

IARA CRISTINA DE ARAUJO

PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA NA FUNÇÃO
CARDIOVASCULAR DE RATOS RECÉM-DESMAMADOS SOB TRATAMENTO
CRÔNICO COM FRUTOSE E SOBRECARGA SALINA

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Medicina Translacional

São Paulo

2014

IARA CRISTINA DE ARAUJO

PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA NA FUNÇÃO
CARDIOVASCULAR DE RATOS RECÉM-DESMAMADOS SOB TRATAMENTO
CRÔNICO COM FRUTOSE E SOBRECARGA SALINA

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Medicina Translacional
(Ciências)

Orientadora: Vera de Moura Azevedo Farah

Co-orientadora: Dulce Elena Casarini

São Paulo

2014

Araujo, Iara Cristina de

Participação do Sistema Renina Angiotensina na função cardiovascular de ratos recém-desmamados sob tratamento crônico com frutose e sobrecarga salina/ Iara Cristina de Araujo-- São Paulo, 2014.

xvi,86p.

Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Medicina Translacional.

Involvement of Renin Angiotensin System in cardiovascular function of post-weaning rats under chronic treatment with fructose and high salt.

1.Síndrome metabólica; 2.Sal; 3. Frutose; 4. Sistema Renina Angiotensina;
5.Hipertensão

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TRANSLACIONAL

Essa dissertação foi realizada no Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp)

Chefe de Departamento: Profa. Dra. Maria Tereza Zanella

Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Medicina Translacional: Profa. Dra. Dulce Elena Casarini

IARA CRISTINA DE ARAUJO

PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA NA FUNÇÃO
CARDIOVASCULAR DE RATOS RECÉM-DESMAMADOS SOB TRATAMENTO
CRÔNICO COM FRUTOSE E SOBRECARGA SALINA

Banca examinadora

Prof^a. Dr^a Tatiana de Souza Cunha Uchiyama

Prof^a. Dr^a. Vera de Moura Azevedo Farah (orientadora)

Prof^a. Dr^a. Patrícia Fiorino

Prof^a. Dr^a. Kátia de Angelis

Prof^a. Dr^a. Miriam Oliveira Ribeiro

Dissertação homologada em 27/08/2014

RESUMO

Estudos relacionam o crescente aumento de incidência da síndrome metabólica com o aumento do consumo de frutose e sal na dieta da população, fatores estes que aumentam o risco para doenças cardiovasculares, consideradas como uma das principais causas de mortes em todo o mundo. Sabe-se que o Sistema Renina Angiotensina (SRA) é um complexo e importante sistema hormonal para ajustes homeostáticos atuando como um mecanismo de conservação de cloreto de sódio e da regulação da pressão arterial (PA), onde fatores externos influenciam o mesmo, alterando as vias de formação de seus componentes. Desse modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da sobrecarga salina de 2% na função cardiovascular em um modelo experimental de síndrome metabólica induzida por frutose e investigar o papel do sistema renina angiotensina tecidual. Ratos Wistar machos, recém-desmamados, (50-60g) foram separados em 4 grupos experimentais (n≥4): controle (C), sal (S), frutose (F), e frutose sal (FS). Os principais resultados obtidos foram: 1) redução do peso corporal nos grupos tratados com sal; 2) aumento da deposição de gordura retroperitoneal e epididimal em F e redução no grupo S; 3) intolerância a sobrecarga de glicose nos grupos S,F e FS; 4) aumento da PA nos grupos S,F e FS associado a diminuição da FC do grupo S; 5) aumento na atividade da ECA no rim do grupo S em relação ao grupo C; 6) aumento da formação das angiotensinas I, II, 1-7 nos grupos F, FS. Assim sendo, nossos resultados sugerem que o SRA pode participar na gênese da hipertensão arterial induzida pela frutose, ao passo que o tratamento com sal utiliza outros mecanismos para o aumento da PA e que o aumento da formação de Ang1-7 atua como mecanismo protetor para o organismo. Além disso, a combinação dos fatores de risco, frutose e sal, promoveu um quadro de disfunções diferenciadas nos componentes do SRA podendo justificar pelo menos em parte as alterações metabólicas, como no peso corporal, glicemia de jejum e intolerância à glicose, e cardiovasculares observadas nos grupos experimentais.

Palavras-chave: 1.Síndrome metabólica; 2.Sal; 3. Frutose; 4. Sistema Renina Angiotensina; 5.Hipertensão.

