GILSON FERNANDES RUIVO

**Estudo dos mecanismos envolvidos na redução da
sensibilidade à insulina decorrente da restrição crônica de sal:
o sistema nervoso simpático e a via l-arginina - óxido nítrico**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Medicina.

SÃO PAULO

2002

GILSON FERNANDES RUIVO

**Estudo dos mecanismos envolvidos na redução da
sensibilidade à insulina decorrente da restrição crônica de sal:
o sistema nervoso simpático e a via l-arginina - óxido nítrico**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Medicina.

Área de concentração: Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Joel Claudio Heimann

SÃO PAULO

2002

DEDICATÓRIA

A Vanessa,

Querida esposa, amiga e companheira, por me apoiar com tanto carinho e paciência em todos os meus passos de crescimento científico, pessoal e profissional
estou de volta para casa

Ao Enzo,

meu filho, razão da minha vida
você me devolveu a vontade de sonhar e lutar por um futuro melhor

Aos meus pais, Benedicto e Maria Helena,

aos meus irmãos Júnior, Rodrigo e Fernanda,

pelo carinho e apoio que me deram durante minha vida e paciência para me ajudar em todas essas etapas

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao meu orientador, Professor Doutor **JOEL CLAUDIO HEIMANN**, por ter me aceito como aluno e pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa científica no seu laboratório, pela grande paciência e dedicação, além da sua valiosa orientação, sempre em tempo integral. Pelo exemplo de pessoa e orientador e pelo primor científico com que guia seus passos. Muito obrigado

Agradeço à Doutora MIRIAM STERMAN DOLNIKOFF, pela amizade e ensinamentos tanto teóricos como práticos ao longo de todo trabalho e pelo carinho com que sempre me tratou.

Agradeço à Doutora LUZIA NAÔKO SHINOHARA FURUKAWA, pela dedicação e amizade, pela “orientação de bancada”, pela paciência e colaboração fundamental para realização desta tese.

Agradeço ao Doutor CARLOS ANTÔNIO DO NASCIMENTO, pela amizade e ensinamentos, tanto teóricos como práticos, ao longo de todo trabalho.

Aos Professores Doutores RUI TOLEDO BARROS e MARCELO MARCONDES MACHADO por terem me aceitado na disciplina de Nefrologia como pós graduando.

À Doutora ELISABETE ALCÂNTARA DOS SANTOS, pelo carinho e amizade e pelas orientações no Laboratório na fase inicial desta pesquisa.

Aos colegas SERGIO CATANOZI E JUSSARA CORDEIRO ROCHA pelo auxílio na determinação de lípides plasmáticos.

À todos os colegas do Hospital Universitário de Taubaté, em especial ao Dr Renato Chiavassa pelo constante apoio.

À todos os colegas da UTI do Hospital Santa Isabel de Clínicas em especial à grande amiga LAIS HELENA B. R. SOUBHIA.

Agradeço especialmente à UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ, principalmente à Professora Maria Júlia, pelo incentivo na realização da Pós-Graduação e pelo apoio através de uma bolsa de estudos.

Agradeço aos Professores JORGE MIGUEL KATHER NETO, diretor do Departamento de Medicina da Universidade de Taubaté e ao Dr JOSÉ CARLOS DE CARVALHO,

responsável pelo Serviço e pela disciplina de Clínica Médica da Universidade de Taubaté pelo apoio e incentivo nesta caminhada.

Agradeço a todos os colegas da disciplina de Clínica Médica da Universidade de Taubaté pela constante demonstração de apoio para meu crescimento científico.

Ao técnico WALTER CAMPESTRE, pela paciência e dedicação no cuidado diário dos animais que participaram do estudo.

À JANICE DA GRAÇA PIÃO DA SILVA, pela amizade e pelos cuidados com os materiais utilizados na pesquisa.

As secretárias DENISE CRISTINA DUARTE e MARINEIDE RIBEIRO pelo apoio e amizade durante o desenvolvimento da tese.

À TODOS OS COLEGAS DO LABORATÓRIO, pelo apoio e carinho no decorrer destes anos.

Ao CNPQ pela concessão da minha bolsa de estudos e à FAPESP pelo financiamento deste projeto de pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
2. MÉTODOS	6
2.1 Animais	6
2.2 Procedimento cirúrgico	6
2.3 Medida da pressão arterial e da frequência cardíaca	7
2.4 Avaliação da sensibilidade à insulina	8
2.4.1 Clamp euglicêmico hiperinsulinêmico	8
2.5 Coleta e armazenamento das amostras de sangue	9
2.6 Grupos experimentais	10
2.7 Determinações bioquímicas	11
2.7.1 Determinação do nitrato e nitrito plasmático	11
2.7.2 Determinação da glicemia e insulinemia	11
2.7.3 Determinação de lípidos plasmáticos	11
2.5 Análise estatística	11
3. RESULTADOS	14
3.1 Gerais	14
3.2 Bloqueio do sistema nervoso simpático	22
3.2.1 Grupo veículo (controle)	22
3.2.2 Grupo bloqueio do sistema nervoso simpático	36
3.3 Infusão de arginina	40

3.3.1 Grupo D-arginina	40
3.3.2 Grupo L-arginina	56
3.4 Grupo Diltiazem	59
3.5 Nitrato e nitrito plasmático	60
4. DISCUSSÃO	62
5. SUMÁRIO DE RESULTADOS	75
6. CONCLUSÕES	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE ABREVIATURAS

CLAMP - “Clamp” euglicêmico hiperinsulinêmico

cGMP – Monofosfato de guanosina cíclico

DA – D-arginina

FC – Frequência cardíaca

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

HO - Dieta hipossódica

HR - Dieta hipersódica

iv – Intravenoso

ip – Intraperitoneal LA – L-arginina

NaCl – Cloreto de sódio

NO – Óxido nítrico

NR - Dieta normossódica

PA - pressão arterial

PAD - Pressão arterial diastólica

PAS - Pressão arterial sistólica

PC - Peso corpóreo

RI – Resistência à insulina

SHR – ratos espontaneamente hipertensos

SI - Sensibilidade à insulina

SNS – Sistema nervoso simpático

SRA - Sistema renina-angiotensina

SS - “Steady-state”

SSBG - “Steady state” da glicemia

SSPI - “Steady state” da insulina sérica NO_x – Nitrato / nitrito plasmático

TAG - Triacilgliceróis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Protocolo experimental – Ratos Wistar machos que receberam desde o desmame as dietas hipo, normo ou hipersódica e ao completarem 12 semanas eram submetidos à medida de pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC). Cada grupo de ratos recebia prazosin e propranolol, veículo, L-arginina ou D-arginina. Após o tratamento farmacológico o clamp euglicêmico hiperinsulinêmico era realizado.

Figura 2. Clamp euglicêmico hiperinsulinêmico, demonstrando os fármacos utilizados no protocolo e coletas de sangue para a determinação de insulinemia, glicemia, nitrato e nitrito e lípides plasmáticos.

Figura 3 . Peso corpóreo medido em animais que foram submetidos às dietas hipossódica (HO), normossódica (NR) e hipersódica (HR) previamente ao implante cirúrgico dos cateteres na 12^a semana de vida.

Figura 4. Peso corpóreo medido antes da realização do clamp euglicêmico hiperinsulinêmico em animais que foram submetidos às dietas hipossódica (HO), normossódica (NR) e hipersódica (HR).

Figura 5. Hematócrito basal medido após o implante cirúrgico de cateteres em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica .(HR) na 12^a semana de vida.

Figura 6. Glicemia basal em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR) na 12^a semana de vida.

Figura 7. Pressão arterial sistólica basal em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR) na 12^a semana de vida.

Figura 8. Pressão arterial diastólica basal em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR) na 12^a semana de vida.

Figura 9. Frequência cardíaca basal em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR).

Figura 10. Colesterol total plasmático basal em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR).

Figura 11. Triacilgliceróis plasmáticos basais em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR).

Figura 12. Efeito da dieta e do tempo de consumo das mesmas sobre o peso corpóreo de animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR) desde o desmame até a 12^a semana de vida.

Figura 13. Valores de glicemia dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos veículo e sob bloqueio do SNS (bl) avaliados nos momentos basal (-45 minutos), antes do CLAMP (0 minutos) e SSBG (120 minutos).

Figura 14. Insulina plasmática basal em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR) nos grupos veículo ou ao bloqueio do sistema nervoso simpático (bl).

Figura 15. Efeito da infusão de veículo ou do bloqueio do sistema nervoso simpático (bl) sobre a insulinemia plasmática antes do início do CLAMP em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR).

Figura 16. Valores de insulina plasmática dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos veículo e sob bloqueio do SNS (bl) avaliados nos momentos basal antes do CLAMP (0 minutos) e SSBG (120 minutos).

Figura 17. Efeito da dieta e da infusão de veículo ou do bloqueio do sistema nervoso simpático (bl) sobre a captação periférica de glicose em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR).

Figura 18. Valores de pressão arterial sistólica dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos veículo e sob bloqueio do SNS (bl) avaliados nos momentos basal(-45minutos) antes do CLAMP (0 minutos) e final do CLAMP (120 minutos).

Figura 19. Valores de pressão arterial diastólica dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos veículo e sob bloqueio do SNS (bl) avaliados nos momentos basal(-45minutos) antes do CLAMP (0 minutos) e final do CLAMP (120 minutos).

Figura 20. Valores de frequência cardíaca dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos veículo e sob bloqueio do SNS (bl) avaliados nos momentos basal(-45minutos) antes do CLAMP (0 minutos) e final do CLAMP (120 minutos).

Figura 21. Valores de colesterol plasmático dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos veículo e sob bloqueio do SNS (bl) avaliados nos momentos basal(-45minutos) antes do CLAMP (0 minutos) e final do CLAMP (120 minutos).

Figura 22. Valores de triacilgliceróis plasmático dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos veículo e sob bloqueio do SNS (bl) avaliados nos momentos basal(-45minutos) antes do CLAMP (0 minutos) e final do CLAMP (120 minutos).

Figura 23. Valores de glicemias dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos D-arginina (DA) e L-arginina (LA) avaliados nos momentos basal(-45 minutos) antes do CLAMP (0 minutos) e final do CLAMP (120 minutos).

Figura 24. Insulina plasmática basal em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR) nos grupos D-arginina (DA) ou L-arginina (LA).

Figura 25. Insulina plasmática antes do início do CLAMP em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR) nos grupos D-arginina (DA) ou L-arginina (LA).

Figura 26. Valores de insulina plasmática dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos D-arginina (DA) e L-arginina (LA) avaliados nos momentos antes do CLAMP (0 minutos) e final do CLAMP (120 minutos).

Figura 27. Captação de glicose medida pelo CLAMP em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR) nos grupos D-arginina (DA) ou L-arginina (LA).

Figura 28. Valores de pressão arterial sistólica dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos D-arginina (DA) e L-arginina (LA) avaliados nos momentos basal (-45 minutos) antes do CLAMP (0 minutos) e final do CLAMP (120 minutos).

Figura 29. Valores de pressão arterial sistólica dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos D-arginina (DA) e L-arginina (LA) avaliados nos momentos basal (-45 minutos) antes do CLAMP (0 minutos) e final do CLAMP (120 minutos).

Figura 30. Valores de frequência cardíaca dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos D-arginina (DA) e L-arginina (LA) avaliados nos momentos basal (-45 minutos) antes do CLAMP (0 minutos) e final do CLAMP (120 minutos).

Figura 31. Valores de colesterol plasmático dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos D-arginina (DA) e L-arginina (LA) avaliados nos momentos basal (-45 min) antes do CLAMP (0 min) e final do CLAMP (120 min).

Figura 32. Valores de triacilgliceróis plasmáticos dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos D-arginina (DA) e L-arginina (LA) avaliados nos momentos basal (-45 min) antes do CLAMP (0 min) e final do CLAMP (120 min).

Figura 33. Concentração plasmática de nitrato e nitrito em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR) na 12^a semana de vida.

Figura 34. Valores de nitrato e nitrito plasmáticos dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos D-arginina (DA) e L-arginina (LA) avaliados nos momentos basal (-45 minutos) antes do CLAMP (0 minutos) e final do CLAMP (120 minutos).

RESUMO

RUIVO, G.F. Estudo dos mecanismos envolvidos na redução da sensibilidade à insulina decorrente da restrição crônica de sal: o sistema nervoso simpático e a via l-arginina - óxido nítrico. São Paulo, 2002 107p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

A restrição crônica de sal na dieta tem sido recomendada como medida não medicamentosa do tratamento da hipertensão arterial sistêmica. Entre os efeitos observados desta medida terapêutica tem sido descrita uma redução dos valores da pressão arterial (PA), tanto em indivíduos normotensos e pacientes hipertensos, assim como em animais de laboratório. Outros efeitos observados são alterações do metabolismo de carboidratos e de lipídeos. Tanto em indivíduos normotensos e pacientes hipertensos, assim como em animais de laboratório foram observadas maiores concentrações de peptídeo C e de insulina, sem alteração da glicemia e com redução da captação periférica de glicose pelos tecidos, caracterizando um estado de resistência à insulina. No metabolismo de lipídeos, uma outra consequência da restrição crônica de sal é a maior concentração plasmática de colesterol total e triacilgliceróis. Apesar da demonstração dos efeitos do sal sobre o metabolismo de carboidratos e lipídeos em humanos e animais existem dados conflitantes na literatura, com resultados opostos a estes descritos. Para melhor compreensão deste fenômeno, foi desenvolvido um estudo em nosso laboratório, o qual demonstrou que ratos Wistar machos que receberam restrição crônica de sal na dieta apresentaram maiores insulinemias medidas durante um teste de tolerância à glicose e sem a constatação de resistência à insulina em adipócitos isolados avaliada pela EC₅₀. Entretanto, o que não ficou esclarecido neste estudo é se este quadro era restrito ao tecido estudado ou se ocorria no animal como um todo, ou seja, se era um fenômeno generalizado. Tendo em vista estes resultados, um outro estudo foi desenvolvido em nosso laboratório. Analisando o animal intacto, foi verificado que a restrição crônica de sal em ratos Wistar estava associada a uma menor sensibilidade à insulina medida por meio de um clamp euglicêmico hiperinsulinêmico (CLAMP) em animais anestesiados. Também foi observado maior peso corpóreo (PC) e maior massa dos tecidos adiposos. No intuito de se compreender quais eram os mecanismos envolvidos na menor sensibilidade à insulina durante a restrição de sal na dieta, também foi feito o pareamento de peso entre os animais que receberam dietas hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) e mesmo sem diferença entre os PC, os animais sob restrição salina mantiveram-se insulino resistentes. Em uma nova etapa foi feito o bloqueio do sistema renina angiotensina com o uso de captopril (inibidor da enzima conversora de angiotensina) ou losartan (antagonista do receptor ATI de angiotensina II) tendo sido verificado que o captopril melhorou a sensibilidade à insulina, o que não ocorreu com o uso de losartan. Outra consequência da restrição crônica de sal na dieta é a maior atividade do sistema nervoso simpático (SNS) e uma menor atividade da via L-arginina (LA) / óxido nítrico (NO). Assim, o objetivo deste estudo foi verificar se o SNS e a via LA/NO são mecanismos envolvidos na menor sensibilidade à insulina durante a restrição crônica de sal. Para o desenvolvimento deste estudo, ratos Wistar machos receberam dieta HO, NR ou HR desde o desmame aos 21 dias de vida até completarem 12 semanas. Ao tornarem-se adultos, os ratos foram submetidos ao implante cirúrgico de cateteres e três a cinco dias após era realizado um CLAMP em ratos acordados. No dia do experimento, após um jejum de seis horas se realizava a coleta de sangue e medidas metabólicas e hemodinâmicas. Neste momento, um grupo

de ratos recebeu prazosin e propranolol para o bloqueio do SNS e outro grupo recebeu veículo. Um terceiro grupo de animais recebeu LA e outro grupo recebeu D-arginina (DA). Um quinto grupo de animais que consumiu apenas a dieta HR recebeu diltiazem (bloqueador de canal de cálcio). Quarenta e cinco minutos após a infusão das drogas o CLAMP foi iniciado. Foram medidos PC, glicemias, insulinemias, lípides, nitrato/nitrito (NOx), PA sistólica (PAS), diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC). O PC foi maior na dieta HO do que na NR e HR. Também foi observado maior PC na dieta NR do que HR. Em situação basal observaram-se maiores valores de glicemia e insulinemia durante a restrição salina em comparação aos ratos em dieta NR e HR. A PAS e PAD foram maiores na dieta HR em comparação aos ratos em dieta NR e HO, enquanto a FC foi maior nos ratos em dieta HO em comparação àqueles sob dietas NR e HR. Também foram observadas maiores concentrações plasmáticas de colesterol total (COL) e triacilgliceróis (TAG) durante a restrição salina. Os animais controle apresentaram menor sensibilidade à insulina em comparação àqueles em dieta NR ou HR. O bloqueio do SNS corrigiu o efeito do sal sobre a captação de glicose, não sendo mais observada diferença entre as dietas. O bloqueio do SNS não influenciou a glicemia mas reduziu a maior insulinemia nos ratos em dieta HO, não sendo mais observada diferença entre as dietas quanto às insulinemias ao início do CLAMP. A infusão de LA melhorou a menor captação periférica de glicose nos ratos em dieta HO, sem influência sobre os animais tratados com dieta NR ou HR. Diltiazem não modificou a sensibilidade à insulina apesar de ter reduzido a PA em intensidade semelhante ao bloqueio do SNS. O bloqueio do SNS reduziu os valores de PAS e PAD nas três dietas, com queda mais intensa dos seus valores nos animais sob sobrecarga salina, logo ao início do CLAMP. Diltiazem reduziu a PAS e PAD. DA não influenciou ($p>0,05$) os valores de PAS e PAD. Já a infusão de LA promoveu redução dos valores de PAS e PAD somente em ratos em sobrecarga salina e reduziu os maiores valores de FC observados nos ratos durante a restrição de sal na dieta. O bloqueio do SNS e a infusão de LA reduziram os maiores valores de TAG ao término do CLAMP, o que não foi observado nos grupos veículo e DA. Não foi observada modificação da concentração plasmática de COL entre os grupos independentemente dos fármacos ministrados. Durante a restrição salina foi observado menor concentração plasmática de NOx em comparação à sobrecarga salina. A infusão de LA promoveu um incremento na concentração plasmática de NOx ao término do CLAMP nas três dietas, o que não foi observado nos ratos tratados com DA. Ao término do CLAMP não foram observadas diferenças na concentração de NOx plasmático entre as dietas nos animais que receberam LA. A concentração plasmática de NOx nas três dietas foi menor nos ratos que receberam DA. Assim, o bloqueio do SNS e a ativação da via LA/NO melhoraram os efeitos metabólicos decorrentes da restrição crônica de sal.

