCACCACCCT	TCCGTGGCAAAGCGAGCCAG
CCL5	CCTCACCATATGGCTCGGACACCA	GCTGTGCAGAGCCTCGGAGC
MCP1	TCAGCCAGATGCAGTTAACGCCC	GTGTACTCAGTCTCCACAGA
CD86	CCCAGCAACACAGCCTCTAA	ACTCTGCATTTGGTTTTGCTGA

 Tabela 2 - Sequência dos primers utilizados neste estudo para qPCR do bloco hipotalâmico e do tronco encefálico.

### 3.8 Imunohistoquímica

Ao final dos protocolos de dieta, 4 a 5 camundongos foram profundamente anestesiados através de anestesia inalatória (isoflurano 5% no ar inspirado de oxigênio medicinal) e submetidos à perfusão cardíaca via ventrículo esquerdo com uma agulha conectada a uma bomba peristáltica por tubos (Cole Parmer, Chicago, IL) inicialmente utilizando 50 ml de solução salina (0,9%), seguida por 180 ml de solução de paraformaldeído (PFA, 4% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4) durante oito minutos. Os encéfalos foram removidos da calota craniana imediatamente e pós-fixados por 4 horas a 4 °C em PFA 4%. A seguir, os encéfalos foram crioprotegidos em solução tampão fosfato com 20% de sacarose a 4 °C *"overnight"*. No dia seguinte, os encéfalos foram seccionados em plano coronal em um micrótomo de congelamento e foram coletados cortes com 30 µm de espessura em quatro compartimentos. Os tecidos foram conservados em solução anti-congelante. Um desses compartimentos foi processado com a técnica Imunoperoxidase para o CART.

Os cortes foram incubados por 40 horas a 4 °C com anticorpo para CART (55-102) feito em coelho, anti-camundongo (Phoenix Pharmaceutics) na concentração de 1:20000 em tampão fosfato (TF) contendo 2% de soro normal da espécie hospedeira do anticorpo secundário e 0,3% Triton X-100. A concentração do anticorpo primário foi escolhida após um teste de gradiente com as concentrações 1:5000, 1:10000 e 1:20000. Este anticorpo já foi amplamente utilizado na literatura e mostrou imunoreatividade em núcleos do encéfalo que classicamente são descritos como possuindo CART corroborando com descrições anteriores (ELIAS et al., 2001). Depois de várias lavagens em tampão fosfato de potássio (KPBS) 0,02M, os cortes foram incubados por duas horas em anticorpo feito em cabra anti-coelho 1:200 biotinilado (Vector, Burlingame, CA). Após várias lavagens em KPBS 0,02M, os cortes foram então incubados por 2 horas em um complexo avidina-biotina (Vectastain, Elite ABC kit, Vector, 1:200). Os cortes foram lavados novamente em KPBS 0,02M e o produto da reação da peroxidase foi visualizado usando o método da glicose oxidase (ITOH et al., 1979) e tendo diaminobenzidina (DAB) como cromógeno. Os cortes foram lavados novamente em KPBS 0,02M e montados em lâminas gelatinizadas. A imunomarcação foi intensificada mergulhando-se as lâminas com os cortes em uma solução de tetróxido de ósmio durante 15 segundos. Finalmente, os cortes foram desidratados, diafanizados em xilol e cobertos com DPX (Sigma-Aldrich). Os cortes foram fotografados com o uso de um microscópio Zeiss

Axioimager A1 (Zeiss, Muenchen, Germany) equipado com uma câmera digital do tipo Zeiss AxioCam HRc (Zeiss).

Outra série dos cortes foi incubada por 48 h a 4 °C com anticorpo para proteína adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (Iba-1) (1:2000) feito em coelho anti-camundongo (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) em TF contendo 2% de soro normal de cabra e 0,3% Triton X-100. Esta proteína é marcador estrutural microglia. A concentração do anticorpo primário foi escolhida após um teste de gradiente com as concentrações 1:500, 1:1000 e 1:2000. Depois de várias lavagens em KPBS 0,02M, os cortes foram incubados por duas horas em anticorpo feito em cabra anti-coelho 1:200 biotinilado (Vector). Após várias lavagens em KPBS 0,02M, os cortes foram então incubados por 2 horas em um complexo avidina-biotina (Vectastain, Elite ABC kit, Vector, 1:200). Os cortes foram lavados novamente em KPBS 0,02M e o produto da reação da peroxidase foi visualizado usando o método da glicose oxidase (ITOH et al., 1979) e tendo DAB como cromógeno. Os cortes foram lavados novamente em KPBS 0,02M e montados em lâminas gelatinizadas. A imunomarcação foi intensificada mergulhando-se as lâminas em uma solução de tetróxido de ósmio durante 15 segundos. Por fim, os cortes foram desidratados, diafanizados em xilol e cobertos com DPX (Sigma-Aldrich).

Os cortes dos encéfalos de camundongos, corados através da reação de Imunoperoxidase, foram fotografados com o uso de um microscópio Zeiss Axioimager A1 (Zeiss, Muenchen, Germany) equipado com uma câmera digital do tipo Zeiss AxioCam HRc (Zeiss) com um aumento de 10 x.

A análise de contagem de células CART-positivas e a esqueletonização do Iba foram realizadas utilizando o programa ImageJ. A contagem de células CART positivas foi feita em toda distribuição rostro-caudal do encéfalo. A análise por esqueletonização consiste em quantificar a densidade das células marcadas. A imagem resultante foi convertida para uma imagem binária e esqueletonizada. O AnalyzeSkeleton plugin (http://imagejdocu.tudor.lu/) foi aplicado para quantificar o número de pontos por quadro para quantificar a densidade da microglia.

### 3.9 Animais transgênicos Myd88loxNestinCre+/+

Foi utilizada a tecnologia recombinase-CRE-lox a fim de obter camundongos transgênicos Myd88<sup>lox</sup>Nestin<sup>Cre</sup>, tornando possível deletar o fator mielóide de

diferenciação 88 (Myd88) e, conseguentemente, a via de ativação do receptor TLR especificamente em neurônios e glia. A recombinase-cre é uma enzima que cataliza a recombinação entre duas regiões loxP, promovendo assim a deleção de regiões específicas entre duas sequências loxP do genoma que estejam (ATAACTTCGTATAGCATACATTATAC GAAGTTAT). Como a seguência loxP está em uma região do gene que é essencial para a função da proteína, ocorrerá a deleção da função desta proteína (SAUER; HENDERSON, 1988; STERNBERG et al., 1981). No caso do presente experimento, a proteína deletada foi o Myd88. Assim, foram silenciados os receptores TLR.

A recombinase-cre foi inserida com uma sequência do promotor do gene Nestin, um gene expresso exclusivamente em neurônios e glia, fazendo com que a recombinase-cre fosse transcrita juntamente com a proteína Nestin. Isso possibilitou a deleção do gene Myd88 apenas em células que expressam a proteína Nestin e por consequência a recombinase-cre, ou seja, apenas em neurônios e glia. Assim, houve a deleção da via de sinalização de todos os TLRs, exceto TLR3, apenas no sistema nervoso central em neurônios e células da glia (Figura 2).

Foi realizado o cruzamento por três gerações de animais Nestin<sup>Cre</sup> com animais Myd88<sup>lox</sup>, originando camundongos do grupo controle (com a presença da sequência lox, porém sem a recombinase-cre, Myd88<sup>lox</sup>Nestin<sup>Cre-/-</sup>; Cre neg) e do (com a presença de lox recombinase-cre, grupo experimental е da Myd88<sup>lox</sup>Nestin<sup>Cre+/+</sup>; Cre pos) que foram identificados por genotipagem. É fundamental nesse tipo de experimento que o grupo controle possua também a sequência lox para excluir o viés de efeitos da inserção desta sequência na função da célula e por consequência alterar os resultados do protocolo experimental. Estes dois grupos receberam dieta hiperlipídica por 15 semanas e foi analisada a pressão arterial, frequência cardíaca e atividade simpática para os vasos e coração e parassimpática para o coração.



Figura 2 - Esquema exemplificando a ação da enzima Cre-recombinase apenas em neurônios e células da glia por estar acoplada ao gene Nestin.

### 3.10 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos em média±erro padrão da média. A análise estatística dos dados foi realizada no programa GraphPad Prism 5.0<sup>®</sup>. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando P<0,05. Análise de variância (ANOVA) de 1 via com pós-teste de Newman-Keuls foram utilizados para analisar os dados de peso, área abaixo da curva no GTT, glicemia basal, massa dos tecidos periféricos, parâmetros bioquímicos, pressão arterial, frequência cardíaca, análise espectral, qPCR e neurônios CART-positivos. Foi utilizado teste-t não-pareado unicaudal para os dados de qPCR da CCL5. Para análise das correlações utilizou-se correlação de Pearson seguida de regressão linear.

### 4 RESULTADOS

#### 4.1 Validação do modelo animal experimental de obesidade

### 4.1.1 Medida do peso corporal e massa de tecidos periféricos

Inicialmente validamos o modelo experimental para dieta controle. Não houve diferença no peso final entre os animais alimentados com dieta controle Nuvilab<sup>®</sup> (29,6±0,4g) e dieta controle balanceada (27,5±0,5g, Tabela 3). Mas, os animais que receberam dieta controle balanceada apresentaram diminuição do peso do gastrocnêmio (0,15±0,01g) em comparação com os camundongos Nuvilab<sup>®</sup> (0,19±0,01g, Tabela 3) sugerindo uma menor massa muscular por terem o mesmo peso final. Observamos ainda que os camundongos que receberam dieta controle balanceada apresentaram níveis de PAM de animais hipertensos, ou seja, mais elevados que os Nuvilab<sup>®</sup> (controle balanceada8: 111±4 *vs* controle Nuvilab<sup>®</sup>8: 98±4, mmHg, n=9 e n=8 respectivamente). Por isso, optou-se por utilizar neste estudo como controle apenas camundongos alimentados com Nuvilab<sup>®</sup>.

Os animais expostos à dieta HL por 8 semanas mostraram um aumento de peso gradual a partir da primeira semana de dieta. Ao final da oitava semana do protocolo HL e HL+HS estes animais desenvolveram obesidade como evidenciado pelo aumento do peso corporal (C: 27,1±0,4 vs HL: 35,9 ± 0,9 vs HL+HS:41,7±0,7, g, 31%, *P* <0,05, Figura 3A), e da adiposidade (C: 0,63±0,04 vs HL: 3,88±0,29 vs HL+HS: 3,85±0,23, g, *P*<0,05, Figura 3B). A adiposidade trata-se da soma da massa do tecido adiposo epididimal, retroperitoneal e inguinal que foram todas aumentadas tanto no grupo HL como no grupo HL+HS (Figura 3B). Além disso, o peso do rim foi aumentado tanto pela dieta HL como pela HL+HS (C: 0,36±0,01 vs HL: 0,52±0,08 vs HL+HS: 0,59±0,10, g, P<0,05, Figura 3B). Não houve diferenças na massa do tecido adiposo marrom, do fígado, coração ou músculo gastrocnêmio (Figura 3B). Os animais HL+HS apresentaram obesidade com maior ganho de peso que animais HL. Um dos motivos foi a maior ingestão calórica dos animais HL+HS comparados aos HL (Figura 3A).

	Controle Nuvilab®	Controle Balanceada
Tecido adiposo epididimal (g)	0,42±0,03	0,57±0,03*
Tecido adiposo retroperitoneal (g)	0,10±0,01	0,15±0,01*
Tecido adiposo inguinal (g)	0,15±0,02	0,24±0,04*
Adiposidade (g)	0,63±0,04	0,97±0,07*
Tecido adiposo marrom (g)	0,11±0,01	0,09±0,01
Fígado (g)	1,00±0,05	1,10±0,06
Rim (g)	0,36±0,01	0,36±0,01
Coração (g)	0,15±0,01	0,11±0,00**
Índice coração/tíbia (g/cm)	0,08±0,00	0,07±0,01
Gastrocnêmio (g)	0,19±0,01	0,15±0,01*

**Tabela 3 - Peso dos tecidos, em gramas, dos tecidos de camundongos C57BL/6J J alimentados com dieta Nuvilab® ou controle balanceada por 8 semanas.** \* P<0,05 *vs* controle Nuvilab®, \*\* P<0,01 *vs* Controle Nuvilab®. ANOVA-1 via e pós-teste de Newman-Keuls. Valores em N = 9-12 animais por grupo.

Nos animais que receberam HL por 15 semanas o peso final aumentou ainda mais (HL15:  $45,6\pm2,4$  vs HL8:  $35,9\pm0,9$ , g, vs C8, +60% e +100%, respectivamente, P<0,05, Figura 4A). Depois de 15 semanas o peso de HL e HL+HS continuou aumentando, porém não houve mais diferenças entre o peso de HL e HL+HS ao final dos protocolos (C15:  $28,1\pm0,6$  vs HL15:  $46,3\pm0,9$  vs HL+HS15:  $43,6\pm1,6$ , g, Figura 4A). A adiposidade aumentou ainda mais nos HL15 com diminuição nos HL+HS15 (C15:  $0,74\pm0,07$  vs HL15:  $4,24\pm0,16$  vs HL+HS15:  $3,09\pm0,13$ , g, Figuras 3B e 4B) exemplificada na resposta do tecido adiposo epididimal (C15:  $0,46\pm0,03$  vs HL15:  $1,81\pm0,12$  vs HL+HS15:  $1,17\pm0,12$ , g, Figuras 3B e 4B).



**Figura 3 - Peso dos camundongos ao longo das 8 semanas de exposição à dieta hiperlipídica (HL) e controle (C). (A)** Peso de camundongos C57BL/6J J alimentados com dieta controle Nuvilab<sup>®</sup> (C), hiperlipídica (HL) ou hiperlipídica associada à sacarose (HL+HS) ao longo das 8 semanas, ganho de peso ao final das 8 semanas e ingestão calórica total após 8 semanas de dieta (kcal). (B) Massa de tecidos periféricos ao final de 8 semanas. \* P<0,05 vs C e +P<0,05 vs HL ganho de peso. Em A, ANOVA-1 via e pós-teste de Newman-Keuls dos valores da área abaixo da curva. Em B, ANOVA-1 via e pós-teste de Newman-Keuls. N= 8-24 animais por grupo.

Após 15 semanas de dieta, evidenciou-se um aumento do peso do fígado nos animais HL que foi maior nos animais HL+HS (C15:  $1,05\pm0,04 vs$  HL15:  $1,54\pm0,12 vs$  HL+HS15:  $2,64\pm0,33$ , g, Figura 4B). Além disso, houve uma hipertrofia do tecido adiposo marrom que foi maior em HL+HS (C15:  $0,10\pm0,01 vs$  HL15:  $0,21\pm0,02 vs$ HL+HS15:  $0,36\pm0,04$ , g, Figura 4B). O aumento do peso do rim visto com 8 semanas em HL e HL+HS manteve-se (C15:  $0,36\pm0,01 vs$  HL15:  $0,47\pm0,01 vs$  HL+HS15:  $0,44\pm0,22$ , g, Figura 4B).



**Figura 4 - Peso dos camundongos ao longo das 15 semanas de exposição à dieta hiperlipídica (HL) e controle (C). (A)** Peso de camundongos C57BL/6J J alimentados com dieta controle Nuvilab<sup>®</sup> (C), hiperlipídica (HL) ou hiperlipídica associada à sacarose (HL+HS) ao longo das 15 semanas e ganho de peso ao final das 15 semanas. **(B)** Massa de tecidos periféricos ao final de 15 semanas. \* P<0,05 vs C e +P<0,05 vs HL ganho de peso. Em A, ANOVA-1 via e pós-teste de Newman-Keuls dos valores da área abaixo da curva. Em B, ANOVA-1 via e pós-teste de Newman-Keuls. N= 11-19 animais por grupo.

### 4.1.2 Parâmetros metabólicos

Ao final das 8 ou 15 semanas de dieta foi realizado o teste de tolerância à glicose em todos os animais. Como podemos observar na Figura 5A, a ingestão de dieta HL ou HL+HS por 8 semanas levou à intolerância à glicose demonstrada pelo aumento da área abaixo da curva (C8:  $30299\pm1979$  vs HL8:  $57762\pm1474$  vs HL+HS8:  $53325\pm1798$ , u.a *P*<0,0001, Figura 5A) e tal efeito foi de menor magnitude nos camundongos HL+HS (Figura 5A). Além disso, os grupos HL8 e HL+HS8 apresentaram maior glicemia basal (C8:  $166,7\pm8,5$  vs HL8:  $257,9\pm12,5$  vs HL+HS8:  $250,0\pm6,6$ , mg/dL, P<0,01) e hiperinsulinemia (C8:  $43,4\pm6,6$  vs HL8:  $672,2\pm127,0$  vs HL+HS:  $566,9\pm53,7$ , mg/dl, P<0,05, Figura 5B) quando comparados ao grupo controle.

Os grupos HL e HL+HS após 8 semanas de dieta tiveram aumento dos níveis plasmáticos de glicemia em jejum (C:167±9 vs HL: 200±6 vs HL+HS: 250±7, mg/dl, P<0,05, Figura 5C), leptina (C: 8,086±1,129 vs HL: 17343±2062 vs HL+HS: 30141±1253, ng/dl,P <0,05, Figura 5C), triacilglicerol (C: 1,0±0,2 vs HL: 2,2±0,2 vs HL+HS: 2,2±0,2, mmol/L, P <0,05, Figura 5C), ácidos graxos livres não-estereficados (NEFA) (C: 0,2±0,1 vs HL: 0,7±0,1 vs HL+HS: 0,7±0,1, mmol/L, P<0,05, Figura 5C), sem alterações na resistina (C: 4232±626 vs HL: 4177±841 vs HL+HS: 4180± 378, ng/ml, P<0,05, Figura 5C) ou interleucina-6 (IL- 6) (C: 22±4 vs HL: 21±4 vs HL+HS: 15±3, ng/ml, P<0,05, Figura 5C). Apenas os camundongos C e HL desenvolveram um aumento dos níveis de insulina no período pós-prandial (C: 2179±216 vs HL: 2207±420 vs HL+HS: 1093±361, pmol/L, P<0,05, Figura 5C). Assim, a dieta HL levou a alterações na bioquímica plasmática e alterações metabólicas, características típicas observadas na obesidade já com 8 semanas de ingestão de dieta hiperlipídica.



**Figura 5 - Parâmetros metabólicos nos camundongos que receberam dieta hiperlipídica por 8 semanas. (A)** Valores de glicemia (mg/dl) durante o teste de tolerância à glicose. Área abaixo da curva dos gráficos representados em A. Níveis de glicemia basais no dia do GTT, **(B)** Insulina plasmática no jejum e **(C)** Parâmetros metabólicos plasmáticos. \* P< 0,05 vs C, P<0,05 + vs HL. ANOVA-1 via e pós-teste de Newman-Keuls. N = 8-24 animais por grupo.

Não houve diferença entre os HL8 e HL15 quanto à intolerância à glicose (HL15: 59737±3141 vs HL8: 57762±1474, u.a., Figuras 5A e 6) e à glicemia basal (HL15: 245,8±8,8 vs HL8: 257,9±12,5 mg/dL, Figuras 5C e 6).



**Figura 6 - Parâmetros metabólicos nos camundongos que receberam dieta por 15 semanas.** Valores da glicemia (mg/dl) durante o teste de tolerância à glicose. Área abaixo da curva dos gráficos. Níveis de glicemia basais no dia do GTT. \* P< 0,05 vs C, + P<0,05 vs HL. ANOVA-1 via e pós-teste de Newman-Keuls. N = 11-19 animais por grupo.

# 4.2 Parâmetros cardiovasculares e índice da atividade do sistema nervoso autônomo

Após a realização do GTT foram respeitados três dias de intervalo antes da cirurgia de cateterização da artéria femoral. Após um dia de recuperação da cirurgia, os dados hemodinâmicos foram registrados. Nos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica houve dois fenótipos distintos de pressão arterial que podem ser observados nas Figuras 7 e 8A e evidenciados pelos dois picos na frequência de distribuição nas Figuras 8E e 8F: 1) obesos hipertensos (HL-H), tratando-se dos que desenvolveram um aumento de pressão arterial média (PAM>106,6 mmHg, n=10) e; 2) obesos resistentes à hipertensão (HL-R, PAM<106,6 mmHg, n=5, C8: 98±4 *vs* HL-R8: 97±3 *vs* HL-H: 119±3, mmHg). Por sua vez os animais que receberam dieta HL+HS não desenvolveram hipertensão após 8 semanas de dieta (Figuras 7 e 8A).



