



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

BRENO TENÓRIO GALVÃO FONSECA

**Respostas cardiovasculares mediadas pelo aumento agudo dos
níveis cerebrais de angiotensina-(1-7) em animais alimentados com
dieta rica em frutose**

MACEIÓ - AL

2020

BRENO TENÓRIO GALVÃO FONSECA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Priscila da Silva Guimarães.

Maceió – AL

2020

**Catálogo na fonte Universidade
Federal de Alagoas Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

F676r Fonseca, Breno Tenório Galvão.

Respostas cardiovasculares medidas pelo aumento agudo dos níveis cerebrais de angiotensina-(1-7) em animais alimentados com dieta rica em frutose / Breno Tenório Galvão Fonseca. – 2021.

46 f. : il., figs. e tabs. color.

Orientadora: Priscila da Silva Guimarães.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 41-44.

Anexos: f. 45-46.

1. Frutose. 2. Estresse. 3. Eixo angiotensina-(1-7)/Mas. 4. Hipotálamo dorsomedial. I. Título.

CDU: 616.1: 611.814

AGRADECIMENTOS

À professora Priscila Guimarães, que desde o primeiro momento que a conheci, se mostrou ser uma verdadeira educadora, e que com paciência e puxões de orelha me ensinou muito do que sei. Durante todos esses anos na Ufal como seu orientando, tive a oportunidade de adquirir muito mais que conhecimento científico. Ao longo desses seis anos de convivência, cresci também como ser humano ao seu lado, sempre aprendendo a me dedicar, a superar os obstáculos e a respeitar o próximo. Agradeço por nunca ter desistido de mim e pelas palavras de incentivo durante o caminho tortuoso que é o da pós-graduação. Como diria sua música favorita: “Cada ser em si carrega o dom de ser capaz e ser feliz”.

Aos meus amados pais e familiares, pelo incentivo e pela torcida por um futuro melhor. Sei que mesmo errando, vocês tentam acertar.

À Beatriz Cordeiro, minha amiga e parceira de laboratório. Agradeço pela companhia, incentivo e ajuda, indispensáveis durante os experimentos. Sua presença me trouxe luz e conforto mesmo nos dias mais escuros.

À Catarina Guimarães, filha da professora Priscila, que ainda dentro da barriga de sua mãe foi paciente até o fim da gestação, mesmo estando na UFAL até tarde da noite.

Às minhas amigas, Cibele e Jéssica, que durante esses anos foram as pessoas mais compreensivas com quem pude contar fora do meio acadêmico.

Aos técnicos e funcionários do ICBS pelo apoio fundamental para a realização do trabalho.

À Universidade Federal de Alagoas, gratuita e de qualidade, por todos os ensinamentos e oportunidades que tive aqui dentro desde a graduação.

Aos dias em que nada deu certo, cuja única alternativa dada a mim foi prosseguir e aprender por meio da superação.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular e Neuroendócrina na Universidade Federal de Alagoas, com o auxílio financeiro da CAPES, CNPQ e FAPEAL.

“Quando você tiver dias ruins, eu espero que você se olhe no espelho e lembre-se do que você é e do que não é. Você não é seus erros. Você não está danificado pelas suas explorações fracassadas. Você não é a opinião de alguém que não o conhece. Você é um produto das lições que aprendeu. Você é mais sábio porque passou por algo terrível. E você é a pessoa que sobreviveu a um monte de tempestades e continuou andando. Agora acredito que a dor nos fortalece e agora acredito que atravessar muitas tempestades te deixa limpo.”

- Taylor Swift

RESUMO

O consumo em excesso de frutose e a maior exposição à situações de estresse têm sido considerados fatores de risco independentes que predis põem o indivíduo ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Nesse contexto, o eixo Ang-(1-7)/receptor Mas, constitui um importante mecanismo endógeno que, seja por vias centrais ou periféricas, promove efeitos benéficos importantes, atenuando a hipertensão arterial, melhorando o metabolismo energético, e a resposta ao estresse. Nesse sentido, diversos estudos têm apontado que mais especificamente a região hipotalâmica dorsomedial (DMH) é considerada uma região-chave das vias centrais que medeiam as respostas cardiovasculares durante a reação de alarme no estresse. Assim, o presente estudo objetivou elucidar as respostas cardiovasculares mediadas pelo aumento agudo dos níveis centrais de angiotensina-(1-7) em condição fisiológica normal e na dieta rica em frutose. Para isso, ratos Wistar (7 semanas de idade) foram submetidos à ingestão de solução de frutose 10% (FF) ou água potável (grupo controle – CTL) por 20 semanas. Ao final do estudo, em estado anestesiado, os animais receberam infusão intracerebroventricular (icv) de angiotensina-(1-7) (grupos A7) ou de veículo (solução salina 0,9% estéril; grupos Sal). Foram avaliados: pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), sensibilidade do controle barorreflexo da frequência cardíaca (BRS) e resposta cardiovascular ao estímulo dos receptores NMDA no DMH. Diferenças estatísticas foram analisadas utilizando o teste One-Way ANOVA, ou teste *t Student* pareado, quando aplicável. Observou-se que o aumento agudo dos níveis centrais de Ang-(1-7) melhora a resposta bradicárdica no grupo FF e a resposta taquicárdica do grupo CTL. Os grupos que receberam a infusão icv aguda de Ang-(1-7) tiveram redução no tempo para normalização da PA, quando comparados aos seus respectivos grupos controle. Além disso, a infusão icv aguda de Ang-(1-7) parece ter contribuído para a diminuição do tempo para atingir o pico de resposta da FC em resposta a diminuição da PA, no grupo CTL. A resposta pressórica e taquicárdica decorrente do estímulo dos receptores NMDA no DMH foi semelhante entre os grupos experimentais, não havendo efeito decorrente da ingestão crônica de frutose. Considerando que a variação da PA também reduziu no grupo CTL-sal após a infusão icv, a infusão icv aguda de Ang-(1-7) parece não contribuir para atenuar a resposta pressórica no grupo FF-A7. Estes dados sugerem que a maior disponibilidade aguda do peptídeo endógeno Ang-(1-7) por via central promove a melhora do controle barorreflexo da frequência cardíaca e não altera a resposta cardiovascular mediada pela estimulação dos receptores NMDA no DMH. Em adição, a atividade dos receptores NMDA no DMH parece não estar alterada em ratos alimentados cronicamente com dieta rica em frutose (10 ou 20 semanas; apêndices A e B).

Palavras-chave: Frutose; Estresse; Região hipotalâmica dorsomedial; Angiotensina(1-7).

ABSTRACT

Excessive fructose consumption and the greater exposure to stressful situations are considered risk factors that predispose the development of cardiovascular diseases. In this context, the Ang- (1-7) / receptor axis, an important endogenous mechanism that either via central or peripheral pathways, promotes important and beneficial effects, attenuating arterial hypertension, improving energy metabolism and the response to emotional stress. Several studies have pointed out the hypothalamic dorsomedial region (DMH) as a key region of the central pathways that mediate the cardiovascular responses during an alarm reaction in stress. Thus, the present study aimed at elucidate cardiovascular responses mediated by the acute increase in central levels of angiotensin- (1-7) in normal physiological conditions and in a fructose-rich diet. For this, the Wistar rats (6 weeks old) were submitted to a 10% fructose solution (FF) or drinking water (control group - CTL) for 20 weeks. At the end of the study, in an anesthetized state, the animals receive an intracerebroventricular infusion (icv) of angiotensin- (1-7) (groups A7) or sterile 0.9% saline (vehicle groups). The following were reduced: mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), sensitivity of heart rate control (BRS) and cardiovascular response to NMDA receptor stimulation in DMH. Statistical differences were analyzed using the one-way ANOVA test, or student test, when applicable. An Ang- (1-7) seems to act in order to improve the clinical response in the FF group (0.74 ± 0.06 vs 0.46 ± 0.09) in face of the increase in BP and improve the tachycardic response in the group of control, compared to AP (1.39 ± 0.35 vs 0.99 ± 0.28). Both FF groups that received an acute ic- infusion of Ang- (1-7) reduced the BP normalization time when compared to their CTL groups (27.0 ± 3.7 vs 75.0 ± 5.6 ; $66, 0 \pm 8.0$ vs 141.7 ± 12.2) In addition , an acute infusion of Ang- (1-7) seems to have contributed to decrease the time to reach the peak HR response in response to the BP response, in the CTL group (54.0 ± 8.1 vs 96.0 ± 8.1). The pressure and chemical response resulting from the stimulation of NMDA receptors in DMH was impaired among the groups of experiments, with no effect resulting from chronic fructose intake. Possibly the acute icv infusion of Ang- (1-7) was responsible for attenuating a pressure response in the FF-A7 group. These data suggest that the acute delivery of the peptide Ang- (1-7) centrally, promotes improvements in the baroreflex control of heart rate and that the exacerbated response to stress observed in rats chronically fed a diet rich in fructose (10 or 20 weeks; 1 and 2) due to the change in the activity of other receptors in DMH, not in NMDA.

Keywords: Fructose; Stress; Dorsomedial hypothalamic nucleus; Angiotensin-(1-7).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração simplificada das vias proteolíticas para a formação de peptídeos de angiotensina biologicamente ativos.....	13
Figura 2 - Localização da região hipotalâmica dorsomedial.....	16
Figura 3 - Diagrama esquemático (baseado em estudos funcionais e anatômicos) mostrando vias descendentes envolvidas na organização da resposta cardiovascular ao estresse emocional em diferentes níveis da neuronais.....	17
Figura 4 – Linha do tempo representando a ordem cronológica do experimento.....	26
Figura 5 - Pressão arterial média e frequência cardíaca basais de ratos Wistar submetidos à ingestão crônica de frutose a 10% por 20 semanas.....	27
Figura 6 – Sensibilidade do controle barorreflexo da frequência cardíaca em resposta ao aumento da pressão arterial e em resposta a redução da pressão arterial.....	29
Figura 7 – Tempo total para o pico e para a normalização da pressão arterial em resposta a administração de fenilefrina e nitroprussiato de sódio depois da infusão intracerebroventricular aguda de angiotensina-(1-7) ou veículo	32
Figura 8 – Variação da resposta pressórica e taquicárdica ao estímulo dos receptores de N-metil D-Aspartato no hipotálamo dorsomedial.....	34
Figura 9 - Respostas pressórica e taquicárdicas ao estresse emocional agudo por contenção em ratos Wistar provenientes do biotério central submetidos à ingestão crônica de solução de frutose 10% por 10 semanas.....	40
Figura 10 - Respostas pressórica e taquicárdicas ao estresse emocional agudo por contenção em ratos Wistar provenientes do biotério central submetidos à ingestão crônica de solução de frutose 10% por 20 semanas.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Valores da sensibilidade do controle barorreflexo	29
Tabela 02 – Delta da variação da pressão arterial média e da frequência cardíaca antes ou depois da infusão intracerebroventricular aguda de angiotensina-(1-7) ou salina.....	30
Tabela 03 - Valores do tempo total (segundos) para o pico e para a normalização da pressão arterial antes da infusão intracerebroventricular de angiotensina-(1-7) ou salina.....	31
Tabela 04 – Valores do tempo total (segundos) para o pico e para a normalização da pressão arterial depois da infusão intracerebroventricular de angiotensina-(1-7) ou salina.....	32
Tabela 05 – Valores do tempo total (segundos) para o pico da e para a normalização da frequência cardíaca antes da infusão intracerebroventricular de angiotensina-(1-7) ou salina.....	33
Tabela 06 – Valores do tempo total (segundos) para o pico e para a normalização da frequência cardíaca depois da infusão infusão intracerebroventricular de angiotensina-(1-7) ou salina.....	33
Tabela 07 – Valores da variação da resposta pressórica e taquicárdica ao estímulo dos receptores N-metil D-Aspartato no hipotálamo dorsomedial antes e depois da infusão intracerebroventricular de angiotensina-(1-7) ou salina.....	35
Tabela 08 - Valores (minutos) do tempo total da resposta taquicárdica em resposta ao estímulo dos receptores NMDA no hipotálamo dorsomedial antes e depois da infusão intracerebroventricular de angiotensina-(1-7) ou veículo.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ANG-(1-7)	Angiotensina (1-7)
BRS	Barorreflexo
CTL	Grupo controle
CVLM	Área Ventrolateral Caudal do Bulbo
DMH	Hipotálamo Dorsomedial
EPM	Erro padrão da média
FC	Frequência Cardíaca
FF	Frutose
GLUT	Transportador de glicose
GABA	Ácido gama-aminobutírico
ICV	Intracerebroventricular
NAmb	Núcleo Ambíguo
NMDA	N-metil D-Aspartato
NP	Nitroprussiato de sódio
NTS	Núcleo do Trato Solitário
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pressão Arterial
PE	Felinefrina
PAM	Pressão Arterial Média
PVN	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
RVLM	Área Ventrolateral Rostral do Bulbo
SAL	Salina
SNC	Sistema Nervoso Central
SRA	Sistema Renina-Angiotensina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1. Angiotensina-(1-7) e suas ações sobre o sistema cardiovascular.....	14
2.2. Resposta ao estresse e o maior risco cardiovascular	16
2.3. Participação da região hipotalâmica dorsomedial na resposta ao estresse agudo	17
2.4. Frutose: o doce vilão	20
4. OBJETIVOS.....	23
4.1 Objetivo geral	23
4.2 Objetivos específicos	23
5. METODOLOGIA	24
5.1 Animais	24
5.2. Dieta rica em frutose	24
5.3. Procedimentos cirúrgicos	24
5.4. Registro da Pressão Arterial Média e da Frequência Cardíaca	25
5.5. Avaliação da sensibilidade do controle barorreflexo da frequência cardíaca.....	25
5.6. Estímulo dos receptores NMDA na região hipotalâmica dorsomedial ..	26
5.7. Infusão intracerebroventricular aguda de Angiotensina (1-7).....	26
5.8.	26
Desenho experimental e grupos experimentais	26
5.9.	27
Eutanásia	27
5.10. Análise Estatística.....	27
6. RESULTADOS	28
6.1. Parâmetros Cardiovasculares Basais	28
6.2. Sensibilidade do controle barorreflexo da frequência cardíaca	29

6.3. Resposta cardiovascular ao estímulo dos receptores NMDA da região dorsomedial do hipotálamo.....	35
7. DISCUSSÃO.....	37
8. CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41
APÊNDICE A.....	45
APÊNDICE B.....	46

1. INTRODUÇÃO

Estudos realizados em humanos e em roedores indicam que o aumento da ingestão em longo prazo de frutose pode estar relacionado com o aparecimento de diferentes alterações cardiovasculares e metabólicas. Esse aumento se deve principalmente a sua maior utilização na indústria alimentícia como xarope de milho rico em frutose. (Brownell; Frieden, 2009; Tappy; Lê, 2010).