RUIVO, G.F. Study of the mechanisms of the lower insulin sensitivity due to chronic salt restriction: the sympathetic nervous system and the l-arginine - nitric oxide pathway. São Paulo, 2002 107p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Chronic dietary salt restriction is recommended as non-pharmacological measure of hypertension treatment. One of the observed effects of this therapeutic measure is the blood pressure (BP) decrease in normotensive subjects and in hypertensive patients, and also in laboratory animals. Another side effects observed are disorders of carbohydrate and lipid metabolism. Salt restriction induced higher C-peptide and insulin levels, without changes on plasma glucose, and lower glucose uptake by the tissues in normotensive subjects and in hypertensive patients, and also in laboratory animals, suggesting an insulin resistant state. Other consequences of salt restriction are higher plasma levels of cholesterol and triacylglycerols. Some studies have disclosed opposite results. With the objective to better understand these phenomena, a study was developed in our laboratory, that showed that male Wistar rats on chronic salt restriction presented higher insulin plasma levels measured during a glucose tolerance test, without insulin resistance in isolated adipocytes measured by the EC₅₀ of the insulin - glucose uptake curve. It was not clear in this study if this phenomenon was restricted to the evaluated tissue or if it was a phenomenon in the whole animal. With these results, another study was developed in our laboratory. Analyzing the whole animal, chronic salt restriction in male Wistar rats was associated with lower insulin sensitivity measured by a euglycemic hyperinsulinemic clamp (CLAMP) in anesthetized rats. Higher body weight (BW) and adipose tissue mass was also observed. With the objective to understand the involved mechanisms in the lower insulin sensitivity due to dietary salt restriction, weight was paired among animals on low (LSD), normal (NSD) or high (HSD) salt diet, and even without BW difference, salt restricted animals were still insulin resistants. In another step, renin angiotensin system blockade with captopril (angiotensin enzyme conversion inhibitor) or losartan (angiotensin II type I receptor antagonist) was performed. It was observed that captopril, but not losartan, improved insulin sensitivity. Another consequence of salt restriction is a higher sympathetic nervous system (SNS) and a lower L-arginine (LA) / nitric oxide (NO) pathway activity. The objective of this study was to verify if SNS and LA / NO are mechanisms involved in the lower insulin sensitivity due to chronic salt restriction. Male Wistar rats received LSD, NSD, or HSD since weaning until adulthood. In the 12th week of age, catheters were inserted and three to five days latter, a CLAMP was performed in awaked rats. On the day of the experiment, after six hours fasting, blood samples were collected and metabolic and hemodynamic measures were done. At this moment, a group of rats received prazosin and propranolol for SNS blockade and another group received vehicle. A third group of animals received LA and a fourth group received D-arginine (DA). Another group of rats only on HSD received diltiazem (calcium channel blocker). Fourty five minutes after drug infusion the CLAMP was started. BW, plasma glucose, insulin, lipids, and nitrate/nitrite (NOx), systolic BP (SBP), diastolic (DBP), and heart rate (HR) were measured. BW was higher on LSD than on NSD and HSD. BW was also higher on NSD than HSD. Basal plasma glucose and insulin were higher during salt restriction than on NSD and HSD. SBP and DBP were higher on HSD than on NSD and LSD, and HR was higher on LSD than on NSD and HSD. Cholesterol (CHOL) and triacylglycerol (TAG) plasma levels were higher on salt restriction. LSD rats presented lower insulin sensitivity compared to animals on NSD or HSD. SNS blockade corrected effect of salt on glucose uptake. SNS blockade had no influence on glucose levels but reduced the

higher plasma insulin in LSD rats, without differences in insulin levels between diets at the start of the CLAMP. LA improved the lower glucose uptake observed in LSD rats, with no influence on the rats on NSD or HSD. Diltiazem had no effect on insulin sensitivity. SNS blockade reduced SBP and DBP in rats on the three diets, with an intense BP fall on HSD rats at the start of the CLAMP. Diltiazem reduced SBP and DBP. DA had no influence in SBP and DBP. On the other hand, LA decreased SBP and DBP only in salt overloaded rats and reduced the higher HR observed on salt restricted rats. SNS blockade and LA infusion reduced the higher TAG concentration at the end of the CLAMP, which was not observed in vehicle and DA groups. COL level was not influenced by drug infusion. During salt restriction, lower plasma NO_x was observed compared to salt overload. LA infusion promoted plasma NO_x increment at the end of the CLAMP. At the end of the CLAMP, no difference was observed in plasma NO_x among the rats on the three salt diets and infused with LA. Plasma NO_x was lower in rats in the DA group. In conclusion, SNS blockade and LA/NO pathway activation improved the metabolic effects due to chronic dietary salt restriction.

1) INTRODUÇÃO

Desde a descoberta da insulina¹ tem se observado que os indivíduos diabéticos apresentam diferentes respostas ao uso de insulina exógena e anos após² esta descoberta, sugeriu-se que havia indivíduos insulino sensíveis e outros não sensíveis à insulina. Em outro estudo do mesmo autor³ verificaram-se diferentes respostas glicêmicas entre os diabéticos, o que mais recentemente gerou a classificação de diabetes insulino e não insulino dependentes, ou diabetes do tipo 2, onde é patognomônico a menor sensibilidade à insulina (SI).

Estudos desenvolvidos posteriormente mostraram que não somente os indivíduos diabéticos apresentavam resistência à insulina. Welborn et al.⁴ correlacionaram hipertensão arterial sistêmica (HAS) com maiores insulinemias durante testes de tolerância oral à glicose em seres humanos. Posteriormente, estudos epidemiológicos⁵ e clínicos⁶ também mostraram evidências da associação entre HAS e alterações da SI.

Reaven⁷ denominou como Síndrome X a associação entre resistência à insulina (RI), intolerância à glicose, hiperinsulinemia, HAS e alterações lipídicas, sendo que a RI corresponderia ao evento precursor e as demais alterações seriam

complicações secundárias do fenômeno em questão. Morris e Connel⁸ definem RI como sendo o estado no qual há redução na captação periférica de glicose estimulada pela insulina.

A hiperinsulinemia aumenta a reabsorção tubular de sódio⁹, estimula o sistema nervoso simpático¹⁰ (SNS) e promove proliferação das células musculares lisas vasculares subintimais¹¹. Outros estudos têm mostrado resultados divergentes da influência da insulina sobre a PA. Brands et al.¹² verificaram que a indução da hiperinsulinemia crônica em cães normais promoveu a redução dos valores da PA. Já Hall et al.¹³ estudando cães com a massa renal reduzida não verificaram elevação da PA média após a infusão crônica de insulina.

Estudos em modelos animais têm associado à elevação dos valores de PA com modificações da SI. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) submetidos tanto ao teste de supressão de insulina¹⁴ e ao clamp euglicêmico hiperinsulinêmico (CLAMP) apresentaram menor SI¹⁵. Entretanto, estes resultados não foram reproduzidos por outros autores¹⁶ também em ratos SHR ou em ratos Wistar Kyoto. Em outro modelo de hipertensão experimental, utilizando-se ratos Sprague-Dawley tratados com dieta rica em frutose observaram a associação de HAS e RI¹⁷, embora também tenha se demonstrado resultados distintos¹⁸.

Em humanos tem sido evidenciado que cerca de 50% dos pacientes com HAS apresentam RI¹⁹⁻²¹. Alterações do metabolismo da glicose e insulina têm sido observadas em hipertensos mesmo na ausência de obesidade e diabetes mellitus^{5,6,19,21}.

O sal ou cloreto de sódio (sódio, Na, NaCl) representa um importante fator ambiental envolvido na gênese de doenças cardiovasculares, como a HAS e, por isso,

a intensidade do seu consumo na dieta pela população tem sido uma constante preocupação.

Estudos clínicos e experimentais têm mostrado uma correlação positiva entre o sal ingerido na dieta e valores de PA. O consumo de dieta com elevado conteúdo de cloreto de sódio está associado a PA mais elevada. Esta afirmativa tem como fundamento vários estudos que avaliaram indivíduos normotensos^{22,23}, hipertensos²⁴⁻²⁶ e animais de laboratório²⁷, bem como grandes populações²⁸ e pequenas amostras²⁹⁻³¹. Também se verificou que a redução da ingestão de sal na dieta promove redução da PA e da morbidade por doença cardiovascular. Tuomilehto et al³² demonstraram que o maior consumo de sal estava associado com maior morbi-mortalidade por doença cardíaca coronariana independente de outros fatores de risco cardiovascular como a PA. Assim, com base nestes conhecimentos, diversas entidades governamentais nacionais e internacionais têm enfatizado a recomendação para a redução no consumo diário de sal pela população em geral e para o tratamento anti-hipertensivo em particular³³⁻³⁵.

Também se verificou que o baixo teor de sal na dieta está associado a alterações no metabolismo da glicose e insulina, assim como do metabolismo lipídico, em voluntários normotensos³⁶⁻³⁸ e em pacientes hipertensos^{39,40}. Durante a restrição de sal, foram observados níveis plasmáticos aumentados de peptídeo-C e de insulina, porém sem alteração da glicose sérica^{27,36,40} sugerindo resistência dos tecidos alvo à captação de glicose. Também foram observadas maiores concentrações plasmáticas de colesterol total e triacilgliceróis em humanos e em animais de laboratório^{36,41}.

Em modelos experimentais, como no rato Dahl, onde a hipertensão é dependente da ingestão de sal observou-se maior nível de insulinemia durante o teste de tolerância à glicose nos ratos Dahl sensíveis a sal em comparação aos ratos Dahl resistentes ao sal⁴². Somova e Channa⁴³ mostraram que os ratos Dahl resistentes e os ratos Wistar tinham “turnover” de glicose e insulina semelhantes enquanto os ratos Dahl sal-sensíveis apresentavam resistência à insulina.

Existem alguns resultados conflitantes na literatura quanto à influência do sal na dieta sobre a sensibilidade à insulina. Em parte isto se deve aos métodos, como tempo de consumo da dieta -estudos de curta ou longa duração-, diferentes métodos para avaliação da sensibilidade à insulina, mesmo quando o CLAMP, que é considerado o padrão ouro para a avaliação da sensibilidade à insulina, é aplicado, diferentes resultados são observados.

No estudo de Lind et al.⁴⁰ não foram observadas modificações nos valores da captação de glicose após 7 dias de consumo de dieta hipossódica (HO) ou hipersódica (HR). No estudo de Fliser et al.³⁶ observou-se menores valores de captação de glicose em indivíduos normotensos após 3 dias de dieta HO, o que não foi observado com 7 dias da mesma dieta. Já Donovan et al.³⁷ verificaram resultados opostos, onde a dieta HR ao longo de 7 dias promoveu menores valores de captação de glicose.

Na tentativa de entender melhor a associação entre o consumo de sal e sensibilidade à insulina, foi realizado um estudo em nosso laboratório por Lima et al.²⁷. Este estudo mostrou que ratos Wistar com 12 semanas de idade, submetidos à restrição crônica de sal desenvolveram hiperinsulinemia durante um teste de tolerância à glicose intravenoso, mas sem evidências de maior RI medida em

adipócitos isolados do tecido adiposo peri-epididimal. Neste estudo observou-se também maior captação de glicose insulino independente em adipócitos de ratos submetidos à sobrecarga salina. Ainda mais, a mortalidade dos animais que receberam dieta HR desde o desmame foi maior do que dos ratos que ingeriram dieta HO ao longo de 18 meses de observação. O que não foi verificado neste estudo é se os efeitos da restrição de sal na dieta, limitam-se ao tecido analisado ou se é um fenômeno generalizado, ou seja, no animal como um todo. Para esclarecer esta questão, um outro estudo foi realizado por Prada et al.⁴⁴ onde a sensibilidade à insulina foi medida por meio do CLAMP, portanto em animais intactos. Neste estudo a SI foi menor no grupo de ratos com 12 semanas de idade que consumiam dieta HO do que em animais que ingeriam dieta normossódica (NO) ou HR. Também foi avaliado se a ativação do sistema renina angiotensina (SRA) induzida pela restrição de sal era um dos mecanismos responsáveis pela menor SI. Os resultados obtidos não permitiram estabelecer uma relação de causa-efeito entre a ativação do SRA e a redução da sensibilidade à insulina. Além da ativação do SRA⁴⁵ a restrição de sal aumenta a atividade do SNS⁴⁶ e diminui a atividade da via L-arginina (LA) / óxido nítrico (NO)⁴⁷. Alguns estudos permitem conjecturar que estes dois efeitos decorrentes do consumo de dieta HO podem ser os responsáveis pela menor SI observada nesta situação.

Em humanos normais, a sobrecarga de sal está associada à redução das catecolaminas séricas e a restrição de sal está associada com aumento das catecolaminas séricas^{48,49} e urinárias⁵⁰⁻⁵². Em animais, Faucheux et al.⁵³ observaram que a infusão de salina promoveu redução da noradrenalina e adrenalina séricas. As aminas simpatomiméticas podem alterar o metabolismo da glicose e da insulina.

Estudos onde foi realizada a infusão de catecolaminas promoveram elevação da glicemia e insulinemia⁵⁴.

A inibição da via L-arginina / óxido nítrico decorrente da restrição de sal ou do uso de drogas bloqueadoras desta via pode promover redução da sensibilidade à insulina. O uso de antagonistas da óxido nítrico sintase (NOS) como N-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) induz resistência à insulina⁵⁵. Kitiyakara et al.⁵⁶ observaram que ratos que receberam restrição de sal apresentaram menor atividade da via L-arginina / óxido nítrico em comparação aqueles sob sobrecarga de sal, com menor excreção urinária de metabólitos do NO, menor concentração de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) e de arginina plasmática.

O objetivo deste trabalho foi verificar se a maior atividade do SNS e a menor atividade da via L-arginina/óxido nítrico são mecanismos responsáveis pela menor sensibilidade à insulina e pelos demais efeitos metabólicos induzidos pela restrição crônica do consumo de sal na dieta.

2) MÉTODOS

Todos os experimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

2.1) ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos, os quais eram provenientes do biotério central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, após a aprovação do projeto de pesquisa. Os animais receberam dietas idênticas quanto a sua composição, com exceção do conteúdo de sal, desde o seu recebimento no biotério de nosso laboratório após o desmame, ou seja, na terceira semana de vida, até completarem 12 semanas, ou seja, quando chegavam a vida adulta. Foram utilizadas três dietas com diferentes concentrações de sódio: dieta hipossódica (HO: 0,15% de NaCl ou 0,06% de Na, TD 92141 – Harlan Teklad), normossódica (NR: 1,3% de NaCl ou 0,5% de Na, TD 92140) ou hipersódica (HR: 7,94% de NaCl ou 3,12% de Na, TD 92142), sendo a concentração de proteínas idênticas, com 25% de proteínas em cada dieta. Os ratos foram acondicionados em gaiolas de plástico (5 animais/gaiola) em ambiente mantido em temperatura controlada (25°C), com ciclos

claro-escuro fixos (a luz era acesa às 6 horas da manhã e desligada às 6 horas da tarde) e recebendo água potável e ração *ad libitum*.

2.2) PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Ao completarem 12 semanas de idade, os animais foram submetidos a um procedimento cirúrgico para a colocação de dois cateteres (PE 50– Intramedic Inc., Becton Dickinson, Sparks, MD – USA), um na artéria carótida esquerda e o outro na veia jugular esquerda. Estes eram implantados sob anestesia com pentobarbital sódico, na dose de 50 mg/kg de peso corpóreo (PC), por via intraperitoneal (ip). Após o implante dos mesmos, eram preenchidos com solução fisiológica a 0,9% e heparina (50 UI/mL), ocluídos com um tampão metálico e exteriorizados na face dorsal do pescoço do animal. Durante o procedimento cirúrgico os animais foram mantidos aquecidos (37°C). Após o procedimento cirúrgico os animais eram colocados em gaiolas de plástico individuais e se fazia o acompanhamento de sua recuperação após a cirurgia. O cateter de artéria carótida foi utilizado para a determinação dos valores de PA, frequência cardíaca (FC) e para a coleta de amostras de sangue, enquanto o cateter de veia jugular foi utilizado para a infusão de soluções.

Quatro a cinco dias após o implante dos cateteres, se os animais apresentavam-se em boas condições, ou seja, com recuperação e/ou ganho de PC, e se os cateteres estavam permeáveis, estes eram submetidos ao CLAMP. Também foi realizada a determinação do hematócrito ao término da cirurgia e se os valores de hematócrito medidos previamente ao CLAMP estavam adequados os animais eram utilizados para o experimento.

2.3) MEDIDA DA PRESSÃO ARTERIAL E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

No dia do experimento os animais eram retirados do biotério e levados para uma sala apropriada onde eram deixados em gaiolas isoladas, acordados e sem restrição a sua movimentação. A aferição da PA e FC foi realizada através do cateter de artéria carótida, os quais eram conectados a um transdutor de pressão (Gould Statham Instruments Inc, modelo P23DB, Hato Rey, Puerto Rico - USA) e a um amplificador (Stemtech Inc, GPA-4 modelo 2) que providenciava o sinal analógico da PA, o qual era digitalizado por um sistema de monitorização computadorizado (DATAQ Instruments Inc).

Os registros de PA e FC foram realizados antes da infusão dos fármacos (basal ou – 45 minutos), antes do início do CLAMP (45 minutos após a infusão dos fármacos) e a cada 10 minutos até o final do experimento, com duração de 120 minutos, totalizando 14 medidas em diferentes momentos. Cada registro de PA e FC foi realizado durante 2 a 3 minutos com os animais conscientes e sem restrição à movimentação. A média de todos os valores obtidos durante cada registro foi considerada para os cálculos.

O objetivo de se realizar controles sucessivos da PA e FC foi o de verificar o efeito da infusão dos fármacos utilizados no estudo sobre o comportamento da PA e FC.

2.4) AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE À INSULINA

2.4.1) “Clamp” Euglicêmico Hiperinsulinêmico

Quatro a cinco dias após o implante cirúrgico dos cateteres, um clamp euglicêmico hiperinsulinêmico foi realizado em animais acordados, sem restrição à

movimentação, após jejum de 6 horas. Esta técnica foi desenvolvida por De Fronzo et al⁵⁷ como medida para avaliação da SI em humanos. Este método é considerado o padrão para avaliação da SI em humanos e no animal intacto.

O método do CLAMP consiste na infusão intravenosa (iv) contínua de insulina e glicose. Utilizou-se a insulina cristalina na velocidade de infusão de 3 mU.kg⁻¹.min⁻¹ (Actrapid, Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) e a infusão foi realizada na veia jugular durante 2 horas. O objetivo da infusão constante de insulina é o de elevar a concentração de insulina plasmática para valores superiores aos basais a ponto de inibir a produção endógena de insulina. A insulina foi diluída em solução de soro albumina bovina. Para manter a glicose sérica em concentrações similares aos níveis basais, foi feita a infusão de glicose (20g/100mL D-glicose), na da veia jugular. Esta foi iniciada 5 minutos após o início da infusão de insulina. A velocidade de infusão era modificada a cada 5 minutos, de acordo com a necessidade para a manutenção de uma euglicemia, com base em um princípio de controle de “feedback” negativo. Os últimos 30 minutos do experimento são considerados como o período de estabilização, os “steady-state”. Durante os últimos 30 minutos do CLAMP, o steady-state da glicose sérica (SSBG) e da insulina plasmática (SSPI) foram atingidos. A quantidade de glicose infundida durante o período de “steady-state” foi considerado como a captação de glicose⁵⁷. Durante este período a produção hepática de glicose está praticamente inibida⁵⁸. Durante o período de SS foram feitas medidas de variáveis como insulinemia, PA, FC, lípidos, entre outras, sendo que o valor expresso correspondia a média de 3 medidas (aos 90, 105 e 120 minutos). Experimentos onde o coeficiente de variação da glicose ou insulina séricas durante o período de steady-state foi maior do que 10% foram excluídos. O hematócrito foi

determinado no início e no final de todos os experimentos com o objetivo de se verificar se ocorreu hemodiluição devido às sucessivas coletas de amostras de sangue. A Figura 2 mostra o procedimento do CLAMP o qual era realizado no estudo.

2.5) COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Amostras de sangue para a determinação dos níveis de insulina, lípidos e nitrato e nitrito (NOx) foram centrifugadas imediatamente após a sua coleta a 3000 g por 5 minutos, e os sobrenadantes eram colhidos e armazenados a -20°C até a sua dosagem. Os eritrócitos eram resuspensos em solução fisiológica a 0,9% e reinfundidos nos animais. Amostras de sangue para determinação de insulina, lípidos e NOx eram coletadas antes da infusão dos fármacos e 45 minutos após, quando o CLAMP era iniciado. A partir de então, as amostras eram coletadas aos 90, 105 e 120 minutos durante o CLAMP. As amostras para determinação da glicose sérica (25 μL) eram coletadas antes da infusão dos fármacos, ao início do CLAMP e a partir de então a cada 5 minutos. Amostras de sangue para determinação do hematócrito foram colhidas após o implante cirúrgico dos cateteres, antes do início e ao término do CLAMP.