Figura 7 - Pressão arterial e frequência cardíaca em animais alimentados com dieta controle Nuvilab<sup>®</sup>, dieta hiperlipídica ou dieta hiperlipídica associada à sacarose por 8 semanas. Traçados representativos da pressão pulsátil, pressão arterial média e frequência cardíaca em animais C, HL e HL+HS.Camundongos C57BL/6J J alimentados com dieta Nuvilab<sup>®</sup> (C), dieta hiperlipídica (HL), classificados em obesos hipertensos (HL-H) e obesos resistentes a hipertensão (HL-R) e dieta hiperlipídica associada à sacarose (20% na água, HL+HS) ao final das 8 semanas de dieta.



**Figura 8 - Pressão arterial e frequência cardíaca em animais alimentados com dieta controle Nuvilab®, dieta hiperlipídica ou dieta hiperlipídica associada à sacarose por 8 semanas.** Camundongos C57BL/6J alimentados com dieta Nuvilab® (C), dieta hiperlipídica (HL), classificados em obesos hipertensos (HL-H) e obesos resistentes a hipertensão (HL-R) e dieta hiperlipídica associada à sacarose (20% na água, HL+HS) ao final das 8 semanas de dieta. (A) Pressão arterial média (PAM), (B) frequência cardíaca (FC), (C) pressão arterial sistólica (PAS), (D) pressão arterial diastólica (PAD) basais de animais acordados, (E) Distribuição dos valores de PAM em cada grupo. A linha pontilhada vermelha representa o valor crítico que determina hipertensão arterial de acordo com a frequência de distribuição, (F) Histograma de frequência de distribuição dos valores da PAM nos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. \*P<0,05 vs C, + P<0,05 vs grupo indicado. ANOVA-1 via e pós-teste de Newman-Keuls. N=8-15 animais/ grupo.

Interessante notar que a hipertensão secundária nesse modelo é tempodependente. Isso porque, houve maior prevalência de hipertensão nos animais que ingeriram dieta hiperlipídica por 15 semanas de dieta hiperlipídica, HL-H15 (68% 119±3 mmHg, n=11, Figura 9E) quando comparados aos animais HL-H8 (33%, 119±3 mmHg, n=10, Figura 8E). Após 15 semanas de dieta hiperlipídica associada à sacarose, alguns animais HL+HS desenvolveram hipertensão (50%, Figura 9E), mas em menor porcentagem que os HL15. O aumento de PAM tanto nos HL-H8 como em HL-H15 é reflexo da pressão arterial sistólica (PAS) e da pressão arterial diastólica (PAD) aumentadas (Figuras 8C, 8D, 9C e 9D). Não houve diferenças significativas entre os grupos com relação à frequência cardíaca (C8: 599±18, HL8-R: 615±38, HL8-H: 631±19, HL15-R: 565±59, HL15-H: 554±25, bpm, P>0,05, Figura 8B e 9B).



**Figura 9 - Pressão arterial e frequência cardíaca em animais alimentados com dieta controle Nuvilab®, dieta hiperlipídica ou dieta hiperlipídica associada à sacarose por 15 semanas.** Camundongos C57BL/6J alimentados com dieta Nuvilab® (C), dieta hiperlipídica (HL), classificados em obesos hipertensos (HL-H) e obesos resistentes a hipertensão (HL-R) e dieta hiperlipídica associada à sacarose (20% na água, HL+HS) ao final das 15 semanas de dieta. (A) Pressão arterial média (PAM), (B) frequência cardíaca (FC), (C) pressão arterial sistólica (PAS), (D) pressão arterial diastólica (PAD) basais de animais acordados, (E) Distribuição dos valores de PAM em cada grupo. A linha pontilhada vermelha representa o valor crítico que determina hipertensão arterial de acordo com a frequência de distribuição, (F) Histograma de frequência de distribuição dos valores da PAM nos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. \*P<0,05 vs C, + P<0,05 vs grupo indicado. ANOVA-1 via e pós-teste de Newman-Keuls. N=5-10 animais/ grupo.

A seguir, realizamos a análise da variabilidade e análise espectral da pressão arterial e intervalo de pulso dos registros com diferencial de pulso entre pressão sistólica e diastólica maior que 20 mmHg para garantir maior confiabilidade aos resultados. Utilizamos os mesmos trechos dos registros utilizados para as análises de PAM e FC.

A ingestão de dieta hiperlipídica por 8 ou 15 semanas levou a aumento da variabilidade da pressão arterial sistólica (SDNN, Figuras 10A, 10B, 10C e 11A) e do intervalo de pulso (RMSSD, Figuras 10G, 10H, 10I e 11E) nos animais hipertensos. O aumento da variabilidade da pressão arterial sistólica nos animais HL-H foi acompanhado de aumento nos componentes VLF, índice da ação hormonal e do ciclo circadiano na pressão arterial (Figuras 10D e 11B) e LF que é um índice da ação do sistema nervoso simpático nos vasos regulando a pressão arterial (Figuras 10E e 11C).

HL-H8 e HL-H15 apresentaram aumento na variabilidade do intervalo de pulso (Figuras 10G, 10H, 10I e 11E) acompanhado por aumento do simpático cardíaco (LF, Figuras 10J e 11F) e aumento do parassimpático cardíaco (HF, Figuras 10L e 11G) resultando em aumento no índice de equilíbrio simpato-vagal para o coração (LF/HF, Figuras 10M e 11H). Os animais HL-R, resistentes à hipertensão após a ingestão por 8 semanas de dieta hiperlipídica também apresentaram aumento no índice de equilíbrio simpato-vagal, porém em menor magnitude que não apareceu no grupo HL-R15 (Figuras 10M e 11H).

Por sua vez, o grupo HL+HS, após 8 ou 15 semanas de dieta, teve um aumento da variabilidade da pressão arterial sistólica (Figuras 10C e 11A) devido ao aumento do componente HF em relação aos animais C (Figuras 10F e 11D) que está associado à atividade respiratória (PARATI et al., 1995).

Apenas após 15 semanas os animais que receberam dieta hiperlipidica associada à sacarose tiveram um aumento da variabilidade do intervalo de pulso (Figuras 10I e 11E) e do índice de equilíbrio simpato-vagal para o coração (Figuras 10M e 11H). Isso aconteceu porque só apenas após 15 semanas de dieta hiperlipídica associada à sacarose houve nesses animais um aumento no componente LF do intervalo de pulso, um índice da atividade simpática cardíaca (Figuras 10J e 11F). Essa observação está associada à observação que apenas após 15 semanas alguns HL+HS tornaram-se hipertensos (Figuras 8E e 9E).









**Figura 10 - Análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) e do intervalo de pulso (IP) de animais que receberam dieta durante 8 semanas.** Análise espectral da pressão arterial sistólica e intervalo de pulso de camundongos C57BL/6J alimentados com dieta controle Nuvilab<sup>®</sup> (C), hiperlipídica (HL) ou hiperlipídica associada à sacarose 20% na água (HL+HS) ao final de 8 semanas. (A) traçados representativos da PAS mostrando a variabilidade em um animal HL-R e um animal HL-H, (**B**) espectro representativo da variabilidade da PAS em um animal HL-R e um animal HL-H, (**C**) análise da variabilidade total da PAS pelo desvio padrão de valores sucessivos de PA (SDNN), (**D**) componente de muito baixa frequência da PAS (VLF), (**E**) componente de baixa frequência (LF) da PAS, (**F**) componente de alta frequência (HF) da PAS, (**G**) traçados representativo da variabilidade do IP em um animal HL-R e um animal HL-H, (**I**) análise da variabilidade total do IP pela raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças entre sucessivos valores de IP (RMSSD), (**J**) componente de alta frequência (HF) do IP e (**M**) índice LF/HF do intervalo de pulso. ANOVA-1 via e pós-teste de Newman-Keuls. N= C (n=8), HL-R (n=15) and HL-H (n=9), HL+HS (n=11).



D









**Figura 11 - Análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) e do intervalo de pulso (IP) de animais que receberam dieta durante 15 semanas.** Análise espectral da pressão arterial sistólica e intervalo de pulso de camundongos C57BL/6J alimentados com dieta controle Nuvilab<sup>®</sup> (C), hiperlipídica (HL) ou hiperlipídica associada a sacarose 20% na água (HL+HS) ao final de 15 semanas. (A) análise da variabilidade total da PAS pelo desvio padrão de valores sucessivos de PA (SDNN), **(B)** componente de muito baixa frequência da PAS (VLF), **(C)** componente de baixa frequência (LF) da PAS, **(D)** componente de alta frequência (HF) da PAS, **(E)** análise da variabilidade total do IP pela raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças entre sucessivos valores de IP (RMSSD), **(F)** componente de baixa frequência (LF) do IP, **(G)** componente de alta frequência (HF) do IP e **(H)** índice LF/HF do intervalo de pulso. ANOVA-1 via e pós-teste de Newman-Keuls. N= C (n=7), HL-R (n=5) and HL-H (n=10), HL+HS (n=8).

## 4.3 Medida dos níveis de RNA mensageiro por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) de neuropeptídeos no hipotálamo e tronco-encefálico

A metodologia de qPCR foi utilizada para estudar a expressão gênica de diversos neurotransmissores envolvidos com o controle alimentar e equilíbrio energético, citocinas, quimiocinas e fatores inflamatórios e antinflamatórios, e suas possíveis alterações em decorrência da alimentação hiperlipídica. Em seguida, foram feitas correlações entre a expressão gênica destes e os parâmetros hemodinâmicos de cada animal.

O gene de referência escolhido foi o 36B4 por apresentar a menor variação dentre os genes testados diante da dieta hiperlipídica tanto no hipotálamo (C8:  $1,00\pm0,14 \text{ vs HL8: } 0,97\pm0,12$ , Figura 12) como no tronco-encefálico ( $1,00\pm0,07 \text{ vs } 1,00\pm0,06$ , Figura 13).

A dieta hiperlipídica por 8 semanas aumentou os níveis de RNAm de CART apenas no hipotálamo de HL-H em comparação aos animais C e HL-R (C: 1,0 $\pm$ 0,1 vs HL-R: 4,0 $\pm$ 1,5 vs HL-H: 7,8 $\pm$ 1,2, n=4-7, P<0,05, Figura 12), mas não no tronco encefálico (C: 1,0 $\pm$ 0,0 vs HL-R: 1,0 $\pm$ 0,1 vs HL-H: 1,0 $\pm$ 0,2, u.a., P>0,05, Figura 13). Por outro lado, o grupo HL+HS não apresentou alterações no RNAm de CART no hipotálamo (HL+HS: 0,8 $\pm$ 0,1 u.a., Figura 12) ou no tronco encefálico (HL+HS: 0,9 $\pm$ 0,1 u.a., Figura 13) comparado ao grupo C.

Houve aumento na expressão gênica de POMC no hipotálamo no grupo HL-R em comparação com o grupo C (Figura 12). Além disso, houve diminuição da expressão gênica de AgRP no grupo HL+HS em comparação ao grupo C (Figura 12). Apesar dessas alterações, só o CART foi escolhido para ser estudado nos próximos experimentos. Isso porque ele foi o único neuropeptideo que teve alteração da expressão gênica diferenciada no grupo HL-H em comparação ao grupo C e HL-R (Figura 12).



Figura 12 - Expressão gênica de neuropeptídeos hipotalâmicos em camundongos C57BL/6J alimentados por 8 semanas com dieta controle (C), dieta hiperlipídica resistentes à hipertensão (HL-R), dieta hiperlipídica hipertensos (HL-H) ou dieta hiperlipídica associada à sacarose (HL+HS). Expressão do gene de referência 36B4, transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART), pro-opiomelanocortina (POMC), peptídeo relacionada ao agouti (AgRP) e neuropeptídeo Y (NPY). \*P<0,05 vs C. +P<0,05 vs grupo indicado. ANOVA-1 via e pós-teste de Newman-Keuls.



Figura 13 - Expressão gênica de neuropeptídeos no tronco encefálico em camundongos C57BL/6J alimentados por 8 semanas com dieta controle (C), dieta hiperlipídica resistentes à hipertensão (HL-R), dieta hiperlipídica hipertensos (HL-H) ou dieta hiperlipídica associada à sacarose (HL+HS). Expressão do gene de referência 36B4, transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART), pro-opiomelanocortina (POMC), peptídeo relacionada ao agouti (AgRP) e neuropeptídeo Y (NPY). \*P<0,05 vs C. +P<0,05 vs grupo indicado. ANOVA-1 via e pós-teste de Newman-Keuls.

#### 4.4 Identificação dos neurônios CART-positivos por Imunohistoquímica

Como a expressão gênica de CART foi maior no hipotálamo de camundongos que receberam dieta hiperlipidica e eram hipertensos HL-H (Figura 12), em seguida foi realizada a análise imunohistoquímica dos núcleos do hipotálamo para identificar a localização os neurônios CART-positivos e correlacioná-los com as alterações na expressão gênica, na pressão arterial e no sistema nervoso autônomo. A Figura 14 mostra que a dieta HL por 8 semanas aumentou o número de neurônios CART-positivos no DMH (HL: 342±32 vs C: 156±4, P <0,05, Figura 14A e 14C), mas não em outras áreas hipotalâmicas, tais como ARC (Figura 15A), PVN (Figura 15B) e LHA (Figura 15C). Além disso, não houve alteração na imunorreatividade ao CART em núcleos do tronco-encefálico, como por exemplo, o NTS (Figura 15D). Por outro lado, no grupo HL+HS foi observado um aumento no número total de neurônios no DMH, porém de menor magnitude que no grupo HL (HL+HS: 204±10, Figura 14C).



**Figura 14 - Imunohistoquímica para CART no núcleo dorsomedial do hipotálamo. (A)** Fotomicrografias em campo claro de corpos celulares de neurônios CART no núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH) em camundongos alimentados com dieta controle (C, painel da esquerda superior) e hiperlipídica (HL, painel da direita superior e inferior) e hiperlipídica associada à sacarose (HL+HS, painel da esquerda inferior). (B) distribuição rostro-caudal de neurônios CART-positivos ao longo do DMH. **(C)** Média de neurônios CART-positivos por animal no DMH inteiro. Aumento de 10 x. \*P<0,05 vs C. +P<0,05 vs grupo indicado. ANOVA-1 via e pós-teste de Newman-Keuls. N=4 a 5 animais/grupo. DMH: núcleo dorsomedial do hipotálamo; f: fórnix; 3V: terceiro ventrículo.



100µm













**Figura 15 - Imunohistoquímica para CART em núcleos do hipotálamo e tronco encefálico.** Fotomicrografias em campo claro de neurônios CART-positivos no núcleo arqueado (ARC) **(A)**, núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) **(B)**, área hipotalâmica lateral (LHA) **(C)** e núcleo do trato solitário (NTS) **(D)**. Aumento de 10 x. N= 4-5 animais/grupo. ARC: núcleo arqueado; AP: área postrema; CC: canal central; DMV: núcleo motor dorsal do vago; f: fórnix; LHA: área hipotalâmica lateral; NTS: núcleo do trato solitário; PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo; VMH: hipotálamo ventromedial; 3V: terceiro ventrículo.

### 4.5 Correlações

Para melhor interpretação dos resultados analisamos as correlações e regressões lineares entre os dados hemodinâmicos (pressão arterial, frequência cardíaca e análise espectral) ou parâmetros metabólicos quantificados (peso final, glicemia basal, área abaixo do GTT e massa dos diversos tecidos periféricos) com os níveis de RNAm de neuropeptídeos que se apresentaram alterados com a dieta hiperlipídica. Estão representados na Figura 16 apenas os dados que apresentaram correlação estatisticamente significativa.

A pressão arterial sistólica apresentou correlação positiva com o RNAm de CART no hipotálamo (y=-1,22+0,02x, r=0,60, P=0,03, Figura 16C), mas não no tronco encefálico (y=0,58-0,01x, r=0,20, P=0,30, Figura 16D). Além disso, PAS e PAM mostraram uma correlação positiva com o peso do tecido adiposo marrom (PAM y=39,74-0,03x, r=0,60, P=0,02, n=11; PAS y=-0,19+0.01x, r=0,56, P=0,02, n=11, Figura 16A e B) um tecido envolvido na termogênese.



Figura 16 - Estudo das correlações e regressões lineares entre parâmetros cardiovasculares, metabólicos e expressão gênica dos neuropeptídeos dos animais submetidos à dieta hiperlipídica por 8 semanas. (A) correlação entre a pressão arterial média e massa do tecido adiposo marrom, (B) correlação entre a pressão arterial sistólica e massa do tecido adiposo marrom, (C) correlação entre a pressão arterial sistólica e RNAm de CART no hipotálamo, (D) correlação entre a pressão arterial sistólica e RNAm de CART no hipotálamo, termente a pressão entre a pressão arterial sistólica e RNAm de CART no tronco-encefálico. Correlação de Pearson seguida de regressão linear. #P<0,05. N=9-13 com camundongos de todos os grupos.

### 4.6 Medida dos níveis de RNA mensageiro de citocinas e quimiocinas no hipotálamo e tronco-encefálico por qPCR

Em um segundo conjunto de experimentos foi feito também o rastreamento por qPCR de potenciais citocinas, quimiocinas, fatores inflamatórios e antiinflamatórios que poderiam estar alterados neste modelo de dieta hiperlipídica. A intenção foi estudar a diferença na expressão gênica de fatores inflamatórios e antinflamatórios entre os camundongos HL-R (obesos resistentes à hipertensão) e HL-H (obesos hipertensos).

Dos genes relacionados à inflamação avaliados no hipotálamo, apenas a expressão gênica de CCL5 apresentou aumento nos animais alimentados com dieta hiperlipídica (C8: 1,00±0,11 *vs* HL8: 1,51±0,28, P=0,09, Figura 17B). Esse aumento é correlacionado positivamente com o LF da pressão arterial sistólica, ou seja, o

simpático para os vasos (y=0,21x-0,26, r=0,62, P=0,008, Figura 17C). Os demais genes estudados: IL-1β, TNF, MCP1, COX1, COX2 e iNOS não tiveram alteração entre os grupos C, HL e HL+HS no hipotálamo (Figura 18).

Podemos observar na Figura 19A no tronco-encefálico que houve um aumento da molécula co-estimulatória CD-86, expressa na superfície das células apresentadoras de antígeno incluindo macrófagos/microglia inflamatórias M1 e células dendríticas, dos camundongos que ingeriram dieta hiperlipídica (C8:1,00±0,07 *vs.* HL8: 1,28±0,16, P=0,09, Figura 19A). Além disso, CD86 está negativamente correlacionada com a variabilidade da pressão arterial sistólica (y=-0,26x+2,01, r=-0,79, P=0,005) e com o índice LF/HF (y=-0,27x+1,61, r=-0,56, P=0,06). As demais citocinas estudadas no tronco-encefálico, IL-1 $\beta$  e TNF, não foram alteradas pela dieta HL ou HL+HS (Figura 19B).



### Hipotálamo

**Figura 17** - Valores da expressão gênica CCL5 no hipotálamo de camundongos C57BL/6J alimentados com dieta controle ou dieta hiperlipídica por 8 semanas e sua correlação com dados hemodinâmicos. Expressão no hipotálamo do gene de referência 36B4 (A) e quimiocina-C-C-ligante-5 (CCL5) (B) e sua correlação com o LF da pressão arterial sistólica (C). Em A e B, Teste-t não pareado unicaudal. \**P*<0,05 vs C. Em C, correlação de Pearson seguida de regressão linear. #P<0,05.

### Hipotálamo



Figura 18 - Valores da expressão gênica de citocinas, quimiocinas e outros fatores relacionados à inflamação no hipotálamo de camundongos C57BL/6J alimentados com dieta controle ou dieta hiperlipídica por 8 semanas. (A) interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), (B) fator de necrose tumoral (TNF), (C) proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), (D) ciclooxigenase-1 (COX-1), (E) ciclooxigenase-2 (COX-2) e (F) óxido nítrico sintase indutível (iNOS) no hipotálamo. \**P*<0,05 vs C. ANOVA-1 via e pós-teste de Newman-Keuls.



Tronco encefálico


Figura 19 - Valores de expressão gênica de citocinas, quimiocinas e outros fatores relacionados à inflamação no tronco encefálico de camundongos C57BL/6J alimentados com dieta controle ou dieta hiperlipídica por 8 semanas. (A) Expressão do gene de referência 36B4 e molécula co-estimulatória 86 (CD86) e correlação da expressão gênica de CD86 dos animais que receberam dieta hiperlipídica com a variabilidade da pressão arterial sistólica e LF/HF (B) interleucina-1β (IL-1β) e fator de necrose tumoral (TNF). \**P*<0,05 vs C. ANOVA-1 via e pós-teste de Newman-Keuls. Em A, correlação de Pearson seguida de regressão linear. #P<0,05.