Em paralelo às alterações na dieta alimentar, a sociedade atual tem enfrentado cada vez mais diferentes situações estressoras. Nas últimas décadas, o ser humano passou a exigir de si mesmo uma maior capacidade de adaptação física, mental e social, se expondo a uma frequente situação de conflito, ansiedade, angústia e instabilidade emocional (Araldi-Favassa; Armiliato; Kalinine, 2005). Atualmente, sabe-se que o estresse é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, principalmente infarto agudo do miocárdio; e que a relação fisiopatológica entre estresse e o aparecimento de doenças cardiovasculares ainda não é completamente bem compreendida. (Rosengren et al., 2004).

É sabido que o sistema renina angiotensina (SRA), por meio da atividade exacerbada e inapropriada do eixo angiotensina (Ang) II/ receptor AT_1 , contribui para o desenvolvimento e o agravamento de diferentes doenças, especialmente aquelas relacionadas às funções cardíaca, vascular e renal (Bader et al., 2001). Por outro lado, está bem estabelecido que o eixo Ang-(1-7)/ receptor Mas contrabalança muitas das ações da Ang II via receptor AT_1 , e que cronicamente, a maior atividade deste eixo constitui um importante mecanismo fisiológico a favor da atenuação da hipertensão arterial e melhora do metabolismo energético.

Dados presentes na literatura sugerem que a infusão intracerebroventricular (icv) crônica de Ang-(1-7) normaliza a pressão arterial e reduz a atividade simpática cardíaca e melhora o metabolismo glicídico em ratos com dieta rica em frutose (Guimaraes et al., 2014). Além disso, a microinjeção aguda icv de Ang-(1-7) também atenua a resposta taquicárdica ao estresse emocional agudo em animais normotensos (Martins et al., 2013), e promove efeito ansiolítico e antidepressivo em animais transgênicos que apresentam baixa atividade do SRA cerebral (Kangussu et al., 2013). No mesmo sentido, ratos transgênicos com aumento de ang-(1-7)

circulante mostraram uma redução no comportamento ansioso quando confrontados com situações de estresse emocional (Kangussu et al., 2017).

Nesse contexto, torna-se relevante elucidar se a dieta rica em frutose altera a atividade dos receptores NMDA no DMH, bem como se altera a resposta fisiológica cardiovascular decorrente da maior disponibilidade aguda da Ang-(1-7); e se esta, seja em condições controle, ou mesmo na dieta rica em frutose, é capaz de influenciar na resposta cardiovascular mediada pela maior atividade dos receptores NMDA no DMH.

Nossos principais achados sugerem que: I) a ingestão crônica de frutose 10% por 20 semanas causou um prejuízo na resposta bradicárdica e na resposta taquicárdica barorreflexa (aumentando o tempo para normalizar a PA e diminuindo o tempo para atingir o pico de queda da PA, frente a variações pressóricas); II) a ang-(1-7) melhorou a resposta bradicárdica, em ambos os grupos (CTL-A7 e FF-A7) e taquicárdica, no grupo CTL-A7, sugerindo que a infusão icv aguda desse peptídeo melhora a sensibilidade do controle barorreflexo da FC III) a ang-(1-7) contribuiu para diminuir o tempo de resposta taquicárdica em resposta a diminuição da PA no grupo CTL-A7; V) a ang-(1-7) parece não influenciar de forma significativa na resposta pressórica do grupo alimentado com frutose em resposta ao estímulo dos receptores NMDA no DMH.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Angiotensina-(1-7) e suas ações sobre o sistema cardiovascular

A angiotensina-(1-7) é um dos peptídeos bioativos do sistema renina angiotensina (SRA) que, por meio de seu receptor específico Mas, promove diferentes ações fisiológicas, das quais muitas se opõem àquelas mediadas pela angiotensina II, via receptor AT_1 . Juntamente com o eixo Alamandina/ receptor MrgD, o eixo Ang-(1-7)/ receptor Mas constituem o braço “*protetor e vasodilatador*” desse sistema, enquanto o eixo Ang II/ receptor AT_1 , junto da Ang A e da Ang III constituem o eixo “*constritor e maléfico*” (Figura 01). (Sanjuliane et al. , 2011; Villela et al., 2014; Ocaranza et al., 2020).

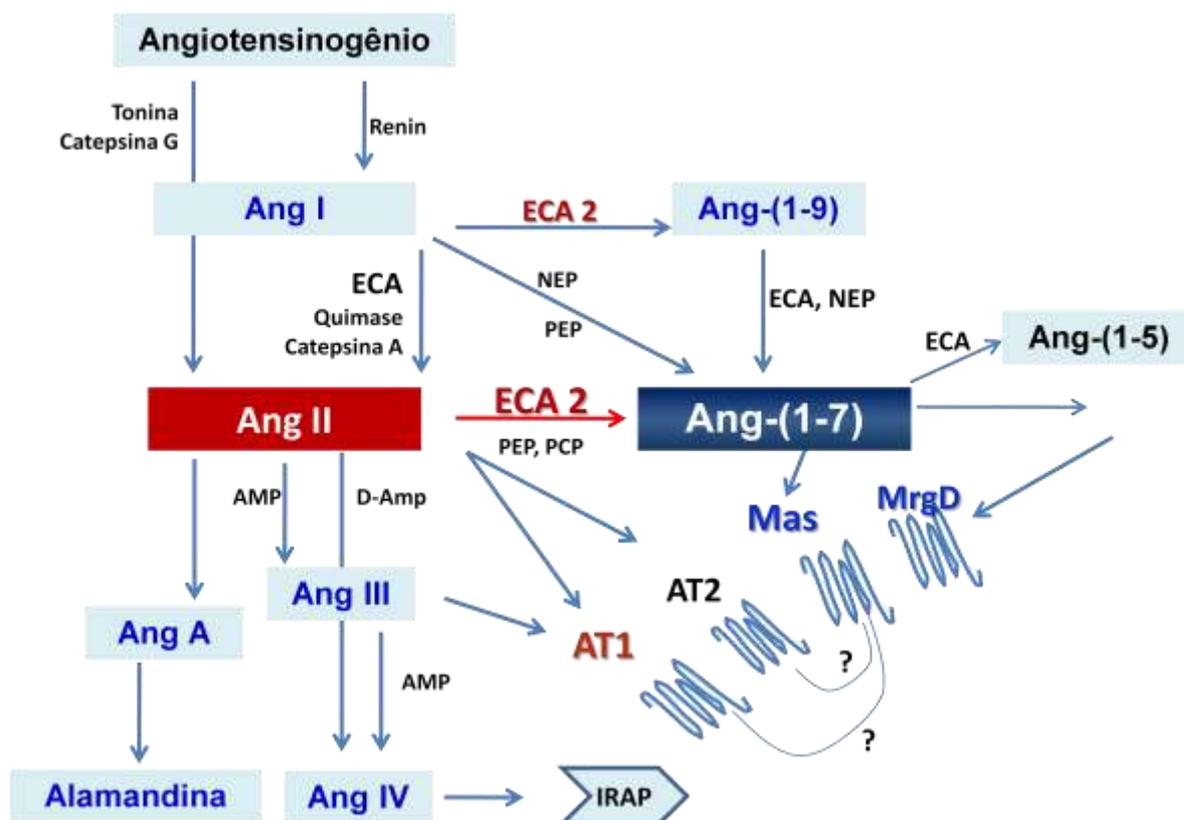


Figura 1 - Ilustração simplificada das vias proteolíticas para a formação de peptídeos de angiotensina biologicamente ativos. ACE: enzima de conversão da angiotensina; AD: aspartato descarboxilase; Amp: aminopeptidase; Amp A: aminopeptidase A; APN: alanil aminopeptidase N; D-Amp: ; D-Amp: dipeptidil-aminopeptidase I-III; IRAP: aminopeptidase regulada pela insulina; MRGD: receptor Mas acoplado a proteína G; NEP: endopeptidase neutra; PCP: prolil-carboxipeptidase; PEP: prolil-endopeptidase. (Adaptado de Santos e Ferreira, 2007).

Estudos em animais mostram que, periféricamente, a Ang-(1-7) é um potente vasodilatador e apresenta efeito antitrombótico, anti-hipertrofico, e anti-hipertensivo (Santos e Ferreira, 2007). O aumento agudo periférico deste peptídeo atenua a taquicardia ao estresse emocional (Martins et al., 2013), e facilita a ação da insulina em tecido muscular (Fu et al., 2014), enquanto o aumento crônico dos níveis periféricos de Ang-(1-7) atenua a hipertensão arterial, a resistência à insulina e o remodelamento cardíaco em animais submetidos à dieta rica em frutose (Giani et al., 2009; Giani et al., 2010).

No SNC, a Ang-(1-7) melhora o controle barorreflexo, observada tanto em estudos com infusão intracerebroventricular (icv) de forma aguda (Campagnole-Santos et al., 1992) ou crônica, em animais hipertensos (Guimaraes et al., 2012; Xue et al., 2013), ou com hipertensão arterial associada à síndrome metabólica (SMet) (Guimaraes et al., 2014). É consistente a observação do efeito anti-hipertensivo e simpatoinibitório da Ang-(1-7) quando administrada por via icv cronicamente em animais hipertensos ou com insuficiência cardíaca (Campagnole-Santos et al., 1992; Guimaraes et al., 2012; Xue et al., 2013). De forma semelhante, a infusão icv crônica de Ang-(1-7) normaliza a pressão arterial e reduz a atividade simpática cardíaca e melhora o metabolismo glicídico em ratos alimentados com dieta rica em frutose (Guimaraes et al., 2014). Além disso, a microinjeção aguda icv de Ang-(1-7) também atenua a resposta taquicárdica ao estresse emocional agudo em animais normotensos (Martins et al., 2013), e promove efeito ansiolítico e antidepressivo em animais transgênicos que apresentam baixa atividade do SRA cerebral (Kangussu et al., 2013). No mesmo sentido, ratos transgênicos com aumento de ang-(1-7) circulante mostraram uma redução no comportamento ansioso quando confrontados com situações de estresse emocional (Kangussu et al., 2017). Em paralelo, a carência de receptores Mas foi apontada como responsável pelo aumento da ansiedade em camundongos (Walther et al., 1998), e, curiosamente, foi sugerido que a transdução do sinal mediado pelo receptor AT_1 é alterada em camundongos sem o Mas proto-oncogene, apoiando um papel importante do receptor Mas nos efeitos mediados pela Ang II na amígdala, estrutura límbica conhecida por seu envolvimento com a resposta ao estresse emocional (Halbach et al., 2000).

Em conjunto, estes estudos indicam que o estímulo crônico favorecendo a maior atividade da Ang-(1-7), por via central ou periférica, promove efeitos benéficos importantes, melhorando o metabolismo energético e atenuando a hipertensão

arterial, além de sugerir que esse peptídeo atue de forma benéfica em resposta ao estresse emocional.

2.2. Resposta ao estresse e o maior risco cardiovascular

Atualmente, sabe-se que o estresse é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, principalmente infarto agudo do miocárdio; e que essa relação entre estresse e o aparecimento de doenças cardiovasculares se mostra similar em homens e mulheres de diferentes idades, sendo independente da condição socioeconômica (Rosengren et al., 2004).

Nas últimas décadas, o modo de vida moderno passou a exigir do ser humano uma grande capacidade de adaptação física, mental e social, expondo as pessoas a uma frequente situação de conflito, ansiedade, angústia e desestabilização emocional (Bauer, 2002; Araldi-Favassa; Armiliato; Kalinine, 2005). As forças e pressões psicológicas e sociais, sob a forma de eventos ou situações, podem ser referidas como fatores estressores quando exercem um efeito negativo sobre a saúde de uma pessoa (Nakajima, 1994). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o estresse afeta mais de 90% da população mundial e é considerado uma epidemia global que não mostra sua verdadeira face. O estresse não é uma doença em si, mas uma forma de adaptação e proteção do corpo contra agentes agressores externos ou internos (Bauer, 2002).