2.6) GRUPOS EXPERIMENTAIS

Cada um dos grupos de dietas (HO, NR e HR) foram divididos em 4 sub-grupos experimentais:

- 1) Bloqueio do sistema nervoso simpático,
- 2) Estimulação da via L-arginina / óxido nítrico com a infusão de L-arginina,
- 3) D-arginina, onde se infundia D-arginina (DA)

4) Grupo controle, o qual recebia apenas solução fisiológica a 0,9%.

5) Além disso, foi estudado um 5º grupo apenas em dieta HR. Este grupo recebeu bloqueador de canal de cálcio.

Para a inibição do SNS foi usada uma injeção em bolus de antagonista alfa 1 (prazosin 1 mg/kg PC, iv – Sigma, USA) e de um beta bloqueador (propranolol 5 mg/kg PC, ip – Sigma, USA). Para a estimulação da via L-arginina / óxido nítrico foi usada a injeção em bolus de L-arginina (300 mg/kg PC, iv – Ajinomoto, Brasil). Como controle do grupo experimental LA, um grupo similar de animais recebeu a injeção em bolus de D-arginina (300 mg/kg PC, iv – Sigma, USA), ao invés de LA. Todos os fármacos utilizados foram administrados 45 minutos antes do início do CLAMP. Uma vez que houve uma redução intensa da PA nos animais HR em resposta ao bloqueio do SNS, outro grupo de ratos em dieta HR recebeu a infusão de diltiazem (100 mg/kg PC iv – Baldacci, Brasil), o qual foi administrado 45 minutos antes do início do CLAMP com o objetivo de verificar se os resultados observados nos ratos sob dieta HR e nos quais foi realizado o bloqueio do SNS foram decorrentes da redução da PA ou do bloqueio do SNS. Para visualização do protocolo experimental vide Figura 1.

2.7) DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

2.7.1) Determinação do nitrato e nitrito plasmáticos

Os níveis de NO_x plasmático foram determinados pela reação de Griess⁵⁹ após o tratamento das amostras com nitrato redutase.

2.7.2) Determinação da glicemia e insulinemia

A concentração de glicose sérica foi medida por meio de fitas reagentes (Advantage, Roche Diagnostics Corporation) usando um "glucometer" (Advantage, Boehringer Mannheim). A insulina sérica foi medida por radioimunoensaio descrito inicialmente por Yalow e Berson⁶⁰, utilizando os "kits" para insulina humana e insulina de rato (Diagnostic Products Corporation para insulina humana e Linco Research Inc. para insulina de rato). As amostras de sangue dos grupos 1 (Bloqueio do SNS) e 4 (veículo) foram dosadas por kit de insulina humana e os grupos 2 (LA) e 3 (DA) e 5 (diltiazem) foram medidas por kit de insulina de rato.

2.7.3) Determinação dos lípides plasmáticos

Os lípides plasmáticos (colesterol total e triacilgliceróis - TAG) foram determinados por "kit" (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA.).

2.8) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. A comparação entre 2 médias foi feita pelo teste *t* de Student não pareado e entre 3 ou mais médias por análise de variância de um fator (one-way ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Hipótese nula foi rejeitada quando o valor de $p < 0,05$. Análise de variância de dois fatores (two-way ANOVA) foi utilizada para avaliar o efeito da dieta e do tempo na evolução ponderal dos três grupos de animais em dietas HO, NR

e HR. Análise de regressão linear foi realizada para se avaliar a existência de uma associação entre os valores de NOx e captação de glicose.

FIGURA 1. Protocolo experimental – Ratos Wistar machos que receberam desde o desmame as dietas hipo, normo ou hipersódica e ao completarem 12 semanas eram submetidos à medida de pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC). Cada grupo de ratos recebia prazosin e propranolol, veículo, L-arginina ou D-arginina. Após o tratamento farmacológico o clamp euglicêmico hiperinsulinêmico era realizado.

CLAMP EUGLICÊMICO HIPERINSULINÊMICO

Figura 2. Clamp euglicêmico hiperinsulinêmico, demonstrando os fármacos utilizados no protocolo e coletas de sangue para a determinação de insulinemia, glicemia, nitrato e nitrito e lípides plasmáticos.

3) RESULTADOS

3.1) RESULTADOS GERAIS

Na Tabela 1 estão os resultados de PC, glicemia, PA sistólica (PAS), PA diastólica (PAD), FC, colesterol, TAG e hematócrito realizados antes da infusão das drogas (prazosin, propranolol, L-arginina, D-arginina ou diltiazem) em cada grupo de dieta. Uma vez que não foram encontradas diferenças entre os grupos controle e experimental no momento basal em cada dieta, os resultados dos grupos veículo, bloqueio do SNS, D-arginina e L-arginina foram agrupados para a avaliação do efeito do conteúdo de sal na dieta sobre as variáveis analisadas.

O PC foi maior ($p<0,001$) em ratos em dieta HO (401 ± 11 g, $n=24$) comparado às dietas NR (367 ± 11 g, $n=24$) e HR (356 ± 13 g, $n=24$). O PC também foi maior ($p<0,01$) nos animais em dieta NR comparados àqueles em dieta HR. (Figura 3) O PC medido imediatamente antes da realização do CLAMP, três a cinco dias após o implante cirúrgico dos cateteres, foi semelhante ao PC na situação basal. No início do CLAMP maior ($p<0,001$) PC foi observado entre os animais em dieta HO (397 ± 16 g, $n=24$) comparado às dietas NR (360 ± 14 g, $n=24$) e HR (350 ± 13 g, $n=24$). O PC também foi maior ($p<0,05$) nos animais em dieta NR comparados àqueles em

dieta HR. (Figura 4) A perda de peso foi quantificada para avaliar o efeito do procedimento cirúrgico para o implante dos cateteres sobre o estado geral do animal no início do CLAMP. A perda de peso medida após a cirurgia não foi diferente ($p>0,05$) entre os grupos HO (9 ± 6 g, $n=24$), NR (10 ± 6 g, $n=24$) e HR (12 ± 7 g, $n=24$).

FIGURA 3. Peso corpóreo medido em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR) previamente ao implante cirúrgico dos cateteres na 12^a semana de vida.

FIGURA 4. Peso corpóreo medido antes da realização do clamp euglicêmico hiperinsulinêmico em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR).

O hematócrito foi medido imediatamente após a cirurgia para o implante dos cateteres com o objetivo de verificar se houve interferência do procedimento cirúrgico sobre seus valores. O hematócrito foi medido antes do início e ao término do CLAMP. Assim, o hematócrito medido imediatamente após a cirurgia foi maior nos animais sob dieta HO ($49 \pm 3\%$, $n=24$), do que sob dieta NR ($48 \pm 2\%$, $p<0,05$, $n=24$) e HR ($46 \pm 2\%$, $p<0,001$, $n=24$). (Figura 5) Ao início do CLAMP, o hematócrito foi maior ($p<0,05$) nos animais em dieta HO ($48 \pm 5\%$, $n=24$) comparados àqueles em dieta HR ($46 \pm 4\%$, $n=24$), sem diferença em relação aos animais em dieta NR ($47 \pm 4\%$, $n=24$). Ao término do CLAMP os animais em dieta HO apresentaram menor ($p<0,05$) valor de hematócrito comparado aos valores previamente observados ao início do CLAMP, entretanto, os valores finais de hematócrito não foram diferentes ($p>0,05$) entre as três dietas (HO - $46 \pm 3\%$, $n=24$, NR - $45 \pm 5\%$, $n=24$, HR - $45 \pm 5\%$, $n=24$).

A glicemia basal foi maior ($p<0,001$) na dieta HO (101 ± 9 mg/dL, $n=24$), do que na dieta NR (87 ± 7 mg/dL, $n=24$) e HR (85 ± 8 mg/dL, $n=24$). (Figura 6)

A PAS basal foi maior ($p<0,001$) nos animais que receberam a dieta HR (142 ± 9 mmHg, $n=24$) do que na dieta NR (126 ± 8 mmHg, $n=24$) e HO (118 ± 9 mmHg, $n=24$). Também foi observado um maior ($p<0,01$) valor de PAS na dieta NR em comparação à dieta HO. (Figura 7)

A PAD basal foi maior ($p<0,001$) na dieta HR (108 ± 12 mmHg, $n=24$) do que na dieta NR (92 ± 8 mmHg, $n=24$) e HO (84 ± 8 mmHg, $n=24$). A PAD também foi maior ($p<0,05$) nos ratos em dieta NR em comparação aos que receberam dieta HO. (Figura 8)

FIGURA 5. Hematócrito basal medido após o implante cirúrgico de cateteres em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR).

FIGURA 6. Glicemia basal em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR).

FIGURA 7. Pressão arterial sistólica basal em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR).

FIGURA 8. Pressão arterial diastólica basal em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR.).

FIGURA 9. Freqüência cardíaca basal em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR).

Também foi observado maior ($p < 0,001$) valor de FC em animais em dieta HO (374 ± 16 bpm, $n=24$) em comparação aqueles em dieta NR (355 ± 14 bpm, $n=24$) e HR (337 ± 13 bpm, $n=24$). (Figura 9)

Maiores concentrações plasmáticas de colesterol foram observadas em animais em dieta HO (85 ± 10 mg/dL, $n=24$) em comparação aos ratos em dieta NR (74 ± 11 mg/dL, $p < 0,05$ vs HO, $n=24$) e HR (66 ± 12 mg/dL, $p < 0,001$ vs HO, $n=24$). (Figura 10) A restrição salina também esteve associada com maior ($p < 0,001$) concentração plasmática de TAG na dieta HO (91 ± 11 mg/dL, $n=24$) do que na dieta NR (74 ± 13 mg/dL, $n=24$) e HR (69 ± 11 mg/dL, $n=24$). (Figura 11)

A análise de two-way ANOVA mostrou o efeito do tempo ($p < 0,0001$) e do consumo de sal ($p < 0,0001$) sobre o peso corporal. (Figura 12)

FIGURA 10. Colesterol total plasmático basal em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR).

FIGURA 11. Triacilgliceróis plasmáticos basais em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR).

TABELA 1. Peso corpóreo, pressão arterial e variáveis bioquímicas em ratos Wistar machos com 12 semanas de idade submetidos à dieta hipo, normo ou hipersódica.

Variável	HO	NR	HR
	(n=24)	(n=24)	(n=24)
Peso corpóreo (g)	401±11 *	367±11	356±13 #
Glicemia (mg/dL)	101±9 *	87±7	85±8
PAS (mmHg)	118±9 *	126±8	142±9 #
PAD (mmHg)	84±8 *	92±8	108±12 #
FC (bpm)	374±16 *	355±14	337±13 #
Hematócrito (%)	49±3 *	48±2	46±2
Colesterol total (mg/dL)	85±10 *	74±11	66±12
Triacilgliceróis (mg/dL)	91±11 *	74±13	69±11

PAS - pressão arterial sistólica, PAD - pressão arterial diastólica, FC - frequência cardíaca. Os dados estão representados como média ± desvio padrão da média. As diferenças foram expressas como $p < 0,05$.

* $p < 0,05$ vs NR e HR, # $p < 0,05$ vs NR.

FIGURA 12. Efeito da dieta e do tempo de consumo das mesmas sobre o peso corpóreo de animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR) desde o desmame até a 12^a semana de vida.

3.2) BLOQUEIO DO SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO

3.2.1) Grupo veículo (controle)

Como pode ser observado na tabela 2, a glicose sérica basal não foi diferente ($p>0,05$) no grupo de animais que recebeu a dieta HO (98 ± 7 mg/dL, $n=6$), NR (91 ± 6 mg/dL, $n=6$) e HR (91 ± 6 mg/dL, $n=6$). A infusão de veículo não influenciou ($p>0,05$) a concentração plasmática de glicose ao início do CLAMP. Antes do início do CLAMP os valores de glicemia não foram diferentes ($p>0,05$) entre as dietas HO (98 ± 7 mg/dL, $n=6$), NR (90 ± 5 mg/dL, $n=6$) e HR (90 ± 5 , $n=6$). O SSBG não foi diferente ($p>0,05$) dos valores basais e entre os grupos de dietas, mantendo valores semelhantes aos previamente observados. Durante o SSBG os valores encontrados para a glicemia foram: na dieta HO (102 ± 4 mg/dL, $n=6$) em comparação aos animais que receberam as dietas NR (92 ± 5 mg/dL, $n=6$) e HR (94 ± 4 mg/dL, $n=6$). (Figura 13)

A insulinemia basal foi maior ($p<0,05$) na dieta HO ($84,1\pm20,2$ pmol/L, $n=6$), em comparação a dieta NR ($56,1\pm18,3$ pmol/L, $n=6$) e HR ($53,5\pm16,9$ pmol/L, $n=6$). (Figura 14) A infusão de veículo não influenciou a insulinemia antes do início do CLAMP, mantendo as diferenças previamente observadas. A insulinemia antes do CLAMP foi maior ($p<0,05$) na dieta HO ($84,1\pm24,8$ pmol/L, $n=6$), do que na dieta NR ($54,8\pm15,0$ pmol/L, $n=6$) e HR ($53,1\pm16,3$ pmol/L, $n=6$). (Figura 15) Ao término do CLAMP ou durante o SSPI, não foi observada diferença ($p>0,05$) na insulinemia entre as dietas. Os valores encontrados para a insulinemia no SSPI foram: na dieta HO ($469,6\pm58,7$ pmol/L, $n=6$), NR ($463,0\pm65,2$ pmol/L, $n=6$) e HR ($456,5\pm52,2$ pmol/L, $n=6$). (Figura 16)

Nos ratos que receberam veículo a captação de glicose foi menor ($p<0,001$) nos animais em dieta HO ($3,5\pm2,0 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $n=6$) do que naqueles em dieta NR ($11,6\pm2,2 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $n=6$) e HR ($21,8\pm2,9 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $n=6$). Os animais em dieta NR também apresentaram menor ($p<0,001$) captação de glicose do que aqueles em dieta HR. (Figura 17)

Como pode ser visto na tabela 3, a PAS basal foi maior na dieta HR ($144\pm4 \text{ mmHg}$, $n=6$) em comparação a dieta HO ($115\pm10 \text{ mmHg}$, $p<0,001$, $n=6$) e NR ($127\pm6 \text{ mmHg}$, $p<0,01$, $n=6$). A PAS também foi maior ($p<0,05$) na dieta NR em comparação a dieta HO. A infusão de veículo não influenciou ($p>0,05$) a PAS ao início do CLAMP, mantendo-se maior nos animais em dieta HR ($144\pm11 \text{ mmHg}$, $n=6$) em comparação aos animais em dieta HO ($115\pm12 \text{ mmHg}$, $p<0,001$, $n=6$) e NR ($126\pm8 \text{ mmHg}$, $p<0,05$, $n=6$). Ao final do CLAMP a PAS manteve-se maior nos animais em dieta HR ($141\pm4 \text{ mmHg}$, $n=6$), do que na dieta NR ($122\pm10 \text{ mmHg}$, $p<0,01$, $n=6$) e HO ($113\pm7 \text{ mmHg}$, $p<0,001$, $n=6$). (Figura 18)

A PAD basal foi maior na dieta HR ($110\pm3 \text{ mmHg}$, $n=6$) do que nas dietas HO ($84\pm8 \text{ mmHg}$, $p<0,001$, $n=6$) e NR ($97\pm10 \text{ mmHg}$, $p<0,01$, $n=6$). Também foi observada maior ($p<0,05$) PAD na dieta NR do que na dieta HO. Ao início do CLAMP a PAD foi maior ($p<0,01$) na dieta HR ($108\pm10 \text{ mmHg}$, $n=6$) do que na dieta HO ($82\pm12 \text{ mmHg}$, $n=6$), sem diferença ($p>0,05$) em relação à dieta NR ($94\pm9 \text{ mmHg}$, $n=6$). No final do CLAMP as diferenças previamente observadas entre os valores de PAD comparados aos valores basais estavam mantidas, com maiores valores na dieta HR ($107\pm10 \text{ mmHg}$, $n=6$) comparados às dietas NR ($90\pm11 \text{ mmHg}$, $p<0,05$, $n=6$) e HO ($84\pm9 \text{ mmHg}$, $p<0,01$, $n=6$). (Figura 19)

A FC basal foi maior na dieta HO (384 ± 13 bpm, $n=6$) do que na dieta HR (338 ± 9 bpm, $p < 0,001$, $n=6$), e NR (361 ± 18 bpm, $p < 0,05$, $n=6$). Também se constatou maior ($p < 0,05$) FC basal na dieta NR comparada à HO. Após a infusão de veículo, a FC manteve-se maior na dieta HO (380 ± 19 bpm, $n=6$) no início do CLAMP em comparação a dieta HR (327 ± 11 bpm, $p < 0,001$, $n=6$), e NR (352 ± 17 bpm, $p < 0,05$, $n=6$). Também foi encontrado maior ($p < 0,05$) valor de FC na dieta NR do que na dieta HR. Ao término do CLAMP, a infusão de veículo não influenciou ($p > 0,05$) a FC, mantendo os maiores valores nos ratos que receberam dieta HO (379 ± 12 bpm, $n=6$) em comparação àqueles que receberam dieta HR (325 ± 12 , $p < 0,001$, $n=6$) e NR (364 ± 10 bpm, $p < 0,05$, $n=6$). Também foi observada maior ($p < 0,001$) FC na dieta NR do que na dieta HR. (Figura 20)

Como pode ser visto na tabela 2, a concentração plasmática basal do colesterol total foi maior ($p < 0,05$) nos ratos que receberam dieta HO (71 ± 7 mg/dL, $n=6$), comparados àqueles que receberam dieta HR (55 ± 8 mg/dL, $n=6$), sem diferença ($p > 0,05$) em relação aos animais em dieta NR (65 ± 7 mg/dL, $n=6$). A colesterolemia total ao início do CLAMP foi maior ($p < 0,05$) nos ratos que receberam dieta HO (70 ± 9 mg/dL, $n=6$), comparados àqueles que receberam dieta HR (55 ± 9 mg/dL, $n=6$), sem diferença em comparação aos animais em dieta NR (66 ± 8 mg/dL, $n=6$), mostrando que a infusão de veículo não influenciou a colesterolemia. Ao término do CLAMP não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) quanto a colesterolemia comparados aos valores basais. Maior ($p < 0,05$) concentração plasmática de colesterol total também foi encontrada nos ratos que receberam restrição salina (HO: 73 ± 7 mg/dL, $n=6$) comparados àqueles que

receberam sobrecarga salina (HR: 56 ± 7 mg/dL, $n=6$), sem diferença em comparação aos ratos em dieta NR (64 ± 9 mg/dL, $n=6$). (Figura 21)

A concentração plasmática basal dos TAG foi maior ($p < 0,05$) nos ratos que receberam dieta HO (92 ± 8 mg/dL, $n=6$), comparados àqueles que receberam dieta NR (71 ± 11 mg/dL, $n=6$) e HR (74 ± 7 mg/dL, $n=6$). A concentração plasmática dos TAG ao início do CLAMP foi maior ($p < 0,05$) nos ratos que receberam dieta HO (87 ± 7 mg/dL, $n=6$), do que naqueles que receberam dieta HR (70 ± 8 mg/dL, $n=6$), sem diferença ($p > 0,05$) em comparação aos animais em dieta NR (71 ± 10 mg/dL, $n=6$). Os TAG plasmáticos ao término do CLAMP foram maiores ($p < 0,05$) nos ratos que receberam dieta HO (86 ± 8 mg/dL, $n=6$), comparados àqueles que receberam dieta HR (68 ± 9 mg/dL, $n=6$), sem diferença ($p > 0,05$) em relação aos animais em dieta NR (70 ± 10 mg/dL, $n=6$), mostrando que a infusão de veículo não influenciou a concentração plasmática de TAG. (Figura 22)

TABELA 2 Glicemia, insulinemia, captação de glicose e a concentração plasmática de colesterol total (COL) e triacilgliceróis (TAG) em ratos submetidos a dieta hipo (HO), mormo (NR) e hipersódica desde o desmame até a idade adulta que receberam o bloqueio do sistema nervoso simpático (BSNS) ou a infusão de veículo.