#### 4.7 Concentração da microglia

A Figura 20 apresenta os resultados obtidos através da técnica de Imunoperoxidase para identificar a proteína adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (Iba-1), um marcador estrutural de microglia/macrófagos. O objetivo deste experimento foi investigar se a densidade microglial difere entre os núcleos estudados. A região de interesse estudada foi o núcleo do trato solitário (NTS) face à alteração da expressão gênica do CD86 no tronco encefálico (Figura 19A). Através do método de esqueletonização podemos observar que nos animais alimentados com dieta hiperlipídica há uma maior densidade de células Iba<sup>+</sup> na porção caudal do NTS (NTS HL8: 329,7, Figura 20, painel superior) que não foi observada nos camundongos alimentado com dieta HL+HS (NTS HL+HS8: 200,3, Figura 20, painel inferior) comparada a outra região do mesmo corte (HL: 162,1 e HL+HS: 142,1, Figura 20) sugerindo que a microglia pode se concentrar após ingestão de dieta hiperlipídica em áreas envolvidas com controle autônomo no grupo HL.



10<u>0µ</u>m

**Figura 20 - Estudos de Imunohistoquímica.** Fotomicrografias em campo claro da região do núcleo do trato solitário (NTS) caudal de animais que receberam dieta hiperlipídica (HL, PAINEL SUPERIOR) ou dieta hiperlipídica associada à sacarose (HL+HS, PAINEL INFERIOR) durante 8 semanas mostrando células imunomarcadas para Iba, imagem binária e esqueletonização. O retângulo pontilhado em branco nas fotomicrografias no nível superior foi ampliado da região do NTS e o retângulo inferior corresponde a uma ampliação de outra região do tronco encefálico no mesmo corte usadas para comparar a densidade da microglia. Aumento de 10 x. NTS: Núcleo do Trato Solitário

#### 4.8 Os animais transgênicos Myd88<sup>lox</sup>NestinCre<sup>+/+</sup> desenvolveram obesidade e intolerância à glicose quando submetidos à dieta hiperlipídica

Foram realizados experimentos com camundongos da linhagem transgênica Myd88<sup>lox</sup>Nestin<sup>Cre+/+</sup> (Cre-pos) com deleção seletiva apenas em neurônios e células da glia da via inflamatória TLR-NF-κB e seus controles Myd88<sup>lox</sup>Nestin<sup>Cre-/-</sup> (Cre-neg) alimentados por 15 semanas com dieta hiperlipídica. Foi comprovada a transcrição do gene Cre e lox, responsáveis pela deleção do gene Cre, nesses animais através de experimentos de genotipagem em gel de eletroforese (Figura 21A). Foi observado que tanto os animais Cre-pos, com a deleção, como seus controles Cre-neg, sem a deleção, desenvolveram obesidade (Figura 21B) e intolerância à glicose (Figura 21C) depois da ingestão de dieta hiperlipídica por 15 semanas.



Figura 21 - Parâmetros metabólicos em camundongos transgênicos Myd88loxNestinCre+/+ com deleção de uma proteína na via inflamatória do receptor *toll-like* em neurônios e glia que receberam dieta por 15 semanas. (A) Gel de eletroforese de genotipagem comprovando a transcrição do gene lox e Cre nos animais utilizados no experimento, (B) Peso ao longo das 15 semanas e (C) Valores da glicemia (mg/dl) durante o teste de tolerância à glicose ao final das 15 semanas em camundongos Cre-pos e seus controles Cre-neg. \* P<0,05 vs C, + P<0,05 vs HL. ANOVA-1 via e pós-teste de Newman-Keuls. N = 13-19 animais por grupo.

### 4.9 Os animais transgênicos Myd88<sup>lox</sup>NestinCre<sup>+/+</sup> não desenvolveram hipertensão secundária à obesidade

Os dados apresentados a seguir confirmaram nossa hipótese de que a inflamação no sistema nervoso central é essencial para o desenvolvimento de hipertensão secundária à obesidade. Os animais Myd88<sup>lox</sup>Nestin<sup>Cre+/+</sup> que possuem deleção seletiva em neurônios e glia da via inflamatória desencadeada por TLR não desenvolveram hipertensão após serem alimentados por 15 semanas com dieta hiperlipídica como os C57BL/6J (C:98,3±2,4 vs HL-H15:118,7±2,6 vs Cre-pos HL: 96,8±3,3 mmHg, Figura 22A). Além disso, os animais apresentaram PAS (Figura 22C) e PAD (Figura 22D) em níveis de normotensão mesmo após 15 semanas de dieta hiperlipídica.



Figura 22 - Pressão arterial e frequência cardíaca em animais transgênicos Myd88<sup>lox</sup>NestinCre<sup>+/+</sup> alimentados com dieta hiperlipídica por 15 semanas em comparação com seus respectivos controles Myd88<sup>lox</sup>NestinCre<sup>-/-</sup> e animais alimentados com dieta controle Nuvilab<sup>®</sup>, dieta hiperlipídica ou dieta hiperlipídica associada à sacarose por 15 semanas. (A) Pressão arterial média (PAM), (B) frequência cardíaca (FC), (C) pressão arterial sistólica (PAS) e (D) pressão arterial diastólica (PAD) basais de animais acordados. (E) Distribuição dos valores de pressão arterial média (PAM) em cada grupo. A linha pontilhada vermelha representa o valor crítico que determina hipertensão arterial. \*P<0,05 vs C, + P<0,05 vs grupo indicado. ANOVA-1 via e pós-teste de Newman-Keuls. N=6-16 animais/ grupo.

# 4.10 Animais transgênicos Myd88loxNestinCre+/+ submetidos à dieta hiperlipídica não apresentaram disfunção autonômica

A deleção seletiva em neurônios e glia da via inflamatória desencadeada por TLR também é capaz de alterar a resposta do sistema nervoso autônomo à dieta hiperlipídica. Os animais Cre-pos HL, comparados a seus controles Cre-neg HL e HL-H15, não apresentaram aumento da variabilidade da pressão arterial sistólica (Figura 23A), nem do LF da pressão arterial sistólica (Figura 23B). Além disso, a deleção seletiva da via TLR-NF-κB em neurônios e células da glia fez com que esses animais não tivessem aumento da variabilidade do intervalo de pulso (Figura 23D) nem do índice de equilíbrio simpato-vagal para o coração após 15 semanas de dieta hiperlipídica (Figura 23E).



Figura 23 - Análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica e do intervalo de pulso de animais em animais transgênicos Myd88loxNestinCre+/+ alimentados com dieta hiperlipídica por 15 semanas em comparação com seus respectivos controles Myd88loxNestinCre-/- e animais alimentados com dieta controle Nuvilab®, dieta hiperlipídica ou dieta hiperlipídica associada à sacarose por 15 semanas. Análise espectral da pressão arterial sistólica e intervalo de pulso de camundongos C57BL/6J alimentados com dieta controle Nuvilab® (C), hiperlipídica (HL) ou hiperlipídica associada a sacarose 20% na água (HL+HS) ao final de 8 semanas. (A) Análise da variabilidade total da PAS pelo desvio padrão de valores sucessivos de PA (SDNN), (B) componente de baixa frequência (LF) da PAS, (C) componente de alta frequência (HF) da PAS, (D) análise da variabilidade total do IP pela raiz quadrada da média da soma dos quadrados das diferenças entre sucessivos valores de IP (RMSSD), (E) índice LF/HF do intervalo de pulso. ANOVA-1 via e pós-teste de Newman-Keuls. \* P<0,05 vs C, + P<0,05 vs grupo indicado. N=6-16 animais/ grupo.

## 5 DISCUSSÃO

No presente trabalho investigou-se se a obesidade induzida por dieta hiperlipídica e dieta hiperlipídica associada à sacarose está relacionada à hipertensão arterial, disfunção autonômica e alterações de neuropeptídeos e fatores inflamatórios no hipotálamo e tronco cerebral. Para isso, foi realizada em camundongos C57BL6J e transgênicos Myd88<sup>lox</sup>Nestin<sup>Cre</sup> a cateterização da artéria femoral para posterior registro e análise da pressão arterial média, frequência cardíaca e análise espectral. Em seguida, foram realizados experimentos de qPCR e Imunohistoquímica para relacionar alterações nos neuropeptídeos e fatores inflamatórios no hipotálamo e tronco cerebral com as alterações funcionais. Os resultados apresentados na presente tese foram que:

 a ingestão de dieta hiperlipídica por 8 ou 15 semanas foi suficiente para promover um quadro metabólico de obesidade;

2) uma porcentagem dos camundongos submetidos à dieta HL não desenvolveu hipertensão e outra sim. Além disso, esta prevalência de hipertensão foi tempo-dependente, ou seja, os camundongos que ingeriram dieta HL por 15 semanas possuíam maior prevalência de hipertensão arterial que os animais que ingeriram por 8 semanas;

 a hipertensão nos HL-H foi acompanhada de aumento da variabilidade da pressão arterial sistólica e do intervalo de pulso e dos componentes VLF e LF da pressão arterial sistólica e LF, HF e LF/HF do intervalo de pulso cardíaco;

6) os camundongos que receberam dieta hiperlipídica hipertensos apresentaram aumento na expressão gênica de CART no hipotálamo;

 o aumento do RNAm para CART no hipotálamo de animais hipertensos submetidos à dieta hiperlipídica foi confirmado pela imunomarcação deste neuropeptídeo no núcleo dorsomedial do hipotálamo;

 8) houve forte correlação entre os dados hemodinâmicos alterados pela dieta hiperlipídica com a expressão gênica de CART no hipotálamo;

9) a dieta hiperlipídica aumentou a expressão gênica de CCL5 no hipotálamo que correlacionou-se positivamente ao componente LF da variabilidade da pressão arterial sistólica; 10) a dieta hiperlipídica aumentou CD86 no tronco encefálico que correlacionou-se negativamente à variabilidade da pressão arterial sistólica e ao índice de equilíbrio simpato-vagal LF/HF;

 os camundongos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram maior densidade de microglia no NTS caudal;

12) os animais transgênicos Myd88<sup>lox</sup>Nestin<sup>Cre+/+</sup> que possuem deleção seletiva em neurônios e glia da via inflamatória TLR- NF-κB após serem alimentados por 15 semanas com dieta hiperlipídica não desenvolveram hipertensão nem disfunção no sistema nervoso autônomo, apesar de apresentarem um quadro metabólico de obesidade;

13) os camundongos HL+HS após oito semanas de exposição à dieta não desenvolveram: hipertensão, alterações na análise espectral, aumento de CART, CCL5, CD86 ou densidade de microglia no NTS comparados ao grupo controle. Apenas 50% dos HL+HS após 15 semanas de exposição à dieta desenvolveram hipertensão arterial acompanhada de aumento da variabilidade do intervalo de pulso e do índice LF/HF pelo aumento do componente LF.

#### 5. 1 Padronização do modelo animal experimental de obesidade

A ingestão de dieta hiperlipídica por camundongos é conhecida por produzir alterações bioquímicas e metabólicas que são comumente encontradas na obesidade humana (BUETTNER et al., 2007). Por isso, a ingestão de dieta hiperlipídica vem sendo amplamente utilizada por diversos grupos de pesquisa como modelo para o estudo de obesidade associada a outras co-morbidades (AUVINEN et al., 2012, BOUSTANY et al., 2004; BRADLEY, et al., 2008; DOBRIAN, 2000; PURKAYASTHA, et al., 2011). Diversos estudos têm mostrado que a dieta hiperlipídica rica em ácidos graxos é eficaz em desenvolver a obesidade em camundongos (AUVINEN et al., 2012; BRADLEY et al., 2008), porém não em ratos (BOUSTANY et al., 2004; DOBRIAN, 2000).

É importante mencionar que foi adotada como controle a dieta Nuvilab® isso porque essa dieta manteve a massa muscular do gastrocnêmio ao longo dos protocolo ao contrário da controle balanceada. Estudos mostraram que o consumo de bebidas com alto nível de açúcar, como os refrigerantes, está relacionado ao desenvolvimento de obesidade levando a inflamação, resistência à insulina e prejuízo na função das células β do pâncreas em humanos (LIU, et al., 2002; SCHULZE et al., 2004; PRADHAN et al., 2001). Para mimetizar o consumo de dieta rica em gordura animal e bebidas com alto nível de açúcar foi utilizado no presente estudo o modelo de dieta hiperlipídica associada à sacarose.

A exposição do animal à HL ou HL+HS durante 8 semanas induziu características metabólicas importantes da obesidade como: aumento de peso corporal, aumento de adiposidade, intolerância à glicose severa, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, aumento de triacilglicerol e aumento de ácidos graxos não-esterificados. Isso demosntra que 8 semanas foram um tempo suficiente, neste modelo experimental, para promover as alterações metabólicas típicas da obesidade e investigar mecanismos na hipertensão secundária à obesidade.

# 5. 2 Alterações na pressão arterial no modelo animal experimental de obesidade

Um avanço importante deste estudo em relação aos estudos anteriores sobre pressão arterial, frequência cardíaca e atividade simpato-vagal de camundongos obesos é que os registros foram feitos em camundongos acordados e com livre movimentação. Em experimentos sem o uso de anestésicos evita-se a influência destes na neurotransmissão de núcleos encefálicos que controlam a atividade do sistema nervoso autônomo e consequentemente os níveis de pressão arterial (HOLSCHER et al., 2008).

Além da manutenção da massa muscular, outro motivo para usar como controle a dieta Nuvilab®, foi a observação de que alguns camundongos alimentados com dieta controle balanceada apresentaram hipertensão (dados não mostrados). Ademais os níveis de pressão arterial média dos camundongos alimentados com a dieta Nuvilab® estavam mais próximos de dados de pressão arterial já descritos anteriormente para camundongos normotensos (PURKAYASTHA et al., 2011). Uma hipótese para isso é o fato de que a dieta Nuvilab® possuía 4% de lipídeos enquanto a controle balanceada possuía 10%.

Alguns estudos mostraram que a ingestão de dieta hiperlipídica promove aumento da pressão arterial (BOUSTANY et al., 2004; DOBRIAN, 2000;

PURKAYASTHA et al., 2011; STOCKER et al., 2007) corroborando com nossos resultados. Todavia, outros estudos evidenciaram que a dieta hiperlipídica não leva ao aumento da pressão arterial (CHEN et al., 2010), sugerindo que a espécie animal ou mesmo diferentes componentes da dieta hiperlipídica podem contribuir para o desenvolvimento ou não de hipertensão. Assim, nossos dados mostrando desenvolvimento de hipertensão secundária à ingestão de dieta hiperlipídica confirmam que a linhagem C57BL/6J e a dieta hiperlipídica utilizadas neste estudo constituem um modelo experimental adequado para estudar a hipertensão secundária à obesidade.

No presente trabalho foi observado que os camundongos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram dois fenótipos hemodinâmicos: obesos hipertensos ou obesos resistentes ao desenvolvimento da hipertensão. Essa observação é interessante experimentalmente, pois permite comparando esses dois fenótipos expressão conteúdo estudar as diferenças na gênica е protéico de neurotransmissores e fatores inflamatórios nestes dois fenótipos e sugerir novos mecanismos na hipertensão secundária à ingestão de dieta hiperlipídica.

Foi observado que camundongos expostos a 15 semanas de dieta hiperlipídica possuem maior prevalência de hipertensão arterial e disfunção autonômica, ou seja, as alterações de pressão e do sistema nervoso autônomo são mais prevalentes com maior tempo de exposição à dieta. Isso demonstra que o tempo de dieta é um fator crítico para o desenvolvimento de hipertensão e alterações no equilíbrio simpato-vagal, porém as alterações metabólicas são mais precoces que as alterações na pressão arterial e sistema nervoso autônomo.

Interessantemente, os camundongos HL+HS, ao contrário dos HL, embora fossem mais pesados e intolerantes à glicose que os HL, não desenvolveram hipertensão após 8 semanas de dieta e apresentaram menor prevalência de hipertensão que o grupo exposto a 15 semanas de dieta hiperlipídica somente. Uma hipótese para isso seria a menor ingestão de ácidos graxos livres pelos HL+HS. Como a sacarose é oferecida diluída na água aos camundongos HL+HS eles se saciaram com maior facilidade e por consequência consumiram menos dieta hiperlipídica que os camundongos HL. Estes dados destacam a importância do regime alimentar, ao invés da obesidade em si, no desenvolvimento de hipertensão. Assim, nossos resultados sugerem que os mecanismos pelos quais a obesidade

aumenta a incidência de hipertensão sejam desencadeados pelos ácidos graxos livres provenientes da dieta hiperlipídica rica em gordura animal. Este é um fato interessante que merece ser investigado mais detalhadamente em outro estudo.

Os mecanismos que contribuem para o desenvolvimento de hipertensão induzida pela obesidade são multifatoriais e complexos. Diversos estudos indicam que mecanismos neurohumorais, renais e vasculares contribuem para a hipertensão secundária à obesidade em humanos e animais (BERGMAN et al., 2007; ESLER, 1995; GRASSI et al, 2004; HALL, 2003; HALL et al, 2010; REAVEN, 2002). No presente trabalho, foi avaliado o equilíbrio autonômico cardiovascular através da análise espectral da pressão arterial e da frequência cardíaca, uma importante ferramenta não-invasiva, previamente validada em camundongos (THIREAU et al., 2007). Nossos resultados indicam que a hipertensão induzida pela dieta hiperlipídica está associada ao aumento dos componentes LF da PAS e LF do IP, que são índices da atividade do sistema nervoso simpático vascular e cardíaco, respectivamente (THIREAU et al., 2007). Nossos resultados diferem dos resultados de outro estudo em que a hipertensão estava associada ao aumento do LF do IP, mas não do LF da PAS (WILLIAMS et al., 2003) em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica por 15 semanas. Esta discrepância entre os estudos pode ser devido à diferente dieta controle utilizada ou à idade dos camundongos. Foram estudados na presente tese camundongos com 10 semanas de idade enquanto WILLIAMS et al., 2003 estudou camundongos com 5 semanas de idade no início dos protocolos.

A disfunção autonômica nos vasos e coração sugerida pela análise espectral nos camundongos hipertensos que receberam dieta hiperlipídica é um resultado importante, pois já foi bem descrito que estes parâmetros estão correlacionados a doenças em órgãos-alvo associadas à hipertensão, como o acidente vascular cerebral (PAL et al., 2013). Além disso, a hipertonia simpática possui uma correlação direta com a morbidade e mortalidade de diversas doenças (FELDER, 2010; FELDER et al., 2003; ZUCKER et al., 1995).

Algumas evidências da literatura científica corroboram com esta observação de aumento da atividade do simpático na obesidade. Dentre elas: 1) hipertonia simpática observada em obesos, especialmente para o território renal (VAZ et al., 1997); 2) o bloqueio farmacológico da atividade adrenérgica diminui a pressão

arterial em maior magnitude em obesos do que em sujeitos magros (WOFFORD et al., 2001); 3) a denervação renal diminui marcadamente a retenção de sódio e a hipertensão em animais obesos (KASSAB et al., 1995) e 4) a administração ou tratamento crônico com bloqueadores  $\alpha$  e  $\beta$ - adrenérgicos ou clonidina, um fármaco que estimula receptores  $\alpha$ -2 adrenérgicos centrais e que reduz a atividade do SNS, previnem a maior parte do aumento na pressão arterial em cães alimentados com dieta hiperlipídica e em pacientes obesos hipertensos (HALL et al., 2010; WOFFORD; HALL, 2004).

# 5.3 Papel do CART no DMH na hipertensão e disfunção autonômica secundária a dieta hiperlipídica

Para investigar novos mecanismos pelos quais a ingestão de dieta hiperlipídica aumenta a incidência de hipertensão e disfunção autonômica, foi realizado um rastreamento por qPCR de diversos neurotransmissores envolvidos com o equilíbrio energético (controle alimentar e gasto energético) e que poderiam estar alterados na hipertensão secundária a ingestão de dieta hiperlipídica.

Nossos resultados revelaram que houve um aumento da expressão gênica do CART apenas no hipotálamo de animais que receberam dieta hiperlipídica hipertensos, sem alterações no tronco encefálico, e que se correlacionou positivamente com os valores de pressão arterial sistólica. Além disso, foi avaliado em qual núcleo do hipotálamo estaria ocorrendo esse aumento de neurônios CART-positivos. Foi evidenciado pelos resultados que o aumento de neurônios CART-positivos pela dieta hiperlipídica ocorreu no DMH. Estes nossos achados sugerem um papel do DMH também no controle a longo prazo do sistema cardiovascular visto que a literatura enfatiza o papel agudo do DMH mediando, por exemplo, alterações e respostas cardiovasculares no modelo de estresse (DIMICCO et al., 2002; YARDLEY; HILTON, 1986; ZARETSKAIA et al., 2002). Neste sentido seria interessante investigar como estes neurônios CART-positivos estariam participando do controle cardiovascular, investigando suas ações em áreas de neurônios pré-simpáticos.