O fisiologista húngaro Hans Selye em 1936 introduziu o termo "*stress*" na área da saúde para denominar a resposta geral e inespecífica do organismo a um estressor ou a uma situação estressante (Selye, 1936). Posteriormente, o termo passou a ser utilizado tanto para designar a resposta do organismo, como a situação que desencadeia os efeitos desta. (De Kloet et al., 2005)

A resposta a um estressor pode compreender aspectos cognitivos, comportamentais e fisiológicos, tais como o aumento da frequência cardíaca e respiratória, alterações hemodinâmicas, aumento dos níveis de cortisol e mobilização de substratos energéticos, aumento do estado de alerta e da cognição, euforia e analgesia. Além disso, ocorre inibição de outras funções vegetativas, como alimentação, digestão, crescimento, e reprodução (Smith e Vale, 2006).

Quando o cérebro interpreta alguma situação como ameaçadora ou tensa, todo organismo passa a desenvolver uma série de alterações denominadas por Selye de *Síndrome Geral da Adaptação* ou Estresse. Na primeira etapa ocorre uma

Reação de Alarme, onde todas as respostas corporais entram em estado de prontidão geral. Se o fator estressor continua por um período mais longo, sucede-se a segunda fase, chamada de *Fase de Adaptação ou Resistência*. Nesta fase o corpo começa a acostumar-se aos estímulos causadores do estresse e entra num estado de resistência ou de adaptação. Se o estresse continuar por um longo período de tempo, o corpo todo pode entrar na terceira fase, o Estado de Esgotamento, onde haverá queda acentuada da capacidade adaptativa (Ballone, 2015).

Estudos mostram que as regiões cerebrais ativadas durante a exposição ao estresse agudo podem ser variadas dependendo do tipo de agente estressor (Pacak and Palkovits, 2001). Nesse contexto, o hipotálamo é considerado uma das principais regiões cerebrais envolvidas na resposta cardiovascular ao estresse agudo (Dampney, 2015).

2.3. Participação da região hipotalâmica dorsomedial na resposta ao estresse agudo

O a região hipotalâmica dorsomedial (DMH) é uma estrutura diencefálica, localizada bilateralmente e adjacente ao terceiro ventrículo, caudal ao núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e dorsal ao núcleo ventromedial (Paxinos and Watson, 1986; Figura 02). Ao longo de anos, diversos estudos tem apontado que mais especificamente a região hipotalâmica dorsomedial (DMH) como uma região-chave das vias centrais que modulam de forma direta (e, possivelmente, também indireta) a atividade de núcleos bulbares que possuem neurônios pré-motores simpáticos, que por fim, regulam a atividade simpática periférica (em órgãos-alvo) durante a reação de alarme (De Novellis et al. 1995; DiMicco, 2002; Fontes et al. 2011; Figura 03).

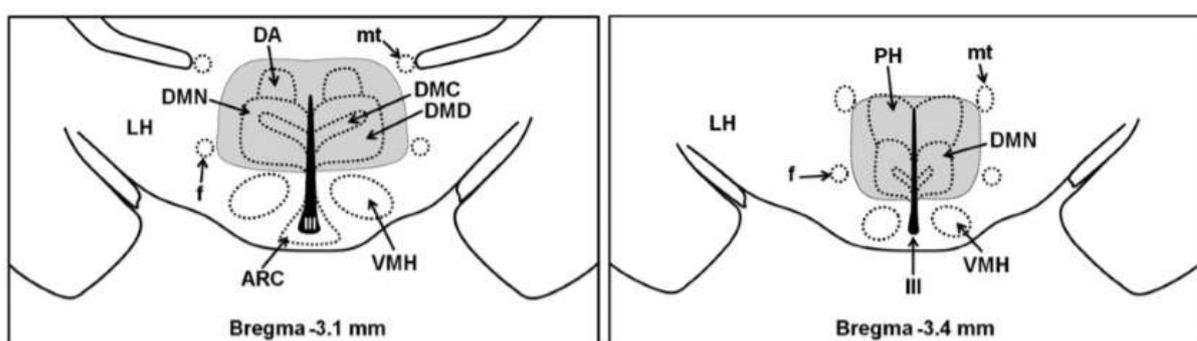


Figura 02 - Localização da região hipotalâmica dorsomedial (sombra cinza), de acordo com Paxinos e Watson (1986). (Adaptado de Fontes et al., 2011).

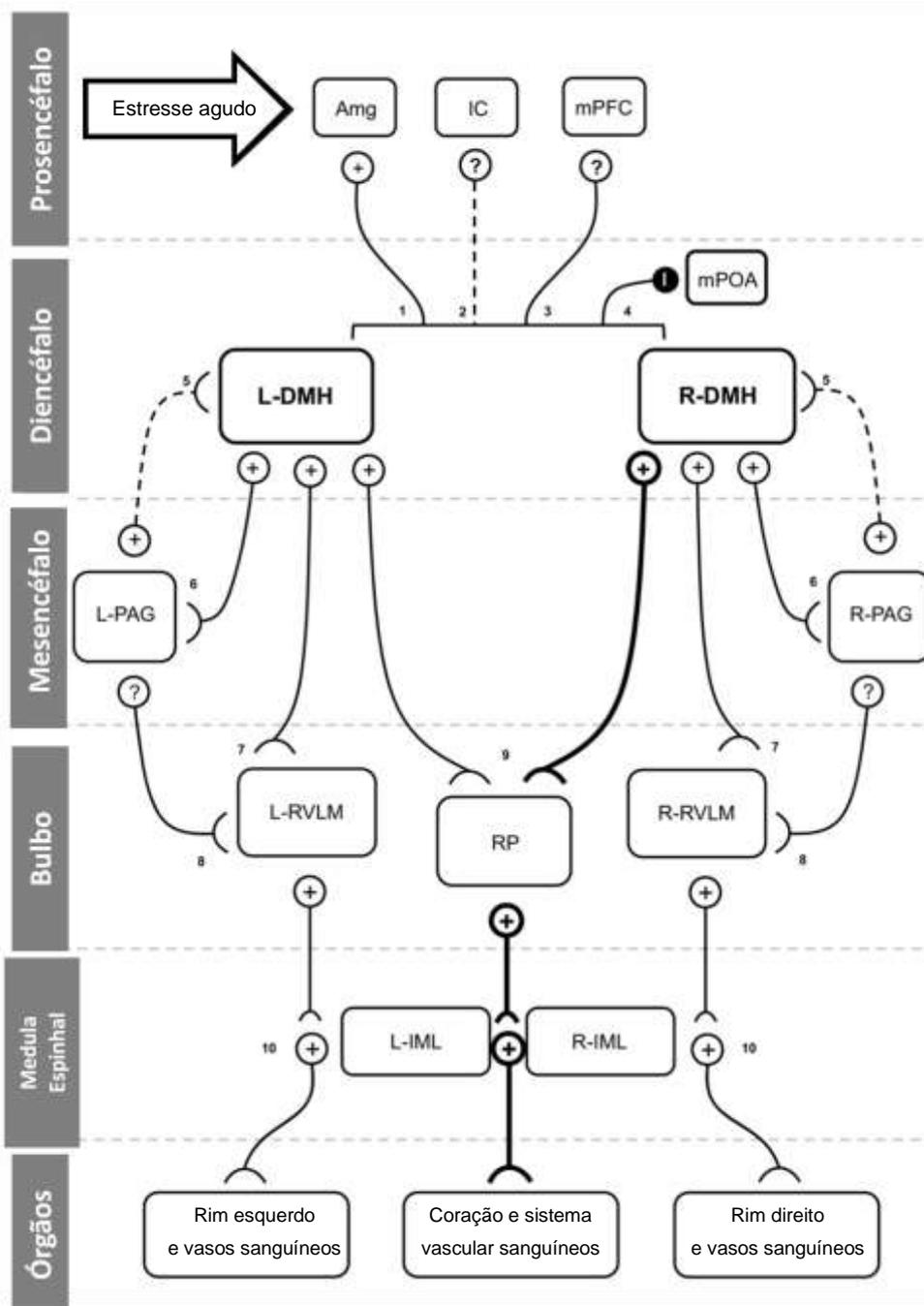


Figura 3 - Diagrama esquemático (baseado em estudos funcionais e anatômicos) mostrando vias descendentes envolvidas na organização da resposta cardiovascular ao estresse emocional em diferentes níveis da neuronal. 1:Amígdala; 2:Lobo da ínsula; 3: córtex pré-frontal; 4:Área pré-óptica medial; 5:Região hipotalâmica dorsomedial; 6:substância cinzenta periaquedutal; 7-8: Região Rostro Ventrolateral do Bulbo; 9: Núcleo Pálido da Rafe; 10: Núcleo intermediolateral. (Adaptado de Fontes et al, 2011).

O equilíbrio entre as transmissões sinápticas excitatórias e inibitórias, mediadas por glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA), no DMH é crucial para regulação da excitabilidade dos neurônios nessa região e, por consequência, fundamental para regular a resposta simpática associada à resposta ao estresse

emocional agudo (DiMicco, 2002). A inibição de neurônios na região posterior do hipotálamo via microinjeção de muscimol (agonista do receptor GABA_A), se mostrou eficiente em abolir o típico aumento da resposta taquicárdica frente ao estresse agudo por jato de ar (Lisa et al. , 1989). Em adição, a microinjeção de bicuculina (antagonista do receptor GABA_A) no DMH promoveu um aumento pressórico e taquicárdico em ratos conscientes, semelhante à resposta padrão encontrada em resposta ao estresse emocional, sugerindo que os neurônios do DMH estejam sob uma constante ação inibitória (DiMicco, 2002). Sugere-se que durante o estresse emocional agudo, a percepção de perigo do ambiente supera ou reduz a inibição tônica dos neurônios do DMH, resultando em respostas cardiovasculares características ao estresse (Fontes et al. , 2011).

Nesse contexto, a microinjeção de aminoácidos excitatórios no DMH se mostrou eficiente em promover um aumento pressórico e taquicárdico em ratos conscientes (De Novellis et al. 1995). Em adição, o bloqueio dos receptores destes mesmos aminoácidos excitatórios no DMH, suprimiu o aumento da resposta pressórica e taquicárdica provocada na mesma região (Soltis e DiMicco, 1992). Esses achados sugerem que as alterações cardiovasculares produzidas pelo bloqueio da inibição gabaérgica no DMH dependem da ativação dos receptores de aminoácidos excitatórios na região (Fontes et al. , 2011).

O DMH é uma região essencial na resposta cardiovascular frente ao estresse emocional e suas vias descendentes envolvidas nessa resposta têm sido mapeadas ao longo dos anos (Dimicco et al., 1996; Dampney et al., 2001; Fontes et al., 2011; Dampney, 2015). É sugerido que resposta pressórica e simpatoexcitatória gerada pelos neurônios do DMH sejam dependentes da atividade neuronal na área ventrolateral rostral do bulbo (RVLM) e a resposta taquicárdica seja mediada via núcleos da rafe, já que a inibição desse núcleo, por microinjeção de muscimol, inibiu a resposta taquicárdica produzida pela ativação dos neurônios do DMH. (Samuels et al., 2002; Fontes et al., 2011).

Um número crescente de evidências aponta para um papel importante da maior simpatoexcitação , intensificando a resposta cardiovascular ao estresse, como um fator predisponente ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Fontes et al., 2014; Fontes et al., 2015). Estudos têm mostrado que ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica (Abreu et al., 2014) ou obesos por mutação gênica (D'Angelo et al., 2006) manifestam reatividade cardiovascular aumentada ao estresse

emocional. Em adição, estudos em humanos sugerem que indivíduos obesos podem apresentar uma atenuação na resposta cardiovascular ao estresse (Brydon, 2011; Phillips, 2011; De Rooij, 2013) ou um atraso na recuperação cardiovascular no período pós-estresse (Steptoe; Wardle, 2005; Burch; Allen, 2014).

Por outro lado, o estresse parece influenciar tanto na quantidade, quanto nos tipos de alimentos que a maioria das pessoas ingere. Por exemplo, aproximadamente 35-60% das pessoas relatam ingerir mais calorias totais quando estão sob situações de estresse, enquanto aproximadamente 25-40% das pessoas relatam perder o apetite. Além disso, muitas pessoas apresentam preferência por alimentos altamente palatáveis, ou seja, alimentos mais saborosos, contendo grandes quantidades de açúcares, gorduras, ou sal. Essa seleção de alimentos induzidas pelo estresse é muitas vezes referida como '*comfort food*' - um termo que reflete a ideia de que a ingestão de alimentos palatáveis reduz as respostas do estresse, proporcionando assim um meio em potencial para o alívio do estresse (Ulrich-Lai et al., 2015).

Estudo em modelo experimental apontou que o estresse crônico e níveis elevados de corticosterona impulsionam a maior ingestão calórica de alimentos palatáveis, que por sua vez induzem a maior deposição de gordura abdominal (Dallman et al., 2003). Da mesma forma, em humanos, um estudo mostrou que indivíduos que respondem ao estresse com níveis elevados de cortisol aumentam a ingestão de alimentos (Epel et al., 2001). Conseqüentemente, aqueles que ingerem mais alimentos durante o estresse terão maior secreção de insulina, e deposição de gordura abdominal.