Variável	HO		NR		HR	
	Veículo (n=6)	BSNS (n=6)	Veículo (n=6)	BSNS (n=6)	Veículo (n=6)	BSNS (n=6)
Glicemia (mg/dL)						
Basal	98±7	107±7 *	91±6	90±5	91±6	90±7
Antes do CLAMP	98±7	110±7 *	90±5	94±6	90±5	94±6
SSBG	102±4 *	106±7 *	92±5	90±5	94±4	93±6
Insulina (pmol/L)						
Basal	84,1±20,2 *	88,4±16,8 *	56,1±18,3	55,4±16,3	53,5±16,9	54,8±19,6
Antes do CLAMP	84,1±24,8 *	56,3±16,1	54,8±15,0	51,5±16,9	52,8±16,3	49,6±15,6
SSPI	469,6±58,7	456,5±71,7	463,0±65,2	443,5±58,7	456,5±52,2	463,0±80,2
Captação de glicose (mg.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	3,5±2,0 *	10,1±2,4	11,6±2,2	9,3±2,3	21,8±2,9 #	9,5±2,9
COL (mg/dL)						
Basal	71±7 +	74±9 +	65±7	63±8	55±8	56±6
Antes do CLAMP	70±9 +	73±9 +	66±8	65±8	55±9	58±10
Final do CLAMP	73±7 +	70±10 +	64±9	61±9	56±7	55±8
TAG (mg/dL)						
Basal	92±8 *	89±12 +	71±11	72±14	74±7 #	70±13
Antes do CLAMP	87±7 +	85±12 +	71±10	67±9	70±8	62±9
Final do CLAMP	86±8 +	76±8	70±10	71±6	68±9	70±8

CLAMP - clamp euglicêmico hiperinsulinêmico SSBG – “steady state” da glicose plasmática, (SSPI) - “steady state” insulina plasmática

Os dados estão representados como média ± desvio padrão da média. As diferenças estão expressas como p<0,05.

* p<0,05 vs NR e HR, # p<0,05 vs NR, + p<0,05 vs HR,

FIGURA 13. Valores de glicemia dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos veículo e sob bloqueio do SNS (bl) avaliados nos momentos basal (-45 minutos), antes do CLAMP (0 minutos) e SSBG (120 minutos).

FIGURA 14. Insulina plasmática basal em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR) nos grupos veículo ou ao bloqueio do sistema nervoso simpático (bl).

FIGURA 15. Efeito da infusão de veículo ou do bloqueio do sistema nervoso simpático (bl) sobre a insulinemia plasmática antes do início do CLAMP em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR).

FIGURA 16. Valores de insulina plasmática dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos veículo e sob bloqueio do SNS (bl) avaliados nos momentos basal antes do CLAMP (0 minutos) e SSBG (120 minutos).

FIGURA 17. Efeito da dieta e da infusão de veículo ou do bloqueio do sistema nervoso simpático (bl) sobre a captação periférica de glicose em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR).

FIGURA 18. Valores de pressão arterial sistólica dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos veículo e sob bloqueio do SNS (bl) avaliados nos momentos basal (-45min) antes do CLAMP (0 minutos) e final do CLAMP (120 minutos).

Tabela 3. Pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca em ratos submetidos a dieta hipossódica (HO), mormossódica (NR) e hipersódica desde o desmame até a idade adulta após o bloqueio do sistema nervoso simpático (BSNS) ou infusão de veículo.

Variável	HO		NR		HR	
	Veículo (n=6)	BSNSB (n=6)	Veículo (n=6)	BSNS (n=6)	Veículo (n=6)	BSNS (n=6)
PAS (mmHg)						
Basal	115±10 *	117±4 * §	127±6	123±6	144±2 #	143±4 # §
Antes do CLAMP	115±12 +	105±7 #	126±8	118±6	144±11 #	96±5 #
Final do CLAMP	113±7 +	102±3	122±10	108±11	141±4 #	108±4 §
PAD (mmHg)						
Basal	84±8 *	85±7 +	97±10	95±8	110±3 #	111±5 # §
Antes do CLAMP	82±12 +	86±10 +	94±9	90±7	108±10 #	72±4 #
Final do CLAMP	84±9 +	80±6 +	90±11	81±9	107±10 #	96±5 # §
FC (bpm)						
Basal	384±13 *	381±12 *	361±18	364±5 §	338±9 #	337±10 #
Antes do CLAMP	380±19 *	§	352±17	353±7	327±11 #	§
Final do CLAMP	379±6 *	338±16 +	364±10	346±9	325±12 #	293±20 #
		302±23 #				306±12 #
		§				

Os dados estão representados como média ± desvio padrão da média. As diferenças estão expressas como p<0,05.

* p<0,05 vs NR e HR, # p<0,05 vs NR, + p<0,05 vs HR, § p<0,05 vs antes do CLAMP.

FIGURA 19. Valores de pressão arterial diastólica dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos veículo e sob bloqueio do SNS (bl) avaliados nos momentos basal (-45minutos) antes do CLAMP (0 minutos) e final do CLAMP (120 minutos).

FIGURA 20. Valores de frequência cardíaca dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos veículo e sob bloqueio do SNS (bl) avaliados nos momentos basal(-45minutos) antes do CLAMP (0 minutos) e final do CLAMP (120 minutos).

FIGURA 21. Valores de colesterol plasmático total dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos veículo e sob bloqueio do SNS (bl) avaliados nos momentos basal(-45minutos) antes do CLAMP (0 minutos) e final do CLAMP (120 minutos).

FIGURA 22. Valores de triacilgliceróis plasmático dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos veículo e sob bloqueio do SNS (bl) avaliados nos momentos basal(-45minutos) antes do CLAMP (0 minutos) e final do CLAMP (120 minutos).

3.2.2) Grupo bloqueio do sistema nervoso simpático

Como pode ser observado na Tabela 2, a glicose sérica basal foi maior ($p < 0,01$) nos animais que receberam a dieta HO (107 ± 7 mg/dL, $n=6$) do que na dieta NR (90 ± 5 mg/dL, $n=6$) e HR (90 ± 7 mg/dL, $n=6$). O bloqueio do SNS não influenciou ($p > 0,05$) a concentração plasmática de glicose ao início do CLAMP. Antes do início do CLAMP os valores de glicemia foram maiores ($p < 0,01$) na dieta HO (110 ± 7 mg/dL, $n=6$) do que na dieta NR (94 ± 6 mg/dL, $n=6$) e HR (94 ± 6 mg/dL, $n=6$). O SSBG não foi diferente ($p > 0,05$) dos valores basais entre os grupos de dietas, mantendo as diferenças previamente observadas entre os grupos, sendo maior ($p < 0,01$) na dieta HO (106 ± 7 mg/dL, $n=6$) do que nas dietas NR (90 ± 5 mg/dL, $n=6$) e HR (93 ± 6 mg/dL, $n=6$). (Figura 13)

A insulinemia basal foi maior ($p < 0,05$) na dieta HO ($87,4 \pm 22,8$ pmol/L, $n=6$), do que na dieta NR ($55,4 \pm 16,3$ pmol/L, $n=6$) e HR ($54,8 \pm 19,6$ pmol/L, $n=6$). (Figura 14) O bloqueio do SNS promoveu a redução ($p < 0,05$) da insulinemia nos animais em dieta HO antes do início do CLAMP, corrigindo a diferença previamente existente entre as dietas. Assim, a insulinemia antes do CLAMP na dieta HO ($56,3 \pm 16,1$ pmol/L, $n=6$) foi semelhante à dieta NR ($53,5 \pm 16,9$ pmol/L, $n=6$) e HR ($49,6 \pm 15,6$ pmol/L, $n=6$). (Figura 15) Ao término do CLAMP ou durante o SSPI a insulinemia não foi diferente entre as dietas. Os valores apresentados para a insulinemia ao término do CLAMP foram na dieta HO ($456,5 \pm 71,7$ pmol/L, $n=6$), NR ($443,5 \pm 58,7$ pmol/L, $n=6$) e HR ($463,0 \pm 80,2$ pmol/L, $n=6$). (Figura 16)

Nos ratos sob o bloqueio do SNS a captação de glicose não foi diferente ($p > 0,05$) entre as três dietas, corrigindo o efeito do sal previamente observado nos animais controle. Os valores encontrados para a captação de glicose foram: HO

($10,1 \pm 2,4 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $n=6$), NR ($9,3 \pm 2,3 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $n=6$) e HR ($9,5 \pm 2,9 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $n=6$). Este efeito sugere que a inibição do SNS melhora a SI. (Figura 17)

Como pode ser visto na tabela 3 a PAS basal foi maior ($p<0,001$) na dieta HR ($144 \pm 11 \text{ mmHg}$, $n=6$) em comparação a dieta HO ($115 \pm 10 \text{ mmHg}$, $n=6$) e NR ($127 \pm 9 \text{ mmHg}$, $n=6$). O bloqueio do SNS promoveu a redução da PAS no início do CLAMP nos animais em dieta HO ($105 \pm 7 \text{ mmHg}$, $p<0,01$ vs basal, $n=6$) e HR ($96 \pm 5 \text{ mmHg}$ vs basal, $p<0,001$, $n=6$), mantendo-se maior nos animais em dieta NR ($118 \pm 6 \text{ mmHg}$, $n=6$) do que nos animais em dieta HR ($p<0,001$ vs NR) e HO ($p<0,01$ vs NR). Ao final do CLAMP a PAS não foi diferente ($p>0,05$) entre os animais nas três dietas. Os valores de PAS ao final do CLAMP foram: dieta HR ($102 \pm 5 \text{ mmHg}$, $n=6$), NR ($108 \pm 11 \text{ mmHg}$, $n=6$) e HO ($108 \pm 4 \text{ mmHg}$, $n=6$). (Figura 18)

A PAD basal foi maior na dieta HR ($111 \pm 5 \text{ mmHg}$, $n=6$) em comparação às dietas HO ($85 \pm 7 \text{ mmHg}$, $p<0,001$, $n=6$) e NR (95 ± 8 , $p<0,01$, $n=6$). O bloqueio do SNS promoveu a redução ($p<0,001$) dos valores de PAD no início do CLAMP apenas nos animais em dieta HR. Assim, a PAD no início do CLAMP, foi menor na dieta HR ($72 \pm 4 \text{ mmHg}$, $n=6$) do que nas dietas NR ($90 \pm 7 \text{ mmHg}$, $p<0,01$, $n=6$) e HO ($86 \pm 10 \text{ mmHg}$, $p<0,05$, $n=6$). O bloqueio do SNS reduziu os valores de PAD nas dietas NR ($p<0,05$) e HR ($p<0,01$) comparada aos valores basais. No final do CLAMP, a PAD foi menor ($p<0,01$) nos animais em dieta HR ($96 \pm 5 \text{ mmHg}$, $n=6$) comparados às dietas NR ($81 \pm 9 \text{ mmHg}$, $n=6$) e HO ($73 \pm 6 \text{ mmHg}$, $n=6$). Estes resultados demonstram o efeito do bloqueio do SNS sobre a PAD. (Figura 19)

A FC basal foi maior na dieta HO ($381 \pm 12 \text{ bpm}$, $n=6$) do que na dieta NR ($364 \pm 5 \text{ bpm}$, $p<0,05$, $n=6$) e HR ($337 \pm 10 \text{ bpm}$, $p<0,001$, $n=6$). Após o bloqueio do

SNS, no início do CLAMP a FC foi menor nas dietas HO ($p<0,05$ vs basal), NR ($p<0,05$ vs basal) e HR ($p<0,001$ vs basal). No início do CLAMP a FC foi menor ($p<0,001$) na dieta HR (293 ± 20 bpm, $n=6$) com relação à dieta HO (338 ± 16 bpm, $n=6$) e NR (353 ± 7 bpm, $n=6$). Ao término do CLAMP o bloqueio do SNS reduziu a FC nos ratos em dieta HO ($p<0,001$ vs basal), NR ($p<0,01$ vs basal) e HR ($p<0,01$ vs basal). Ao término do CLAMP a FC foi maior ($p<0,???$) na dieta NR (346 ± 9 bpm, $n=6$) em comparação às dietas HO (302 ± 23 bpm, $n=6$) e HR (306 ± 12 bpm, $n=6$). (Figura 20)

Como pode ser visto na tabela 2 a concentração plasmática basal do colesterol total foi maior ($p<0,05$) nos ratos que receberam dieta HO (74 ± 9 mg/dL, $n=6$), comparados àqueles que receberam dieta HR (56 ± 6 mg/dL, $n=6$), sem diferença em comparação aos animais em dieta NR (63 ± 8 mg/dL, $n=6$). A colesterolemia total no início do CLAMP foi maior ($p<0,05$) nos ratos que receberam dieta HO (73 ± 9 mg/dL, $n=6$), do que os que receberam dieta HR (58 ± 10 mg/dL, $n=6$), sem diferença em relação aos animais em dieta NR (65 ± 8 mg/dL, $n=6$), mostrando que o bloqueio do SNS não influenciou a colesterolemia. Ao término do CLAMP não foram observadas diferenças ($p>0,05$) na colesterolemia comparada aos valores basais. Maior ($p<0,05$) concentração plasmática de colesterol total também foi encontrada nos ratos que receberam restrição salina (HO: 70 ± 10 mg/dL, $n=6$) comparados àqueles que receberam sobrecarga salina (HR: 55 ± 8 mg/dL, $n=6$), sem diferença em relação aos ratos em dieta NR (61 ± 9 mg/dL, $n=6$). (Figura 21)

A concentração plasmática basal dos TAG foi maior ($p<0,05$) nos ratos que receberam dieta HO (88 ± 13 mg/dL, $n=6$), comparados àqueles que receberam dieta

HR (63 ± 12 mg/dL, $n=6$), sem diferença em comparação aos animais em dieta NR (69 ± 9 mg/dL, $n=6$). A concentração plasmática dos TAG no início do CLAMP foi maior ($p < 0,05$) nos ratos que receberam dieta HO (85 ± 12 mg/dL, $n=6$), comparados àqueles que receberam dieta HR (62 ± 9 mg/dL, $n=6$), sem diferença em relação aos animais na dieta NR (67 ± 9 mg/dL, $n=6$). O bloqueio do SNS promoveu redução ($p < 0,05$) dos TAG plasmáticos ao término do CLAMP comparado aos valores basais nos animais em dieta HO. Ao término do CLAMP não foi observada diferença ($p > 0,05$) entre os valores de TAG nas dietas HO (73 ± 8 mg/dL, $n=6$), NR (70 ± 10 mg/dL, $n=6$) e HR (68 ± 9 mg/dL, $n=6$). Estes resultados sugerem que o bloqueio do SNS corrigiu o efeito do sal sobre a concentração plasmática de TAG. (Figura 22)

3.INFUSÃO DE ARGININA

3.3.1) Grupo D-arginina

Como pode ser observado na Tabela 4, a glicose sérica basal foi maior nos animais que receberam a dieta HO (96 ± 7 mg/dL, $n=6$) do que na dieta NR (84 ± 8 mg/dL, $p < 0,05$, $n=6$) e HR (81 ± 7 mg/dL, $p < 0,01$, $n=6$). A infusão de DA não influenciou ($p > 0,05$) a concentração plasmática de glicose no início do CLAMP. Antes do início do CLAMP os valores de glicemia foram maiores ($p < 0,05$) na dieta HO (95 ± 9 mg/dL, $n=6$) do que na dieta NR (83 ± 9 mg/dL, $n=6$) e HR (80 ± 5 mg/dL, $n=6$). O SSBG não foi diferente ($p > 0,05$) dos valores basais nos três grupos de dietas, mantendo as diferenças previamente observadas entre os grupos, sendo maior na dieta HO (96 ± 6 mg/dL, $n=6$) em comparação aos animais que receberam as dietas NR (84 ± 9 mg/dL, $p < 0,05$, $n=6$) e HR (82 ± 5 mg/dL, $p < 0,01$, $n=6$). (Figura 23)

A insulinemia basal foi maior ($p < 0,01$) na dieta HO (485 ± 87 pmol/L, $n=6$), em comparação à dieta HR (312 ± 78 , $n=6$), sem diferença com relação à dieta NR (389 ± 53 pmol/L, $n=6$). (Figura 24) DA não influenciou a insulinemia antes do início do CLAMP, mantendo as diferenças previamente observadas. A insulinemia antes do CLAMP foi maior ($p < 0,01$) na dieta HO (474 ± 78 pmol/L, $n=6$), do que na dieta HR (309 ± 62 pmol/L, $n=6$), sem diferença em relação à dieta NR (393 ± 61 pmol/L, $n=6$). (Figura 25) A infusão de DA também não influenciou a insulinemia ao término do CLAMP ou durante o SSPI, com maior concentração nos animais tratados com dieta HO (1287 ± 146 pmol/L, $n=6$), em comparação aos animais em dieta HR (994 ± 112 pmol/L, $n=6$), sem diferença em comparação ao grupo de ratos em dieta NR (1198 ± 158 pmol/L, $n=6$). (Figura 26)

Nos ratos que receberam DA, a captação de glicose foi menor ($p<0,001$) nos animais em dieta HO ($3,5\pm2,0 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $n=6$) do que naqueles em dieta NR ($11,6\pm2,2 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $n=6$) e HR ($21,8\pm2,9 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $n=6$). Os animais em dieta NR também apresentaram menor ($p<0,001$) captação de glicose do que àqueles em dieta HR. (Figura 27)

Como pode ser visto na tabela 5 a PAS basal foi maior na dieta HR ($138\pm9 \text{ mmHg}$, $n=6$) do que na dieta HO ($120\pm7 \text{ mmHg}$, $p<0,01$, $n=6$) e NR ($126\pm6 \text{ mmHg}$, $p<0,05$, $n=6$). A infusão de DA não influenciou ($p>0,05$) a PAS ao início do CLAMP, mantendo-se maior nos animais em dieta HR ($138\pm7 \text{ mmHg}$, $n=6$) em comparação aos animais em dieta HO ($120\pm5 \text{ mmHg}$, $p<0,001$, $n=6$) e NR ($126\pm6 \text{ mmHg}$, $p<\pm0,05$, $n=6$). Ao final do CLAMP, a PAS manteve-se maior ($p<0,001$) nos animais em dieta HR ($140\pm4 \text{ mmHg}$, $n=6$) em comparação aos animais em dieta NR ($126\pm5 \text{ mmHg}$, $n=6$) e HO ($121\pm6 \text{ mmHg}$, $n=6$). (Figura 28)

A PAD basal foi maior na dieta HR ($104\pm10 \text{ mmHg}$, $n=6$) do que nas dietas HO ($87\pm6 \text{ mmHg}$, $p<0,01$, $n=6$) e NR ($88\pm9 \text{ mmHg}$, $p<0,05$, $n=6$). A infusão de DA não influenciou ($p>0,05$) a PAD ao início do CLAMP, com maiores valores nas dietas HR ($102\pm11 \text{ mmHg}$, $n=6$) do que nas dietas NR ($87\pm6 \text{ mmHg}$, $p<0,05$, $n=6$) e HO ($88\pm6 \text{ mmHg}$, $p<0,05$, $n=6$). No final do CLAMP, as diferenças previamente observadas entre os valores de PAD estavam mantidas, com maiores ($p<0,001$) valores na dieta HR ($104\pm7 \text{ mmHg}$, $n=6$) do que nas dietas NR ($87\pm7 \text{ mmHg}$, $n=6$) e HO ($86\pm5 \text{ mmHg}$, $n=6$). (Figura 29)

A FC basal foi maior ($p<0,05$) na dieta HO ($365\pm13 \text{ bpm}$, $n=6$) do que na dieta HR ($337\pm16 \text{ bpm}$, $n=6$), sem diferença com relação à dieta NR ($352\pm13 \text{ bpm}$, $n=6$). Após a infusão de DA, a FC manteve-se maior na dieta HO ($361\pm13 \text{ bpm}$, $n=6$)

no início do CLAMP em comparação à dieta HR (337 ± 13 bpm, $n=6$), sem diferença com relação à dieta NR (348 ± 12 bpm, $n=6$). Ao término do CLAMP a infusão de DA não influenciou ($p>0,05$) a FC, mantendo os maiores ($p<0,01$) valores nos ratos que receberam dieta HO (362 ± 12 bpm, $n=6$) em comparação àqueles que receberam dieta HR (338 ± 12 bpm, $n=6$), sem diferença em relação à dieta NR (349 ± 12 bpm, $n=6$). (Figura 30)