CART é um neuropeptídeo envolvido em diferentes comportamentos e processos, como recompensa, dependência química, alimentação, regulação de

peso corporal, gasto energético e ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal durante o estresse (ROGGE et al., 2008).

Entre os diversos neuromoduladores envolvidos na ativação do SNS, um dos na obesidade é a leptina, secretada mais estudados por adipócitos proporcionalmente ao grau de adiposidade do indivíduo. Níveis elevados de leptina poderiam explicar, pelo menos em parte, a hipertensão induzida pela obesidade e hiperatividade simpática renal em humanos (EIKELIS et al., 2003; RAHMOUNI et al., 2002) e camundongos (SIMONDS et al., 2014), sugerindo que a leptina possa atuar como uma ligação entre o excesso de adiposidade e a hiperatividade simpática (RAHMOUNI et al., 2005). A leptina regula a homeostase de energia porque age sobre os circuitos neuronais hipotalâmicos reduzindo a ingestão de calorias e aumentando o gasto energético (FRIEDMAN, 2009).

Os seres humanos com mutações que causam perda de função da leptina ou dos seus receptores têm pressão arterial reduzida, apesar de serem obesos (SIMONDS et al, 2014). Foi recentemente demonstrado que a leptina aumenta a pressão arterial em condições de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, agindo sobre os neurônios do DMH (SIMONDS et al., 2014). O bloqueio da ação da leptina com um anticorpo específico, antagonistas farmacológicos ou inibindo a atividade de seu receptor em neurônios do DMH gerou uma queda de pressão arterial em camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica e tal efeito foi revertido com a re-expressão de receptores de leptina no DMH (SIMONDS et al., 2014). Os mecanismos, no entanto, através dos quais a leptina atua no DMH promovendo hipertensão associada à obesidade ainda são desconhecidos.

No ARC a leptina inibe neurônios NPY/AgRP (SCHWARTZ et al., 1996) e ativa neurônios POMC/CART (COWLEY et al., 2001; ELIAS et al., 1998). Além disso, a leptina estimula os neurônios NPY/CART do DMH, que se projetam para o PVN (LEE et al., 2013a) apenas em obesos (LEE et al., 2013b). A administração periférica de leptina aumenta a expressão de CART no hipotálamo, inclusive no DMH (ELIAS et al., 1998; KRISTENSEN et al., 1998; LEE et al, 2013b). Neste sentido, o CART pode ser um importante neuropeptídeo envolvido nas ações centrais da leptina sobre o controle do sistema cardiovascular.

Camundongos HL+HS e HL-resistentes à hipertensão após 8 semanas de dieta hiperlipídica apesar de terem níveis elevados de leptina, não desenvolveram

hipertensão ou aumento na expressão gênica de CART hipotalâmico e neurônios CART-positivos no DMH. Sobre isso, pode-se argumentar que talvez a leptina tenha ações distintas em animais HL-hipertensos comparados com animais HL-resistentes à hipertensão. Os mecanismos pelos quais camundongos com a mesma genética tiveram respostas diferentes à níveis elevados de leptina neste modelo são desconhecidos e merecem ser investigados. Estes dados sugerem que além dos níveis circulantes de leptina outros fatores como a responsividade à leptina por diferentes populações neuronais no hipotálamo podem estar envolvidos na gênese de hipertensão e disfunção autonômica encontradas na obesidade. Tem sido demonstrado que animais obesos têm resistência à leptina, não só na periferia, mas também centralmente (LIN et al., 2000), o que poderia explicar, pelo menos em parte, a incapacidade da leptina em promover hipertensão arterial e aumento da expressão de CART no DMH em camundongos HL-R e HL+HS.

Além da leptina, foi mostrada que a insulina, cujos níveis são também elevados em indivíduos obesos insulino-resistentes, atua no sistema nervoso central, aumentando a atividade simpática periférica em roedores (LANDSBERG; YOUNG, 1985).

Apesar da estrutura e efeitos do CART serem conhecidos há pelo menos 15 anos, o receptor do CART ainda não foi identificado e clonado, limitando o desenvolvimento de um antagonista e o progresso científico nesta área. Um estudo mostrou que o CART tem baixa ligação inespecifica em culturas de células (MALETÍNSKÁ et al., 2007). A falta de antagonistas seletivos para bloquear receptores de CART prejudica a capacidade de abordar funcionalmente o papel deste neuropeptídeo como elo causal entre obesidade, hipertensão e hiperatividade simpática.

Então, pode-se concluir que a hipertensão induzida por 8 semanas de dieta hiperlipídica e disfunção autonômica estão associados a um aumento dos níveis de CART no DMH de camundongos. Porém, mais estudos são necessários para avaliar a possível causalidade entre estas observações.

# 5.4 Papel de fatores inflamatórios e da via TLR-NFκB em núcleos autonômicos do sistema nervoso central

Estudos prévios demonstraram que o consumo de dieta rica em ácidos graxos saturados pode ativar a resposta inflamatória no hipotálamo o que altera o controle

da ingestão alimentar e do gasto energético causando obesidade (PEREIRA et al., 2003; TORSONI et al., 2003; VELLOSO et al., 2008). Ratos alimentados comdieta hiperlipídica por 16 semanas apresentaram aumento de citocinas como TNF, IL-1 e IL-6 no hipotálamo caracterizando uma situação de inflamação hipotalâmica (DE SOUZA et al., 2005; MILANSKI et al., 2009; POSEY et al., 2009; TAPIA-GONZÁLEZ et al., 2011). As diversas citocinas pró-inflamatórias atuam no hipotálamo modulando a resposta à insulina e à leptina no controle da ingestão alimentar e do gasto energético (DE SOUZA et al., 2005; VELLOSO et al., 2008).

No presente estudo sobre a expressão gênica das citocinas, quimiocinas e fatores inflamatórios foi observado que a dieta hiperlipídica ministrada por 8 semanas aumenta no hipotálamo a CCL5, uma quimiocina envolvida no recrutamento de leucócitos a áreas inflamatórias (LEY et al., 2007) o que está correlacionado positivamente com a atividade simpática para os vasos. A expressão gênica de CCL5 já foi estudada no NTS de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e sua expressão, porém mostrou-se diminuída (GOURAUD et al., 2011). Semelhante ao que acontece com outras citocinas e quimiocinas inflamatórias, a CCL5 pode ter um papel na função e homeostase em condições fisiológicas normais (HESSELGESSER; HORUK, 1999; ROSTÈNE et al., 2007; SZELÉNYI, 2001), como por exemplo: modulação da migração neuronal (BOLIN et al., 1998), regulação da proliferação e/ou diferenciação de astrócitos (BAKHIET et al., 2001), modulação da neurotransmissão de glutamato (MUSANTE et al., 2008). E além das células inflamatórias, as células da glia podem ser uma fonte de CCL5 (BESONG et al., 2002). Como a CCL5 afeta a circuitaria do hipotálamo na condição de obesidade induzida por dieta e como interfere no controle da pressão arterial são questões que ainda precisam ser esclarecidas.

Outro resultado foi o aumento de RNAm do CD86, um fator co-estimulatório associado com a presença de macrófagos/microglia pró-inflamatórios M1, no tronco encefálico de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica por 8 semanas. Um dado interessante foi a correlação negativa entre a expressão gênica de CD86 com a variabilidade da pressão arterial sistólica e o equilíbrio simpato-vagal ao coração. Não há trabalhos mostrando a relação da CD86 com hipertensão secundária à obesidade. Porém, em outros modelos experimentais de hipertensão as evidências sugerem que há ativação da microglia (SHI et al., 2010; WU et al., 2012) com

acúmulo de macrófagos/monócitos especialmente nas regiões perivasculares (LIU et al., 1994).

As células da microglia fazem parte do mecanismo de neuromodulação muito importante no controle imunológico do SNC podendo fazer uma varredura completa do encéfalo em poucas horas (DAVALOS, et al., 2005; NIMMERJAHN et al., 2005). Os resultados do presente trabalho mostraram que há maior concentração de células Iba-positivas no NTS de camundongos HL. Estes resultados são qualitativos, porém não deixam de ser interessantes, pois sugerem que a maior concentração de microglia no NTS poderia gerar uma inflamação localizada neste importante núcleo encefálico de integração cardiovascular.

Os resultados observados no RNAm são interessantes, porém também têm suas limitações. Nem sempre o conteúdo protéico e a função protéica acompanham as alterações da expressão gênica. Portanto, para confirmar a função da inflamação central no desenvolvimento de hipertensão neurogênica secundária à ingestão de dieta hiperlipidica foram utilizados animais com a deleção da via inflamatória do TLR-NF-KB em neurônios e glia. Diante disso, foram utilizados neste protocolo experimental camundongos transgênicos Myd88<sup>lox</sup>Nestin<sup>Cre</sup>. O Myd88 é uma das proteínas adaptadoras conhecidas dos TLRs, ou seja, participa da ativação do sinal downstream destes receptores. O Myd88 é comum a todos os TLR exceto o TLR-3 (MIAN et al., 2014; WATTERS et al., 2007). Nos animais transgênicos utilizados neste estudo, o gene Myd88 continha a sequência loxP e o gene Nestin-Cre traduzido apenas em neurônios e glia continha a sequência para traduzir a Cre recombinase. Assim, foi possível deletar o Myd88 e consequentemente a via de ativação do receptor toll-like especificamente em neurônios e glia. Esse protocolo foi fundamental para verificar se a ausência da via inflamatória TLR-NF-kB no sistema nervoso central impediria o desenvolvimento de hipertensão nos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica por 15 semanas e comprovar o papel da inflamação na hipertensão neurogênica secundária à dieta hiperlipídica. Interessantemente, os animais transgênicos, alimentados por 15 semanas com dieta hiperlipidica, apresentaram um quadro de obesidade e intolerância à glicose, porém não desenvolveram hipertensão tampouco disfunção autonômica quando comparados aos seus controles selvagens C57BL/6J e seus controles transgênicos que apresentavam o lox inserido sem a deleção do gene Myd88.

Já havia sido demonstrado que a ativação aguda do NF-kB e sua proteína ativadora IkB quinase-b (IKK-b) no hipotálamo mediobasal eleva rapidamente a independentemente pressão arterial em camundongos da obesidade (PURKAYASTHA et al., 2011). A forma de hipertensão induzida por inflamação hipotalâmica estudada no trabalho de PURKAYASTHA et al., 2011 também apresentava disfunção autonômica com hiperatividade simpática cardiovascular que quando suprimida reverteu a hipertensão. Animais transgênicos com perda da função de NF-kB no hipotálamo mediobasal não desenvolveram hipertensão secundária à obesidade mesmo desenvolvendo obesidade (PURKAYASTHA et al., 2011). Portanto, no presente trabalho, sugerimos o TLR como novo elo entre o NFkB, a disfunção autonômica, a hipertensão e obesidade.

Porém, faz se necessário o entendimento dos mecanismos pelos quais a delação da via inflamatória TL-R-NF-kB limitante das vias de citocinas evita a hipertensão secundária a ingestão de dieta hiperlipidica. Estas alterações podem estar diretamente relacionadas à alteração na expressão dos genes de CCL5 e CD86 nos animais HL ou ainda do CART nos hipertensos o que poderia ser um possível mecanismo de gênese da hipertensão neurogênica secundária à ingestão de dieta hiperlipídica.

Assim, a identificação de novos mecanismos inflamatórios envolvidos na patogênese da obesidade e hipertensão associada à obesidade traz novos candidatos a alvos terapêuticos no tratamento destas patologias. Esta resposta inflamatória poderia afetar a neurobiologia e integrações neuronais entre estes núcleos conduzindo a uma hiperatividade simpática e, consequentemente, causar hipertensão neurogênica associada à obesidade.

# 6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho mostraram que a hipertensão secundaria à obesidade por ingestão de dieta hiperlipidica a obesidade induzida está associada à aumento de CART no núcleo dorsomedial do hipotálamo correlacionadoa com a pressão arterial sistólica e também com a via inflamatória central TLR-NFKB central. Esses dois mecanismos estão relacionados à disfunção autonômica na hipertensão neurogênica secundária à obesidade. Além disso, a dieta hiperlipídica aumentou a expressão gênica de CCL5 e CD86 relacionadas com o recrutamento de leucócitos para áreas inflamatórias e ativação da microglia, repectivamente, concentrada no NTS desses animais.

# **REFERÊNCIAS\***

ABBOUD, F. M.; HARWANI, S. C.; CHAPLEAU, M. W. Autonomic neural regulation of the immune system. Inplications for hypertension and cardiovascular disease. **Hypertension**, v. 59, p. 755-762, 2012.

ALVAREZ, G. E. et al. Sympathetic neural activation in visceral obesity. **Circulation**, v. 106, p. 2533–2536, 2002.

AMARAL, M. E. et al. Tumor necrosis factor-alpha activates signal transduction in hypothalamus and modulates the expression of pro-inflammatory proteins and orexigenic/anorexigenic neurotransmitters. **J. Neurochem.**, v. 98, p. 203–212, 2006.

ARRUDA, A. P. et al. Hypothalamic actions of tumor necrosis factor alpha provide the thermogenic core for the wastage syndrome in cachexia. **Endocrinology**, v. 151, n. 2, p. 683-694, 2010.

ARRUDA, A. P. et al. Hypothalamic inflammation and thermogenesis: the brown adipose tissue connection. **J. Bioenerg. Biomembr.,** v. 43, n. 1, p.53-58, 2011.

AUVINEN, H. E. et al. The effects of high fat diet on the basal activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in mice. **J. Endocrinol.**, v. 214, n. 2, p. 191-7, 2012.

BAKHIET, M. et al. RANTES promotes growth and survival of human first trimester forebrain astrocytes. **Nat. Cell Biol.**, v. 3, p.150–157, 2001.

BANDLER, R.; KEAY, K. A.; FLOYD, N.; PRICE, J. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. **Brain Res. Bull.**, v. 1, n. 53 (Pt. 1), p. 95-104, 2000.

BARSH, G. S.; SCHWARTZ, M. W. Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. **Nat. Rev. Genet.**, v. 3, n. 8, p. 589-600, 2002.

BENARROCH, E. E. Paraventricular nucleus, stress response, and cardiovascular disease. **Clin. Auton. Res.**, v. 15, n. 4, p. 254-263, 2005.

BERGMAN, R. N. et al. Abdominal obesity: role in the pathophysiology of metabolic disease and cardiovascular risk. **Am. J. Med.,** v. 120, n. 2 (Suppl 1), p.S3-S8; discussion p. S29-S33, 2007.

\*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

BERNARDIS L. L.; BELLINGER, L. L. The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1998 update. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 218, n. 4, p.284-306, 1998.

BESONG, G. et al. Activation of group III metabotropic glutamate receptors inhibits the production of RANTES in glial cell cultures. **J. Neurosci.**, v. 22, p. 5403–5411, 2002.

BEUTLER, B. Inferences, questions and possibilities in toll-like receptor signalling. **Nature**, v. 430, p. 257–263, 2004

BJORBAEK, C.; KAHN, B. B. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. **Recent Prog. Horm. Res.,** v. 59, p. 305–331, 2004.

BLACK, B. L.; CROOM, J.; EISEN, E. J.; PETRO, A. E.; EDWARDS, C. L.; SURWIT, R. S. 1998. Differential effects of fat and sucrose on body composition in A/J and C57BL/6 mice. **Metabolism**, v. 47, p. 1354-1359, 1998.

BOLIN, L. M. et al., Primary sensory neurons migrate in response to the chemokine RANTES. J. **Neuroimmunol.**, v. 81, p. 49–57, 1998.

BOUSTANY, C. M. et al. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 287, n. 4, p. R943-R959, 2004.

BRADLEY, R. L. et al. Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose inflammation in diet-induced obese mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 295, p. E586-E594, 2008.

BUETTNER, R.; SCHÖLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity**, v. 15, n. 4, p.798-808, 2007.

BUIJS, R. M.; SWAAB, D. F.; DOGTEROM, J.; VAN LEEUWEN, F. W. Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. **Cell Tissue Res.**, 31;186(3):423-33, 1978.

BURMAN, K. J. et al. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in catecholamine and noncatecholamine presympathetic vasomotor neurons of rat rostral ventrolateral medulla. **J. Comp. Neurol**., v. 476, n. 1, p.19-31, 2004.

CAO, W. H.; FAN, W.; MORRISON, S. F. Medullary pathways mediating specific sympathetic responses to activation of dorsomedial hypothalamus. **Neuroscience**, v. 126, p. 229-240, 2004.

CHAN, J. M. et al. Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. **Diabetes**, v. 17, n. 9, p. 961-969, 1994.

CHEN, F. et al. High-fat feeding alters the cardiovascular role of hypothalamic paraventricular nucleus. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 298, n. 3, p. R799-R807, 2010.

CHEN, X.; HESS, S. Adipose proteome analysis: focus on mediators of insulin resistance. **Expert. Rev. Proteomics**., v. 5, n. 6, p. 827-839, 2008.

CHIU, H. Y. et al. Potentiation of spinal NMDA-mediated nociception by cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide via PKA and PKC signaling pathways in rats. **Regul. Pept.,** v. 158, n. 1-3, p.77-85, 2009.

CHIU, H. Y. et al. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide activates ERK pathways via NMDA receptors in rat spinal cord dorsal horn in an age-dependent manner. **Regul. Pept**., v. 164, n. 2-3, p. 90-96, 2010.

CHOI, H. N.; KANG, M. J.; LEE, S. J.; KIM, J. I. Ameliorative effect of myricetin on insulin resistance in mice fed a high-fat, high-sucrose diet. **Nutr. Res. Pract.,** v. 8, p. 544-549, 2014.

COLDITZ, G. A. et al. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. **Ann. Intern. Med.**, v. 122, n. 7, p.481-p486, 1995.

COLLINS, S.; SURWITT, R. S. The beta-adrenergic receptors and the control of adipose tissue metabolism and thermogenesis. **Rec. Prog. Horm. Res.**, v. 56, p. 309–328, 2001.

CONTRERAS, R. J.; WILLIAMS, V. L. Dietary obesity and weight cycling: effects on blood pressure and heart rate in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 256, p. 1209-1219, 1989.

COWLEY, M. A.; SMART, J. L.; RUBINSTEIN, M.; CERDÁN, M. G.; DIANO, S.; HORVATH, T. L.; CONE, R. D.; LOW, M. J. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. **Nature**, v. 411, p. 480-484, 2001.

DAMPNEY R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol. Rev.,** v. 74, n. 2, p. 323-364, 1994.

DAVALOS, D. et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nat. Neurosci.**, v. 8, p. 752–758, 2005.

DE SOUZA, C. T. et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**, v. 146, p. 4192–4199, 2005.

DESPRÉS, J. P. Inflammation and cardiovascular disease: is abdominal obesity the missing link? **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord**., v. 27, n. 3, p. S22-S24, 2003.

DIMICCO, J. A.; SAMUELS, B. C.; ZARETSKAIA, M. V.; ZARETSKY, D. V. The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. **Pharmacol. Biochem. Behav.,** v. 71, n. 3, p. 469-480, 2002.

DIMICCO, J. A.; SARKAR, S.; ZARETSKAIA, M. V.; ZARETSKY, D. V. Stressinduced cardiac stimulation and fever: common hypothalamic origins and brainstem mechanisms. **Auton. Neurosci.**, v. 30, p. 106-19, 2006.

DINARELLO, C. A. et al. Role of IL-1beta in type 2 diabetes. Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes., v. 17, n. 4, p.314-321, 2010.

DOBRIAN, A. D. Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity. **Hypertension**, v. 35, n. 4, p. 1009-1015, 2000.

DONATH, M. Y.; MANDRUP-POULSEN, T. The use of interleukin-1-receptor antagonists in the treatment of diabetes mellitus. **Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.**, v. 4, n. 5, p. 240-241, 2008.

DUN, S. L.; CASTELLINO, S. J.; YANG, J.; CHANG, J. K.; DUN, N. J. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide-immunoreactivity in dorsal motor nucleus of the vagus neurons of immature rats. **Brain Res. Dev. Brain Res.**, v. 26, n. 131 (Pt. 1-2), p. 93-102, 2001.

EGAN, B. M. et al. Regional hemodynamic abnormalities in overweight men. Focus on alpha-adrenergic vascular responses. **Am. J. Hypertens.**, v. 2, p. 428-434, 1989.

EIKELIS, N.; SCHLAICH, M.; AGGARWAL, A.; KAYE, D.; ESLER, M. Interactions between leptin and the human sympathetic nervous system. **Hypertension**, v. 41, p. 1072-1079, 2003.