2.4. Frutose: o doce vilão

A frutose é um açúcar encontrado naturalmente na cana de açúcar, no mel e nas frutas. Contudo, com o desenvolvimento tecnológico na indústria alimentícia, o consumo de frutose por humanos aumentou significativamente nas últimas cinco décadas, o que é em grande parte devido ao desenvolvimento do xarope de milho rico em frutose, um aditivo comercial de açúcar que contém grandes quantidades de frutose livre. O xarope de milho rico em frutose é frequentemente adicionado a alimentos processados e bebidas, em parte porque é um excelente adoçante, mas ainda mais porque sua produção é de baixo custo. Embora a frutose em combinação com fibras, vitaminas e minerais, como presente nas frutas, seja uma

fonte saudável de energia, a frutose livre adicionada a alimentos processados tem sido associada à ocorrência de vários distúrbios de saúde, como a resistência à insulina e hipertensão arterial (Brown et al., 2008; Lowette et al., 2015).

A literatura científica mostra que a ingestão aguda de frutose aumenta a pressão arterial média, a frequência cardíaca e a atividade simpática, bem como reduz a sensibilidade do controle barorreflexo da FC em humanos saudáveis (Brown et al., 2008). De acordo, a ingestão crônica desse monossacarídeo por indivíduos com sobrepeso está relacionada com o aumento da massa adiposa abdominal, dos níveis de triacilgliceróis (TAG) pós-prandial, da glicemia e insulinemia de jejum, bem como com intolerância à glicose (Teff et al., 2009).

De acordo, estudos em roedores também reportam que a ingestão em longo prazo de frutose promove diferentes alterações nas funções do sistema cardiovascular e do metabolismo energético que constituem fatores de risco ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes tipo II, tais como: aumento da pressão arterial, prejuízo na sensibilidade barorreflexa, maior simpatoexcitação cardíaca, intolerância à glicose e maior deposição de gordura visceral (De Angelis et al., 2012; Guimaraes et al., 2014; Machi et al., 2013; Morvan et al., 2013). Além disso, uma dieta rica em frutose e gordura foi apontada como um gatilho para um comportamento depressivo e ansiolítico em modelo experimental (Gancheva et al., 2017).

E, apesar do número crescente de estudos que apontam a frutose como um “doce vilão” à saúde, há pouca evidência científica acerca da relação entre ingestão aumentada de frutose e a resposta do indivíduo ao estresse, seja ela no aspecto homeostático (ex.: ajustes cardiovasculares e metabólicos) ou comportamental (ex.: luta ou fuga). Até o momento, sabe-se apenas de um estudo publicado recentemente que relaciona o consumo crônico de frutose em animais com a resposta cardiovascular ao estresse (Thompson et al., 2016). Esse estudo apresenta diferentes limitações metodológicas, e apesar disso sugere que o consumo crônico de frutose prejudica a atividade vasodilatadora beta-adrenérgica pós-estresse, retardando a recuperação desses animais quanto à resposta pressórica no período pós-estresse.

Dados recentes e ainda não publicados pelo grupo de estudo (apêndices A e B) sugeriram que roedores alimentados cronicamente com dieta rica em frutose (10 ou 20 semanas) apresentaram resposta cardiovascular exacerbada ao estresse

emocional agudo, quando comparados aos animais controle. Em adição, resultados prévios do mesmo grupo de pesquisa mostraram que o aumento crônico dos níveis cerebrais de Ang-(1-7) normaliza a atividade simpática cardíaca de animais alimentados cronicamente com dieta rica em frutose, além de promover outros efeitos cardiovasculares e metabólicos benéficos (Guimaraes et al, 2014). No entanto, ainda resta saber se os efeitos deletérios produzidos pela dieta rica em frutose podem decorrer de um prejuízo na atividade endógena do eixo Ang-(1-7)/receptor Mas.

Considerando o exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar as respostas cardiovasculares mediadas pelo aumento agudo cerebral de Ang-(1-7) em ratos alimentados com dieta rica em frutose e se estas ações podem permear as respostas fisiológicas evocadas pela estimulação dos receptores NMDA no DMH. Por fim, este estudo pretende avaliar se a estimulação dos receptores NMDA no DMH está alterada na dieta rica em frutose.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar as respostas cardiovasculares decorrentes do aumento agudo dos níveis cerebrais de angiotensina-(1-7) em animais alimentados com dieta rica em frutose.

4.2 Objetivos específicos

1) Avaliar o efeito mediado pelo aumento agudo dos níveis cerebrais de angiotensina-(1-7) sobre:

- a) pressão arterial e frequência cardíaca de repouso
- b) sensibilidade do controle barorreflexo da frequência cardíaca
- c) resposta cardiovascular ao estímulo dos receptores NMDA no hipotálamo dorsomedial.

2) Avaliar se a ingestão crônica de frutose altera a resposta cardiovascular ao estímulo dos receptores NMDA no hipotálamo dorsomedial;

3) Avaliar se os possíveis efeitos mediados pelo aumento agudo dos níveis cerebrais de angiotensina-(1-7) estão alterados nos animais alimentados com dieta rica em frutose.

5. METODOLOGIA

5.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (6 semanas de idade) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas. Os animais foram acomodados em sala apropriada com renovação de ar, temperatura controlada (22-24°C) e ciclo claro-escuro de 12-12h (06:00h–18:00h), em caixas de polipropileno adequadas para roedores (2-3 animais/ caixa), com livre acesso à ração padrão para roedores e ingestão de líquido (água potável ou solução de frutose).

Todos os procedimentos experimentais foram realizados com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFAL (protocolo n. 71/2016).

5.2. Dieta rica em frutose

A partir da 7ª semana de idade, parte dos animais recebeu solução de frutose 10% (Synth®) para beber (grupo FF). A solução foi preparada utilizando água potável, e sendo renovada a cada 48h, durante 20 semanas *ad libitum*. Ao grupo controle foi ofertada água potável (grupo CTL).

5.3. Procedimentos cirúrgicos

Ao final das 20 semanas de dieta rica em frutose, os animais foram anestesiados com Uretana (1,2 a 1,4g/kg; Sigma-Aldrich) por via intraperitoneal (i.p.), tricotomizados nas regiões inguinal, traqueal e da cabeça, e devidamente acomodados em superfície plana de temperatura controlada à 37 °C (*heat pad*, Insight).

Inicialmente os animais foram traqueostomizados, com o intuito de facilitar o fluxo de ar pelas vias respiratórias, por meio da inserção de um cateter intravenoso tipo abocath 21G (1,5 cm) na traqueia. Em seguida, os animais foram submetidos à canulação de artéria e veia femoral por meio de uma pequena incisão (1,0 cm) no trígono femoral, para permitir o registro dos parâmetros cardiovasculares e a administração de drogas vasoativas, respectivamente (Moldestad et al., 2009). As cânulas vasculares foram preparadas a partir da polimerização por aquecimento de tubos de polietileno PE10 (3,5 cm - artéria; 2,5 cm - veia) e PE50 (17 cm) e

preenchidas com solução de heparina (150 UI/ ml) – artéria, ou salina estéril 0,9% - veia.

Na sequência, os animais foram acomodados um instrumento estereotáxico de 2 torres (Bonther®) a 3,3 mm abaixo do plano interaural (barra incisiva = -3,3 mm) e por meio das barras auriculares, a cabeça foi mantida em uma posição fixa. Em seguida, foi realizada uma incisão mediana para exposição do crânio e localização do bregma, que foi usado como referência para a leitura das coordenadas. Com o auxílio de uma broca esférica odontológica foram produzidos dois furos no crânio, que permitiram a entrada das cânulas nas regiões. As coordenadas alvo foram: 1) DMH: -3,3 mm antero-posterior, -0,6 mm lateral, -8,2 mm dorso-ventral e 2) icv: -1,0 mm antero-posterior, +1,5 mm lateral, -4,5 mm dorso-ventral (Paxinos e Watson, 1997). As cânulas injetoras (agulhas gengivais, DMH: 30G curta e icv: 27G longa) ficaram presas às torres do esterotáxico, e assim, permitiram a microinjeção de drogas na região intracerebroventricular e na região hipotalâmica dorsomedial durante os procedimentos experimentais. Após o estímulo dos receptores NMDA no DMH, as torres do esterotáxico não foram movimentadas, a não ser verticalmente.

5.4. Registro da Pressão Arterial Média e da Frequência Cardíaca

A cânula da artéria femoral foi conectada ao transdutor de pressão (SP 844/Memscap; PowerLab/ADInstruments®). O registro foi obtido pelo software LabChart 8.0 Pro® em uma frequência de amostragem de 2000 Hz.

Os parâmetros cardiovasculares basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram obtidos a partir da PA pulsátil e monitorados por aproximadamente 30 minutos antes do início da avaliação do controle barorreflexo da FC.

5.5. Avaliação da sensibilidade do controle barorreflexo da frequência cardíaca

A avaliação da sensibilidade do controle barorreflexo da FC (BRS) foi realizada por meio da administração endovenosa do agonista α -adrenérgico fenilefrina (PE; 50 μ g/ml; e.v.; Sigma-Aldrich®) e de Nitroprussiato de sódio (NP; 50 μ l/ml; e.v.; Sigma-Aldrich®), utilizando uma bomba de infusão (Scienlabor®) na taxa de 350 μ l/min com a finalidade de alterar a PAM em 50 mmHg no intervalo de 60 a 90 segundos. A avaliação da BRS foi realizada antes e durante os 30 minutos

finais da infusão icv de veículo ou angiotensina-(1-7). Para análise da BRS (ms/mmHg) foram obtidos os valores correspondentes da FC dentro dos picos de alteração da PAM (20, 30, 40 e 50 mmHg) durante o tempo de infusão das drogas vasoativas. O ganho no barorreflexo cardíaco foi determinado pela razão $\Delta FC/\Delta PAM$, expressa em intervalo de pulso (milissegundos) por milímetro de mercúrio (ms/mmHg).

5.6. Estímulo dos receptores NMDA na região hipotalâmica dorsomedial

Para a estimulação dos receptores NMDA na região hipotalâmica dorsomedial foi utilizado o *ácido N-metil-D-aspartato* (Sigma-Aldrich®), na concentração de 100 pmol em 100 nl de salina estéril. Para esse procedimento foi utilizada uma seringa Hamilton de 5 μ l, conectada por meio de um tubo de polietileno PE-10 à agulha injetora fabricada a partir de uma agulha gengival 30G. Com o auxílio da bomba de perfusão (Scienlabor®) o volume de 100 nl foi microinjetado no DMH, com duração de 30 segundos para cada microinjeção. O estímulo foi realizado antes e ao final da infusão intracerebroventricular de salina 0,9% ou angiotensina-(1-7).

5.7. Infusão intracerebroventricular aguda de Angiotensina (1-7)

A infusão intracerebroventricular de angiotensina-(1-7) (2,0 μ g; Sigma-Aldrich®) ou de solução salina estéril 0,9% (solução veículo), foi realizada no ventrículo lateral cerebral esquerdo, na taxa de 3,0 μ l/hora por 2h30min (duas horas e meia; volume total = 7,5 μ l), com o auxílio de uma seringa Hamilton de 10 μ l, conectada por um tubo de polietileno PE-10 à agulha injetora (27G) e acoplada à bomba de perfusão (Scienlabor®).

5.8. Desenho experimental e grupos experimentais

A Figura 04 ilustra o desenho do protocolo experimental para registro dos parâmetros cardiovasculares realizado em animais anestesiados ao final das 20 semanas de ingestão de dieta rica em frutose. Para realização desse protocolo, os animais a partir de 7 semanas de idade foram agrupados a cada 2-3 animais/caixa e separados em 4 grupos experimentais:

a) CTL-Sal: ratos Wistar alimentados com ração para roedores e água potável para beber e receberam infusão icv de salina 0,9%.

b) FF-Sal: ratos Wistar alimentados com ração para roedores e solução de frutose 10% para beber e receberam infusão icv de salina 0,9%.

c) CTL-A7: ratos Wistar alimentados com ração para roedores e água potável para beber e receberam infusão icv de angiotensina 1-7.

d) FF-A7: ratos Wistar alimentados com ração para roedores e solução de frutose 10% para beber e receberam infusão icv de angiotensina 1-7.

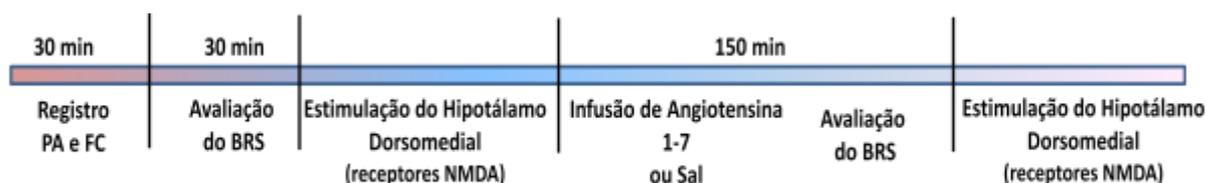


Figura 04 – Desenho experimental mostrando a sequência temporal do protocolo experimental

5.9. Eutanásia

Ao final dos experimentos, os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica com tiopental sódico (40 mg/kg, e.v; Cristália®).

5.10. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e "n" representa o número de animais utilizados nos protocolos experimentais. Foi realizada uma análise descritiva dos resultados para avaliação da normalidade e da variabilidade amostral. Diferenças entre os 4 grupos experimentais foram analisadas por One-Way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls (# $p < 0,05$ vs CTL-sal; & $p < 0,05$ vs FF-sal; φ vs CTL-A7), diferenças dentro de cada grupo em função da infusão icv foram analisadas pelo teste *t Student* pareado (* $p < 0,05$; antes vs depois), e diferenças entre os grupos CTL e FF quanto aos parâmetros basais foram analisadas por teste *t Student* não pareado, quando apropriado ($\dagger p < 0,05$). Foi considerado como nível de significância $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando os programas estatísticos GraphPad Prism® 6.0 e Sigma-Plot® 12.0.