Como pode ser visto na tabela 4 a concentração plasmática basal de colesterol total foi maior ($p<0,01$) nos ratos que receberam dieta HO (87 ± 7 mg/dL, $n=6$), comparados àqueles que receberam dieta HR (67 ± 12 mg/dL, $n=6$), sem diferença em comparação aos animais em dieta NR (77 ± 10 mg/dL, $n=6$). A colesterolemia total no início do CLAMP foi maior ($p<0,01$) nos ratos que receberam dieta HO (86 ± 8 mg/dL, $n=6$), do que nos que receberam dieta HR (69 ± 9 mg/dL, $n=6$), sem diferença em relação aos animais em dieta NR (77 ± 8 mg/dL, $n=6$), mostrando que DA não influenciou a colesterolemia total. Ao término do CLAMP não foram observadas diferenças ($p>0,05$) de colesterolemia total comparados aos valores basais. A maior concentração plasmática de colesterol total também foi encontrada nos ratos que receberam restrição salina (HO: 85 ± 11 mg/dL, $n=6$) comparados àqueles que receberam sobrecarga salina (HR: 67 ± 10 mg/dL, $n=6$), sem diferença com os ratos em dieta NR (75 ± 8 mg/dL, $n=6$). (Figura 31)

A concentração plasmática basal de TAG foi maior ($p<0,05$) nos ratos que receberam dieta HO (93 ± 15 mg/dL, $n=6$), comparados àqueles que receberam dieta HR (68 ± 12 mg/dL, $n=6$), sem diferença em relação aos animais em dieta NR (79 ± 17 mg/dL, $n=6$). Também no início do CLAMP, a concentração plasmática dos TAG foi maior ($p<0,05$) nos ratos em dieta HO (86 ± 12 mg/dL, $n=6$), do que

naqueles em dieta HR (65 ± 10 mg/dL, $n=6$) e maior ($p < 0,05$) na dieta NR (72 ± 16 mg/dL, $n=6$) em comparação aos animais em dieta HR. A concentração dos TAG plasmáticos ao término do CLAMP foi maior ($p < 0,05$) nos ratos que receberam dieta HO (77 ± 10 mg/dL, $n=6$) do que nos ratos com dieta HR (61 ± 8 mg/dL, $n=6$), sem diferença ($p > 0,05$) em comparação com os animais em dieta NR (71 ± 10 mg/dL, $n=6$), mostrando que DA não influenciou a concentração plasmática de TAG. (figura 32)

Tabela 4. Glicemia, insulinemia, captação de glicose e a concentração plasmática de colesterol total (COL) e triacilgliceróis (TAG) em ratos submetidos a dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) e hipersódica desde o desmame até a idade adulta que receberam a infusão de D-arginina (DA) ou L-arginina (LA).

Variável	HO		NR		HR	
	DA (n=6)	LA (n=6)	DA (n=6)	LA (n=6)	DA (n=6)	LA (n=6)
Glicemia (mg/dL)						
Basal	96±7 *	98±9 *	84±8	82±4	81±7	77±4
Antes do CLAMP	95±9 *	100±9 *	83±9	85±3	80±5	79±4
SSBG	96±6 *	99±9 *	84±9	83±5	82±5	79±5
Insulina (pmol)						
Basal	485±87 ⁺	470±79 ⁺	389±53	372±60	312±78	304±57
Antes do CLAMP	474±78 ⁺	470±70	393±61	389±58	309±62	321±45
SSPI	1287±146 ⁺ §	1325±132	1198±158	1169±124 [§]	994±112 [§]	1043±109
Captação de glicose (mg.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	3,3±1,7*	10,0±2,2 ⁺	11,4±2,2	13,0±2,1	20,4±1,9 [#]	21,4±3,0 ⁺
COL (mg/dL)						
Basal	87±7 ⁺	90±10 ⁺	77±10	80±11	67±12	72±11
Antes do CLAMP	86±8 ⁺	85±8 ⁺	77±8	74±7	69±9	73±8
Final do CLAMP	85±11 ⁺	84±9 ⁺	75±8	78±10	67±10	69±10
TAG (mg/dL)						
Basal	93±15 ⁺	89±11 ⁺	79±17	78±11	68±12	70±13
Antes do CLAMP	86±12 ⁺	66±18	72±16	65±11	65±10	63±11
Final do CLAMP	77±10 ⁺	58±20	71±10	64±14	61±8	62±10

CLAMP= clamp euglicêmico hiperinsulinêmico. Os dados estão representados como média ± desvio padrão da média. As diferenças estão expressas como p<0,05.

* p<0,05 vs NR e HR, # p<0,05 vs NR, + p<0,05 vs HR, § p<0,05 vs antes do CLAMP.

FIGURA 23. Valores de glicemias dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos D-arginina (DA) e L-arginina (LA) avaliados nos momentos basal(-45minutos) antes do CLAMP (0 minutos) e final do CLAMP (120 minutos).

FIGURA 24. Insulina plasmática basal em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR) nos grupos D-arginina (DA) ou L-arginina (LA).

FIGURA 25. Insulina plasmática antes do início do CLAMP em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR) nos grupos D-arginina (DA) ou L-arginina (LA).

FIGURA 26. Valores de insulina plasmática dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos D-arginina (DA) e L-arginina (LA) avaliados nos momentos antes do CLAMP (0 minutos) e final do CLAMP (120 minutos).

FIGURA 27. Captação de glicose medida pelo CLAMP em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR) nos grupos D-arginina (DA) ou L-arginina (LA).

TABELA 5. Pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) em ratos submetidos a dieta hipossódica (HO), mormossódica (NR) e hipersódica desde o desmame até a idade adulta após a infusão de L-arginina (LA) ou D-arginina (DA).

	HO		NR		HR	
Variável	DA (n=6)	LA (n=6)	DA (n=6)	LA (n=6)	DA (n=6)	LA (n=6)
PAS (mmHg)						
Basal	120±7 ⁺	119±8 ⁺	126±6	123±8	138±9 [#]	142±7 [#]
Antes do CLAMP	120±5 ⁺	117±9 ⁺	126±6	122±6	138±7 [#]	135±6 [#]
Final do CLAMP	121±6 ⁺	118±9	126±5	120±4	140±4 [#]	128±6
PAD mmHg						
Basal	87 ± 6 ⁺	82 ± 8 ⁺	88 ± 9	92 ± 8	104 ± 10 [#]	108 ± 6 [#]
Antes do CLAMP	88±3 ⁺	81±7 ⁺	87±6	89±5	102±11 [#]	106±4 [#]
Final do CLAMP	86±5 ⁺	83±8	87±7	90±8	104±7 [#]	91±10
FC (bpm)						
Basal	362±15 ⁺	369±12 ⁺	348±16	356±9	337±16	334±17 [#]
Antes do CLAMP	361±13 ⁺	360±11 ⁺	348±12	348±10	337±13	336±18 [#]
Final do CLAMP	362±12 ⁺	342±10 [§]	349±12	343±10	338±12	344±15

CLAMP= clamp euglicêmico hiperinsulinêmico Os dados estão representados como média ± desvio padrão da média. As diferenças estão expressas como p<0,05.

* p<0,05 vs NR e HR, # p<0,05 vs NR, + p<0,05 vs HR, § p<0,05 vs antes do CLAMP

FIGURA 28. Valores de pressão arterial sistólica dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos D-arginina (DA) e L-arginina (LA) avaliados nos momentos basal (-45 minutos) antes do CLAMP (0 minutos) e final do CLAMP (120 minutos).

FIGURA 29. Valores de pressão arterial diastólica dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos D-arginina (DA) e L-arginina (LA) avaliados nos momentos basal (-45 minutos) antes do CLAMP (0 minutos) e final do CLAMP (120 minutos).

FIGURA 30. Valores de frequência cardíaca dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos D-arginina (DA) e L-arginina (LA) avaliados nos momentos basal (-45 minutos) antes do CLAMP (0 minutos) e final do CLAMP (120 minutos).

FIGURA 31. Valores de colesterol total plasmático dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos D-arginina (DA) e L-arginina (LA) avaliados nos momentos basal (-45 minutos) antes do CLAMP (0 minutos) e final do CLAMP (120 minutos).

FIGURA 32. Valores de triacilgliceróis plasmáticos dos animais que foram submetidos às dietas hipo, normo e hipersódica, nos grupos D-arginina (DA) e L-arginina (LA) avaliados nos momentos basal (-45 minutos) antes do CLAMP (0 minutos) e final do CLAMP (120 minutos).

TABELA 6. Efeito da infusão de D-arginina (DA) ou L-arginina (LA) sobre a concentração plasmática de nitrato e nitrito em ratos submetidos a dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) e hipersódica desde o desmame até a idade adulta.

	HO		NR		HR	
Variável	LA	DA	LA	DA	LA	
	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	
Basal	0,24±0,02	0,25±0,03	0,25±0,03	0,28±0,04	0,27±0,01	0,29±0,03
(μmol/L)						
Antes do	0,25±0,01	0,29±0,07	0,27±0,04	0,29±0,05	0,27±0,03	0,33±0,08 ^c
CLAMP						
(μmol/L)						
Final do	0,27±0,03 [*]	0,40±0,03 [#]	0,29±0,02 [*]	0,42±0,04 [#]	0,30±0,03	0,42±0,05 [#]
CLAMP					*	
(μmol/L)						

Clamp euglicêmico hiperinsulinêmico (CLAMP) Os dados estão representados como média ± desvio padrão da média. As diferenças estão expressas como p<0,05.

* p<0,05 vs LA, # p<0,05 vs antes do CLAMP

FIGURA 33. Concentração plasmática de nitrato e nitrito em animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR) na 12ª semana de vida.

FIGURA 33. Valores de nitrato e nitrito plasmáticos dos animais que foram submetidos às dietas hipo (HO), normo (NR) e hipersódica (HR), nos grupos D-arginina (DA) e L-arginina (LA) avaliados nos momentos basal (-45 minutos) antes do CLAMP (0 minutos) e final do CLAMP (120 minutos).

3.3.2) Grupo L-arginina

Como pode ser observado na Tabela 4, a glicose sérica basal foi maior nos animais que receberam a dieta HO (98 ± 9 mg/dL, $n=6$) do que nos em dieta NR (82 ± 4 mg/dL, $p<0,01$, $n=6$) e HR (77 ± 4 , $p<0,001$, $n=6$). A infusão de LA não influenciou ($p>0,05$) a concentração plasmática de glicose ao início do CLAMP. Antes do início do CLAMP os valores de glicemia foram maiores na dieta HO (100 ± 9 mg/dL, $n=6$) do que na dieta NR (85 ± 3 mg/dL, $p<0,01$, $n=6$) e HR (79 ± 4 mg/dL, $p<0,001$, $n=6$). O SSBG não foi diferente ($p>0,05$) dos valores basais entre os grupos de dietas, mantendo as diferenças previamente observadas entre os grupos, sendo maior ($p<0,001$) na dieta HO (99 ± 9 mg/dL, $n=6$) em comparação aos animais que receberam as dietas NR (83 ± 5 mg/dL, $n=6$) e HR (79 ± 5 mg/dL, $n=6$). (Figura 23)

A insulinemia basal foi maior ($p<0,01$) na dieta HO (470 ± 78 pmol/L, $n=6$), em comparação à dieta HR (304 ± 57 pmol/L, $n=6$), sem diferença ($p>0,05$) com relação a dieta NR (372 ± 60 pmol/L, $n=6$). (Figura 24) LA não influenciou ($p>0,05$) a insulinemia antes do início do CLAMP, mantendo as diferenças previamente observadas. A insulinemia antes do CLAMP foi maior ($p<0,01$) na dieta HO (470 ± 70 pmol/L, $n=6$), do que na dieta HR (321 ± 45 pmol/L, $n=6$), sem diferença quanto à dieta NR (389 ± 58 pmol/L, $n=6$). (Figura 25) A infusão de LA também não influenciou ($p>0,05$) a insulinemia ao término do CLAMP ou durante o SSPI, com maior ($p<0,01$) concentração de insulina nos animais tratados com dieta HO (1325 ± 132 pmol/L, $n=6$), em comparação aos animais em dieta HR (1043 ± 109 pmol/L, $n=6$), sem diferença em relação ao grupo de ratos em dieta NR (1169 ± 124 , pmol/L, $n=6$). (Figura 26)

Nos ratos que receberam LA, a captação de glicose foi maior ($p < 0,001$) nos animais em dieta HR ($21,4 \pm 3,0 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $n=6$) do que naqueles em dieta NR ($12,9 \pm 2,1 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $n=6$) e HO ($10,0 \pm 2,2 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $n=6$). A captação de glicose nos animais em dieta NR não foi diferente ($p > 0,05$) daqueles em dieta HO. (Figura 27) A infusão de LA melhorou a sensibilidade à insulina nos animais em dieta HO, pois esta não foi diferente ($p > 0,05$) dos animais controles em dieta NR. Também foi observada maior ($p < 0,001$) captação de glicose nos animais HO tratados com LA comparados aos animais HO que receberam DA.

Como pode ser visto na tabela 5, a PAS basal foi maior na dieta HR ($142 \pm 7 \text{ mmHg}$, $n=6$) do que na dieta HO ($119 \pm 8 \text{ mmHg}$, $p < 0,001$, $n=6$) e NR ($123 \pm 8 \text{ mmHg}$, $p < 0,01$, $n=6$). A infusão de LA não influenciou ($p > 0,05$) a PAS ao início do CLAMP, mantendo-se maior nos animais em dieta HR ($135 \pm 6 \text{ mmHg}$, $n=6$) em comparação aos animais em dieta HO ($117 \pm 9 \text{ mmHg}$, $p < 0,01$, $n=6$) e NR ($122 \pm 6 \text{ mmHg}$, $p < 0,05$, $n=6$). Ao final do CLAMP a infusão de LA promoveu uma redução ($p < 0,01$) dos valores de PAS nos animais em dieta HR ($128 \pm 6 \text{ mmHg}$, $n=6$) comparado aos valores basais. A PAS não foi diferente ($p > 0,05$) entre as dietas HR, NR ($120 \pm 4 \text{ mmHg}$, $n=6$) e HO ($118 \pm 9 \text{ mmHg}$, $n=6$). A infusão de LA promoveu redução dos valores de PAS ao final do clamp nos ratos HR, sendo os valores de PAS diferentes entre os animais que receberam DA e LA, com maiores ($p < 0,01$) valores de PAS no primeiro grupo. (Figura 28)

A PAD basal foi maior na dieta HR ($108 \pm 6 \text{ mmHg}$, $n=6$) do que nas dietas HO ($82 \pm 8 \text{ mmHg}$, $p < 0,001$, $n=6$) e NR ($92 \pm 8 \text{ mmHg}$, $p < 0,01$, $n=6$). A infusão de LA não influenciou ($p > 0,05$) a PAD no início do CLAMP, com maiores ($p < 0,001$) valores nas dietas HR ($106 \pm 4 \text{ mmHg}$, $n=6$) do que nas dietas NR ($89 \pm 5 \text{ mmHg}$, $n=6$)

e HO (81 ± 7 , $n=6$). No final do CLAMP a infusão de LA reduziu os valores da PAD nos animais em dieta HR, sendo menor ($p < 0,01$) que os valores basais e ao início do CLAMP. Também se encontrou diferença ($p < 0,05$) entre os valores de PAD dos grupos DA e LA. Ao término do CLAMP os valores encontrados para a PAD foram: na dieta HR (91 ± 10 mmHg, $n=6$), na dieta NR (90 ± 8 mmHg, $n=6$) e na dieta HO (83 ± 8 mmHg, $n=6$). (Figura 29)

A FC basal foi maior na dieta HO (369 ± 12 bpm, $n=6$) do que na dieta HR (334 ± 18 bpm, $p < 0,01$, $n=6$) e na dieta NR (356 ± 9 bpm, $n=6$). Após a infusão de LA a FC manteve-se maior na dieta HO (368 ± 9 bpm, $n=6$) ao início do CLAMP em comparação a dieta HR (336 ± 18 bpm, $p < 0,01$, $n=6$) e à dieta NR (355 ± 7 bpm, $p < 0,05$, $n=6$). Ao término do CLAMP a infusão de LA promoveu redução ($p > 0,01$) da FC, comparada ao momento basal, sem diferença entre os valores de FC entre as dietas: HO (342 ± 10 bpm, $n=6$), NR (343 ± 10 bpm, $n=6$) e HR (344 ± 15 bpm, $n=6$). Os valores finais de FC entre os grupos DA e LA na dieta HO foram diferentes, sendo maior ($p < 0,05$) entre os animais que receberam DA. (Figura 30)

Como pode ser observado na tabela 4, a concentração plasmática basal do colesterol total foi maior ($p < 0,05$) nos ratos que receberam dieta HO (90 ± 10 mg/dL, $n=6$) do que naqueles que receberam dieta HR (72 ± 11 mg/dL, $n=6$), sem diferença em relação aos animais em dieta NR (72 ± 11 mg/dL, $n=6$). A colesterolemia total no início do CLAMP foi maior ($p < 0,05$) nos ratos que receberam dieta HO (85 ± 8 mg/dL, $n=6$), comparados àqueles que receberam dieta HR (73 ± 8 mg/dL, $n=6$), sem diferença em comparação com os animais em dieta NR (74 ± 7 mg/dL, $n=6$). Ao término do CLAMP não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) quanto a colesterolemia total comparados aos valores basais. Maior concentração plasmática

de colesterol total também foi encontrada nos ratos que receberam restrição salina (84 ± 9 mg/dL, $n=6$) comparados àqueles que receberam sobrecarga salina (69 ± 10 mg/dL, $n=6$), sem diferença em relação aos ratos em dieta NR (78 ± 10 mg/dL, $n=6$). Estes resultados mostram que LA não influenciou a colesterolemia total. (Figura 31)

A concentração plasmática basal dos TAG foi maior ($p < 0,05$) nos ratos que receberam dieta HO (89 ± 11 mg/dL, $n=6$) do que naqueles que receberam dieta HR (70 ± 13 mg/dL, $n=6$), sem diferença em relação aos animais em dieta NR (78 ± 11 mg/dL, $n=6$). Ao início do CLAMP, a concentração plasmática dos TAG não foi diferente ($p > 0,05$) entre as dietas. Os valores encontrados neste momento foram: HO (66 ± 18 mg/dL, $n=6$), NR (65 ± 11 mg/dL, $n=6$) e HR (63 ± 11 mg/dL, $n=6$). Ao término do CLAMP, os TAG plasmáticos não foram diferentes ($p > 0,05$) entre as dietas. Os valores obtidos foram: HO (58 ± 20 mg/dL, $n=6$), NR (64 ± 14 mg/dL, $n=6$) e HR (62 ± 10 mg/dL, $n=6$). Estes resultados demonstraram o efeito da LA sobre a concentração plasmática dos TAG ao longo do CLAMP promovendo a redução ($p < 0,05$) dos mesmos apenas na dieta HO. (Figura 32)

3.4) GRUPO DILTIAZEN

Um grupo de ratos ($n=3$) recebeu diltiazem com o objetivo de estudar se a redução da PA com outro fármaco que não fosse um bloqueador do SNS ou LA poderia promover modificações na SI nos animais recebendo dieta HR. Os resultados mostraram que a PAS (140 ± 9 mmHg) e PAD (105 ± 11 mmHg) basais não foram diferentes ($p > 0,05$) dos valores apresentados pelos animais do grupo veículo na mesma dieta. Antes do início do CLAMP a infusão de diltiazem não influenciou ($p > 0,05$) os valores de PAS (135 ± 10 mmHg) e de PAD (100 ± 12 mmHg). Ao término do CLAMP diltiazem promoveu redução ($p < 0,05$ vs. veículo) dos valores da PAS

(125±10 mmHg) e da PAD (90±11 mmHg) com intensidade semelhante ao efeito promovido pela infusão de LA. Entretanto, não foi observada redução ou incremento da captação de glicose (19,4±2,0 mg.kg⁻¹.min⁻¹). Os animais deste grupo apresentaram FC basal (351±16 bpm) semelhantes ao do grupo veículo e o uso de diltiazem não modificou (p>0,05) seus valores seja no início (FC: 354±15 bpm) ou no término do CLAMP (FC: 360±14 bpm). A glicemia (80±9 mg/dL), a concentração plasmática basal de colesterol total (57±10 mg/dL) e os TAG (70±8 mg/dL) não foram diferentes (p>0,05) dos animais controles em dieta HR. Não foi feita comparação da insulinemia basal (320±59 pmol/L) com o grupo controle uma vez que foram usados kits diferentes para sua dosagem. A infusão de diltiazem também não influenciou (p>0,05) os valores da glicemia, insulinemia, colesterolemia e dos TAG, seja ao início ou ao término do CLAMP. Ao início do CLAMP foram encontradas as seguintes concentrações para glicemia (84±10 mg/dL), insulinemia (325±49 pmol/L), colesterol (60±12 mg/dL) e TAG (67±12 mg/dL). Ao término do CLAMP foram encontradas as seguintes concentrações para glicemia (82±12 mg/dL), insulinemia (311±58 pmol/L), colesterol (56±13 mg/dL) e TAG (64±11 mg/dL).