ELIAS, C. F.; LEE, C.; KELLY, J.; ASCHKENASI, C.; AHIMA, R. S.; COUCEYRO, P. R.; KUHAR, M. J.; SAPER, C. B.; ELMQUIST, J. K. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. **Neuron**, v. 21, n. 6, p. 1375-1385, 1998.

ELIAS, C. F.; LEE, C. E.; KELLY, J. F.; AHIMA, R. S.; KUHAR, M.; SAPER, C. B.; ELMQUIST, J. K. Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. **J. Comp. Neurol.**, v. 432, p. 1-19, 2001.

EMILSSON, V. et al. Genetics of gene expression and its effect on disease. **Nature**, v. 27, p. 423-428, 2008.

ESLER, M. Sympathetic nervous system: contribution to human hypertension and related cardiovascular diseases. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 26, (Suppl 2), p. S24-S28, 1995.

FELDER, R. B. et al. Heart failure and the brain: new perspectives. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**., v. 284, n. 2, p. R259-R276, 2003.

FELDER, R. B. Mineralocorticoid receptors, inflammation and sympathetic drive in a rat model of systolic heart failure. **Exp. Physiol**., v. 95, n. 1, p. 19-25, 2010.

FENWICK, N. M.; MARTIN, C. L.; LLEWELLYN-SMITH, I. J. Immunoreactivity for cocaine- and amphetamine-regulated transcript in rat sympathetic preganglionic neurons projecting to sympathetic ganglia and the adrenal medulla. **J. Comp. Neurol.**, v. 495, p. 422-433, 2006.

FESTUCCIA, W. T. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gammamediated positive energy balance in the rat is associated with reduced sympathetic drive to adipose tissues and thyroid status. **Endocrinology**, v. 149, n. 5, p. 2121-2130, 2008.

FRIEDMAN, J. M. Leptin at 14 y of age: an ongoing story. **Am. J. Clin. Nutr.,** v. 89, p. 973S-979S, 2009.

FONTES, M. A.; TAGAWA, T.; POLSON, J. W.; CAVANAGH, S. J.; DAMPNEY, R. A. Descending pathways mediating cardiovascular response from dorsomedial hypothalamic nucleus. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 280, p. H2891-H2901, 2001.

GEHRMANN, J. et al. Phenotypic screening for heart rate variability in the mouse. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 279, n. 2, p. H733-H740, 2000.

GOLDSTONE, A. P. et al. Leptin interacts with glucagon-like peptide-1 neurons to reduce food intake and body weight in rodents. **FEBS Lett.**, v. 415, p. 134-138, 1997.

GOURAUD, S. S. et al. Down-regulation of chemokine Ccl5 gene expression in the NTS of SHR may be pro-hypertensive. **J. Hypertens.**, v. 29, p. 732–740, 2011.

GRANJER, J. P. An emerging role for inflammatory cytokines in hypertension. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** v. 290, p. H923–H924, 2006.

GRASSI, G. et al. Effect of central and peripheral body fat distribution on sympathetic and baroreflex function in obese normotensives. **J. Hypertens.**, v. 22, n. 12, p. 2363-2369, 2004.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory mechanisms in obesity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 29, p. 415-445, 2011.

GRILL, H.J.; KAPLAN, J. M. Sham feeding in intact and chronic decerebrate rats. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. R1070–R1074, 1992.

GRILL, H. J.; KAPLAN, J. M. The Neuroanatomical Axis for Control of Energy Balance. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 23, n. 1, p. 2-40, 2002.

GRILL, H. J.; NORGREN, R. The taste reactivity test. II. Mimetic responses to gustatory stimuli in chronic thalamic and chronic decerebrate rats. **Brain. Res.**, v. 143, p. 281–297, 1978.

GRILL, H. J.; SMITH, G. P. Cholecystokinin decreases sucrose intake in chronic decerebrate rats. **Am. J. Physiol**., v. 254, n. 6 (Pt 2), p. R853-R856, 1988.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nat. Rev. Neurosci**., v. 7, n. 5, p. 335-346, 2006.

GUYENET, S. J.; MATSEN, M. E.; MORTON, G. J.; KAIYALA, K. J.; SCHWARTZ, M. W. Rapid glutamate release in the mediobasal hypothalamus accompanies feeding and is exaggerated by an obesogenic food. **Mol. Metab.,** v. 11, n. 2 (Pt. 2), p. 116-122, 2013.

GUYTON, A. C. Long-term arterial pressure control: an analysis from animal experiments and computer and graphic models. **Am. J. Physiol.**, v. 259, n. 5 (Pt 2), p. R865-R877, 1990.

HALL, J. E. The kidney, hypertension, and obesity. **Hypertension**, v. 41, n. 3 (Pt 2), p. 625-633, 2003.

HALL, J. E. et al. Obesity-induced hypertension: role of sympathetic nervous system, leptin, and melanocortins. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 23, p.17271-17276, 2010.

HANISCH, U. K.; JOHNSON, T. V.; KIPNIS, J. Toll-like receptors: roles in neuroprotection? **Trends Neurosci.,** v. 31, n. 4, p. 176-182, 2008.

HARWANI, S. C.; CHAPLEAU, M. W.; LEGGE, K.; BALLAS, Z.; ABBOUD, F. M. Autonomic dysregulation of innate immunity in genetic hypertension . **Hypertension**, v. 57, p. 1026-1033, 2011.

HESSELGESSER, J. E.; HORUK, R. Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. **J. Neurovirol.**, v. 5, p. 13–26, 1999.

HILTON, S. M. The defence-arousal system and its relevance for circulatory and respiratory control. **J. Exp. Biol.**, v. 100, p. 159-174, 1982.

HOLSCHER, C. et al. Anaesthesia generates neuronal insulin resistance by inducing hypothermia. **Neurosci.,** v. 9, n. 100, 2008.

HORIUCHI, J.; MCALLEN, R. M.; ALLEN, A. M.; KILLINGER, S.; FONTES, M. A.; DAMPNEY, R. A. Descending vasomotor pathways from the dorsomedial

hypothalamic nucleus: role of medullary raphe and RVLM. **Am. J. Physiol. Regul. Integr, Comp. Physiol.**, v. 287, p. R824-R832, 2004.

HSUN LIN, H. et al. Potentiation of spinal N-methyl-D-aspartate-mediated nociceptive transmission by cocaine-regulated andamphetamine-regulated transcript peptide in rats. **Neuroreport,** v. 16, n. 3, p. 253-257, 2005.

HWANG, L. L. et al. Central pressor effects of CART peptides in anesthetized rats. **Neuropeptides,** v. 38, n. 2-3, p.69-76, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Brasília: IBGE, 2010. [130 p].

ITOH, K. et al. Application of coupled oxidation reaction to electron microscopic demonstration of horseradish peroxidase: cobalt-glucose oxidase method. **Brain Res.**, v. 175, n. 2, p. 341-346, 1979.

JIN, C., HENAO-MEJIA, J., FLAVELL, R. A. Innate Immune Receptors: Key Regulators of Metabolic Disease Progression. **Cell Metab.**, v. 4, p. 873-882, 2013.

KANAREK, R. B.; APRILLE, J. R.; HIRSCH, E.; GUALTIERE, L.; BROWN, C. A. Sucrose-induced obesity: effect of diet on obesity and brown adipose tissue. **Am. J. Physiol.**, v. 253, p.158-166, 1987.

KANG, Y. M. et al. Cross-talk between cytokines and renin-angiotensin in hypothalamic paraventricular nucleus in heart failure: role of nuclear factor-kappaB. **Cardiovasc. Res.**, v. 79, n. 4, p. 671-678. 2008a.

KANG, Y. M. et al. Inhibition of brain proinflammatory cytokine synthesis reduces hypothalamic excitation in rats with ischemia-induced heart failure. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 295, n. 1, p. H227-H236, 2008b.

KANNAN, H. et al. Activation of sympathetic outflow by recombinant human interleukin-1 beta in conscious rats. **Am. J. Physiol**., v. 270, p. R479-R485, 1996.

KAPLAN, J. M. et al. Food deprivation does not potentiate glucose taste reactivity responses of chronic decerebrate rats. **Brain Res.**, v. 870, p.102–108, 2000.

KASSAB, S. et al. Renal denervation attenuates the sodium retention and hypertension associated with obesity. **Hypertension.**, v. 25, p. 893-897, 1995.

KOYLU, E. O.; COUCEYRO, P. R.; LAMBERT, P. D.; LING, N. C.; DESOUZA, E. B.; KUHAR, M. J. Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. **J. Neuroendocrinol.**, v. 9, p. 823-833, 1997.

KRAUSS, R. M; SIRI, P. W. Dyslipidemia in type 2 diabetes. **Med. Clin. North Am.**, v. 88, n. 4, p. 897-909, 2004.

KRISTENSEN, P.; JUDGE, M. E.; THIM, L.; RIBEL, U.; CHRISTJANSEN, K. N.; WULFF, B. S.; CLAUSEN, J. T.; JENSEN, P. B.; MADSEN, O. D.; VRANG, N.; LARSEN, P. J.; HASTRUP, S. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. **Nature**, v. 393, p. 72-76, 1998.

KRUG, A. W.; EHRHART-BORNSTEIN, M. Adrenocortical dysfunction in obesity and the metabolic syndrome. **Horm. Metab. Res.**, v. 40, n. 8, p. 515-517, 2008.

LANDSBERG, L.; YOUNG, J. B. Insulin-mediated glucose metabolism in the relationship between dietary intake and sympathetic nervous systemactivity. **Int. J. Obes.**, v. 9 (Suppl. 2), p. 63-68, 1985.

LEE, S. J.; KIRIGITI, M.; LINDSLEY, S. R.; LOCHE, A.; MADDEN, C. J.; MORRISON, S. F.; SMITH, M. S.; GROVE, K. L. Efferent projections of neuropeptide Y-expressing neurons of the dorsomedial hypothalamus in chronic hyperphagic models. **J. Comp. Neurol.**, v. 521, p. 1891-914, 2013a.

LEE, S. J.; VERMA, S.; SIMONDS, S. E.; KIRIGITI, M. A.; KIEVIT, P.; LINDSLEY, S. R.; LOCHE, A.; SMITH, M. S.; COWLEY, M. A.; GROVE, K. L. Leptin stimulates neuropeptide Y and cocaine amphetamine-regulated transcript coexpressing neuronal activity in the dorsomedial hypothalamus in diet-induced obese mice. J. **Neurosci.**, v. 33, p. 15306-15317, 2013b.

LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, n. 9, p. 678-689. 2007.

LIN, S.; THOMAS, T. C.; STORLIEN, L. H.; HUANG, X. F. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57BL/6J J mice. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord., v. 24, p. 639-646, 2000.

LIU, S. et al. Relation between a diet with a high glycemic load and plasma concentrations of high sensitivity C-reactive protein in middle-aged women. **Am. J. Clin. Nutr.,** v.75, p.492–498, 200-2.

LIU, Y. et al. Quantitation of perivascular monocytes and macrophages around cerebral blood vessels of hypertensive and aged rats. **J. Cereb. Blood Flow Metab.,** v. 14, n. 2, p. 348-352, 1994.

LUMENG, C. N. et al. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **J. Clin. Invest.**, v. 117, n. 1, p.175-184, 2007a.

LUMENG, C. N. et al. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 56, n. 1, p. 16-23, 2007b.

MALETÍNSKÁ, L.; MAIXNEROVÁ, J.; MATYSKOVÁ, R.; HAUGVICOVÁ, R.; SLONCOVÁ, E.; ELBERT, T.; SLANINOVÁ, J.; ZELEZNÁ, B. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide specific binding in pheochromocytoma cells PC12. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 559, p. 109-114, 2007.

MALIK, V. S.; POPKIN, B. M.; BRAY, G. A.; DESPRÉS, J. P.; HU, F. B. Sugarsweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk. **Circulation**, v. 121, p. 1356-1364, 2010.

MATSUMURA, K. et al. Central human cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide 55-102 increases arterial pressure in conscious rabbits. **Hypertension**, v. 38, n. 5, p. 1096-1100, 2001.

MCCARTHY, C. G.; GOULOPOULOU, S.; WENCESLAU, C. F.; SPITLER, K.; MATSUMOTO, T.; WEBB, R. C. Toll-like receptors and damage-associated molecular patterns: novel links between inflammation and hypertension. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 306, p. H184–H196, 2014.

MCDOWALL, L. M.; HORIUCHI, J.; DAMPNEY, R. A. Effects of disinhibition of neurons in the dorsomedial hypothalamus on central respiratory drive. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 293, n. 4, p. R1728-R1735, 2007.

MEIGS, J. B. et al. Risk variable clustering in the insulin resistance syndrome. The Framingham Offspring Study. **Diabetes**, v. 46, n. 10, p. 1594-1600, 1997.

MIAN, M. O.; PARADIS, P.; SCHIFFRIN, E. L. Innate immunity in hypertension. **Current Hypertens. Reports,** v. 16, p. 413, 2014.

MILANSKI, M. et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. **J. Neurosci.**, v. 29, n. 2, p.359-370, 2009.

MONTAGUE, C. T.; O'RAHILLY, S. The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. **Diabetes**, v. 49, n. 6, p. 883-888, 2000.

MUSANTE, V.; LONGORDO, F.; NERI, E.; PEDRAZZI, M.; KALFAS, F.; SEVERI, P.; RAITERI, M.; PITTALUGA, A. RANTES modulates the release of glutamate in human neocortex. **J. Neurosci.**, v. 28, p.12231–12240, 2008.

NAKAJIMA, S.; HIRA, T.; HARA, H. Postprandial glucagon-like peptide-1 secretion is increased during the progression of glucose intolerance and obesity in high-fat/high-sucrose diet-fed rats. **Br. J. Nutr.,** v. 113, p. 1477-1488, 2015.

NG, M. et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980—2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. **The Lancet**, v. 384, p. 766-781, 2014.

NIMMERJAHN, A. et al. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v. 308, p. 1314–1318, 2005

OLIVEIRA, L. R. et al. Induction of chronic non-inflammatory widespread pain increases cardiac sympathetic modulation in rats. **Auton. Neurosci.,** v. 167, n. 1-2, p. 45-49, 2012.

OLIVEIRA, L. S.; SANTOS, D. A.; BARBOSA-DA-SILVA, S.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; AGUILA, M. B. The inflammatory profile and liver damage of a sucrose-rich diet in mice. **J. Nutr. Biochem.**, v. 25, p. 193-200, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Health topics: Obesity**. Organização Mundial da Saúde (OMS). Disponível em: <a href="http://www.who.int/topics/obesity/en/">http://www.who.int/topics/obesity/en/</a>. Acesso em: 30 de Junho de 2011.

PAL, G. K. et al. Cardiovascular dysfunctions and sympathovagal imbalance in hypertension and prehypertension: physiological perspectives. **Future Cardiol.,** v. 9, p. 53-69, 2013.

PARATI, G.; SAUL, J. P.; DI RIENZO, M.; MANCIA, G. Spectral analysis of blood pressure and heart rate variability in evaluating cardiovascular regulation. A critical appraisal. **Hypertension**, v. 25, n. 6, p. 1276-1286, 1995.

PATEL, K. P.; SCHMID, P. G. Role of paraventricular nucleus (PVH) in baroreflexmediated changes in lumbar sympathetic nerve activity and heart rate. **J. Auton. Nerv. Syst.,** v.22, n. 3, p. 211-219, 1988.

PEREIRA-DA, M. et al. Hypothalamic melanin-concentrating hormone is induced by cold exposure and participates in the control of energy expenditure in rats. **Endocrinology,** v. 144, p. 4831-4840, 2003.

POSEY, K. A. et al. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 296, n. 5, p. E1003-E1012, 2009.

PRADHAN, A. D. et al. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. **JAMA**, v. 286, n. 3, p. 327–334, 2001.

PURKAYASTHA, S. et al. Uncoupling the mechanisms of obesity and hypertension by targeting hypothalamic IKK- $\beta$  and NF- $\kappa\beta$ . **Nature Medicine**, v. 17, n. 7, p. 883-888, 2011.

RAHMOUNI, K.; HAYNES, W. G.; MARK, A. L. Cardiovascular and sympathetic effects of leptin. **Curr. Hypertens. Rep.**, v. 4, p. 119-125, 2002.

RAHMOUNI, K.; CORREIA, M. L.; HAYNES, W. G.; MARK, A. L. Obesity-associated hypertension: new insights into mechanisms. **Hypertension**, v. 45, p. 9-14, 2005.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neurosci Lett.**, v. 339, n. 1, p. 62-66, 2003.

REAVEN, G. Metabolic syndrome: pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease. **Circulation**, v. 106, p. 286–288, 2002.

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. J. Nutr., v. 127, n. 5, p. 838S-841S, 1997.

REIL, T. D.; BARNARD, R. J.; KASHYAP, V. S.; ROBERTS, C. K.; GELABERT, H. A. 1999. Diet-induced changes in endothelial-dependent relaxation of the rat aorta. **J. Surg. Res.**, v. 85, p. 96-100, 1999.

RICHARDSON, R. J.; GRKOVIC, I.; ANDERSON, C. R. Cocaine- and amphetaminerelated transcript peptide and somatostatin in rat intracardiac ganglia. **Cell Tissue Res.**, v. 324, p. 17-24, 2006

RITTER, S. et al. Immunotoxic destruction of distinct catecholamine subgroups produces selective impairment of glucoregulatory responses and neuronal activation. **J. Comp. Neurol.**, v. 432, n. 2, p.197-216, 2001.

ROBERTS, C. K.; VAZIRI, N. D.; BARNARD, R. J. Protective effects of estrogen on gender-specific development of diet-induced hypertension. **J. Appl. Physiol.**, v. 91, p. 2005-2009, 2001.

ROCCHINI, A. P. et al. Hypertension and insulin resistance are not directly related in obese dogs. **Hypertension**, v. 43, n. 5, p. 1011-1016, 2004.

RODRIGUES, F.L. et al. Effect of baroreceptor denervation on the autonomic control of arterial pressure in conscious mice. **Exp. Physiol.**, v. 96, n. 9, p. 853–862, 2011.

ROGGE, G.; JONES, D.; HUBERT, G. W.; LIN, Y.; KUHAR, M. J. CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions. **Nat. Rev. Neurosci.,** v. 9, n. 10, p. 747-758, 2008.

ROMANATTO, T. et al. TNF-alpha acts in the hypothalamus inhibiting food intake and increasing the respiratory quotient – effects on leptin and insulin signaling pathways. **Peptides,** v. 28, p.1050–1105, 2007.

ROSTÈNE, W. et al. Chemokines: a new class of neuromodulator? **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 8, p. 895–903, 2007.

SANTOS, S. O. et al. Experimental gestational hypothyroidism evokes hypertension in adult offspring rats. **Auton. Neurosci.,** v. 170, n. 1-2, p. 36-41, 2012.

SANTURÉ, M.; PITRE, M.; MARETTE, A.; DESHAIES, Y.; LEMIEUX, C.; LARIVIÈRE, R.; NADEAU, A.; BACHELARD, H. Induction of insulin resistance by high-sucrose feeding does not raise mean arterial blood pressure but impairs haemodynamic responses to insulin in rats. **Br. J. Pharmacol.,** v. 137, p. 185-196, 2002.

SAUER, B.; HENDERSON, N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A,** v. 85, n. 14, p. 5166-5170, 1988.

SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 205, n. 3, p. 260-272, 1982.

SCHEFE, J. H. et al. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. **J. Mol. Med.,** v. 84, n. 11, p. 901-910, 2006.

SCHULZE, M. B. et al. Glycemic index, glycemic load, and dietary fiber intake and incidence of type 2 diabetes in younger and middle-aged women. **Am. J. Clin. Nutr.,** v. 80, n. 2, p. 348–356, 2004.

SCHWARTZ, G. J.; MORAN, T. H. Leptin and neuropeptide y have opposing modulatory effects on nucleus of the solitary tract neurophysiological responses to gastric loads: implications for the control of food intake. **Endocrinology**, v. 143, p. 3779–3784, 2002.

SCHWARTZ, M. W.; BASKIN, D. G.; BUKOWSKI, T. R.; KUIJPER, J. L.; FOSTER, D.; LASSER, G.; PRUNKARD, D. E; PORTE, D.; WOODS, S. C.; SEELEY, R. J.; WEIGLE, D. S. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. **Diabetes**, v. 45, p. 531-535, 1996.

SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 661-671, 2000.

SCRUGGS, P. et al. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide potentiates spinal glutamatergic sympathoexcitation in anesthetized rats. **Regul. Pept.**, v. 127, n. 1-3, p. 79-85, 2005.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (VIGITEL). Brasília: Ministério da Saúde, 2013. [297 p.]