6. RESULTADOS

6.1. Parâmetros Cardiovasculares Basais

A figura 05 mostra os valores basais de PAM (CTL-Sal = $89,01 \pm 2,5$ mmHg; FF-Sal = $86,99 \pm 6$; CTL-A7 = $89,12 \pm 3,4$; FF-A7 = $85,81 \pm 3,6$) e FC (CTL-Sal = $316,6 \pm 6,9$; FF-Sal = $335,6 \pm 8,9$; CTL-A7 = $291,9 \pm 13,9$; FF-A7 = $313,4 \pm 11,5$) para os quatro grupos experimentais. Como observado, a PAM e a FC basais não diferiram entre os grupos.

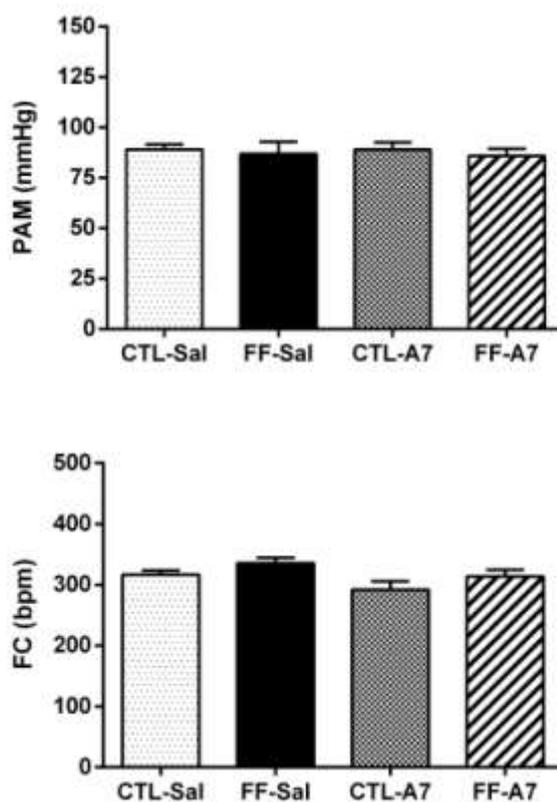


Figura 05 - Pressão arterial média (A) e frequência cardíaca (B) basais de ratos Wistar submetidos à ingestão crônica de frutose a 10% por 20 semanas. Os valores estão apresentados como média \pm EPM. CTL-Sal = Controle Salina (n=6); FF-Sal= Frutose salina (n=6); CTL-A7= Controle angiotensina-(1-7) (n=5); FF-A7= Frutose angiotensina-(1-7) (n=6); N = número amostral.

6.2. Sensibilidade do controle barorreflexo da frequência cardíaca

A Figura 06 mostra que os animais do grupo FF-sal (Fig. 05B) apresentaram uma redução de aproximadamente 50% de prejuízo barorreflexo da FC em relação ao grupo CTL-sal (Fig. 06A; † $p < 0,05$). De acordo, tal prejuízo persistiu após a infusão icv de solução veículo (FF-sal; $p = 0,08$). Por outro lado, os animais do grupo FF-A7, que também apresentaram inicialmente (barra clara) prejuízo na resposta bradicárdica à PE (Fig. 06B), apresentaram uma melhora significativa após a realização da infusão aguda icv de Ang-(1-7) (barra escura, Fig. 06B).

De forma diferente, a resposta taquicárdica ao NP não diferiu inicialmente entre os grupos experimentais (barras claras, Fig. 06C e D), ao passo que, após a infusão icv de veículo ou A7 os animais dos grupos CTL apresentaram uma maior resposta taquicárdica quando comparados à resposta antes da infusão, enquanto isso não ocorreu nos animais dos grupos FF-sal e FF-A7 (barras escuras; Fig. 06C e D). Não houve diferença entre os grupos CTL-sal e CTL-A7 para a resposta taquicárdica após a infusão icv (barras escuras; Fig. 06C).

As tabelas 01 e 02 mostram os valores da sensibilidade do controle barorreflexo e a variação máxima da PAM e da FC na avaliação do controle barorreflexo da FC antes ou depois da infusão icv aguda de Ang-(1-7) ou veículo, respectivamente.

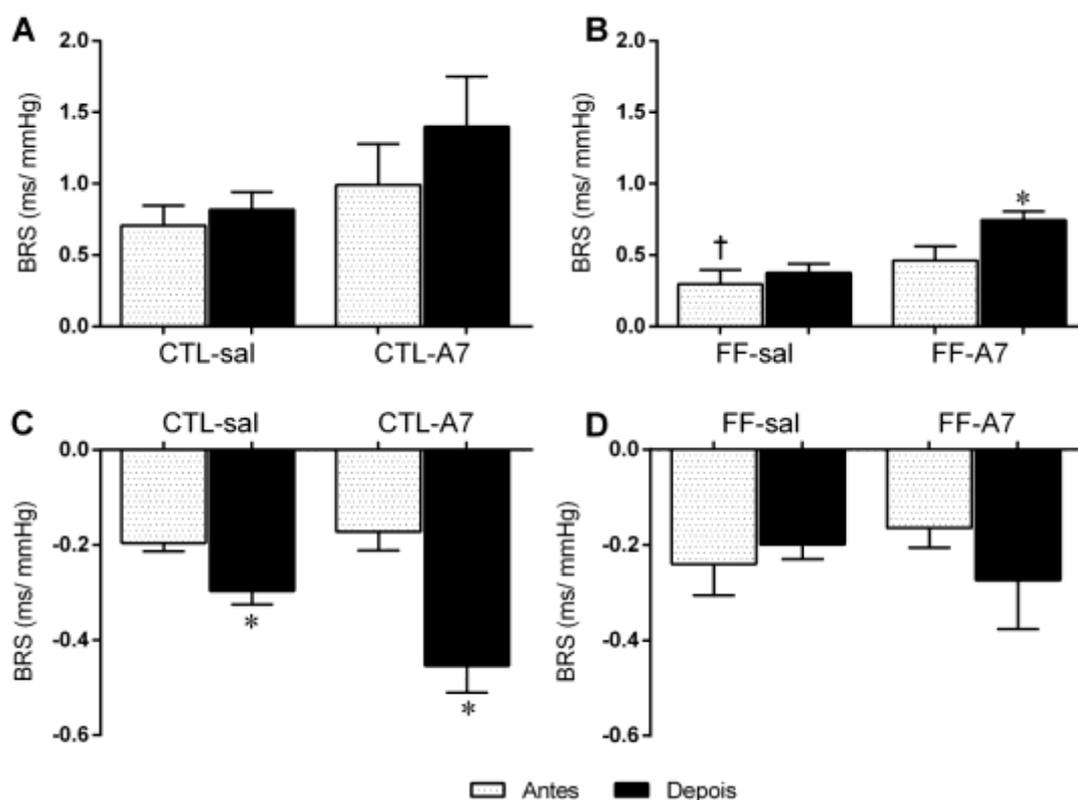


Figura 06 – Sensibilidade do controle barorreflexo da frequência cardíaca em resposta ao aumento da pressão arterial com PE (A e B) e em resposta a redução da pressão arterial com NP (C e D). Legenda: barras claras correspondem aos valores obtidos antes da infusão icv; barras escuras: valores obtidos após a infusão icv. Os valores estão expressos como média \pm EPM. CTL-Sal = Controle Salina (n=6); FF-Sal= Frutose salina (n=6); CTL-A7= Controle angiotensina (1-7) (n=5); FF-A7= Frutose angiotensina (1-7) (n=5); N =número amostral. * $p < 0,05$; teste *t Student* pareado. † $p < 0,05$ vs CTL; teste *t student* não pareado.

Tabela 01 – Valores da sensibilidade do controle barorreflexo (em ms/mmHg) antes e após a infusão intracerebroventricular aguda de angiotensina-(1-7) ou solução veículo.

Grupo Experimental	PE		NP	
	antes	depois	antes	depois
CTL-Sal	0,70 \pm 0,13	0,82 \pm 0,12	-0,19 \pm 0,01	-0,29 \pm 0,02*
FF-Sal	0,29 \pm 0,10	0,37 \pm 0,06	-0,24 \pm 0,06	-0,19 \pm 0,03
CTL-A7	0,99 \pm 0,28	1,39 \pm 0,35	-0,17 \pm 0,03	-0,45 \pm 0,05*
FF-A7	0,46 \pm 0,09	0,74 \pm 0,06*	-0,18 \pm 0,04	-0,27 \pm 0,10

Valores apresentados como média \pm EPM. CTL-Sal = Controle Salina (n=6); FF-Sal= Frutose salina (n=6); CTL-A7= Controle angiotensina (1-7) (n=5); FF-A7= Frutose angiotensina (1-7) (n=5); PE= agonista α -adrenérgico fenilefrina; NP= nitroprussiato de sódio; N =número amostral. * $p < 0,05$ teste *t Student* pareado.

Tabela 02 – Variação máxima (Δ) da pressão arterial média (mmHg) e da frequência cardíaca (bpm) na avaliação do controle barorreflexo da FC antes ou depois da infusão intracerebroventricular aguda de angiotensina-(1-7) ou veículo.

Grupo Exp	PE			
	antes		depois	
	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC
CTL-Sal	51,25 \pm 0.5	-51,44 \pm 7.9	48,46 \pm 2.8	-66,27 \pm 9.5
FF-Sal	48,61 \pm 1.9	-25,89 \pm 7.3	39,11 \pm 2.2	-33,13 \pm 5.2
CTL-A7	49,27 \pm 2.0	-52,97 \pm 12.6	32,20 \pm 5.5	-72,26 \pm 10.9
FF-A7	51,08 \pm 0.04	-35,74 \pm 8.6	37,03 \pm 3.5	-49,74 \pm 2.5
	NP			
	antes		depois	
	Δ PAM	Δ FC	Δ PAM	Δ FC
CTL-Sal	-44,21 \pm 2.4	14,41 \pm 2.27	-51,36 \pm 0.5	35,72 \pm 6.4
FF-Sal	-45,89 \pm 2.6	19,17 \pm 5,0	-48,12 \pm 1.8	27,96 \pm 2.8
CTL-A7	-43,46 \pm 3.2	19,00 \pm 5.9	-47,74 \pm 2.0	52,43 \pm 5.4
FF-A7	-36,88 \pm 2.5	12,18 \pm 2.3	-46,19 \pm 2.6	29,30 \pm 10.53

Valores apresentados como média \pm EPM. CTL-Sal = Controle Salina (n=6); FF-Sal= Frutose salina (n=6); CTL-A7= Controle Angiotensina (1-7) (n=5); FF-A7= Frutose Angiotensina (1-7) (n=5); PE= agonista α -adrenérgico fenilefrina; NP= nitroprussiato de sódio; N =número amostral. PAM = pressão arterial média; FC = frequência cardíaca.

Com o objetivo de melhor avaliar a influência da infusão aguda de Ang-(1-7) sobre as respostas pressórica e bradicárdica (ou taquicárdica) em decorrência da infusão das drogas vasoativas (agonista α -adrenérgico fenilefrina e nitroprussiato de sódio), foi realizada a medição do tempo (em segundos) para se atingir o pico das respostas (inf-pico), bem como o tempo para a normalização dos parâmetros cardiovasculares (pico-norm) após a ocorrência deste pico.

Como observado na tabela 03, não houve diferença entre os grupos experimentais quanto ao tempo para se alcançar o pico da variação da PA, nem para a normalização deste parâmetro, seja em decorrência da administração endovenosa de PE ou de NP antes da realização da infusão icv.

Em contraste, após a realização da infusão icv, observa-se que os grupos que receberam a infusão icv aguda de Ang-(1-7) (CTL-A7 e FF-A7) apresentaram uma redução no tempo necessário para normalizar a PA em resposta ao seu aumento pelo agonista α -adrenérgico fenilefrina, quando comparados aos grupos controle que receberam infusão de salina (Fig. 07B e Tabela 04). Em adição, o tempo para se atingir o pico de PA e o tempo para normalizar a PA foram maiores no grupo FF-sal comparado ao CTL-sal (Fig 07A e B e Tabela 04).

Por outro lado, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais em relação ao tempo para a queda da PA provocada pela infusão de nitroprussiato de sódio, nem para a normalização desta (Fig. 07C e D e Tabela 04).

Tabela 03 – Valores do tempo total (segundos) para o pico e para a normalização da pressão arterial antes da infusão intracebroventricular de angiotensina-(1-7) ou veículo.

Grupo Experimental	PE		NP	
	inf-pico	pico-norm	inf-pico	pico-norm
CTL-Sal	75,8 ± 8.2	100,0 ± 4.4	58,3 ± 4.0	83,3 ± 6.1
FF-Sal	70,0 ± 6.8	130,8 ± 11.7	46,0 ± 4.0	68,0 ± 5.8
CTL-A7	84,0 ± 6.7	104,0 ± 6.7	66,0 ± 4.0	82,0 ± 8.0
FF-A7	76,6 ± 4.9	126,0 ± 7.1	75,0 ± 2.2	71,6 ± 4.7

Valores apresentados como média ± EPM. CTL-Sal = Controle Salina (n=6); FF-Sal= Frutose salina (n=6); CTL-A7= Controle Angiotensina (1-7) (n=5); FF-A7= Frutose Angiotensina (1-7) (n=5); PE= agonista α - adrenérgico fenilefrina; NP= nitroprussiato de sódio; N =número amostral. Inf-pico = tempo do início da infusão e.v até o pico da resposta; pico-norm = tempo para normalizar o parâmetro após o alcance do pico da resposta.