3.5) NITRATO E NITRITO PLASMÁTICO

Na tabela 6 estão dispostos os resultados de NOx nas situações basal, antes e após o CLAMP. Analisando-se o grupo de animais como um todo em cada dieta, independente dos sub-grupos DA ou LA, a concentração plasmática basal de NOx foi menor (p<0,05) na dieta HO (0,25±0,03 µmol, n=12) do que na dieta HR (0,28±0,03 µmol/L, n=12), sem diferença em comparação à dieta NR (0,27±0,04 µmol/L, n=12).

(Figura 33) No grupo de animais que recebeu DA, a concentração plasmática basal de NOx não foi diferente ($p>0,05$) entre as dietas. Os valores de NOx neste momento foram: na dieta HO ($0,24\pm0,02$ $\mu\text{mol/L}$, $n=6$), NR ($0,25\pm0,03$ $\mu\text{mol/L}$, $n=6$) e HR ($0,27\pm0,01$ $\mu\text{mol/L}$, $n=6$). Também não foram observadas diferenças ($p>0,05$) entre as dietas na concentração plasmática basal de NOx do grupo LA. Os valores encontrados foram: na dieta HO ($0,25\pm0,03$ $\mu\text{mol/L}$, $n=6$), NR ($0,28\pm0,04$ $\mu\text{mol/L}$, $n=6$) e HR ($0,29\pm0,03$ $\mu\text{mol/L}$, $n=6$). No início do CLAMP tanto DA como LA não influenciaram ($p>0,05$) a concentração plasmática de NOx. Os valores encontrados para a concentração plasmática de NOx no grupo DA no início do CLAMP foram: na dieta HO ($0,25\pm0,01$ $\mu\text{mol/L}$, $n=6$), NR ($0,27\pm0,04$ $\mu\text{mol/L}$, $n=6$) e HR ($0,27\pm0,03$ $\mu\text{mol/L}$, $n=6$). No grupo LA os valores encontrados foram: na dieta HO ($0,29\pm0,07$ $\mu\text{mol/L}$, $n=6$), NR ($0,29\pm0,05$ $\mu\text{mol/L}$, $n=6$) e na HR ($0,33\pm0,08$ $\mu\text{mol/L}$, $n=6$). Ao término do CLAMP, a infusão de DA não influenciou ($p>0,05$) a concentração plasmática entre as dietas HO ($0,27\pm0,03$ $\mu\text{mol/L}$, $n=6$), NR ($0,29\pm0,02$ $\mu\text{mol/L}$, $n=6$) e HR ($0,30\pm0,03$ $\mu\text{mol/L}$, $n=6$) enquanto a LA aumentou a concentração plasmática de NOx nas três dietas: HO ($0,40\pm0,03$ $\mu\text{mol/L}$, $n=6$), NR ($0,42\pm0,04$ $\mu\text{mol/L}$, $n=6$) e HR ($0,42\pm0,05$ $\mu\text{mol/L}$, $n=6$). (Figura 34) Comparando-se os valores basais aos obtidos ao final do CLAMP houve um incremento nas concentrações plasmáticas de NOx nas dietas HO ($p<0,001$ vs basal), NR ($p<0,001$ vs basal) e HR ($p<0,01$ vs basal). Ao final do CLAMP o NOx plasmático foi maior ($p<0,001$) nos ratos tratados com LA do que naqueles com DA nos três grupos de dietas. Não houve diferença ($p>0,05$) no NOx plasmático ao final do CLAMP nos grupos DA e LA. Os ratos das três dietas tratados com LA demonstraram correlação positiva ($p<0,05$) entre a captação de glicose e NOx plasmático, fato não observado

nos ratos tratados com DA. Estes resultados mostram o efeito da LA sobre o NOx plasmático ao longo do CLAMP, o que não foi observado com a infusão de DA.

4) DISCUSSÃO

Há muito tempo o sal é utilizado pelos seres humanos na alimentação, sendo um importante fator ambiental. Efeitos metabólicos e hemodinâmicos associados ao consumo elevado ou reduzido de sal na dieta têm sido verificados em estudos clínicos e experimentais de curta ou de longa duração^{27,36-41}.

O consumo elevado de sódio está associado a maiores valores de pressão arterial, tanto em indivíduos normotensos^{22,23}, pacientes hipertensos²⁴⁻²⁶, em animais de laboratório²⁷, assim como em grandes populações²⁸ e em pequenas amostras²⁹⁻³¹. Estes mesmos estudos têm relacionado a redução no consumo de sal na dieta a uma redução dos valores da PA. Tendo em vista que a persistência de níveis pressóricos elevados está associada ao aumento da morbimortalidade decorrente de eventos como acidente vascular encefálico e insuficiência coronariana³², diversas entidades governamentais nacionais e internacionais têm recomendado a redução da ingestão do consumo de sal na dieta para os pacientes hipertensos³³⁻³⁵.

Outras conseqüências associadas a menor ingestão de sal na dieta ocorrem sobre o metabolismo da glicose, insulina e também sobre o metabolismo lipídico³⁶⁻⁴¹. Fliser et al.³⁶ estudaram indivíduos jovens, do sexo masculino que foram submetidos à restrição (20 mmoles/dia) e a uma sobrecarga salina (200 mmoles/dia) na dieta por três ou sete dias. Após cada período de oferta das dietas, estes indivíduos foram

submetidos à avaliação da sensibilidade à insulina, a qual foi medida por um CLAMP. Estes autores³⁶ mostraram que houve uma maior sensibilidade à insulina após 3 dias de sobrecarga salina, o que não foi observado após sete dias de sobrecarga de sal na dieta. Em um outro estudo, Donovan et al.³⁷ verificaram resultados opostos. Indivíduos com características semelhantes aos dos pacientes estudados por Fliser et al.³⁶ receberam durante cinco dias dieta com baixo teor de sal (10 mmoles/dia) e dieta com elevado teor de sal (200 mmoles/dia). Aqueles que receberam restrição de sal na dieta apresentaram maior sensibilidade à insulina. Em um estudo mais recente, Foo et al.⁵⁰ observaram que indivíduos normais de ambos os sexos, quando submetidos à sobrecarga (220 mmoles/dia) ou a restrição (40 mmoles/dia) de sal na dieta durante seis dias não apresentaram diferença na sensibilidade à insulina entre as dietas, também medida pelo CLAMP.

Uma preocupação é se os resultados divergentes apresentados pelos autores decorrem do curto período de exposição à estas dietas com diferentes conteúdos de sal, ou seja, se são fenômenos transitórios, ou se decorrem também de maior resistência ou sensibilidade ao sal apresentada pelos indivíduos avaliados em cada estudo, ou outros fatores que possam interferir nesta avaliação. Uma outra preocupação também é a aplicabilidade clínica destes resultados descritos aos pacientes que são submetidos à restrição crônica de sal para o tratamento não medicamentoso da HAS.

Com o intuito de avaliar por um período de tempo prolongado o efeito da sobrecarga ou restrição de sal na dieta sobre o metabolismo da glicose, foi desenvolvido um estudo em nosso Laboratório. Lima et al.²⁷ utilizaram um modelo

animal, uma vez que em humanos a utilização da mesma dieta em um período equivalente ao desmame até a vida adulta em ratos seria inviável.

No estudo de Lima et al.²⁷, ratos Wistar machos foram submetidos à sobrecarga ou restrição de sal na dieta desde o desmame na terceira semana de vida até a idade adulta (12 semanas) e não observaram diferença na sensibilidade à insulina em adipócitos isolados destes animais. Também, foi encontrada maior captação de glicose, maior incorporação de glicose em lípidos no grupo submetido à sobrecarga salina em comparação ao grupo tratado com a dieta HO. Entretanto, uma dúvida não esclarecida por este estudo era se este fenômeno observado era restrito ao tecido analisado ou se o mesmo ocorria no animal como um todo, ou seja, se era um fenômeno generalizado. Para esclarecer esta questão, um outro estudo foi desenvolvido em nosso Laboratório por Prada et al.⁴⁴ onde mediram a sensibilidade à insulina *in vivo*. Entre os resultados obtidos verificaram que ratos Wistar machos tratados com dieta HR apresentaram maior PA, sensibilidade à insulina medida pelo CLAMP, massa renal e redução da concentração dos ácidos graxos não esterificados. Já entre os animais que receberam a restrição crônica de sal observou-se o aumento do peso corpóreo e da massa de tecido adiposo e menor sensibilidade à insulina.

Em outro estudo recente, Ogihara et al.⁶¹ mostraram resultados opostos aos demonstrados por Prada et al.⁴⁴ no que diz respeito a sensibilidade à insulina. No estudo de Ogihara et al.⁶¹, ratos Sprague Dawley receberam cronicamente as dietas HR (8% de NaCl) ou NR (0,3% de NaCl) durante oito semanas. Estes autores⁶¹ verificaram menor captação de glicose durante o CLAMP nos animais que receberam sobrecarga salina quando comparados ao grupo controle. Possíveis explicações para esta disparidade entre os resultados encontrados são a cepa de ratos utilizados (ratos

Wistar no estudo de Prada et al. e ratos Sprague-Dawley no estudo de Ogihara et al.). Outro fato importante é que o tempo de início das dietas foi diferente (na terceira semana de vida no estudo de Prada et al. e na oitava semana no estudo de Ogihara et al.). Além disso, o tempo do consumo das dietas também foi diferente (9 semanas no estudo de Prada et al. e 8 semanas no estudo de Ogihara et al.). Estas diferenças entre os métodos utilizados nos estudos citados talvez possam ser responsáveis pelos diferentes resultados obtidos.

Tendo em vista a menor sensibilidade à insulina observada durante a restrição crônica de sal, um aspecto importante é esclarecer os possíveis mecanismos responsáveis por este fenômeno. Neste sentido, Prada et al.⁴⁴ analisaram a influência do maior PC e a participação do SRA como mecanismos responsáveis pela menor sensibilidade à insulina durante a restrição crônica de sal na dieta. Para isto, foi feito o pareamento do peso dos animais tratados com dieta HO, NR e HR. Mesmo após o pareamento do peso foi observado menor sensibilidade à insulina durante a restrição crônica de sal, sugerindo que o peso não é um mecanismo envolvido na resistência à insulina destes animais. Há que se ressaltar que a maior massa adiposa observada nos ratos em dieta HO não mais ocorreu após o pareamento do peso. Para a avaliação da participação do SRA como mecanismo associado à resistência à insulina durante a restrição crônica de sal foi utilizado captopril (inibidor da enzima conversora de angiotensina I) e losartan (antagonista do receptor AT1 de angiotensina II). Ratos em dieta HO tratados com captopril apresentaram melhora da sensibilidade à insulina, o que não foi observado em resposta ao losartan.

Uma vez que a restrição crônica de sal está associada com maior atividade do SNS⁴⁶ e menor atividade da via L-arginina / óxido nítrico⁴⁷, estas duas consequências

da restrição crônica de sal na dieta podem ser mecanismos envolvidos na menor sensibilidade à insulina durante a restrição crônica de sal. No presente estudo ratos Wistar machos receberam, desde o desmame, dietas HO, NR e HR ao longo de 9 semanas. Ao atingirem a vida adulta foram submetidos a um CLAMP para a avaliação da sensibilidade à insulina. Foi observado que ratos que consumiam dieta HO e que receberam veículo (salina) apresentaram menor sensibilidade à insulina do que os animais em dieta NR e HR, reproduzindo assim, em ratos acordados os resultados demonstrados previamente por Prada et al.⁴⁴. Já os animais submetidos ao bloqueio do SNS, não apresentaram diferenças na captação de glicose entre as três dietas. Este resultado demonstra que o bloqueio do SNS corrigiu a resistência à insulina previamente observada neste modelo, que havia sido demonstrado em ratos Wistar pela primeira vez por Prada et al.⁴⁴. Para a avaliação da participação da menor atividade da via L-arginina / óxido nítrico decorrente da restrição crônica de sal como mecanismo responsável pela menor sensibilidade à insulina neste modelo, foi feita a infusão de D-arginina e L-arginina. D-arginina não produziu nenhum efeito sobre a captação de glicose, persistindo o padrão de menor sensibilidade à insulina em ratos tratados com dieta HO em comparação àqueles em dieta NR e HR. A infusão de LA corrigiu a menor sensibilidade à insulina observada previamente nos animais em dieta HO, sem modificação do padrão nas demais dietas. Um dado importante é que não foi observada diferença da captação de glicose entre os animais em dieta HO com aqueles em dieta NR. Isto sugere que os animais HR mantiveram-se mais sensíveis comparados aos demais grupos de dietas, mas sem a resistência previamente observada no grupo HO. Estes resultados vão de encontro às hipóteses previamente levantadas sobre a participação do SNS e da via L-arginina / óxido

nítrico como mecanismos responsáveis pela menor sensibilidade à insulina durante a restrição crônica de sal, uma vez que tanto o bloqueio do SNS corrigiu de forma efetiva as diferenças previamente observadas entre as dietas quanto a ativação da via L-arginina / óxido nítrico com a suplementação de L-arginina., pois o fenômeno só foi observado no grupo HO mas mantendo o efeito do sal sobre as dietas NR e HR, uma vez que nestas situações a via encontra-se ativada, ao contrário do observado durante a restrição de sal.

A associação entre o consumo de sal na dieta e a sensibilidade à insulina foi abordada em outros estudos, além dos já mencionados, como o de Iwaoka et al.³⁹ onde verificaram que a menor ingestão de sódio na dieta estava associada a alterações no metabolismo da glicose em indivíduos hipertensos, especialmente naqueles com diabetes mellitus ou intolerância à glicose. Em outro estudo, Melander et al.⁶² verificaram que em situações de maior sensibilidade ao sal, tanto em indivíduos hipertensos como em normotensos, o uso de sobrecarga de sal aumentou a sensibilidade à insulina comparado à restrição de sal. Isto mostra que o sal modula a sensibilidade à insulina somente em indivíduos sensíveis a sal. Raji et al.⁶³ também observaram menor sensibilidade à insulina durante a restrição salina. Também é conhecido que a intensidade do consumo de sal pode influenciar a sensibilidade à insulina tanto sistêmica quanto vascular. Feldman e Schmidt^{64,65} observaram que a restrição no consumo de sal promove resistência vascular e sistêmica à insulina além de elevar a noradrenalina plasmática, tanto em indivíduos normotensos quanto em hipertensos.

Um outro efeito da restrição crônica de sal na dieta é a maior atividade do SNS⁴⁶. Este fato tem sido observado em estudos em indivíduos normotensos^{51,52},

pacientes hipertensos⁴⁶ e em animais de laboratório^{53,66} quando submetidos à dieta restrita em sal, seja durante um curto período de tempo ou um período mais prolongado. A constatação da maior atividade do SNS nestes estudos foi feita através da identificação de maiores concentrações plasmáticas de catecolaminas^{48,49}, maior excreção urinária⁵⁰⁻⁵² de catecolaminas e maiores valores de frequência cardíaca^{46,67}.

Tem sido descrito em outras situações diferentes da restrição de sal na dieta, que as catecolaminas podem promover redução na sensibilidade à insulina. Este fenômeno foi observado em humanos⁶⁸⁻⁷⁰ e em animais de laboratório⁷¹⁻⁷⁵.

Confirmando os resultados de Prada et al.⁴⁴ que estudaram ratos anestesiados, no presente estudo foi observado que animais acordados em dieta hipossódica apresentavam menor sensibilidade à insulina medida pelo CLAMP. Tendo em vista as explanações supra citadas, é plausível conjecturar que a maior atividade do SNS possa ser um mecanismo envolvido na resistência à insulina destes animais em dieta HO. Para testar esta hipótese, a sensibilidade à insulina foi medida em ratos controle e em ratos com bloqueio agudo do SNS com prazosin (alfa bloqueador) e propranolol (beta bloqueador). O bloqueio do SNS corrigiu integralmente o efeito do sal na dieta sobre o metabolismo de carboidratos. As diferenças entre dietas previamente observadas na captação de glicose desapareceram com o bloqueio do SNS. A maior frequência cardíaca nos animais submetidos à dieta hipossódica não foi observada nos ratos em dieta com baixo teor de sal e que tiveram seu SNS bloqueado. Estes resultados vão de encontro com nossa hipótese inicial que sugere que a maior atividade do SNS é um possível mecanismo gerador da resistência à insulina nos animais com restrição de sal na dieta.

Até onde vai nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo que mostrou um mecanismo da menor sensibilidade à insulina em ratos Wistar machos submetidos à restrição crônica de sal na dieta.

Um outro resultado interessante do bloqueio do SNS em ratos em dieta hipossódica foi o efeito sobre o metabolismo de lípides. No grupo de animais sob restrição de sal e sem bloqueio do SNS, foram observadas maiores concentrações séricas de colesterol total e de TAG. Isto já era conhecido de estudos anteriores⁴¹ e pode ser decorrente da maior atividade do SNS^{71,76,77} neste grupo de animais. No grupo de ratos nos quais o SNS foi bloqueado, o efeito da dieta hipossódica sobre o metabolismo de lípides não foi mais observado.