SEELEY, R. J. et al. Neurological dissociation of gastrointestinal and metabolic contributions to meal size control. **Behav. Neurosci.**, v. 108, p. 347–52, 1994.

SEELEY, R. J. et al. Fat hormones pull their weight in the CNS. **Nat. Med.**, v. 10, n. 5, p. 454-455, 2004.

SHI, P. et al. Brain microglial cytokines in neurogenic hypertension. **Hypertension**, v. 56, n. 2, p. 297-303, 2010.

SIMONDS, S. E.; PRYOR, J. T.; RAVUSSIN, E.; GREENWAY, F. L.; DILEONE, R.; ALLEN, A. M.; BASSI, J.; ELMQUIST, J. K.; KEOGH, J. M.; HENNING, E.; MYERS, M. G.; LICINIO, J.; BROWN, R. D.; ENRIORI, P. J.; O'RAHILLY, S.; STERNSON, S. M.; et al. Leptin mediates the increase in blood pressure associated with obesity. **Cell**, v. 159, p. 1404-1416, 2014.

SIRONI, A. M. et al. Visceral fat in hypertension: influence on insulin resistance and beta-cell function. **Hypertension**, v. 44(2), p. 127-133, 2004. Erratum in: **Hypertension**, v. 44, n. 5, p. 8, 2004.

SMITH, U. Adrenergic control of human adipose tissue lipolysis. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 10, p. 343-344, 1980.

SPYER, K. M. Annual review prize lecture. Central nervous mechanisms contributing to cardiovascular control. **J. Physiol.**, v. 474, n. 1, p. 1-19, 1994.

STERNBERG, N.; HAMILTON, D.; HOESS, R. Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome. J. Mol. Biol., v. 25, n. 150 (Pt 4), p. 487-507, 1981.

STOCKER, S. D. et al. Neurons of the rostral ventrolateral medulla contribute to obesity-induced hypertension in rats. **Hypertension**, v. 49, n. 3, p. 640-646, 2007.

STRACK, A. M. et al. A general pattern of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudorabies viral infections. **Brain Res.**, v. 491, p. 156–162, 1989.

SUN, M. K. Central neural organization and control of sympathetic nervous system in mammals. **Prog. Neurobiol.**, v. 47, n. 3, p. 157-233, 1995.

SURWIT, R. S.; FEINGLOS, M. N.; RODIN, J.; SUTHERLAND, A.; PETRO, A. E.; OPARA, E. C.; KUHN, C. M.; REBUFFÉ-SCRIVE, M. 1995. Differential effects of fat

and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. **Metabolism,** v. 44, p. 645-651, 1995.

SWANSON, L. W.; KUYPERS, H.G. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. **J. Comp. Neurol.**, v. 194, p. 555–570, 1980.

SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P. E. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 6, p. 269-324, 1983.

SZELÉNYI, J. Cytokines and the central nervous system. **Brain Res. Bull.**, v. 54, p. 329–338, 2001.

TAPIA-GONZÁLEZ, S. et al. Activation of microglia in specific hypothalamic nuclei and the cerebellum of adult rats exposed to neonatal overnutrition. **J. Neuroendocrinol.**, v. 23, n. 4, p. 365-370, 2011.

TEZINI, G. C. et al. Aerobic physical training has little effect on cardiovascular autonomic control in aging rats subjected to early menopause. **Exp. Gerontol.**, v. 48, n. 2, p. 147-153, 2013.

THIREAU, J. et al. Heart rate variability in mice: a theoretical and practical guide. **Exp. Physiol.**, v. 93, n. 1, p. 83–94, 2007.

THOMPSON, R. H.; CANTERAS, N. S.; SWANSON, L. W. Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 2, n. 376 (Pt.1), p. 143-147, 1996.

TORSONI, M. A. et al. Molecular and functional resistance to insulin in hypothalamus of rats exposed to cold. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 285, p. E216–E223, 2003.

VAZ, M. et al. Regional sympathetic nervous activity and oxygen consumption in obese normotensive human subjects. **Circulation**, v. 96, p. 3423–3429, 1997.

VELLOSO, L. A. et al. Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, n. 3, p. 189-193, 2008.

WAKI, H. et al. Junctional adhesion molecule-1 is upregulated in spontaneously hypertensive ats: evidence for a prohypertensive role within the brain stem. **Hypertension**, v. 49, n. 6, p. 1321-1327, 2007.

WAKI, H. et al. Specific inflammatory condition in nucleus tractus solitarii of the SHR: novel insight for neurogenic hypertension. **Auton. Neurosci.,** v. 142, n. 1-2, p. 25-31, 2008.

WANG, R.; KOGANEZAWA, T.; TERUI, N. Differential responses of sympathetic premotor neurons in the rostral ventrolateral medulla to stimulation of the dorsomedial hypothalamus in rabbits. Brain Res, v. 1356, p. 44-53, 2010.

WATTERS, T. M.; KENNY, E. F.; O'NEILL, L. A. Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. **Immunol. Cell Biol**., v. 85, p. 411–419, 2007.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J. Clin. Invest.**, v. 112, n. 12, p. 1796-1808, 2003.

WEISS, B.; MAICKEL, R. P. Sympathetic nervous control of adipose tissue lipolysis. **Int. J. Neuropharmac.**, v. 7, p. 395-403, 1968.

WILLIAMS, G. et al. The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 59, n. 3, p. 385-396, 2000.

WILLIAMS, T. D.; CHAMBERS, J. B.; ROBERTS, L. M.; HENDERSON, R. P.; OVERTON, J. M. Diet-induced obesity and cardiovascular regulation in C57BL/6J J mice. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 30, p. 769-778, 2003.

WINTERS, R. W.; MCCABE, P. M.; GREEN, E. J.; DUAN, Y. F.; SCHNEIDERMAN, N. Electrophysiological evidence for hypothalamic defense area input to cells in the lateral tegmental field of the medulla of rabbits. **Brain Res.**, v. 558, n. 1, p. 171-175, 1991.

WOFFORD, M. R. et al. Antihypertensive effect of alpha- and beta-adrenergic blockade in obese and lean hypertensive subjects. **Am. J. Hypertens.**, v. 14, n. 7 (Pt. 1), p. 694-698, 2001.

WOFFORD, M. R.; HALL, J. E. Pathophysiology and treatment of obesity hypertension. **Curr. Pharm. Des.**, v. 10, n. 29, p. 3621-3637, 2004.

WU, K. L. et al. Neuroinflammation and oxidative stress in rostral ventrolateral medulla contribute to neurogenic hypertension induced by systemic inflammation. J. **Neuroinflammation**, v. 9, n. 1, p. 212, 2012.

XU, H. et al. Ras participates in CpG oligodeoxynucleotide signaling through association with toll-like receptor 9 and promotion of interleukin-1 receptor-associated kinase/tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 complex formation in macrophages. **J. Biol. Chem.,** v. 278, n. 38, p. 36334-36340, 2003.

YARDLEY, C. P.; HILTON S. M. The hypothalamic and brainstem areas from which the cardiovascular and behavioural components of the defence reaction are elicited in the rat. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 15, n. 3, p. 227-244, 1986.

YOUNG, J.B. et al. Effect of diet and cold exposure on norepinephrine turnover in brown adipose tissue of the rat. **J. Clin. Invest.**, v. 69, p.1061-1071, 1982.

ZARETSKAIA, M. V.; ZARETSKY, D. V.; SHEKHAR, A.; DIMICCO, J. A. Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus evokes non-shivering thermogenesis in anesthetized rats. **Brain Res.**, v. 928, n. 1-2, p. 113-125, 2002.

ZHANG, Z. H. et al. Cardiovascular and renal sympathetic activation by blood-borne TNF-alpha in rat: the role of central prostaglandins. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 284, p. R916–R927, 2003.

ZUCKER, I. H. et al. Neural regulation of sympathetic nerve activity in heart failure. **Prog. Cardiovasc. Dis.,** v. 37, n. 6, p. 397-414, 1995.
#### **ANEXO**

### A – Artigo aceito para publicação na revista Physiological Reports

#### **REVISED VERSION: RESEARCH ARTICLE**

# High-fat diet-induced hypertension and autonomic imbalance are associated with an upregulation of CART in the dorsomedial hypothalamus of mice

CHAAR, Laiali Jurdi El; COELHO, Aline; SILVA, Natalia Mauadie; FESTUCCIA, William Tadeu; ANTUNES, Vagner Roberto<sup>\*</sup>

Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

\*Corresponding author: Vagner R. Antunes Address: Department of Physiology and Biophysics Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo 1524, Professor Lineu Prestes Avenue - 05508-900, Sao Paulo (SP), Brazil Phone/FAX: +55 11 30917765 Email: antunes@icb.usp.br

Running Title: diet-induced hypertension is associated with DMH CART

Number of words: 8146 Number of tables: 2 Number of figures: 6

#### ABSTRACT

**Aim:** We evaluated herein whether diet-induced obesity alters sympathovagal balance, blood pressure and neuropeptides levels at the hypothalamus and brainstem of mice.

**Methods:** Male C57BL6J mice fed with a high-fat (HFD) or a high-fat high-sucrose (HFHSu), or a regular chow diet (C) for 8 weeks were evaluated for metabolic parameters and blood pressure, the latter being performed in conscious freely moving mice. Spectral analysis from the records of systolic blood pressure (SBP) and cardiac pulse intervals (PI) was performed to analyse the autonomic balance in the cardiovascular system.

**Results:** HFD-fed mice developed two distinct hemodynamic phenotypes: hypertensive mice (HFD-H) with high systolic and diastolic BP levels and hypertension-resistant mice (HFD-R) whose BP levels were similar to C group. Spectral analysis of SBP and PI variabilities indicate that the low-frequency(LF)/highfrequency(HF) ratio, which is an index of sympathovagal balance, is higher in HFD-H compared to HFD-R. Along with hypertension and higher LF/HF ratio, HFD-H mice presented increased hypothalamic mRNA levels of cocaine and amphetamine regulated transcript (CART), and increased CART-positive neurones in the dorsomedial hypothalamus (DMH) by high-fat diet when compared to C group. Despite developing obesity to similar levels than HFD feeding, intake of a HFHSu was not associated with hypertension in mice neither CART levels increase.

**Conclusion:** Collectively, our main findings indicate high fat diet inducedhypertension and autonomic imbalance are associated to an upregulation of CART levels in the DMH of mice.

Keywords: cocaine-amphetamine regulated transcript; obesity; sucrose; sympathetic

nervous system, dorsomedial hypothalamus

**Abbreviations:** AgRP, agouti-related protein; ANOVA, analysis of variance; Arc, arcuate nucleus of hypothalamus; C, regular chow diet; CART, cocaine and amphetamine regulated transcript; DAB, diaminobenzidine; DBP, diastolic blood pressure; DMH, dorsomedial hypothalamus; GTT, glucose tolerance test; HF, high-frequency; HFD, high-fat diet; HFD-H, obese hypertensive mice; HFD-R, obese hypertension-resistant mice; HFHSu, high-fat high-sucrose; HR, heart rate; IL-6, interleukin-6; KPBS, potassium phosphate buffer; LF, low-frequency; LF/HF, low-frequency/high-frequency ratio; LHA, lateral hypothalamic area; MAP, Mean arterial pressure; mRNA, messenger RNA; NPY, neuropeptide Y; NTS, nucleus of tract solitary; PAP, pulsatile arterial pressure; PFA, paraformaldehyde; PI, pulse interval; POMC, Pro-opiomelanocortin; PVN, paraventricular nucleus of the hypothalamus; qPCR, quantitative PCR; RMSSD, root mean square of successive differences; SBP, systolic blood pressure; SDNN, standard deviation of normal-to-normal beats intervals; SNS, sympathetic nervous system; VLF, very low-frequency; VMH, ventromedial nucleus of hypothalamus.

#### INTRODUCTION

Obesity is a pandemic disorder and a risk factor for many diseases including diabetes, cancer and cardiovascular maladies such as hypertension (Meigs et al., 1997, Montague and O'Rahilly, 2000, **WHO**, 2010). Despite much work in this field,

the mechanisms through which excessive fat accumulation results in an increased incidence of hypertension are still a matter of debate.

Hyperactivity of the sympathetic nervous system (SNS), a remarkable feature of obesity, has been implicated in the genesis and maintenance of obesityassociated hypertension (Esler, 1995, Reaven, 2002, Hall, 2003, Grassi et al., 2004, Bergman et al., 2007, Hall et al., 2010). SNS activity is constantly modulated by a complex interaction of neurotransmitters at the hypothalamic and brainstem autonomic nuclei level that controls not only blood pressure levels, but also energy balance and body weight.

Of particular interest, the dorsomedial hypothalamus (DMH) is an important center involved in autonomic and neuroendocrine responses, such as cardiac sympathetic hyperactivity, hypertension, feeding behaviour, hyperventilation and increased locomotor activity (Yardley and Hilton, 1986, DiMicco et al., 2002, Zaretskaia et al., 2002, , Bernardis and Bellinger, 2002, Fontes et al., 2001, Cao et al., 2004). In addition, the to the DMH, the arcuate nucleus of hypothalamus (Arc) also contains two subtypes of neurones: i) orexigenic, which stimulates food intake and inhibit energy expenditure by secreting agouti-related protein (AgRP) and/or neuropeptide Y (NPY), and ii) anorexigenic neurones that inhibit food intake and stimulate energy expenditure by secreting Pro-opiomelanocortin (*POMC*) and/or cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) (Schwartz et al., 2000).

CART is also co-expressed with NPY in the DMH and its mRNA levels are upregulated after ten weeks of high-fat diet feeding. Noteworthy, some of these DMH CART-positive neurones are orexigenic (Lee et al., 2013a). Moreover, CART plays an important role on the autonomic nervous system control, since intracerebroventricular injection of CART in conscious rabbits evokes a significant increase in blood pressure and heart rate (Matsumura et al., 2001).

Thus, here we hypothesise that intake of a high-fat diet leads to changes in neuropeptides levels within autonomic nuclei in the hypothalamus and brainstem that could contribute to the development of obesity-associated sympathetic hyperactivity and hypertension. To test this, we screened the hypothalamus and brainstem of mice induced obese by two different regimens, namely intake of a high-fat diet (HFD) or a high-fat diet combined with a 20% sucrose in water (HFHSu), for neuropeptides that might be involved in the obesity-associated hypertension and autonomic imbalance. We have found that intake of HFD, but not HFHSu, induces autonomic imbalance and hypertension in mice, phenotypes that were associated with an upregulation of CART levels at the DMH.

#### METHODS

**Animals:** All experimental procedures were performed in accordance with the Ethical Principles in Animal Research of the Brazilian College of Animal Experimentation and were approved by the Ethical Committee for Animal Research of ICB/USP, (Protocol #026/126-02). Male mice C57BL/6J (10 weeks of age) obtained from the Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, were kept at a constant temperature of 23±1°C, relative humidity of 50-60% and light/dark cycle (12/12 hours). Mice were fed with different diets as described below and drinking water *ad libitum*.

*Diet:* Mice were fed with either a regular chow diet (C; Nuvilab CR1, Sogorb Inc, 66% carbohydrates, 22% protein, 7% fibers and 5% lipids, in %Kcal, n=8), or a high-fat

diet [HFD; 13% carbohydrates, 20% protein, 7% fibers and 60% lipids, in %Kcal; adapted from a previous study by Reeves, 1997, n=24] or high-fat high-sucrose in association with 20% sucrose in the drinking water (HFHSu, n=11) during 8 weeks. Body weight, food and water intake were assessed weekly.

*Glucose tolerance test:* At 8<sup>th</sup> week, a glucose tolerance test (GTT) was performed in C (n=8), HFD (n=24) and HFHSu (n=11) mice. After 6 hours of fasting, mice received an intraperitoneal injection of glucose (1g/kg) and blood glucose levels were determined from an incision in the tail using Accu-Check Compact glucometer (Roche Diagnostics) at 0, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min after injection.

*Adiposity index:* Animals were euthanized under anaesthesia with isoflurane (5% in O<sub>2</sub>-air inspired) between 8-10 a.m. after overnight fasting followed by two hours with free access to food to standardisation of food intake. The sum of the epididymal, retroperitoneal and inguinal adipose tissues mass was considered as an adiposity index in C (n=8), HFD (n=24) and HFHSu (n=11).

**Plasmatic parameters:** Plasma levels of leptin, insulin, interleukin-6 (IL-6) and resistin were evaluated by ELISA (Millipore) in refed conditions in C (n=8), HFD (n=24) and HFHSu (n=11) mice. Plasmatic free fatty acid (Wako) and triglycerides (Labtest) concentrations were measured following the manufacturer's recommendations.

*Hemodynamic recordings:* After 8 weeks, femoral artery catheterization was performed under anaesthesia with isoflurane (5% in O<sub>2</sub>-air inspired) in C (n=8), HFD

(n=24) and HFHSu (n=11) mice. A microrenathane catheter (0.025 mm outer diameter and 0.012 mm internal diameter) was inserted in the femoral artery, tunneled subcutaneously and exteriorized at the scapular region. Animals were housed in individual cages and allowed to recover for one day. Arterial pressure and heart rate (HR) were monitored in conscious freely moving mice between 8-10 a.m., by connecting the arterial catheter, previously heparinized, to a pressure transducer (Model CDX III, Cobe Labs) connected to an amplifier (ML224 Quad Bridge Amp, ADInstruments) and a digital data acquisition system (PowerLab, ADInstruments). The sample rate of the hemodynamic parameters acquisition was 4 kHz. After mice acclimation to the recording room, the cardiovascular parameters were recorded for 90 min. Mean arterial pressure (MAP), systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) and spectral analysis parameters were analysed off-line. Beat-by-beat pulse interval (PI) values were generated off-line from the pulsatile arterial pressure signal by measuring the time interval between two systolic peaks.

Spectral analysis: Data analysis of systolic blood pressure and pulse interval (PI) variabilities performed the software CardioSeries were using (http://www.danielpenteado.com/) following the guidelines for mice as previously described (Thireau et al., 2008). A stable 10 min SBP and PI records without artifacts or large sudden blood pressure changes of each animal were used in the analysis. Beat-by-beat time series of SBP and PI generated from the acquisition software (Lab Chart Pro, AD Instruments) were loaded into CardioSeries software that performs time and frequency domain analysis of arterial pressure and heart rate variability. While the time domain assesses the magnitude of the temporal variations in the cardiac rhythm modulated by autonomic nervous system, i.e., SBP and PI lability, the frequency domain analysis provides the spectral composition of these variations (Wang and Huang, 2012). SBP and PI power spectral density were estimated by Fast Fourier transform algorithm for discrete time series. By using 20Hz of interpolation rate, beat-by-beat series were divided in half-overlapping sequential sets with 512 points (51,2s). All segments were tested for stationary conditions, i.e., if they had mean and covariance stable over time, by means of stationary tests (Berntson et al., 1997, van de Borne et al., 1997, Porta et al., 2004). Nonstationary data and segments with transients were not included in the power spectral density calculation. Variability index of SBP and PI lability were calculated in the time domain. The SBP variability was quantified by the standard deviation of successive SBP values (SDNN). The variability of PI was quantified by standard deviation of normal-to-normal beats intervals (SDNN) and by the root mean square of successive differences (RMSSD) between adjacent normal PI. Thus, for the frequency domain analysis, the SBP and PI spectra were integrated in frequency bands considering the ranges of mice HR and breathing frequencies: very low-frequency (VLF, 0.00–0.15) Hz), low-frequency (LF, 0.15–1.50 Hz) and high-frequency (HF, 1.50–5 Hz) bands as previously described (Thireau et al., 2008). Results are expressed in absolute (ms<sup>2</sup> or mmHg<sup>2</sup>) and normalized units (nu) that is low-frequency or high-frequency total power in % excluding very low frequency band (van de Borne et al., 1997, Billman, 2011). To assess the sympathovagal balance to the heart, low-frequency/highfrequency ratio (LF/HF) of PI variability was calculated (Montano et al., 1994).