Tabela 04 – Valores do tempo total (segundos) para o pico e para a normalização da pressão arterial depois da infusão intracerebroventricular de angiotensina-(1-7) ou veículo.

Grupo Experimental	PE		NP	
	inf-pico	pico-norm	inf-pico	pico-norm
CTL-Sal	68,0 ± 4.8	75,0 ± 5.6	58,33 ± 3.07	70,83 ± 4.3
FF-Sal	101,7 ± 6.5 [#]	141,7 ± 12.2 [#]	55,0 ± 3.1	68,0 ± 3.7
CTL-A7	84,0 ± 10.3	27,0 ± 3.7 [#]	70,0 ± 8.3	74,0 ± 7.4
FF-A7	113,3 ± 4.2	66,0 ± 8.0 ^{&φ}	66,6 ± 6.1	71,6 ± 7.9

Valores apresentados como média ± EPM. CTL-Sal = Controle Salina (n=6); FF-Sal= Frutose salina (n=6); CTL-A7= Controle Angiotensina (1-7) (n=5); FF-A7= Frutose Angiotensina (1-7) (n=5); PE= agonista α -adrenérgico fenilefrina; NP= nitroprussiato de sódio; N =número amostral. Inf-pico = tempo do início da infusão e.v até o pico da resposta; pico-norm = tempo para normalizar o parâmetro após o alcance do pico da resposta. # p<0,05 vs CTL-sal; & p<0,05 vs FF-sal; φ vs CTL-A7; One-way ANOVA seguido por Newman-Keuls

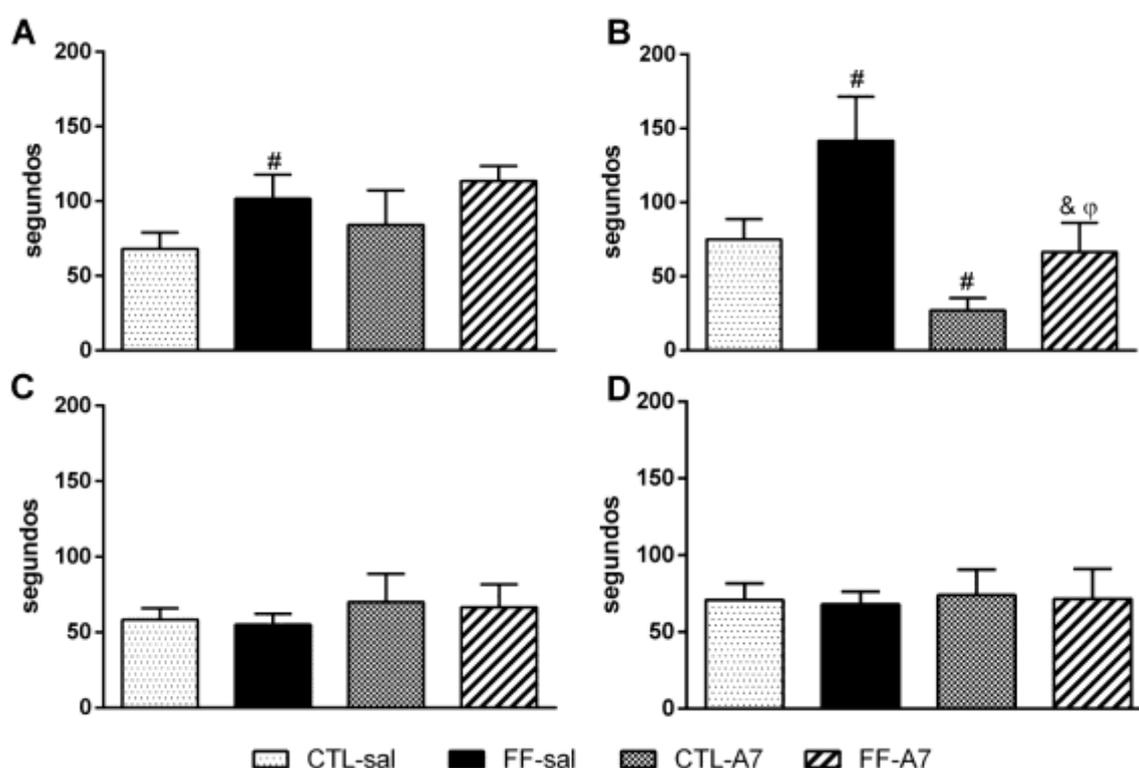


Figura 07 – Tempo total (segundos) para o pico da pressão arterial (A e C) e para a normalização da pressão arterial (B e D) em resposta a administração do agonista α -adrenérgico fenilefrina (PE) (A e B) e nitroprussiato de sódio (NP) (C e D) depois da infusão icv aguda de Ang-(1-7) ou veículo. Os valores estão expressos como média ± EPM. CTL-Sal = Controle Salina (n=6); FF-Sal= Frutose salina (n=6); CTL-A7= Controle angiotensina-(1-7) (n=5); FF-A7= Frutose angiotensina-(1-7) (n=5); N =número amostral. # p<0,05 vs CTL-sal; & p<0,05 vs FF-sal; φ vs CTL-A7; One-way ANOVA seguido por Newman-Keuls.

De forma diferente, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais quanto ao tempo para o pico da FC, ou para a normalização desta, em função da administração de PE ou NP antes da infusão icv de Ang-(1-7) ou veículo (Tabela 05). Por outro lado, foi observada uma redução no tempo para se alcançar o pico da FC nos grupos experimentais, quando comparados ao CTL-sal, após a realização da infusão de Ang-(1-7) ou veículo (Tabela 06).

Tabela 05 – Valores do tempo total (segundos) para o pico e para a normalização da frequência cardíaca antes da infusão intracerebroventricular de angiotensina-(1-7) ou veículo.

Grupo Experimental	PE		NP	
	inf-pico	pico-norm	inf-pico	pico-norm
CTL-Sal	70,83 ± 6.6	68,33 ± 9.0	49,00 ± 4.5	108,3 ± 15.5
FF-Sal	60,0 ± 5.7	75,0 ± 10.57	56,0 ± 6.7	98,0 ± 11.14
CTL-A7	82,0 ± 4.8	76,0 ± 11.22	65,0 ± 5.0	105,0 ± 11.9
FF-A7	63,3 ± 6.6	66,67 ± 6.6	48,0 ± 8.3	73,33 ± 8.02

Valores apresentados como média ± EPM. CTL-Sal = Controle Salina (n=6); FF-Sal= Frutose salina (n=6); CTL-A7= Controle Angiotensina (1-7) (n=5); FF-A7= Frutose Angiotensina (1-7) (n=5); PE= agonista α adrenérgico fenilefrina; NP= nitroprussiato de sódio; N =número amostral.

Tabela 06 – Valores do tempo total (segundos) para o pico e para a normalização da frequência cardíaca depois da infusão intracerebroventricular de angiotensina-(1-7) ou veículo.

Grupo Experimental	PE		NP	
	inf-pico	pico-norm	inf-pico	pico-norm
CTL-Sal	68,0 ± 4.8	90,0 ± 26.4	96,0 ± 8.1	78,0 ± 17.7
FF-Sal	82,00 ± 3.7	108,3 ± 25.0	64,0 ± 5.0 [#]	98,0 ± 10.2
CTL-A7	88,0 ± 12.4	50,0 ± 10.4	54,0 ± 8.1 [#]	95,0 ± 12.4
FF-A7	88,0 ± 3.7	74,0 ± 16.3	66,0 ± 8.1 [#]	106,0 ± 16.6

Valores apresentados como média ± EPM. CTL-Sal = Controle Salina (n=6); FF-Sal= Frutose salina (n=6); CTL-A7= Controle Angiotensina (1-7) (n=5); FF-A7= Frutose Angiotensina (1-7) (n=5); PE= agonista α adrenérgico fenilefrina; NP= nitroprussiato de sódio; N =número amostral.

6.3. Resposta cardiovascular ao estímulo dos receptores NMDA da região dorsomedial do hipotálamo

A Figura 08 mostra a resposta pressórica (A e B) e taquicárdica (C e D) decorrentes do estímulo dos receptores NMDA no hipotálamo dorsomedial dos 4 grupos experimentais. Nesta, é possível observar que houve uma discreta redução, porém significativa, da variação da PAM nos grupos experimentais CTL-sal e FF-A7 após a realização da infusão icv (barras escuras), quando comparados aos valores prévios à infusão (barras claras; Fig 07 A e B; tabela 7). De forma interessante, tais reduções na variação da PAM não foram acompanhadas por alterações na variação da FC (Fig 07 C e D; tabela 7). Com relação ao tempo total da resposta taquicárdica em resposta ao estímulo dos receptores NMDA no DMH, a Ang-1-7 parece ter diminuído o tempo total dessa resposta apenas no grupo CTL-A7 (tabela 8).

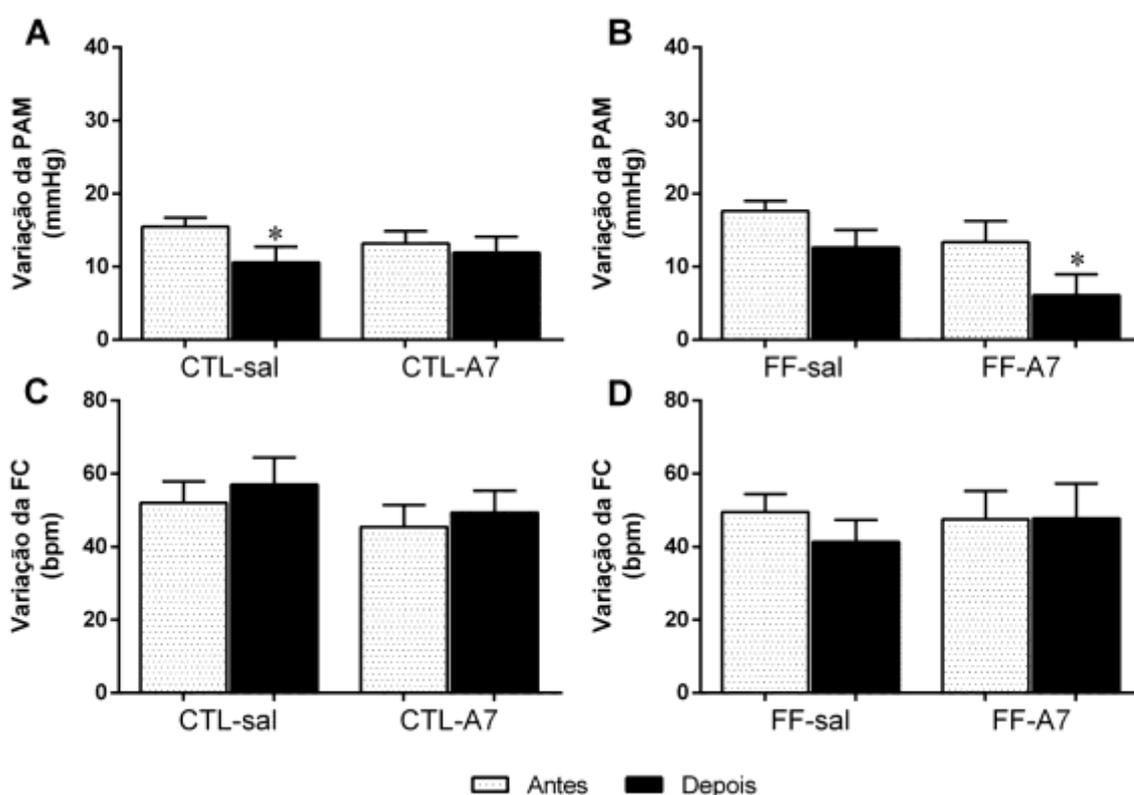


Figura 08 – Variação da pressão arterial média (A e B) e da frequência cardíaca (C e D) ao estímulo dos receptores NMDA no hipotálamo dorsomedial. Os valores estão expressos como média \pm EPM. CTL-Sal = Controle salina (n=6); FF-Sal= Frutose salina (n=6); CTL-A7= Controle angiotensina-(1-7) (n=5); FF-A7= Frutose angiotensina-(1-7) (n=6); N =número amostral. * $p < 0,05$ teste *t Student* pareado.

Tabela 07 – Valores da variação da pressão arterial média e da frequência cardíaca ao estímulo dos receptores NMDA no hipotálamo dorsomedial antes e depois da infusão intracerebroventricular de angiotensina-(1-7) ou veículo.

Grupo Experimental	PAM		FC	
	antes	depois	antes	depois
CTL-Sal	15,49 ± 1,24	10,60 ± 2.1*	52,01 ± 5.9	57,02 ± 7.3
FF-Sal	17,61 ± 1.37	12,60 ± 2.4	49,48 ± 4.8	41,33 ± 6.06
CTL-A7	13,18 ± 1.71	11,91 ± 2.2	45,42 ± 5.9	49,39 ± 5.9
FF-A7	13,37 ± 2.88	6,09 ± 2.8*	47,50 ± 7.7	47,76 ± 9.5

Valores apresentados como média ± EPM. CTL-Sal = Controle Salina (n=6); FF-Sal= Frutose salina (n=6); CTL-A7= Controle angiotensina-(1-7) (n=5); FF-A7= Frutose angiotensina-(1-7) (n=5); N = número amostral. *p<0,05 teste *t Student* pareado.