Durante o bloqueio do SNS também foi observado que os animais em dieta HR apresentaram redução dos valores de captação de glicose, redução intensa dos valores de PAS e de PAD. Durante a sobrecarga de sal não se espera que ocorra uma resposta tão intensa ao bloqueio do SNS uma vez que não há evidências de ativação deste sistema nestas circunstâncias⁴⁸⁻⁵². Realmente, não parece que o efeito hipotensor do propranolol e do prazosin nos ratos com dieta hipersódica é devido ao bloqueio do SNS. Esta afirmativa tem suporte no fato de que ao contrário do observado no grupo sob restrição de sal, os ratos em dieta hipersódica que receberam bloqueadores do SNS pioraram a sensibilidade à insulina. Redução importante dos valores de PA com o primeiro uso de prazosin têm sido descrito em humanos^{78,79} e em animais de laboratório^{80,81}. Este efeito independe do bloqueio do SNS. Uma possível explicação para o fenômeno observado no grupo sob sobrecarga de sal é que tenha ocorrido uma intensa vasodilatação com conseqüente hipotensão e redistribuição do fluxo para tecidos menos importantes no que diz respeito à

captação de glicose insulino-dependente^{79,82}. Desta forma, há um desencontro entre a insulina e a musculatura estriada e o tecido adiposo. Este desencontro pode ser o responsável pela piora da sensibilidade à insulina observada nos animais em dieta hipersódica e que receberam os bloqueadores do SNS. Deve-se ressaltar que esta conjectura deve ser comprovada ou não em estudos futuros. Tendo em vista os resultados encontrados de intensa redução da PA nos animais em dieta HR com SNS bloqueado e com o objetivo de se verificar se a redução na captação de glicose neste grupo era decorrente das modificações hemodinâmicas observadas, foi estudado um grupo de ratos em dieta HR e que receberam diltiazem (bloqueador de canal de cálcio). Esta droga foi dada para verificar se alterações na sensibilidade à insulina também ocorrem na vigência de hipotensão semelhante à observada com os bloqueadores de SNS, porém induzida por outro mecanismo. O uso de diltiazem promoveu redução dos valores de PA em intensidade semelhante à verificada em resposta ao bloqueio do SNS, no entanto, sem modificação da sensibilidade à insulina. Este experimento permite afirmar que o efeito do bloqueio do SNS sobre a sensibilidade à insulina em ratos em dieta hipersódica não é devido à observada queda da pressão arterial. Uma explicação para diferentes efeitos sobre a sensibilidade à insulina de hipotensões semelhantes obtidas com diferentes drogas é uma redistribuição diferente do fluxo para os tecidos. O diltiazem é um bloqueador de canal de cálcio e seu efeito decorre da redução da resistência vascular periférica. O efeito deste fármaco sobre a sensibilidade à insulina é matéria ainda não definitivamente resolvida. Em concordância com o observado no presente estudo, Berne et al⁸³ também não observaram modificação da sensibilidade à insulina em pacientes hipertensos na vigência de uso de diltiazem e verapamil, enquanto que a

nifedipina promoveu resistência à insulina. Existem, no entanto, outros estudos com resultados opostos⁸⁴⁻⁸⁶.

Justificam-se algumas palavras sobre o mecanismo pelo qual o SNS ativado diminui a sensibilidade à insulina. Para melhor explanação deste fenômeno, há que se lembrar que na vigência de SNS ativado, observa-se maior concentração de catecolaminas na circulação^{48,49}. Nos tecidos periféricos, como músculo estriado e tecido adiposo, as catecolaminas alteram o transporte de glicose⁷¹, provavelmente devido ao efeito sobre os transportadores de glicose de superfície, como o GLUT4⁸⁷. Alguns autores associam a ação das catecolaminas com menor translocação do GLUT4 do citoplasma para a membrana celular⁸⁸, o que pode comprometer o transporte de glicose⁸⁸⁻⁹⁰, principalmente na presença de insulina⁹¹, caracterizando um estado de resistência à insulina. No estudo de Prada et al.⁴⁴ foi observado que a expressão gênica do GLUT4 foi modulada pela intensidade do consumo de sal na dieta. Nos tecidos sensíveis à insulina de animais que receberam sobrecarga em comparação àqueles que receberam restrição de sal na dieta, a expressão gênica do GLUT4 estava aumentada. Em um outro estudo do nosso grupo⁹², verificou-se também que o sal na dieta modula outros transportadores de glicose em diversos órgãos. Um outro mecanismo pelo qual as catecolaminas podem modificar a sensibilidade à insulina é um mecanismo hemodinâmico⁷¹ como já previamente comentado.

Um outro efeito da restrição crônica de sal é a menor atividade da via L-arginina / óxido nítrico nesta situação⁴⁷. Estudos têm relacionado a menor intensidade do consumo de sal na dieta com menor concentração plasmática e menor excreção urinária de metabólitos do NO^{47,93,94} - nitrato e nitrito -. Em um outro

estudo⁵⁶, foi observada menor concentração plasmática de arginina e de cGMP na dieta hipossódica. Alguns estudos mostraram que o bloqueio da via L-arginina / óxido nítrico reduz a sensibilidade à insulina^{55,95}. Assim, a menor atividade da via L-arginina / óxido nítrico induzida por restrição de sal na dieta também pode ser um fator envolvido na resistência à insulina encontrada em nosso modelo de estudo. De fato, a partir desta hipótese, ratos acordados que receberam as dietas HO, NR e HR foram tratados com LA e DA e a seguir foram submetidos ao CLAMP. O uso de DA não modificou o efeito do sal sobre a sensibilidade à insulina. No entanto, a infusão de LA corrigiu a menor sensibilidade à insulina observada nos animais sob restrição salina, o que comprova a hipótese formulada.

Uma das maneiras de se avaliar o efeito da infusão de LA sobre a atividade da via L-arginina / óxido nítrico é a medida da concentração plasmática de nitrato e nitrito^{47,56,96,97}. Assim como nos resultados descritos na literatura^{47,56}, neste estudo foi observado que na situação basal, ou seja, avaliando-se o efeito do sal na dieta sobre a concentração plasmática de nitrato e nitrito, este foi menor durante a restrição em relação à sobrecarga de sal na dieta. A infusão de LA aumentou a concentração plasmática de nitrato e nitrito ao término do CLAMP nas três dietas, fato este não observado com os animais que receberam DA, independente da dieta. Um dado importante foi que o incremento de nitrato e nitrito correlacionou-se de forma positiva com a melhora da sensibilidade à insulina expressa pelos maiores valores de captação de glicose nos animais em dieta HO.

Outros resultados importantes encontrados em nosso estudo foram a redução dos valores de PA em resposta a LA somente nos animais em dieta HR, fato este já descrito na literatura tanto em humanos⁹⁸ como em animais de laboratório⁹⁹. Nestes

estudos^{98,99} o efeito da LA é atribuído a uma maior natriurese e diurese, assim como melhora do fluxo sanguíneo renal¹⁰⁰⁻¹⁰². No entanto, no presente estudo, este mecanismo não deve estar operativo em função do curto tempo de observação, insuficiente para manifestação de consequências devidas a incremento na natriurese. Estudos adicionais são necessários para elucidar o efeito hipotensor da LA durante o CLAMP. Um segundo resultado interessante foi o efeito da L-arginina no grupo de animais sob dieta hipossódica. Neste grupo a frequência cardíaca e a concentração plasmática de TAG foram menores do que no grupo em dieta hipossódica e que não recebeu L-arginina. Por outro lado a captação de glicose e a insulina no final do CLAMP foram maiores no grupo dieta hipossódica com do naquele sem L-arginina. A maior captação de glicose pelos tecidos em resposta a L-arginina pode ser devida a uma maior perfusão de tecidos como a musculatura estriada e o tecido adiposo em resposta a uma vasodilatação decorrente da L-arginina¹⁰³⁻¹⁰⁵. Em outros estudos, fenômeno semelhante já foi descrito⁹⁶. Conjectura-se que a menor concentração circulante de TAG, pode ser consequência da maior sensibilidade à insulina. A maior insulinemia no final do CLAMP pode ser explicada por meio do conhecido efeito da L-arginina sobre a liberação de insulina da ilhota pancreática¹⁰⁶. Chama a atenção o efeito da L-arginina sobre a frequência cardíaca. Uma explicação seria uma maior atividade do SNS nesta circunstância, decorrente dos maiores níveis de insulina circulante⁹.

Assim, os resultados obtidos no presente estudo apontam tanto a maior atividade do SNS como a menor atividade da via L-arginina / óxido nítrico como mecanismos envolvidos na menor sensibilidade à insulina durante a restrição crônica de sal. Esta associação já havia sido sugerida previamente por Lepori et al.¹⁰⁷ neste

mesmo modelo. Estes autores¹⁰⁷ sugeriram que um defeito na síntese de NO facilitaria a hiperatividade simpática, o que pode induzir uma resistência à insulina por provável perda da inibição pelo NO do efeito vasoconstritor simpático.

Uma forma alternativa de enxergar o efeito da restrição de sal sobre a sensibilidade à insulina é que ele seja decorrente dos níveis elevados de lípidos circulantes. Alguns estudos têm constatado a participação do maior conteúdo de lípidos nas fibras musculares em humanos¹⁰⁸ e animais¹⁰⁹ que consomem dieta HO como gerador de resistência à insulina. O maior conteúdo de lípidos nas fibras musculares durante a restrição de sal pode promover alterações dos mecanismos de sinalização da insulina na célula. A resistência à insulina nesta situação decorre da menor oxidação de lípidos pelo músculo, favorecendo o seu acúmulo intracelular, o qual pode gerar a ativação de isoenzimas da proteína kinase C que por sua vez promoveria a inibição dos passos iniciais da cascata da insulina¹⁰⁸.

Finalmente, uma possível explicação para o efeito da sobrecarga de sal sobre a sensibilidade à insulina é a maior bradicinina decorrente da desativação do SRA nesta situação⁴⁵. Acredita-se que a bradicinina pode ser responsável pelas modificações encontradas no metabolismo da glicose e na translocação de GLUT4 de ratos Wistar que recebem prolongadamente a dieta HR. Miyata et al.¹¹⁰ demonstraram que a bradicinina potencializa a captação de glicose por aumentar o sinal de transdução insulínico do músculo esquelético em cães. Além da potencialização da ação da insulina, Kishi et al.¹¹¹ têm sugerido uma via independente da ação da insulina, onde a bradicinina aumentaria a translocação do GLUT4.

5) SUMÁRIO DE RESULTADOS

- 1) A restrição crônica de sal na dieta induziu aumento do peso corpóreo e diminuição da sensibilidade à insulina avaliada pelo CLAMP em ratos Wistar machos.
- 2) A menor sensibilidade à insulina parece ser decorrente da maior atividade do sistema nervoso simpático e da menor atividade da via L-arginina / óxido nítrico. O bloqueio do SNS e a ativação da via L-arginina / óxido nítrico corrigiram integralmente a menor sensibilidade à insulina nos animais em restrição de sal.
- 3) O bloqueio do SNS e a infusão de L-arginina reduziram a maior concentração de triacilgliceróis nos animais em dieta hipossódica, sem influenciar a colesterolemia total.
- 4) A sobrecarga salina induziu aumento da pressão arterial em ratos, da sensibilidade à insulina e cursa com menores concentrações de glicemia, insulinemia, triacilgliceróis e colesterol total.
- 5) Nos animais em dieta hipossódica submetidos ao bloqueio do SNS houve redução da insulinemia ao início do CLAMP.
- 6) O bloqueio do SNS reduziu os valores de FC e de PA em todos os grupos de dietas.

- 7) A infusão de L-arginina reduziu a FC nos animais em dieta hipossódica e a PA nos animais em dieta HR.
- 7) Diltiazem promoveu redução da PA nos animais em dieta hipersódica, sem influenciar a sensibilidade à insulina dos mesmos.

6) CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que:

1. A restrição crônica de sal na dieta acarreta efeitos sobre o metabolismo de carboidratos e de lípides. No metabolismo de carboidratos, o menor consumo de sal induz uma resistência à insulina e no metabolismo de lípides o efeito é uma maior concentração circulante, tanto de triacilgliceróis quanto de colesterol total. Além dos efeitos metabólicos, o menor consumo de sal tem também um efeito hipotensor.
2. Um consumo aumentado induz efeitos opostos ao da restrição no consumo de sal. Estes efeitos opostos foram observados tanto no metabolismo de carboidratos e lípides quanto sobre a pressão arterial.
3. Fortes indícios foram obtidos que permitem concluir que uma hiperatividade do sistema nervoso simpático e uma menor atividade da via L-arginina / óxido nítrico são um dos mecanismos responsáveis pelos efeitos metabólicos da restrição crônica de sal na dieta.

7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.
- 2.
- 3.
4. BANTING, F.G.; BEST, C.H. Pancreatic extracts. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 7,p. 464-72, 1972.
5. HIMSWORTH, H.P. The activation of insulin. **Lancet**, v. 2, p. 935-36, 1932.
6. HIMSWORTH, H.P. Diabetes Mellitus. Its differentiation into insulin-sensitive and insulin-insensitive types. **Lancet**, v. 1(part 1), p. 127-30, 1936.
7. WELBORN, T.A.; BRECKENRIDGE, A.; RUBINSTEIN, A.H.; DOLLERY, C.T.; RUSSEL, FRASER, T. Serum insulin in essential hypertension and in peripheral vascular disease. **Lancet**, v. 18, p. 1336-7, 1966.
8. MODAN M, HALKIN H, ALMOG S, LUSKY A, ESHKOL A, SHEFI M, SHITRIT A, FUCHS Z. Hyperinsulinemia: a link between hypertension, obesity and glucose intolerance. **J. Clin. Invest.**, v. 75, p. 809-17, 1985.
9. FERRANNINI E, BUZZIGOLI G, BONAD ONNA R, GIORICO MA, OLEGGINI M, GRAZIADEI L, PEDRINELLI R, BRANDI L,

- BEVILACQUA S. Insulin resistance in essential hypertension. **N. Engl. J. Med.**, v. 317, p. 350-57, 1987.
10. REAVEN, G.M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, p. 1495-607, 1988.
 11. MORRIS, A.D.; CONNELL, J.M. Insulin resistance and essential hypertension: mechanism and clinical implications. **Am. J. Med. Sci.**, v. 307, p. S47-S52 1994.
 12. DEFRONZO, R.A.; COOKE, C.R.; ANDRES, R.; FALOONA, G.R.; DAVIS, P.J. The effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium, and phosphate in man. **J. Clin. Invest.**, v. 55, p. 845-55, 1975.
 13. ARAUZ-PACHECO, C.; LENDER, D.; SNELL, P.G.; HUET, B.; RAMIREZ, L.C.; BREEN, L.; MORA, P.; RASKIN, P. Relationship between insulin sensitivity, hyperinsulinemia, and insulin-mediated sympathetic activation in normotensive and hypertensive subjects. **Am. J. Hypertens.**, v. 9, p. 1172-8, 1996.
 14. BHANOT, S.; MCNEILL, J.H. Insulin and hypertension: a causal relationship? **Cardiovascular Res.**, v. 31, p. 212-21, 1996.
 15. BRANDS, M.W.; MIZELLE, H.L.; GAILLARD, C.A.; HILDEBARNDT, D.A.; HALL, J.E. The hemodynamic response to chronic hyperinsulinemia in conscious dogs. **Am. J. Hypertens.**, v. 4 (2 pt1), p. 164-8, 1991.

16. HALL, J.E.; COLLEMAN, T.G.; MIZELLE, H.L.; SMITH, M.J.JR. Chronic hyperinsulinemia and blood pressure regulation. **Am. J. Physiol.**, v. 258 (3 pt 2), p. F722-F731, 1990.
17. MONDON, C.E.; REAVEN, G.M. Evidence of abnormalities of insulin metabolism in rats with spontaneous hypertension. **Metabolism**, v. 37, p. 303-5, 1988.
18. HULMAN, S.; FALKNER, B.; FREYVOGEL, N Insulin resistance in the conscious spontaneously hypertensive rats: euglycemic hyperinsulinemic clamp study. **Metabolism**, v. 42, p. 14-18, 1993.
19. FRONTONI, S.; OHMAN, L.; HAYWOOD, J.R.; DEFRONZO, R.A.; ROSSETTI, L. In vivo insulin action in genetic models of hypertension. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. E191-E196, 1992.
20. REAVEN, G.M.; HO, H. Sugar-induced hypertension in Sprague-Dawley rats. **Am. J. Hypertens.**, v. 4, p. 610-4, 1991.
21. BRANDS, M.W.; GARRITY, C.A.; HOLMAN, M.G.; KEEN, H.L.; ALONSO-GALICIA, M.; HALL, J.E. High fructose-diet does not raise 24-hour mean arterial blood pressure in rats. **Am. J. Hypertens.**, v. 7, p. 104-9, 1994.
22. ZAVARONI, I.; MAZZA, S.; DALL'AGLIO, E.; GASPARINI, P.; PASSERI, M.; REAVEN, G.M. Prevalence of hyperinsulinemia in patients with high blood pressure. **J. Int. Med.**, v. 231, p. 235-40, 1992.
23. REAVEN, G.M. Pathophysiology of insulin resistance human disease. **Physiol. Rev.**, v. 75, p. 473-86, 1995.

24. MCLAUGHLIN, T.; REAVEN, G.M. Insulin resistance and hypertension. Patients in double jeopardy for cardiovascular disease. **Geriatrics**, v. 55, p.28-35, 2000.
25. MASCIOLI, S.; GRIMM, J.R.R.; LAUNER, C.; SVENDSEN, K.; FLACK, J.; GONZALEZ, N.; ELMER, P.; NEATON, J. Sodium chloride raises blood pressure in normotensive subjects. The study of sodium and blood pressure. **Hypertension**, v. 17 (Suppl 1), p. I21-26, 1991.
26. MENEELY, G.R.; BALL, C.O/T. Experimental epidemiology of chronic sodium chloride toxicity and the protective effect of potassium chloride. **Am. J. Med.**, v. 25, p. 713-25, 1958.
27. CUTLER, J.A.; FOLLMANN, D.; ELLIOT, P.; SUH, I.L. An overview of randomized trials of sodium reduction and blood pressure. **Hypertension**, v. 17(suppl 1), p. 27-33, 1991.
28. LAW, M.R.; FROST, C.D.; WALD, N.J. Ill-Analysis of data from trials of salt reduction. **B. M. J.**, v. 302, p. 819-24, 1991.
29. MACGREGOR, G.A.; MARKANDU, N.D.; SAGNELLA, G.A.; SINGER, D.R;J.; CAPPuccio, F.P. Double-blind study of three sodium intakes and long-term effects of sodium restriction in essential hypertension. **Lancet**, v. 2, p. 1244-247, 1989.
30. LIMA, N.K.C.; LIMA, F.B.; SANTOS, E.A.; OKAMOTO, M.M.; MATSUSHITA. D;H.; HELL, N.S.; HEIMANN, J.C. Chronic sodium chloride overload increases blood pressure and improves glucose metabolism, without changing insulin sensitivity. **Am. J. Hipertens.**, v. 10, p. 720-27, 1997.