**Quantitative PCR (qPCR)**: Hypothalamic and brainstem messeger RNA (mRNA) levels of neuropeptides were quantified by qPCR in the same group of mice that hemodynamic recordings, and spectral analysis were performed [C (n=6), HFD

(n=15) and HFHSu (n=10)]. All animals were euthanized between 8-10 a.m. after overnight fasting followed by two hours with free access to food to avoid feeding related and circadian changes in gene expression. After brain removal from the skull, a hypothalamic tissue block was dissected at the level of +0.26 to -2.30 mm from bregma and is a square between the optic chiasma and the superior cerebellar peduncle. Brainstem samples were dissected at the level of -5.80 to -8.00 mm from bregma between the inferior cerebellar peduncle and the obex. Hypothalamic and brainstem blocks were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Total RNA was extracted using TRizol (Life Technologies) and Illustra RNAspin Mini kit (General Electrics) following the manufacturer's instructions. Total RNA levels were quantified using a spectrophotometer ("Nanodrop 3300" - Thermo Scientific). cDNA synthesis was performed with Superscript Reverse Transcriptase III (Invitrogen) with 1 ug of total RNA. The amplification reaction was performed on rotor Gene Q (Qiagen) using SYBR Green (Sigma-Aldrich). and specific oligonucleotides for cocaine and amphetamine regulated transcript (CART, forward 5'-GTCCCACGAGAAGGAGCTGCCAA-3'; reverse 5'-GCCCATCCGCTCTCTGAGGGGG-3'), pro-opiomelanocortin (POMC, forward 5'-GCCTTTCCGCGACAGGGGTC-3'; reverse 5'-AAACACGGGCGTTCCAGCG-3'), neuropeptide Y (NPY, forward 5'-AGCCTTGTTCTGGGGGGCGTT-3'; reverse 5'-CCCGCCACGATGCTAGGTAA-3') or agouti-related protein (AgRP, forward 5'-ACCTTAGGGAGGCACCTCATGCC--3'; 5'reverse GCGGAGACGAGACTCGCGG-3'). Ribossomal protein 36B4 (forward 5'-CCACTTACTGAAAAGGTCAAGGC-3'; reverse 5'-TGGTTGCTTTGGCGGGATTTA-3'), was used as a reporter gene because it not changed by hypertension or obesity. The specificity of the PCR amplification was confirmed by melting curve analysis. For quantification of the results of real time PCR, the device software (Rotor Gene Q, Qiagen) determined threshold (Ct) (Ramakers et al., 2003). From these values Ef $\Delta\Delta$ Ct was calculated (Schefe et al., 2006). Data are expressed as the ratio between the expression of target genes and the housekeeping gene 36B4.

*Immunohistochemistry:* as for the immunohistochemistry studies mice [C (n=4), HFD (n=4) and HFHSu (n=5)] were deeply anesthetized with isoflurane (5% in O<sub>2</sub>-air inspired) and intracardially perfused with saline (0.9%). followed by paraformaldehyde (PFA 4% in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) through a needle connected to a peristaltic pump (Cole Parmer). The brains were immediately removed, post fixed for 4h at 4°C in 4% PFA and cryoprotected in phosphate buffer containing 20% sucrose at 4°C overnight. On the following day, brains were sectioned in the coronal plane on a freezing microtome; 30-µm thick sections were collected in four compartments. Tissues were stored in antifreeze solution. The sections were incubated for 40 h at 4°C with rabbit anti-CART (55-102) antibody (Phoenix Pharmaceutics) at a concentration of 1:20.000 in phosphate buffer containing 2% goat normal serum and 0.3% Triton. This antibody concentration was chosen after a previous titration with different concentrations: 1:500, 1:10000 and 1:20000. This antibody has been extensively used in previous work and reacts in brain nuclei confirming the presence of CART(Elias et al., 2001). After several washes in 0.02 M potassium phosphate buffer (KPBS), sections were incubated for two hours in biotinylated goat anti-rabbit antibody (1:200, Vector). After several washes in 0.02 M KPBS, sections were then incubated for 2h in an avidin-biotin complex (Vectastain Elite ABC kit, Vector, 1:200). Sections were washed again in 0.02 M KPBS and the peroxidase reaction product was visualized using the glucose oxidase method with DAB as chromogen (Itoh et al., 1979) and mounted on gelatinized slides. Immunostaining was enhanced by soaking the slides in a solution of osmium tetroxide for 15 seconds. Finally, the slides were dehydrated, cleared in xylene and covered with DPX (Sigma-Aldrich). Sections of mice brain stained by immunoperoxidase reaction were photographed using a Zeiss Axioimager A1 (Zeiss) equipped with a digital camera of the type Zeiss HRc AxioCam (Zeiss) using landmarks for the nuclei according to (Franklin and Paxinos, 2008) and previous study (Zhang et al., 2011). Quantitative differences of CART-positive neurones were analised among groups by counting neuronal cell bodies only, not fibers (qualitative analysis), immunostained for CART.

**Statistical analysis:** All results are expressed as means  $\pm$  standard error of mean. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad). Differences were considered significant when *P*<0.05. One-way analysis of variance (ANOVA) with Newman-Keuls post-hoc test were used to analyse the data.

#### RESULTS

#### 1. High-fat diet elicits metabolic and biochemical changes associated with obesity

High-fat or HFHSu diet intake induced obesity in mice as evidenced by the increased body weight (Fig 1A, B), adiposity (masses of epididymal, retroperitoneal and inguinal adipose depots), and liver (Fig 1H). Importantly, HFHSu mice featured higher body weight gain, but not adiposity, than HFD fed mice (Fig 1B and H). Furthermore, HFHSu mice had a smaller cumulative high-fat intake and,

consequently, free fatty acids intake during the 8 weeks of feeding (Fig 1D), but higher caloric intake than HFD-fed mice, because of 20% sucrose drinking (Fig 1C).

Along with obesity, intake of both HFD and HFHSu impaired glucose homeostasis as evidenced by increased fasting glycemia (Fig 1F) and insulinemia (Table 1), and severe glucose intolerance as illustrated by the higher glucose excursion (Fig 1E), and area under the curve in the glucose tolerance test (Fig 1G).

Postprandial plasma levels of leptin, triglycerides and free fatty acids were significantly elevated in HFD and HFHSu fed-mice compared to C diet (Table 1). There were no significant changes in plasma levels of resistin and IL-6 among different feeding regimens (Table 1). Thus, HFD was able to induce biochemical and metabolic alterations typical of those seen in obesity.

## 2. High-fat diet leads to different hemodynamic phenotypes and to autonomic imbalance

Figure 2A depicts representative traces of pulsatile arterial pressure (PAP), MAP and HR from one conscious animal representative of each group fed with different diet. The bimodal distribution, depicted by two peaks in MAP in the histogram (Fig 2B) shows that HFD mice were divided in two groups according to their hemodynamic phenotype: i) obese hypertensive mice (HFD-H) with distribution peak in 120 mmHg (Fig 2B) and average value of MAP baseline of 114±4 mmHg (Fig 2C), and ii) obese hypertension-resistant mice (HFD-R) with distribution peak in 105 mmHg (Fig 2B), and average value of MAP baseline of 97±2 mmHg (Fig 2C). Importantly, increase in MAP was dependent of elevations in both systolic and diastolic blood pressures (Fig 2D and 2E). There were no differences in HR among groups (Fig 2F). In contrast to HFD, obesity induced by the intake of a HFHSu was not associated with changes in MAP (HFHSu: 96±4 mmHg) when compared with C group (98±3 mmHg, Figure 2C). No significant changes were observed in the HR among the groups (data not shown).

Spectral analysis of cardiovascular variabilities was performed in the same group of animals. Regarding SBP variability (Fig 3A), power spectral analysis (Fig 3B) and the SDNN values displayed by HFD-H mice were higher than those of chowfed mice (Fig 3C) as evidenced by the increased VLF (Fig 3D) and LF (Fig 3E) components, which represent hormonal and sympathetic modulation of vessels, respectively. HFHSu also featured higher SBP variability (Fig 3C) than C group, which, in contrast to HFD-fed mice, was due to the increase in the HF component (Fig 3F).

As evaluated by the traces and power spectra of PI variability (Fig 3G and H, respectively), HFD-H mice have shown a higher RMSSD values (Fig 3I) in HFD-H mice when compared to HFD-R and C diet mice caused by increased LF (Fig 3J) and HF spectral power (Fig 3K). As a consequence, the LF/HF ratio, an index of sympatho-vagal balance, was higher in HFD-H group when compared to HFD-R and C group (Fig 3L).

As we have performed a direct blood pressure measurements in councious freely-moving mice, it is important to state that the effects of one day post-surgical procedures were compared with four days of recovery to exclude stress surgery responses in arterial pressure and in autonomic balance (Table 2). There were no differences in the cardiovascular and autonomic parameters between one or four days recovery. This results suggest that this bimodal distribution in MAP seen in the group HF was not a stress response related.

#### 3. CART mRNA level is higher in the hypothalamus of hypertensive obese mice

We next investigated whether the above-described cardiovascular changes were associated with alterations in mRNA expression of neuropeptides involved in the regulation of food intake and energy expenditure within hypothalamus and brainstem in the same group of animals. As depicted in Figure 4, CART mRNA level was significantly increased in the hypothalamus, but not brainstem of HFD-H mice (n=7) when compared to HFD-R (n=6) and C group (n=6, Fig 4A). In contrast, POMC gene expression was higher in the hypothalamus, but not brainstem of HFD-R when compared to HFD-H and C diet mice (Fig 4A). mRNA levels of AgRP and NPY in the hypothalamus and brainstem were not affected by any diet and/or hypertension (Figs 4A,B).

## 4. HFD-fed-mice have higher number of CART-positive neurones in the dorsomedial hypothalamus

Because CART gene expression was higher in the hypothalamus of HFD-H mice, we next performed an immunoperoxidase reaction to determine in which hypothalamic nuclei would exhibit higher levels of CART. As depicted in figure 5A, we found higher number of CART-positive neurones counted in hypothalamic slices every 120-µm interval in the DMH of HFD-fed mice when compared to compared to HFHSu and C groups (Fig 5C). This higher number of CART-positive neurones at the DMH were rostro-caudally located approximately at the position 1.58 mm posterior to bregma and between 1.94 mm posterior to bregma until 2.18 mm posterior to bregma (Fig 5B). We have not found any CART-positive neuronal cell body, only fibers immunostaining, at other hypothalamic nuclei level, such as ventromedial nucleus of hypothalamus (VMH, Fig 6A), paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN, Fig

6B), lateral hypothalamic area (LHA, Figs 6C), and in the brainstem at the NTS level (Fig 6D).

#### DISCUSSION

We investigated herein whether diet-induced obesity is associated with autonomic imbalance, hypertension and changes in hypothalamic and brainstem neuropeptide levels. Through the evaluation of cardiovascular parameters and hypothalamic gene expression in conscious, freely moving mice our main findings are: 1) HFD and HFHSu induced obesity in mice, but only HF diet regimen was associated with hypertension; 2) HFD displayed two hemodynamic phenotypes in mice namely hypertension and resistant to hypertension; 3) Hypertensive HFD-fed mice exhibit autonomic imbalance and increased CART mRNA levels in hypothalamus, but not in brainstem and CART-positive neurones at the DMH. A relevant point in this study is that we were able to study an integrative association of gene expression of neuropeptides with hemodynamic and autonomic control of conscious freely moving mice model of obesity. This approach eliminated the influence of anesthesia on the neurotransmission of autonomic brain nuclei that regulated the blood pressure levels (Holscher et al., 2008).

Feeding mice with a high-fat diet is known to produce biochemical and metabolic changes, which are commonly found in human obesity (Buettner et al., 2007). Corroborating these studies, here we have demonstrated that HFD or HFHSu intake for 8 weeks induced obesity, as evidenced by the increased body weight and adiposity, and impaired glucose homeostasis, as indicated by the increased fasting glycemia, insulinemia and severe glucose intolerance. Such similar metabolic alterations are observed in human obesity, which suggests that these animal model

are suitable for investigating mechanistic links between obesity and hypertension. As for the body weight we have observed that HFHSu group had an increased gain compared to HFD group, besides consumed less amount of high-fat diet. We believe that the reason of this results is the total caloric intake, considering also the sucrose intake, that is increased in the HFHSu group comparing with the HF group. Since only the HFD group became hypertensive, our data imply that diet type *per se* is important, rather than obesity, in hypertension development.

One interesting caveat is that blood glucose was high in both HFD and HFHSu although postpradial insulin was lower in HFHSu than in HFD. We do not know what are the precise mechanisms underlying the reduced postprandial insulin levels featured by HFHSu. Plasma insulin levels represent the balance between insulin secretion by pancreatic beta cells and insulin clearance. HFHSu mice also featured lower insulin levels 30 min after an intraperitoneal glucose injection in the glucose tolerance test (data not shown), indicating that HFHSu mice probably have a defect in insulin secretion by isolated islets in vitro are required to confirm this hypothesis.

Interestingly, in mice fed with a HFD for 8 weeks two different hemodynamic phenotypes were noticed: i) some animals become hypertensive, and ii) others were resistant to high-fat-induced hypertension. Therefore, this is an interesting animal experimental model to study obesity-related hypertension because allows to compare whether neuropeptides gene expression would be distinct between these two hemodynamic phenotypes. Beside of this, HFHSu did not induced hypertension, and particularly this group of mice had a smaller cumulative high-fat intake and, consequently, free fatty acids intake during the 8 weeks of diet, because of the

addition of sucrose solution in the regimen. This can be a mechanism to explain that this group did not developed hypertension, which is the aim of forthcoming studies. The reason why mice with identical genetic background and fed with the same regimen display different cardiovascular outcomes in response to diet-induced obesity is unknown.

The mechanisms underlying the development of obesity-induced hypertension are multifactorial and complex. Several studies indicate that, among neurohumoral, renal, and vascular factors, overactivation of the sympathetic nervous system contributes to the etiology of hypertension in obese humans and animal models(Esler, 1995, Reaven, 2002, Hall, 2003, Grassi et al., 2004, Bergman et al., 2007, Hall et al., 2010). Thus, one aim of our study was to evaluate the role of the autonomic balance on the hypertension secondary to high-fat diet-induced obesity. In this sense, the spectral analysis of arterial pressure and heart rate variability, an important noninvasive tool previously validated to evaluate the physiological influence of autonomic balance in control of cardiovascular parameters. Our main findings indicate that HFD-induced hypertension is associated with an increase in the LF component of SBP and PI, which is an index of vascular sympathetic outflow and cardiac sympathovagal balance, respectively (Thireau et al., 2008). Our findings differ from previous studies, which have shown that hypertension was associated with an increase in LF of PI, but not LF of SBP variability(Williams et al., 2003) in HFD-fed mice for 15 weeks. This discrepancy between studies might be due to different control diet used or mice age at the beggining of the protocols, which were younger (5 weeks old) than we used in our study (10 weeks old).

Further supporting the involvement of sympathetic hyperactivity in obesityassociated hypertension are the previous findings that: 1) pharmacological blockade

124

of adrenergic activity lowers blood pressure to a greater extent in obese than in lean subjects (Wofford et al., 2001, D'Angelo et al., 2006); 2) renal denervation markedly decreases sodium retention and hypertension in obese animals(Kassab et al., 1995); 3) administration or chronic treatment with  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptor antagonists or clonidine, a drug that stimulates central  $\alpha_2$  adrenergic receptors, reduces SNS activity and prevents the increase in blood pressure in dogs fed with HF diet and in hypertensive obese patients (Wofford and Hall, 2004, Hall et al., 2010, Wofford et al., 2001).

We hypothesized that HFD would lead to changes in gene expression of neuropeptides in the central nervous system that could be correlated to obesityinduced hypertension and autonomic imbalance. Indeed, we observed that HFD elicits a significant increase in the CART mRNA expression in the hypothalamus of HFD hypertensive rats when compared to HFD resistant and control diet group.

CART is a neuropeptide involved in different behaviors and processes, such as reward, addiction, feeding, regulation of body weight, energy expenditure and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation in stress (Rogge et al., 2008). Immunohistochemical studies reveal a neuronal network of CART positive-neurones along the sympathetic-adrenal (Fenwick et al., 2006) and the sympathetic-cardiac axis, including the rostral ventrolateral medulla (Burman et al., 2004), preganglionic sympathetic neurones in intermediolateral column of the spinal cord (Fenwick et al., 2006, Elias et al., 1998), chromaffin cells in the adrenal medulla (Koylu et al., 1997) and in the intracardiac ganglia in rats (Richardson et al., 2006).

Intracerebroventricular, intrathecal or intracisternal CART administration in anesthetized rats and conscious rabbits evokes a significant increase in blood pressure and HR(Matsumura et al., 2001, Scruggs et al., 2005, Hwang et al., 2004).

125

CART has been shown to excite directly neurones within the central neural pathways that control the SNS directly or indirectly by potentiating the action of glutamate, via NMDA receptors (Hsun Lin et al., 2005, Chiu et al., 2009, 2010).

Among several neuromodulators involved in activation of the SNS, one of the most studied in obesity is leptin, an adipokine secreted by adipocytes proportionally to the degree of adiposity. High levels of leptin could explain, at least in part, the obesity-induced hypertension and renal sympathetic hyperactivity of humans (Rahmouni et al., 2002, Eikelis et al., 2003) and mice (Simonds et al., 2014). Thus, leptin would be a link between the excess of adiposity and sympathoexcitation (Rahmouni et al., 2005). Leptin regulates energy homeostasis by acting on hypothalamic neuronal circuits to reduce calorie intake and increase energy expenditure (Friedman, 2009). In the Arc nucleus leptin inhibits NPY/AgRP (Schwartz et al., 1996), but activates POMC/CART neurones (Elias et al., 1998, Cowley et al., 2001). Additionally, leptin stimulates CART/NPY neurones within the DMH, that project to the PVN (Lee et al., 2013a), in diet-induced obesity condition (Lee et al., 2013b).

Humans with loss-of-function mutations in leptin or leptin receptor have low blood pressure, despite being obese (Simonds et al., 2014). Importantly, it was recently shown that leptin increases blood pressure in conditions of diet-induced obesity by acting on DMH neurones (Simonds et al., 2014). Indeed, blockade of leptin action with a specific antibody, pharmacological antagonists, or inhibiting the activity of leptin receptor-expressing neurones in the DMH lead to a fall in the MAP in diet-induced obese mice, such effect that was reversed through re-expression of the leptin receptors in the DMH(Simonds et al., 2014). This study demonstrates that leptin is coupled to obesity-induced blood pressure changes in humans and mice (Simonds et al., 2014).

The mechanisms, however, through which leptin acts at the DMH promoting obesity-associated hypertension are still unknown. We could argue that perhaps leptin have distinct actions in HFD hypertensive animals compared to hypertensionresistant animals. Noteworthy, HFHSu mice and HFD hypertension-resistant mice, despite having elevated levels of leptin, did not develop hypertension, or featured elevated hypothalamic CART mRNA expression and CART-positive neurones in DMH when compared to C diet. These data imply that the leptin circulating levels per se do not seem to be related to CART-associated hemodynamic changes at the DMH level. In obese humans (Haynes et al., 1999, Rahmouni et al., 2002) and mice (Simonds et al., 2014) high levels of leptin elicits a renal sympathetic hyperactivity and hypertension, such effect not seen in leptin-deficient animals (Simonds et al., 2014). Take together, these findings suggest that is not the leptin circulating levels that determine hypertension and autonomic imbalance, but instead, is the way how this hormone acts in distict neurones in the hypothalamus. It has been showing elsewhere that obese high-fat fed animals have an increase in plasmatic leptin levels, and this hormone has a reduced sensitivity to activate its receptors, not only in the periphery but also centrally, leading to a condition of leptin resistance (Lin et al., 2000). In the present study, we can suggest that a hypothalamic leptin resistance could interfere in the leptin-stimulated production of CART. In this sense, CART may be an important neuropeptide involved in the leptin actions on the cardiovascular system, because peripheral administration of leptin was shown to increase CART expression within the hypothalamus, including the DMH (Elias et al., 1998, Lee et al., 2013b, Kristensen et al., 1998).

Despite the structure and effects of CART have been known for at least 15 years, CART receptor has not been identified, sequenced and cloned yet, and for this reason there is no pharmacological antagonist available yet limiting progress in this area of research. There is one study about CART receptors, showing that CART had an low non-specific binding in cell cultures (Maletínská et al., 2007). The lack of selective antagonists to block CART receptor could contribute positively to our studies to confirm the CART functional role in the hypertensive-obese animals. Therefore, it is plausible to assume that CART could be directly related to the hyperactivity of the sympathetic nervous system in obesity-associated hypertension, but this assertion still waits further investigation.

Collectively, we can conclude that HFD induced-hypertension and autonomic imbalance are associated to an upregulation of CART levels in the DMH of mice. On the other hand, mice on an HFHSu diet do not have an elevated blood pressure, autonomic imbalance or increased CART gene expression and peptide content in DMH. Further studies are however required to evaluate the possible causality between these phenotypes.

#### PERSPECTIVES

Chonic high-fat intake, from the translational point of view, may bring important insights into the mechanisms underlying hypertension secondary to obesity. The present study highlights the relevance of CART in the sympathovagal imbalance to the heart and cardiovascular alterations associated with obesity. Thus, a better understanding of the underlying mechanism of CART increase in DMH in hypertension would help to uncover new pharmacological and potentially nonpharmacological therapies to overcome the common maladies caused by hypertension secondary to obesity.