Tabela 08 – Valores (minutos) do tempo total da resposta taquicárdica em resposta ao estímulo dos receptores NMDA no hipotálamo dorsomedial antes e depois da infusão intracerebroventricular de angiotensina-(1-7) ou veículo.

	antes	depois
CTL-Sal	12,17 ± 1,7	9,60 ± 1,4
FF-Sal	12,83 ± 1,4	9,30 ± 1,6
CTL-A7	18,00 ± 2,6	6,80 ± 1,0*
FF-A7	11,80 ± 1,6	11,00 ± 1,2

Valores apresentados como média ± EPM. CTL-Sal = Controle Salina (n=6); FF-Sal= Frutose salina (n=6); CTL-A7= Controle angiotensina-(1-7) (n=5); FF-A7= Frutose angiotensina-(1-7) (n=5); N = número amostral. *p<0,05 teste *t Student* pareado.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar as respostas cardiovasculares decorrentes do aumento agudo dos níveis cerebrais de angiotensina-(1-7) em animais alimentados cronicamente com dieta rica em frutose. Os principais achados foram que: I) a ang-(1-7) melhorou a sensibilidade do controle barorreflexo da FC em ratos submetidos a uma dieta crônica rica em frutose e ratos controle; II) a ang-(1-7) reduziu o tempo necessário para normalizar a PA em resposta à droga vasoativa; e III) a ang-(1-7) parece não alterar a resposta pressórica e taquicárdica ao estímulo dos receptores NMDA no DMH.

Como observado no presente estudo, os parâmetros cardiovasculares basais de PAM e FC se mantiveram semelhantes entre os grupos. O aumento da PA induzido pela ingestão crônica de frutose já foi observado e discutido em diferentes estudos. Nesse contexto, há autores que observam o aumento da PA induzido pela ingestão crônica de frutose em modelo experimental com animais acordados (Farah et al., 2006; De Angelis et al., 2012; Guimaraes et al., 2012), enquanto outros não observaram a mesma correlação (Bezerra et al., 2001; D' Angelo et al., 2005; Thompson et al., 2016). Quanto à FC basal, muitos estudos em roedores alimentados com dieta rica em frutose reportam valores basais de FC inalterados (Mostarda et al., 2012; Machi et al., 2013; Guimaraes et al., 2014). Nesse contexto, o presente estudo realizou a obtenção dos dados de PA e FC basais em ratos Wistar anestesiados com uretana, o que provavelmente ocultou possíveis efeitos da frutose sobre tais parâmetros, uma vez que esse agente anestésico causa uma significativa redução destes (Kubota et al., 2006).

Corroborando com estudos prévios, nossos dados sugerem que ratos submetidos à dieta alimentar rica em frutose apresentam prejuízo no controle barorreflexo da FC (De Angelis et al., 2012; Machi et al., 2013; Morvan et al., 2013; Guimaraes et al., 2014). Estudo recente de Bernardes e cols (2018) indicou que já na primeira semana de uma dieta rica em frutose, ratos SHR (espontaneamente hipertensos) apresentaram prejuízo no controle barorreflexo da FC, precedendo, inclusive, quaisquer alterações metabólicas.

Estudos agudos em animais hipertensos ou normotensos mostraram que a Ang-(1-7) no SNC participa da melhora do controle barorreflexo da FC (Campagnole-Santos et al. 1992; Oliveira et al. 1996; Britto et al. 1997; Heringer-

Walther et al. 2001). De forma interessante, a microinjeção icv de D-Ala⁷-Ang-(1-7), antagonista do receptor da Ang-(1-7), promove uma piora no controle barorreflexo (Oliveira et al., 1996; Britto et al. 1997). Estendendo os achados da literatura, o presente estudo indica que a administração aguda icv de ang-(1-7) é capaz de melhorar o controle barorreflexo da FC em ratos alimentados cronicamente com frutose.

Corroborando com os achados de estudos prévios (Soltis e Dimicco, 1991; Soltis e Dimicco, 1992; DiMicco et al., 2002), foi observado que a microinjeção do aminoácido excitatório NMDA no DMH de animais anestesiados evocou aumento significativo na FC e efeito pressor relativamente modesto. Estes mesmos autores mostraram que o bloqueio simultâneo dos receptores NMDA e não-NMDA no DMH é capaz de atenuar a resposta taquicárdica ao estresse por jato de ar, indicando a participação da atividade glutamatérgica no DMH na resposta ao estresse. Em adição, estudos mostraram que a desinibição de neurônios no DMH evoca um padrão de alterações cardiovasculares que se assemelham à reação de defesa clássica, e que essa resposta é, pelo menos em parte mediada pela atividade dos receptores NMDA, GABA_A e glutamatérgicos no DMH (Martins et al., 2013).

Dados recentes e ainda não publicados pelo grupo de pesquisa (apêndices A e B) apontaram para uma resposta cardiovascular exacerbada ao estresse em animais submetidos a uma dieta rica em frutose. No presente estudo, foi mostrado que a resposta pressórica e taquicárdica decorrente do estímulo dos receptores NMDA no DMH foram similares entre animais controle e aqueles alimentados com dieta rica em frutose. Estes achados sugerem que a resposta exacerbada ao estresse nos animais FF pode ser, pelo menos em parte, decorrente de alterações na atividade de outros receptores (que não o NMDA), ou mesmo receber influência de outras regiões cerebrais que não o DMH. Considerando que o presente estudo, por limitações metodológicas, foi realizado em animais anestesiados, é possível que a resposta cardiovascular observada tenha sido atenuada em decorrência da anestesia. Deste modo, torna-se interessante elucidar a atividade desses receptores em animais conscientes. Estudos futuros serão necessários para elucidar tais questões.

Em adição, dados da literatura científica mostram que a administração central de Ang-(1-7) atenua a resposta taquicárdica, mas não pressórica, em ratos conscientes submetidos a estresse por jato de ar e em resposta ao estímulo do DMH por bicuculina metiodide (antagonista do receptor $GABA_A$) em animais anestesiados (Martins et al., 2013).

Nesse contexto, nossos dados sugerem que a infusão aguda icv de Ang-(1-7) diminui a resposta pressórica em ratos submetidos a uma dieta rica em frutose em resposta ao estímulo dos receptores NMDA no DMH, mas não nos ratos CTL-A7. Considerando que os ratos do grupo CTL-sal também tiveram redução discreta na resposta pressórica após a infusão icv, é possível que estes achados não estejam relacionados à ação da Ang-(1-7) em si, mas sim a outro fator, como por exemplo, a duração do protocolo experimental. De forma intrigante, os grupos CTL-A7 e FF-sal não apresentaram alterações significativas deste parâmetro. Assim, a elucidação dos mecanismos que envolvem a atenuação pressórica observada nos grupos CTL-sal e FF-A7 em resposta ao estímulo dos receptores NMDA no DMH após a infusão icv requerem estudos adicionais futuros.

8. CONCLUSÃO

O presente estudo corrobora e estende os achados da literatura científica, mostrando que a ingestão crônica de frutose 10% por 20 semanas ocasionou prejuízos na resposta barorreflexa da FC e que a administração central de ang-(1-7) conseguiu reverter em parte esse prejuízo. Além disso, o presente estudo sugere que a resposta exacerbada ao estresse emocional agudo, encontrada em estudos recentes do grupo de pesquisa, não decorre da atividade inapropriada dos receptores NMDA no DMH. Por fim, o presente estudo sugere que o aumento agudo dos níveis cerebrais de Ang-(1-7) não altera de forma significativa a resposta pressórica decorrente do estímulo dos receptores NMDA no DMH.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. R. Blunted GABA-mediated inhibition within the dorsomedial hypothalamus potentiates the cardiovascular response to emotional stress in rats fed a high-fat diet. **Neuroscience**. v. 262, p. 21–30, 2014.
- ARALDI-FAVASSA, C. T.; ARMILIATO, N.; KALININE, I. Aspectos Fisiológicos e Psicológicos do Estresse. **Rev de Psicologia da UNC**. v. 2, n. 2, p. 84-92, 2005.
- BADER, M. et al. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. **J Mol Med (Berl)**, v.79, n.2-3, p.76-102, 2001.
- BALLONE, G. J. Stress - Fisiologia. **Psiqu Web Psiquiatria Geral**. 2002. Disponível em: <<http://www.psiqweb.med.br/cursos/stress>>. Acesso em: 05/01/2020.
- BAUER, M. E. Estresse: como ele abala as defesas do corpo? **Ciência Hoje**. vol. 30, nº 179, p. 20-25, 2002.
- BEZERRA, R. M. N. et al. A high-fructose diet induces insulin resistance but not blood pressure changes in normotensive rats. **Braz J Med Biol Res**. v. 34, p. 1155-1160, 2001.
- BRITTO, R. R. et al. Role of angiotensin-(1-7) in the modulation of the baroreflex in renovascular hypertensive rats. **Hypertension**. v. 30, p. 549–556, 1997.
- BROWN, C. M. et al. Fructose ingestion acutely elevates blood pressure in healthy young humans. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 294, p. R730–R737, 2008.
- BROWNELL, K. D.; FRIEDEN, T. R. Ounces of prevention--the public policy case for taxes on sugared beverages. **N Engl J Med**. v. 360, n. 18, p. 1805-8, Abril 2009.
- BRYDON, L. Adiposity, leptin and stress reactivity in humans. **Biological Psychology**. v. 86, p. 114–120, 2011.
- BURCH, A. E.; ALLEN, M. T. Stress task specific impairments of cardiovascular functioning in obese participants. **International Journal of Psychophysiology**. v. 94, p. 1–8, 2014.
- CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J. et al. Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. **Am J Physiol**, v.263, n.1, p.R89-94, 1992.
- D'ANGELO, G. et al. Exaggerated Cardiovascular Stress Responses and Impaired Beta-Adrenergic-Mediated Pressor Recovery in Obese Zucker Rats. **Hypertension**. v. 46, p. 806-811, 2006.
- DALLMAN, M. F. et al. Chronic stress and obesity: A new view of “comfort food”. **PNAS**. v. 100, n. 20, p. 11696–11701, Set 2003.
- DAMPNEY, R. A. L. et al. Central Mechanisms Underlying Short-term and Long-term Regulation of the Cardiovascular System. **Australian Physiological and Pharmacological Society**. v. 32, n.1, p. 1-12, 2001.
- DAMPNEY, R. A. L. Central mechanisms regulating coordinated cardiovascular and respiratory function during stress and arousal. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 309: R429–R443, 2015.

DE ANGELIS, K. et al. Sympathetic overactivity precedes metabolic dysfunction in a fructose model of glucose intolerance in mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 302, p. R950–R957, 2012.

DE KLOET E. R., JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the Brain: from Adaptation to Disease. *Neuroscience*. v. 6, p. 463-475, 2005.

DE ROOIJ, S. R. Blunted cardiovascular and cortisol reactivity to acute psychological stress: A summary of results from the Dutch Famine Birth Cohort Study. **International Journal of Psychophysiology**. v. 90, p. 21–27, 2013.

DE NOVELLIS, V. et al. Hypothalamic sites mediating cardiovascular effects of microinjected bicuculline and EAAs in rats. **Am J Physiol**. v. 269, p. R131-R140, 1995.

DIMICCO, J. A. et al. Role of the Dorsomedial Hypothalamus in the Cardiovascular Response to Stress. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. v. 23, p. 171 - 176, 1996.

DIMICCO, JA. The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part evolution. **Pharmacol Biochem Behav**. v. 71, p. 469-480, 2002.

EPEL, E. et al. Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. **Psychoneuroendocrinology**. v. 26, p. 37–49, 2001.

FARAH, D. et al. Exercise Training Prevents Cardiovascular Derangements Induced by Fructose Overload in Developing Rats. **Plos One**. v. 11, p. 1-15, 2006.

FONTES M.A., XAVIER C.H., DE MENEZES R.C., DIMICCO J.A. The dorsomedial hypothalamus and the central pathways involved in the cardiovascular response to emotional stress. **Neuroscience**. v. 184, p. 64-74, 2011.

FONTES, M. A. P. et al. Emotional stress and sympathetic activity: Contribution of dorsomedial hypothalamus to cardiac arrhythmias. **Brain Research**. v. 1554, p. 49 – 58, 2014.

FONTES, M. A. P. et al. Brain angiotensin-(1–7)/Mas axis: A new target to reduce the cardiovascular risk to emotional stress. **Neuropeptides**. v. 56, p. 9-17, 2015.

FU, Z. et al. Angiotensin-(1-7) recruits muscle microvasculature and enhances insulin's metabolic action via mas receptor. **Hypertension**, v.63, n.6, p.1219-27, 2014.

GIANI, J. F. et al. Chronic infusion of angiotensin-(1-7) improves insulin resistance and hypertension induced by a high-fructose diet in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.296, n.2, p.E262-71, 2009.

GIANI, J.F. et al. Angiotensin-(1-7) improves cardiac remodeling and inhibits growth-promoting pathways in the heart of fructose-fed rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.298, n.3, p.H1003-13, 2010.

GUIMARAES, P. S. et al. Chronic infusion of angiotensin-(1-7) into the lateral ventricle of the brain attenuates hypertension in DOCA-salt rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v. 303, n. 3, p. H393-400, Aug 1 2012.

GUIMARAES, P. S. et al. Increasing angiotensin-(1-7) levels in the brain attenuates metabolic syndrome-related risks in fructose-fed rats. **Hypertension**. v. 63, n.5, p. 1078-85, 2014.