31. INTERSALT COOPERATIVE RESEARCH GROUP: INTERSALT: An international study of electrolyte excretion and blood pressure: results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. **B. M. J.**, v. 297, p. 319-28, 1988.
32. DICHTCHEKENIAN, V.; SEQUEIRA, D.M.C.; ANDRIOLLO, A.; MARCONDES, M.; HEIMANN, J.C. Salt sensitivity in human essential hypertension: effect of renin-angiotensin and sympathetic nervous system blockade. **Clin. Exper. Hypertens.**, v. 11(suppl 1), p. 379-87, 1989.
33. DICHTCHEKENIAN, V.; GISIGER, S.; QUENTAL, I.; SANTOS, S.R.C.J.; MARCONDES, M.; HEIMANN, J.C. Higher salt consumption, digoxin-like factor, and nifedipine response are associated with salt sensitivity in essential hypertension. **Am. J. Hypertens.**, v. 5, p. 707-12, 1992.
34. KAWASAKI, T.; DELLEA, C.S.; BARTTER, F.C.; SMITH, H. The effect of high sodium and low sodium intakes on blood pressure and other related variables in human subjects with idiopathic hypertension. **Am. J. Med.**, v. 64, p.193-98, 1978.
35. TUOMILEHTO, J.; JOUSILAHTI, P.; RASTENYTE, D.; MOLTCHANOV, V.; TANSKANEN, A.; PIETINEN, P.; NISSINEN, A. Urinary sodium excretion and cardiovascular mortality in Finland: a prospective study. **Lancet**, v. 357, p. 8448-851, 2001.
36. JOINT NATIONAL COMMITTEE ON DETECTION, EVALUATION, AND TREATMENT OF HIGH BLOOD PRESSURE (JNC V). The fifth report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation,

- and Treatment of High Blood Pressure (JNC V). **Arch. Intern. Med.**, v. 153, p. 154-83, 1993.
37. SEVER, P.; BEEVERS, G.; BULPITT, C.; LEVER, A.; RAMSAY, L.; REID, J.; SWALES, J. Management guidelines in essential hypertension: report of the second working party of the British hypertension society. **B. M. J.**, v. 306, p.983-87, 1993.
 38. WORLD HYPERTENSION LEAGUE. Nonpharmacological interventions as an adjunct to the pharmacological treatment of hypertension: a statement by WHL. **J. Hum. Hypertens.**, v. 7, p.159-64, 1993.
 39. FLISER, D.; FODE, P.; ARNOLD, U.; NOWICKI, M.; KOHL, B.; RITZ, E. The effect of dietary salt on insulin sensitivity. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 25, 39-43, 1995.
 40. DONOVAN, D.S.; SOLOMON, C.G.; SEELY, E.W.; WILLIAMS, G.H.; SIMONSON, D.C. Effect of sodium intake on insulin sensitivity. **Am. J. Physiol.**, v. 264, p. E730-E734, 1993.
 41. EGAN B, WEDER AB, PETRIN J, HOFFMAN RG. Neurohumoral and metabolic effects of short-term dietary NaCl restriction in man. **Am. J. Hypertens.**, v. 4, p. 416-21, 1991.
 42. IWAOKA, T.; UMEDA, T.; OHNO, M.; INOUE, J.; NAOMI, S.; SATO, T.; KAWAKAMI, I. The effect of low and high NaCl diets on oral glucose tolerance. **Klin Wochenschr.**, v.; 66, p. 724-28, 1988.
 43. LIND, L.; LITHELL, H.; GUSTAFSSON, I.B.; POLLARE, T.; LJUNGHALL, S. Metabolic cardiovascular risk factors and sodium

- sensitivity in hypertensive subjects. **Am. J. Hypertens.**, v. 5, p.502-5, 1992.
44. CATANOZI, A.S.; ROCHA, J.C.; NAKADAKARE, E.R.; PASSARELLI, M.; MESQUITA, C.H.; SILVA, A.A.; DOLNIKOFF, M.S.; HARADA, L.M.; QUINTÃO, E.C.R.; HEIMANN, J.C. The rise of the lipid concentration elicited by dietary sodium chloride restriction in Wistar rats is due to an impairment of plasma triacylglycerol removal rate. **Atherosclerosis**, v. 158, p. 81-6, 2001.
 45. KOTCHEN, T.A.; ZHANG, H.Y.; COVELLI, M.; BLEHSCHMIDT, N. Insulin resistance and blood pressure in Dahl rats and in one-kidney, one clip hypertensive rats. **Am. J. Physiol.**, v. 261, p. E692-697, 1991.
 46. SOMOVA, L.; CHANNA, M.L. Glucose metabolism and insulin sensitivity in Dahl hypertensive rats. **Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.**, v. 21, 421-425, 1999.
 47. PRADA, P.; OKAMOTO, M.M.; FURUKAWA, L.N., MACHADO, U.F.; HEIMANN, J.C.; DOLNIKOFF, M.S. High- or low-salt diet from weaning to adulthood: effect on insulin sensitivity in Wistar rats. **Hypertension**, v. 35, p. 424-429, 2000.
 48. DAVIS, J.O. The control of renin release. **Am J Med.**, v. 55, p.333-350, 1973.
 49. CAMPESE, V.M.; ROMOFF, M.S.; LEVITAN, D.; SAGLIKES, Y.; FRIEDLER, R.M.; MASSRY, S.G. Abnormal relationship between sodium intake and sympathetic nervous system activity in salt-sensitive patients with essential hypertension. **Kidney Int.**, v.21, p.371-8, 1982.

50. CHEN, P.Y.; SANDERS, P.W. L-Arginine abrogates salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. **J. Clin. Invest.**, v. 88, p. 1559-1567, 1991.
51. ROMOFF, M.S.; KEUSCH, G.; CAMPESE, V.M.; WANG, M.S.; FRIEDLER, R.M.; WEIDMANN, P.; MASSRY, S.G. Effect of sodium intake on plasma catecholamines in normal subjects. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 48, :p. 26-31, 1978.
52. LUFT, F.C.; RANKIN, L.I.; HENRY, D.P.; BLOCH, R.; GRIM, CE.; WEYMAN, A.E.; MURRAY, R.H.; WEINBERGER, M.H. Plasma and urinary epinephrine values at extremes of sodium intake in normal man. **Hypertension**, v. 1, p. 261-266, 1979.
53. FOO, M.; DENVER, A.E.; COPPACK, S.W.; YUDKIN, J.S. Effect of salt-loading on blood pressure, insulin sensitivity and limb blood flow in normal subjects. **Clin. Sci.**, v. 95, p. 157-64, 1998.
54. GORDON, R.D.; KUCHEL, O.; LIDDLE, G.W.; ISLAND, D.P. Role of the sympathetic nervous system in regulating renin and aldosterone production in man. **J. Clin. Invest.**, v. 46, p. 599, 1967.
55. ALEXANDER, R.W.; GILL, J.R.; YAMABE, H.; LOVENBERG, W.; KEISER, H.R. Effects of dietary sodium and of acute saline infusion on the interrelationship between dopamine excretion and adrenergic activity in man. **J. Clin. Invest.**, v. 54, p. 194-200, 1974.
56. FAUCHEUX, B.; BUU, N.T.; KUCHEL, O. Effects of saline and albumin on plasma and urinary catecholamines in dogs. **Am. J. Physiol.**, v. 232, p. F123-F127, 1977.

57. RACOTTA, R.; RAMIREZ-ALTAMIRANO, L.; VELASCO-DELGADO, E.
Metabolic effects of chronic infusions of epinephrine and norepinephrine
in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 250, p. E518-522, 1986.
58. SADRI, P.; LAUTT, W.W. Blockade of hepatic nitric oxide synthase causes
insulin resistance. **Am. J. Physiol.**, v. 277, p. G101-8, 1999.
59. KITTIYAKARA, C.; CHABRASHVILI, T.; JOSE, P.; WELCH, W.J.;
WILCOX, C.S. Effects of dietary salt intake on plasma arginine. **Am. J.**
Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., v. 280, p. R1069-1075, 2001.
60. DEFRONZO, R.; TOBIN, J.D.; ANDRES, R. Glucose clamp technique: a
method for quantifying insulin secretion and resistance. **Am. J. Physiol.**,
v. 237, p. E214-E223, 1979.
61. GUIGNOT, L.; MITHIEUX, G. Mechanisms by which insulin, associated or
not with glucose, may inhibit hepatic glucose production in the rat. **Am.**
J. Physiol., v. 277, p. E984-89, 1999.
62. VERDON, C.P.; BURTON, B.A.; PRIOR, R.L. Sample pretreatment with
nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively
reduces nitrate while avoiding interference by NADP^+ when the Griess
reaction is used to assay for nitrite. **Anal. Biochem.**, v. 224, p. 502-508,
1995.
63. YALOW, R.S.; BERSON, A.S. Immunoassay of endogenous plasma insulin
in man. **J. Clin. Invest.**, v. 39, 1157-75, 1960.
64. OGIHARA, T.; ASANO, T.; ANDO, K.; CHIBA, Y.; SEKINE, N.;
SAKODA, H.; ANAI, M.; ONISHI, Y.; FUJISHIRO, M.; ONO, H.;
SHOJIMA, N.; INUKAI, K.; FUKUSHIMA, Y.; KIKUCHI, M.;

- FUJITA, T. Insulin resistance with enhanced insulin signaling in high-salt diet-fed rats. **Diabetes**, v. 50, p. 573-583, 2001.
65. MELANDER, O.; GROOP, L.; HULTHEN, U.L. Effect of salt on insulin differs according to gender and degree of salt sensitivity. **Hypertension**, v. 35, p. 827-831, 2000.
 66. RAJI, A.; WILLIAMS, G.H.; JEUNEMAITRE, X.; HOPKINS, P.N.; HUNT, S.C.; HOLLENBERG, N.K.; SEELY, E.W. Insulin resistance in hypertensives: effect of salt sensitivity, renin status and sodium intake. **J. Hypertens.**, v.19, p. 99-105, 2001.
 67. FELDMAN, R.D.; SHMIDT, N.D. Moderate dietary salt restriction increases vascular and systemic insulin resistance. **Am. J. Hypertens.**, v. 12, p. 643-647, 1999.
 68. FELDMAN, R.D.; LOGAN, A.G.; SHMIDT, N.D. Dietary salt restriction increases vascular insulin resistance. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 60, p. 444-451, 1996.
 69. MITCHELL, J.R.; TAYLOR, A.; POLL, J.; LAKE, C.R.; ROLLINS, D.E.; BARTTER, C. Renin-aldosterone profiling in hypertension. **Ann. Intern. Med.**, v. 87, p.596, 1977.
 70. FOLKOW, B.; ELY, D.L. Dietary sodium effects on cardiovascular and sympathetic neuroeffector functions as studied in various rat models. **J. Hypertens.**, v. 5, p. 383-395, 1987.
 71. SACCÀ, L.; VIGORITO, C.; CICALA, M.; UNGARO, B.; SHERWIN, R.S. Mechanisms of epinephrine-induced glucose intolerance in normal

- humans. Role of the splanchnic bed. **J. Clin. Invest.**, v. 69, p.284-293, 1982
72. SACCÀ, L.; MORRONE, G.; CICALA, M.; CORSO, G.; UNGARO, B.
Influence of epinephrine, norepinephrine, and isoproterenol on glucose homeostasis in normal man. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 50, p. 680-684, 1980.
 73. ROSEN, S.G.; CLUTTER, W.E.; SHAH, S.D.; MILLER, J.P.; BIER, D.M.; CRYER, P.E. Direct α -adrenergic stimulation of hepatic glucose production in human subjects. **Am. J. Physiol.**, v. 245, p. E616-R626, 1983.
 74. NONOGAKI, K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. **Diabetologia**, v. 43, p.533-549, 2000.
 75. SACCÀ, L.; SHERWIN, R.; FELIG, P. Effect of sequential infusions of glucagon and epinephrine on glucose turnover in the dog. **Am. J. Physiol.**, v. 235, p. E287-E290, 1978.
 76. ALTSZULER, N.R.S.; RATHGEB, I.; DE BODO, R.C. Glucose metabolism and plasma insulin level during epinephrine infusion in the dog. **Am. J. Physiol.**, v. 212, p. 677-682, 1967.
 77. NIKLASSON, M.; HOLMÄNG, A.; LÖNNROTH, P. Induction of rat muscle insulin resistance by epinephrine is accompanied by increased interstitial glucose and lactate concentrations. **Diabetologia**, v. 41, p. 1467-1473, 1998.

78. CHIASSON, J.L.; SHIKAMA, H.; CHU, D.T.W.; EXTON, J.H. Inhibitory effect of epinephrine on insulin-stimulated glucose uptake by rat skeletal muscle. **J. Clin. Invest.**, v. 68, p. 706-713 1981.
79. NONOGAKI, K.; IGUCHI, A. Stress, acute hyperglycemia and hyperlipidemia: role of autonomic nervous system and cytokines. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 8, p. 192-197, 1997.
80. BARTNESS, T.J.; BAMSHAD, M. Innervation of mammalian white adipose tissue: implications for the regulation of total body fat. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. R1399-R1411, 1998.
81. GRASSI, G.; SERAVALLE, G.; STELLA, M.L.; TURRI, C.; ZANCHETTI, A.; MANCIA, G. Sympathoexcitatory responses to the acute blood pressure fall induced by central or peripheral antihypertensive drugs. **Am. J. Hypertens.**, v. 3, p. 29-34, 2000.
82. COLUCCI, W.S. Alpha-adrenergic receptor blockade with prazosin. Consideration of hypertension, heart failure, and potential new applications. **Ann. Intern. Med.**, v. 97, p. 67-77, 1982.
83. MOZAFFARI, MS.; PATEL, C.; WARREN, B.K.; SCHAFFER, S.W. NaCl-induced hypertensive rat model of non-insulin-dependent diabetes: role of sympathetic modulations. **Am. J. Hypertens.**, v. 13, 540-546, 2000.
84. CHANG, C.J.; WU, J.S.; LU, F.H.; LIU, I.M.; CHI, T.C.; CHENG, J.T. Sympathetic hyperactivity in Wistar rats with insulin-resistance. **J. Auton. Nerv. Syst.**, v. 74, p. 116-9 1998.

85. VAN ZWIETEN, P.A. Antihypertensive drugs interacting with α - and β -adrenoceptors. A review of basic pharmacology. **Drugs**, v. 35, p. 6-19, 1988.
86. BERNE, C.; POLLARE, T.; LITHELL, H. Effects of antihypertensive treatment on insulin sensitivity with special reference to ACE inhibitor. **Diabetes Care**, v. 14, p. 39-47, 1991.
87. HARANO, Y.; KAGEYANA, A.; HIROSE, J. Improvement of insulin sensitivity for glucose metabolism with the long-activity Ca channel blocker amlodipine in essential hypertensive subjects. **Metabolism**, v.44, p. 315-319, 1995.
88. LENDER, D.; ARAUZ-PACHECO, C.; BREEN, L.; MORA-MORA, P.; RAMIREZ, LC.; RSKIN, P. A double blind comparison of the effects of amlodipine and enalapril on insulin sensitivity in hypertensive patients. **Am. J. Hypertens.**, v. 12, p. 298-303, 1999.
89. YOUNG, J.C.; BALON, T.W. Role of dihydropyridine sensitive calcium channels in glucose transport in skeletal muscle. **Life Sci**, v. 61, p.335-342, 1997.
90. KLIP, A.; MARETTE, A. Acute and chronic signals controlling glucose transport in muscle. **J. Cell. Biochem.**, v. 48, p. 51-60, 1992.
91. CHEATHAM ,B.; KAHN , C.R. Insulin action and the insulin signalling network. **Endocrine Rev.**, v.16, p. 117-142, 1995.
92. KASHIWAGI, A ; HUECKSTEADT, T.P.; FOLEY, J.E. The regulation of glucose transport by cAMP stimulators via three different mechanisms

- in rat and human adipocytes. **J. Biol. Chem.**, v.258, p. 13685-13692, 1983.
93. MACAULAY, S.L.; KELADA, A.S.M.; PROIETTO, J. Isoproterenol inhibits cyclic AMP-mediated but not insulin-mediated translocation of the GLUT-4 glucose transporter isoform. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 141, p. 27-33, 1994.
 94. HAN, X.X.; BONEM, A. Epinephrine translocates GLUT-4 but inhibits insulin-stimulated glucose transport in rat muscle. **Am. J. Physiol.**, v. 274, p. E700-E707, 1998.
 95. VESTRI, S.; OKAMOTO, M.M.; DE FREITAS, H.S.; APARECIDA DOS SANTOS, R.; NUNES, M.T.; MORIMATSU, M.; HEIMANN, J.C.; MACHADO, U.F. Changes in sodium or glucose filtration rate modulate expression of glucose transporters in renal proximal tubular cells of rat. **J. Membrane Biol.**, v. 182, p. 105-112, 2001.
 96. BARRI, Y.M.; WILCOX, C.S. Salt intake determines the renal response to L-arginine infusion in normal human subjects. **Kidney Int.**, v. 53, p. 1299-1304, 1998.
 97. YING, W.Z.; SANDERS, P.W. Increased dietary salt activates rat aortic endothelium. **Hypertension**, v.39, p. 239-244, 2002.
 98. YUASA, S.; LI, X.; HITOMI, H.; HASHIMOTO, M.; FUJIOKA, H.; KIYOMOTO, H.; UCHIDA, K.; SHOJI, T.; TAKAHASHI, S.; MIKI, S.; MIYATAKE, A.; MIZUSHIGE, K.; MATSUO, H. Sodium sensitivity and sympathetic nervous system in hypertension induced by

- long-term nitric oxide blockade in rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 27, p. 18-24, 2000.
99. WASCHER, T.C.; GRAIER, WF.; DITTRICH, P.; HUSSAIN, M.A.; BAHADORI, B.; WALLNER, S.; TOPLAK, H. Effects of low dose L-arginine on insulin-mediated vasodilatation and insulin sensitivity. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 27, p. 690-5, 1997
 100. MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N. Engl. J. Med.**, v. 329, p. 2002-2012, 1993.
 101. SIANI, A ; PAGANO, E.; IACONE, R.; IACOVIELLO, L.; SCOPACASA, F.; STRAZZULLO, P. Blood pressure and metabolic changes during dietary L-arginine supplementation in humans. **Am. J. Hypertens.**, v. 13, p. 547-551, 2000.
 102. TOMOHIRO, A.; KIMURA, S.; HE, H.; FUJISAWA, Y.; NISHIYAMA, A ; KIYOMOTO, K.; AKI, Y.; TAMAKI, T.; ABE, Y. Regional blood flow in Dahl-Iwai salt-sensitive rats and the effects of dietary L-arginine supplementation. **Am. J. Physiol.**, v. 272, p. R1013-R1019, 1997.
 103. KIYOMOTO, H.; MATSUO, H.; TAMAKI, T.; AKI, Y.; HE, H.; IWAO, H.; ABE, Y. Effects of L-N^G-nitro-arginine, inhibitor of nitric oxide synthesis, on autoregulation of renal blood flow. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 58, p. 147-155, 1992.
 104. CERNADAS, M.R.; LOPEZ-FARRE, A ; RIESCO, A.; GALLEGO, M.J.; ESPINOSA, G.; PIQUINI, E.; HERNANDO, L.; CASADO, S.; CARMELO, C. Renal and systemic effects of amino acids administered

- separately: comparison between L-arginine and non-nitric oxide donor amino acids. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 263, p. 1023-1029, 1992.
105. CAMPESE, V.M.; AMAR, M.; ANJALI, C.; MEDHAT, T.; WURGAFT, A.
Effect of L-arginine on systemic and renal haemodynamics in salt-sensitive patients with essential hypertension. **J. Hum. Hypertens.**, v. 11, p. 527-532, 1997.
 106. CALVER, A ; COLLIER, J.; VALLANCE, P. Dilator actions of arginine in human peripheral vasculature. **Clin. Sci.** v. 81, p. 695-700, 1991.
 107. BODE-BOGER, S.M.; BÖGER, R.H.; ALFKE, H. L-arginine induces nitric oxide-dependent vasodilatation in patients with critical limb ischemia randomized, controlled study. **Circulation**, v. 93, p.85-90, 1996.
 108. RHODES, P.; BARR, C.S.; STRUTHERS, A.D. Arginine, lysine and ornithine as vasodilators in the forearm of man. **Europ. J. Clin. Invest.**, v. 26, p. 325-331, 1996.
 109. SCHMIDT, H.H.H.W.; WARNER, T.D.; ISHII, K.; SHENG, H.; MURAD, F. Insulin secretion from pancreatic β cells caused by L-arginine-derived nitrogen oxides. **Science**, v. 255, p. 721-723, 1992.
 110. LEPORI, M.; SARTORI, C.; TRUEB, L.; OWLYA, R.; NICOD, P.; SCHERRER, U. Hemodynamic and sympathetic effects of nitric-oxide synthase inhibition by systemic L-NMMA infusion in humans are dose dependent. **J. Hypertens.**, v. 16, p. 519-523, 1998.
 111. KELLEY, D.E.; MANDARINO, L.J. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance. A reexamination. **Diabetes**, v. 49, p. 677-83, 2000.

112. DOBBINS, R.L.; SZCZEPANIAK, L.S.; BENTLEY, B.; ESSER, V.; MYHILL, J.; MCGARRY, J.D. Prolonged inhibition of muscle carnitine palmitoyltransferase-1 promotes intramyocellular lipid accumulation and insulin resistance in rats. **Diabetes**, v. 50, p. 123-130, 2001.
113. MIYATA, T.; TAGUCHI, T.; UEHARA, M.; ISAMI, S.; KISHIKAWA, H.; KANEKO, K.; ARAKI, E.; SHICHIRI, M. Bradykinin potentiates insulin-stimulated glucose uptake and enhances insulin signal through the bradykinin B2 receptor in dog skeletal muscle and rat L6 myoblasts. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 138, p. 344-52, 1998.
114. KISHI, K.; MUROMOTO, N.; NAKAYA, Y.; MIYATA, I.; HAGI, A. ; HAYASHI, H.; EBINA, Y. Bradykinin directly triggers GLUT4 translocation via an insulin-independent pathway. **Diabetes**, v. 47, p. 550-8, 1998.