**ACKNOWLEDGEMENTS:** This study was supported by Sao Paulo Research Foundation (FAPESP) #13/06206-0 to VRA and #09/15354-7 & #15/19530-5 to WTF, and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). LJC and NMS were recipients of FAPESP fellowships #11/13563-8 and #10/19018-9, respectively. We thank Ana Maria Peracoli Campos for help with the neuroanatomical techniques and Mauro Oliveira with the femoral artery catheterization of mice. We thank Dr. Susan M. Barman for helpful suggestions and language editing throughout of the manuscript.

**Conflicts of interest:** There are no conflicts of interest.

**AUTHOR CONTRIBUITIONS:** LJC, WTF, VRA conception, design, and interpretation of the work; LJC, AC, NMS perform the experiments, and acquisition of data for the work; LJC, AC, NMS, WTF, VRA drafting the work and revising it critically for important intellectual content.

#### REFERENCES

- Bellinger, L. L. & Bernardis, L. L. 2002. The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies. *Physiol Behav*, **76**, 431-42.
- Bergman, R. N., Kim, S. P., Hsu, I. R., Catalano, K. J., Chiu, J. D., Kabir, M., Richey, J. M. & Ader, M. 2007. Abdominal obesity: role in the pathophysiology of metabolic disease and cardiovascular risk. *Am J Med*, **120**, S3-8; discussion S29-32.
- Berntson, G. G., Bigger, J. T., Eckberg, D. L., Grossman, P., Kaufmann, P. G., Malik, M., Nagaraja, H. N., Porges, S. W., Saul, J. P., Stone, P. H. & van der Molen, M. W. 1997. Heart rate variability: origins, methods, and interpretive caveats. *Psychophysiology*, 34, 623-48.
- Billman, G. E. 2011. Heart rate variability a historical perspective. *Front Physiol*, **2**, 86.
- Buettner, R., Schölmerich, J. & Bollheimer, L. C. 2007. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*, **15**, 798-808.
- Burman, K. J., Sartor, D. M., Verberne, A. J. & Llewellyn-Smith, I. J. 2004. Cocaineand amphetamine-regulated transcript in catecholamine and noncatecholamine presympathetic vasomotor neurons of rat rostral ventrolateral medulla. *J Comp Neurol*, **476**, 19-31.
- Cao, W. H., Fan, W. & Morrison, S. F. 2004. Medullary pathways mediating specific sympathetic responses to activation of dorsomedial hypothalamus. *Neuroscience*, **126**, 229-40.
- Chiu, H. Y., Lin, H. H. & Lai, C. C. 2009. Potentiation of spinal NMDA-mediated nociception by cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide via PKA and PKC signaling pathways in rats. *Regul Pept*, **158**, 77-85.
- Chiu, H. Y., Lin, H. H. & Lai, C. C. 2010. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide activates ERK pathways via NMDA receptors in rat spinal cord dorsal horn in an age-dependent manner. *Regul Pept*, **164**, 90-6.
- Cowley, M. A., Smart, J. L., Rubinstein, M., Cerdán, M. G., Diano, S., Horvath, T. L., Cone, R. D. & Low, M. J. 2001. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, **411**, 480-4.
- D'Angelo, G., Mintz, J. D., Tidwell, J. E., Schreihofer, A. M., Pollock, D. M. & Stepp, D. W. 2006. Exaggerated cardiovascular stress responses and impaired beta-

adrenergic-mediated pressor recovery in obese Zucker rats. *Hypertension*, **48**, 1109-15.

DiMicco, J. A., Samuels, B. C., Zaretskaia, M. V. & Zaretsky, D. V. 2002. The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol Biochem Behav*, **71**, 469-80.

Eikelis, N., Schlaich, M., Aggarwal, A., Kaye, D. & Esler, M. 2003. Interactions between leptin and the human sympathetic nervous system. *Hypertension*, **41**, 1072-9.

- Elias, C. F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R. S., Couceyro, P. R., Kuhar, M. J., Saper, C. B. & Elmquist, J. K. 1998. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron*, **21**, 1375-85.
- Elias, C. F., Lee, C. E., Kelly, J. F., Ahima, R. S., Kuhar, M., Saper, C. B., Elmquist, J. K. 2001. Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. *J Comp Neurol*, **432**, 1-19.
- Esler, M. 1995. Sympathetic nervous system: contribution to human hypertension and related cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*, **26 Suppl 2**, S24-8.
- Fenwick, N. M., Martin, C. L. & Llewellyn-Smith, I. J. 2006. Immunoreactivity for cocaine- and amphetamine-regulated transcript in rat sympathetic preganglionic neurons projecting to sympathetic ganglia and the adrenal medulla. J Comp Neurol, 495, 422-33.
- Fontes, M. A., Tagawa, T., Polson, J. W., Cavanagh, S. J. & Dampney, R. A. 2001. Descending pathways mediating cardiovascular response from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **280**, H2891-901.
- Franklin, K. B. J. & Paxinos, G. 2008. The mouse brain in stereotaxic coordinates Elsevier.
- Friedman, J. M. 2009. Leptin at 14 y of age: an ongoing story. *Am J Clin Nutr*, **89**, 973S-979S.
- Grassi, G., Dell'Oro, R., Facchini, A., Quarti Trevano, F., Bolla, G. B. & Mancia, G. 2004. Effect of central and peripheral body fat distribution on sympathetic and baroreflex function in obese normotensives. *J Hypertens*, **22**, 2363-9.
- Hall, J. E. 2003. The kidney, hypertension, and obesity. *Hypertension*, **41**, 625-33.
- Hall, J. E., da Silva, A. A., do Carmo, J. M., Dubinion, J., Hamza, S., Munusamy, S., Smith, G. & Stec, D. E. 2010. Obesity-induced hypertension: role of sympathetic nervous system, leptin, and melanocortins. *J Biol Chem*, 285, 17271-6.

- Haynes, W. G., Morgan, D. A., Djalali, A., Sivitz, W. I. & Mark, A. L. 1999. Interactions between the melanocortin system and leptin in control of sympathetic nerve traffic. *Hypertension*, **33**, 542-7.
- Holscher, C., van Aalten, L. & Sutherland, C. 2008. Anaesthesia generates neuronal insulin resistance by inducing hypothermia. *BMC Neurosci*, **9**, 100.
- Hsun Lin, H., Chiu, H. Y. & Lai, C. C. 2005. Potentiation of spinal N-methyl-Daspartate-mediated nociceptive transmission by cocaine-regulated and amphetamine-regulated transcript peptide in rats. *Neuroreport*, **16**, 253-7.
- Hwang, L. L., Chen, C. T., Li, T. L., Chiu, C. Z. & Chi, S. F. 2004. Central pressor effects of CART peptides in anesthetized rats. *Neuropeptides*, **38**, 69-76.
- Itoh, K., Konishi, A., Nomura, S., Mizuno, N., Nakamura, Y. & Sugimoto, T. 1979. Application of coupled oxidation reaction to electron microscopic demonstration of horseradish peroxidase: cobalt-glucose oxidase method. *Brain Res*, **175**, 341-6.
- Kassab, S., Kato, T., Wilkins, F. C., Chen, R., Hall, J. E. & Granger, J. P. 1995. Renal denervation attenuates the sodium retention and hypertension associated with obesity. *Hypertension*, 25, 893-7.
- Koylu, E. O., Couceyro, P. R., Lambert, P. D., Ling, N. C., DeSouza, E. B. & Kuhar,
  M. J. 1997. Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. *J Neuroendocrinol*, 9, 823-33.
- Kristensen, P., Judge, M. E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K. N., Wulff, B. S., Clausen, J. T., Jensen, P. B., Madsen, O. D., Vrang, N., Larsen, P. J. & Hastrup, S. 1998. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature*, **393**, 72-6.
- Lee, S. J., Kirigiti, M., Lindsley, S. R., Loche, A., Madden, C. J., Morrison, S. F., Smith, M. S. & Grove, K. L. 2013a. Efferent projections of neuropeptide Yexpressing neurons of the dorsomedial hypothalamus in chronic hyperphagic models. *J Comp Neurol*, **521**, 1891-914.
- Lee, S. J., Verma, S., Simonds, S. E., Kirigiti, M. A., Kievit, P., Lindsley, S. R., Loche, A., Smith, M. S., Cowley, M. A. & Grove, K. L. 2013b. Leptin stimulates neuropeptide Y and cocaine amphetamine-regulated transcript coexpressing neuronal activity in the dorsomedial hypothalamus in diet-induced obese mice. *J Neurosci*, **33**, 15306-17.
- Lin, S., Thomas, T. C., Storlien, L. H. & Huang, X. F. 2000. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. Int J Obes Relat Metab Disord, 24, 639-46.

- Maletínská, L., Maixnerová, J., Matysková, R., Haugvicová, R., Sloncová, E., Elbert, T., Slaninová, J. & Zelezná, B. 2007. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide specific binding in pheochromocytoma cells PC12. *Eur J Pharmacol*, **559**, 109-14.
- Matsumura, K., Tsuchihashi, T. & Abe, I. 2001. Central human cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide 55-102 increases arterial pressure in conscious rabbits. *Hypertension*, **38**, 1096-100.
- Meigs, J. B., D'Agostino, R. B., Wilson, P. W., Cupples, L. A., Nathan, D. M. & Singer, D. E. 1997. Risk variable clustering in the insulin resistance syndrome. The Framingham Offspring Study. *Diabetes*, **46**, 1594-600.
- Montague, C. T. & O'Rahilly, S. 2000. The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes*, **49**, 883-8.
- Montano, N., Ruscone, T. G., Porta, A., Lombardi, F., Pagani, M. & Malliani, A. 1994. Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt. *Circulation*, **90**, 1826-31.
- Porta, A., D'Addio, G., Guzzetti, S., Lucini, D. & Pagani, M. 2004. Testing the presence of non stationarities in short heart rate variability series. *Comput. Cardiol.*, **31**, 4.
- Rahmouni, K., Correia, M. L., Haynes, W. G. & Mark, A. L. 2005. Obesity-associated hypertension: new insights into mechanisms. *Hypertension*, **45**, 9-14.
- Rahmouni, K., Haynes, W. G. & Mark, A. L. 2002. Cardiovascular and sympathetic effects of leptin. *Curr Hypertens Rep,* **4**, 119-25.
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. & Moorman, A. F. 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett*, **339**, 62-6.
- Reaven, G. 2002. Metabolic syndrome: pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease. *Circulation*, **106**, 286-8.
- Reeves, P. G. 1997. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr*, **127**, 838S-841S.
- Richardson, R. J., Grkovic, I. & Anderson, C. R. 2006. Cocaine- and amphetaminerelated transcript peptide and somatostatin in rat intracardiac ganglia. *Cell Tissue Res*, **324**, 17-24.
- Rogge, G., Jones, D., Hubert, G. W., Lin, Y. & Kuhar, M. J. 2008. CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions. *Nat Rev Neurosci*, 9, 747-58.

- Schefe, J. H., Lehmann, K. E., Buschmann, I. R., Unger, T. & Funke-Kaiser, H. 2006. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. J Mol Med (Berl), 84, 901-10.
- Schwartz, M. W., Baskin, D. G., Bukowski, T. R., Kuijper, J. L., Foster, D., Lasser, G., Prunkard, D. E., Porte, D., Woods, S. C., Seeley, R. J. & Weigle, D. S. 1996. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes*, **45**, 531-5.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Seeley, R. J. & Baskin, D. G. 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature*, **404**, 661-71.
- Scruggs, P., Lai, C. C., Scruggs, J. E. & Dun, N. J. 2005. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide potentiates spinal glutamatergic sympathoexcitation in anesthetized rats. *Regul Pept*, **127**, 79-85.
- Simonds, S. E., Pryor, J. T., Ravussin, E., Greenway, F. L., Dileone, R., Allen, A. M., Bassi, J., Elmquist, J. K., Keogh, J. M., Henning, E., Myers, M. G., Licinio, J., Brown, R. D., Enriori, P. J., O'Rahilly, S., Sternson, S. M., *et al.* 2014. Leptin mediates the increase in blood pressure associated with obesity. *Cell*, **159**, 1404-16.
- Thireau, J., Zhang, B. L., Poisson, D. & Babuty, D. 2008. Heart rate variability in mice: a theoretical and practical guide. *Exp Physiol*, **93**, 83-94.
- van de Borne, P., Montano, N., Pagani, M., Oren, R. & Somers, V. K. 1997. Absence of low-frequency variability of sympathetic nerve activity in severe heart failure. *Circulation*, **95**, 1449-54.
- Wang, H. M. & Huang, S. C. 2012. SDNN/RMSSD as a Surrogate for LF/HF: A Revised Investigation. *Modelling and Simulation in Engineering*, **2012**.
- WHO 2010. Health topics: Obesity. .) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). June, 6th, 2015 ed. Brasília, World Health Organization (WHO).
- Williams, T. D., Chambers, J. B., Roberts, L. M., Henderson, R. P. & Overton, J. M. 2003. Diet-induced obesity and cardiovascular regulation in C57BL/6J mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **30**, 769-78.
- Wofford, M. R., Anderson, D. C., Brown, C. A., Jones, D. W., Miller, M. E. & Hall, J.
  E. 2001. Antihypertensive effect of alpha- and beta-adrenergic blockade in obese and lean hypertensive subjects. *Am J Hypertens*, **14**, 694-8.
- Wofford, M. R. & Hall, J. E. 2004. Pathophysiology and treatment of obesity hypertension. *Curr Pharm Des*, **10**, 3621-37.

- Yardley, C. P. & Hilton, S. M. 1986. The hypothalamic and brainstem areas from which the cardiovascular and behavioural components of the defence reaction are elicited in the rat. J Auton Nerv Syst, 15, 227-44.
- Zaretskaia, M. V., Zaretsky, D. V., Shekhar, A. & DiMicco, J. A. 2002. Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus evokes non-shivering thermogenesis in anesthetized rats. *Brain Res*, **928**, 113-25.
- Zhang, Y., Kerman, I. A., Laque, A., Nguyen, P., Faouzi, M., Louis, G. W., Jones, J. C., Rhodes, C. & Münzberg, H. 2011. Leptin-receptor-expressing neurons in the dorsomedial hypothalamus and median preoptic area regulate sympathetic brown adipose tissue circuits. *J Neurosci*, **31**, 1873-84.

#### FIGURE LEGENDS

Figure 1. Body composition, metabolic and biochemical parameters. (A) body weight mass (g), (B) body weight gain (g), (C) cumulative carolic intake (kcal), (D) cumulative high fat intake (kcal), (E) glucose tolerance test, (F) basal glycemia at fasting, (G) area under the curve (AUC; a.u.=arbitrary units) of the glucose tolerance test, and (H) mass (g) of epididymal adipose tissue, retroperitoneal adipose tissue, inguinal adipose tissue, adiposity and liver of mice over the 8 weeks of exposure to control (C, n=8), high-fat diet (HFD, n=24) or high-fat high-sucrose (HFHSu, n=11). \*p<0.01 vs C and +p<0.01 vs HFD. One-way ANOVA with Newman-Keuls post-hoc test.

**Figure 2. Cardiovascular parameters.** Cardiovascular phenotype of mice fed with control (C, n=8), high-fat (HFD, n=24) or high-fat high-sucrose (HFHSu, n=11) classified in hypertensive high-fat (HFD-H, n=9) or hypertension-resistant high-fat (HFD-R, n=15). (A) Representative traces of the pulsatile pressure (PAP, mmHg), mean arterial pressure (MAP, mmHg) and heart rate (HR, bpm) of one animal of each group; (B) Histogram of mean arterial pressure of HFD mice; (C) Basal mean arterial pressure (MAP mmHg), (D) systolic blood pressure (SBP, mmHg), (E) diastolic blood pressure (DBP, mmHg). (F) Heart rate (HR, bpm). \*p<0.05 vs C, +p<0.05 vs group indicated. One-way ANOVA with Newman-Keuls post-hoc test.

**Figure 3.** Power spectral analysis of the systolic blood pressure (SBP) and pulse interval (PI) variability. (A) Representative traces of SBP variability of HFD-R and HFD-H of one animal of each group; (B) spectra of SBP in HFD-R and HFD-H mice; (C) Analysis of the total variability of SBP (SDNN); (D) very low-frequency component (VLF); (E) low-frequency component (LF) and (F) high-frequency (HF) of SBP. (G) Representative traces of PI of HFD-R and HFD-H mice in one animal of each group; (H) spectra of PI in HFD-R and HFD-H mice; (I) Total PI variability analysis represented by root mean square of successive differences (RMSSD), (J) low-frequency component, (K) high-frequency component, and (L) autonomic balance (LF/HF ratio) to the heart. \*p<0.05 vs C, +p<0.05 vs group correspondent.

One-way ANOVA with Newman-Keuls post-hoc test. C (n=8), HFD-R (n=15) and HFD-H (n=9), HFHSu (n=11).

**Figure 4. Gene expression of hypothalamic and brainstem neuropeptides. (A)** Hypothalamic gene expression of the reference gene 36B4, CART, POMC, AgRP and NPY. **(B)** Brainstem gene expression of 36B4, CART, POMC, AgRP and NPY of C (n=6), HFD-R (n=6), HFD-H (n=7) and HFHSu mice (n=10). \*p<0.05 vs C, +p<0.05 vs HFD-R; One-way ANOVA with Newman-Keuls post-hoc test.

Figure 5. CART-positive (CART<sup>+</sup>) neurones are higher in DMH of HFD mice. (A) Photomicrographs in light field at the DMH level of C (n=4), HFD (n=4) and HFHSu (n=5) mice depicting the CART immunoreactive neuronal cell bodies. (B) Rostrocaudal distribution of CART<sup>+</sup> in DMH from bregma level among the groups. (C) Total number of CART<sup>+</sup> neurones throughtout the DMH. Fornix (f), third ventricule (3V). \*p<0.05 vs C, +p<0.05 vs HFD One-way ANOVA with Newman-Keuls post-hoc test.

**Figure 6.** Immunoperoxidase reaction for CART at others hypothalamic and brainstem nuclei. Photomicrographs in light field 20x magnification at the DMH level of C (n=4), HFD (n=4) and HFHSu (n=5) mice depicting the CART immunoperoxidase reaction at (A) ventromedial nucleus of hypothalamus (VMH), (B) paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN), (C) lateral hypothalamic area (LHA), (D) nucleus of the solitary tract (NTS). Fornix (f), third ventricule (3V), arcuate nucleus of hypothalamus (Arc), dorsal motor vagus nucleus (DMV).

Table 1. Plasmatic p	parameters
----------------------	------------

	Control	HFD	HFHSu
Fasting insulin (mg.dl <sup>-1</sup> )	47±7	472±99 <sup>*</sup>	427±75 <sup>*</sup>
Postprandial insulin (p.mol.L-1)	2179±216	2207±420	1093±361 <sup>*+</sup>
Leptin (ng.dl <sup>-1</sup> )	8086±1129	17343±2062 <sup>*</sup>	16102±1401 <sup>*</sup>
<b>Resistin (</b> ng.ml <sup>-1</sup> )	4232±626	4177±841	4180±378
Triacilglicerides (mmol.L <sup>-1</sup> )	1.0±0.2	2.2±0.2 <sup>*</sup>	2.2±0.2 <sup>*</sup>
Free fatty acids (mmol.L <sup>-1</sup> )	0.2±0.1	0.7±0.1 <sup>*</sup>	0.7±0.1 <sup>*</sup>
Interleukin-6 (ng.ml <sup>-1</sup> )	<b>22</b> ±4	21±4	15±3

Values are means±SEM. Two-way ANOVA. Significances (p<0.05): \* vs C; + vs HFD.

Table 2. Blood pressure (MAP mmHg) and autonomic balance levels compared among animal's group that underwent 1 and 4 days of recovering after blood vessels surgical procedures.

			Groups		
			Croups		
		С	HFD-R	HFD-H	HFHSu
MAP (mmHg)	1 day	98.2±2.5	97.1±2.3+	114.3±3.4*	96.26±3.7+
	4 days	100.1±3.6	105.2±1.1+	122.8±1.2*	90.9±4.6+
LFsbp	1 day	1.9±0.3	2.0±0.3+	3.7±0.6*	2.0±0.3+
	4 days	1.5±0.9	2.1±0.3+	4.0±1.1*	1.5±0.2+
LF/HF	1 day	0.25±0.07	0.63±0.10 <sup>+</sup>	1.10±0.35*	0.35±0.19⁺
	4 days	0.19±0.05	0.66±0.05+	2.18±0.12*	0.5±0.17+

Values are means±SEM. Two-way ANOVA. Significances (p<0.05): \* vs C; + vs HFD-H.













Figure 4











Figure 6