HERINGER-WALTHER, S. et al. Baroreflex improvement in SHR after ACE inhibition involves angiotensin-(1-7). **Hypertension**. v. 37, p.1309–1314, 2001.

KANGUSSU, L.M. et al. Angiotensin-(1-7) attenuates the anxiety and depression-like behaviors in transgenic rats with low brain angiotensinogen. **Behav Brain Res**. v.257, p.25-30, 2013.

KANGUSSU, L. M. et al. Reduced anxiety-like behavior in transgenic rats with chronically overproduction of angiotensin-(1-7): Role of the Mas receptor. **Behavioural Brain Research**. v. 33, p. 193–198, 2017.

KUBOTA, Y. et al. Evaluation of Blood Pressure Measured by Tail-Cuff Methods (without Heating) in Spontaneously Hypertensive Rats. **Biol. Pharm**. v. 29, p. 1756—1758, 2006.

LISA ME. MARMO JH. WIBLE JR; DIMICCO J A. Injection of muscimol into posterior hypothalamus blocks stress-induced tachycardia. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 257, p. R246-R251, 1989.

LOWETTE, K. et al. Effects of high-fructose diets on central appetite signaling and cognitive function. **Frontiers in Nutrition**. v. 2, p. 1-5, 2015.

MACHI, J. F. et al. Walking promotes metabolic and baroreflex sensitivity improvement in fructose-fed male rats. **Eur J Appl Physiol**. v.113, p. 41–49, 2013.

MARTINS LIMA, A. et al. Activation of angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas axis attenuates the cardiac reactivity to acute emotional stress. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.305, n.7, p.H1057-67, 2013.

MOLDESTAD, O. tracheotomy improves experiment success rate in mice during urethane anesthesia and stereotaxic surgery. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 176, p. 57–62, 2009.

MORVAN, E. et al. Metabolic, hemodynamic and structural adjustments to low intensity exercise training in a metabolic syndrome model. **Cardiovascular Diabetology**. v. 12, p. 110, 2013.

MOSTARDA, C. et al. Exercise training prevents diastolic dysfunction induced by metabolic syndrome in rats. **CLINICS**. v. 67, n. 7, p. 815-820, 2012.

NAKAJIMA, H. Stress and Health. **World Health Organization**. Editorial. v. 47, n.2, 1994.

OCARANZA, M. P. Counter-regulatory renin–angiotensin system in cardiovascular disease. **Nature Reviews: Cardiology**. v. 17, p. 116-129, 2020.

OLIVEIRA, D. R. et al. Changes in the baroreflex control of heart rate produced by central infusion of selective angiotensin antagonists in hypertensive rats. **Hypertension**. v. 27, p. 1284–1290, 1996.

PACAK, K., PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. **Endocr. Rev**. v. 22, p. 502–548, 2001.

PAXINOS G., WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2^a ed. **New York: Academic Press**, 1986.

PHILLIPS, A. C. Blunted cardiovascular reactivity relates to depression, obesity, and self-reported health. **Biological Psychology**. v. 86, p. 106–113, 2011.

ROSENGREN, A. et al. Association of psychosocial risk factors with risk of acute myocardial infarction in 11 119 cases and 13 648 controls from 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. **Lancet**. v. 364, p. 953 – 62, 2004.

Santos, R. A.; A. J. Ferreira Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. **Curr Opin Nephrol Hypertens**. v. 16, p. 122-128, 2007.

SAMUELS, BC; ZARETSKY DV; DIMICCO, JA. Tachycardia evoked by desinhibition of the dorsomedial hypothalamus in rats is mediated through medullary raphe. **J Physiol**. v. 538, p. 941-946, 2002.

SANTOS, R.A.; FERREIRA, A.J. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v.16, n.2, p.122-8, 2007.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**. v. 138, n. 32, 1936.

SMITH, S. M.; VALE, W. W. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. **Dialogues Clin Neurosci**. v. 8, p. 383-395, 2006.

SOLTIS R.P., DIMICCO J.A. GABAA and excitatory amino acid receptors in dorsomedial hypothalamus and heart rate in rats. **Am J Physiol**. v. 260, p. R13-20, 1991.

SOLTIS R.P., DIMICCO J.A. Hypothalamic excitatory amino acid receptors mediate stress-induced tachycardia in rats. **Am J Physiol**. v. 262, p. R689-697, 1992.

SPERETTA, G. F. et al. Resistance training prevents the cardiovascular changes caused by high-fat diet. **Life Sciences**. v. 146, p. 154–162, 2016.

TAPPY, L.; LÊ, K. A.. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. **Physiol Ver**. V. 90, n. 1, p. 23, 2010.

TEFF, K. L. et al. Endocrine and Metabolic Effects of Consuming Fructose- and Glucose-Sweetened Beverages with Meals in Obese Men and Women: Influence of Insulin Resistance on Plasma Triglyceride Responses. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 94, n. 5, p. 1562-1569, 2009.

THOMPSON, J. A. et al. Pressor recovery after acute stress is impaired in high fructose-fed Lean Zucker rats. **Physiol Rep**. v. 4, n. 12, 2016.

ULRICH-LAI, Y. M. et al. Stress Exposure, Food Intake, and Emotional State. **Stress**. v. 18, n. 4, p. 381–399, 2015.

XUE, B. et al. Central endogenous angiotensin-(1-7) protects against aldosterone/NaCl-induced hypertension in female rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.305, n.5, p.H699-705, 2013.

APÊNDICE A

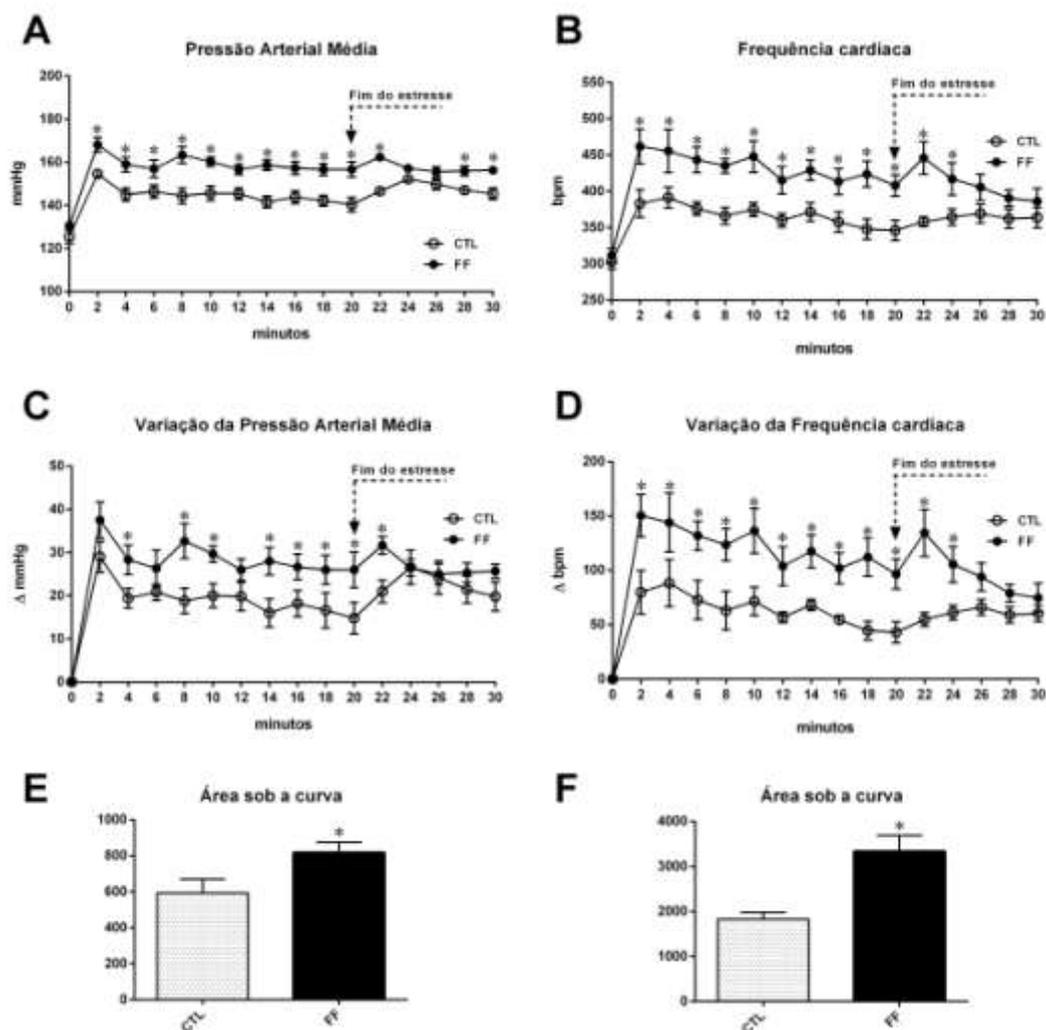


Figura 09 - Resposta pressórica e taquicárdica ao estresse emocional agudo por contenção em ratos Wistar provenientes do BIOCEN submetidos à ingestão crônica de solução de frutose 10% por 10 semanas (CEUA 19/2015). Valores absolutos de pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B), variações da PAM (C) e na FC (D) e área sob a curva de variação da PAM (E) e da FC (F). CTL = grupo controle (n = 7); FF = grupo frutose (n = 6). * $p < 0,05$ vs CTL, Two-way ANOVA com medidas repetidas/ Newman-Keuls (A - D), test t-Student não pareado (E e F).

APÊNDICE B

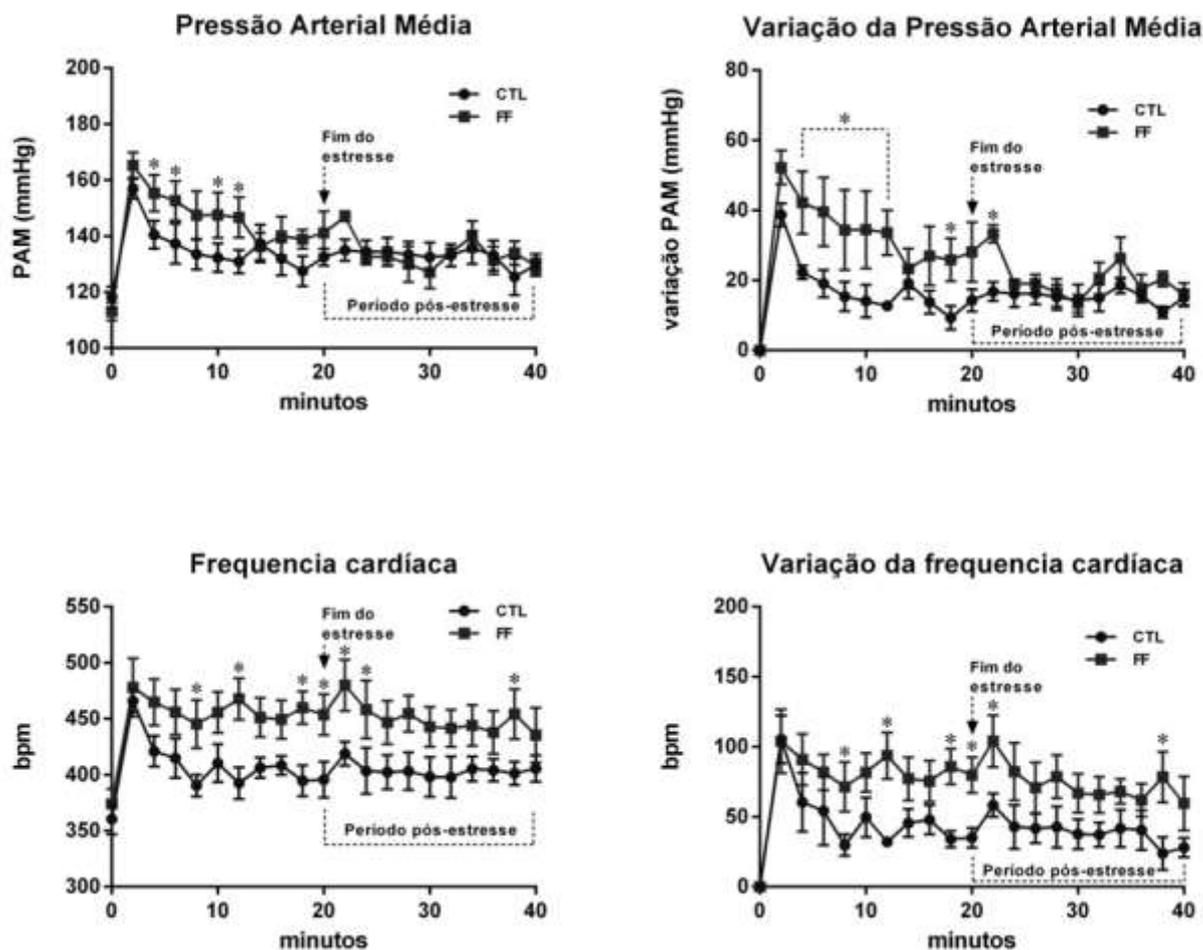


Figura 10 - Resposta pressórica e taquicárdica ao estresse emocional agudo por contenção em ratos Wistar provenientes do BIOCEN submetidos à ingestão crônica de solução de frutose 10% por 20 semanas (CEUA 19/2016). Valores absolutos de pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; C), variações da PAM (B) e na FC (D). CTL = grupo controle (n = 5); FF = grupo frutose (n = 5). * $p < 0,05$ vs CTL, Two-way ANOVA com medidas repetidas/ Newman-Keuls.