ABSTRACT

Studies described the growing incidence of metabolic and cardiovascular disorders in population with increased fructose and salt consumption. These two factors are associated with increased risk of cardiovascular diseases, considered one of the leading causes of death worldwide. It is known that Renin Angiotensin System (RAS) is a complex hormonal system that acts on homeostatic aiding in homeostasis by acting as a mechanism for sodium chloride retention and regulating blood pressure, where external factors influencing the system change the means of formation of its components. The aim of this study was to investigate the effect of saline overload 2% during 10 days on cardiovascular function in an experimental model of metabolic syndrome induced by chronic fructose consumption post-weaning and to investigate the role of RAS in the kidney and heart tissue. Male Wistar rats, weanling (50-60g) formed 4 groups: control (C), salt (S), fructose (F), fructose and salt (FS). The main results were: 1) reduction in body weight in the groups treated with salt; 2) increase of retroperitoneal and epididymal fat deposition in F group and a reduction in S group; 3) glucose intolerance in S, F, FS groups; 4) increased blood pressure in treated groups S, F, FS followed by decreased heart frequency in Salt group; 5) increase of ACE activity in the kidney for S group when compared to C; 7) increased formation of angiotensin I, II, 1-7 in fructose treated groups (F, FS). Thus, our results suggests that RAS assists in the genesis of hypertension induced by fructose, while salt uses different mechanisms that assist in the hypertension induction, and the increased formation of Ang1-7 related to salt could be a protective mechanism for the organism. Moreover, the combination of risk factors, fructose and salt, promoted a framework for different disorders in RAS components that can justify at least in part the metabolic changes such as body weight, fasting glucose and observed in cardiovascular parameters in the experimental groups.

Keywords: 1. Metabolic Syndrome; 2.Salt; 3 Fructose; 4 Renin Angiotensin System; 5.Hypertension.

Lista de Tabelas

- Tabela 1:** Peso corporal, peso corrigido de gordura retroperitoneal, gordura epididimal, coração e rim direito dos animais submetidos ao protocolo experimental25
- Tabela 2:** Valores de consumo de ração, ingestão hídrica e urina excretada em 24 horas dos grupos C(n=10), S(n=5), F(n=7) e FS(n=4).26
- Tabela 3:** Valores de triglicérides, colesterol total, e creatinina dos animais dos grupos estudados.....28

Lista de Figuras

- Figura 1:** Ilustração esquemática do metabolismo hepático da frutose e glicose (modificado de (FERREIRA, 2010))4
- Figura 2:** Ilustração esquemática da versão atualizada do SRA e as principais vias de formação das angiotensinas (modificado de (SANJULIANI, 2011; SPETH, 2013). ECA, enzima conversora de angiotensina; ECA2 enzima conversora de angiotensina 2; NEP, Nephylisin/endopeptidase neutra; Ang, angiotensina; Mas, receptor para angiotensina 1-7; AT1, receptor tipo 1 para angiotensina; AT2, receptor tipo 2 para angiotensina; Mas, receptor para Ang 1-7; PEP, prolil-endopeptidase.11
- Figura 3:** Sequência cronológica dos procedimentos experimentais no estudo para os grupos Controle (C), Sal (S), Frutose (F) e Frutose Sal (FS)..... 16
- Figura 4:** Valores do peso corporal inicial e final dos animais do protocolo de oito semanas dos diferentes grupos experimentais: C=Controle (n= 25), S=Sal (n=27), F=Frutose (n=17), FS=Frutose e Sal (n=27). * p<0.01 vs C; \$ p<0.01 vs F.....23
- Figura 5:** Ganho de peso dos animais dos diferentes grupos de estudo submetidos ao protocolo experimental. C (n= 25), S (n=27), F (n=17), FS (n=27). * p<0.01 vs C; \$ p<0.01 vs F.24
- Figura 6:** Glicemia basal dos animais dos grupos submetidos ao protocolo experimental. C (n=11), S (n=6), F (n=11), FS (n=8). *p<0.05 vs C; #p<0.05 vs F....26

Figura 7: Área sob a curva (mg/dL/min) obtidas no TTG dos animais C (n=11), S (n=6), F (n=11), FS (n=8). *p<0.01 vs C; # p<0.01 vs F; \$ p<0.01 vs S.....27

Figura 8: Teste de tolerância á glicose- Kitt. C (n=13), S 2% (n=4), F (n=9), FS 2%(n=6). *p<0.01 vs C.28

Figura 9: Análise da Pressão Arterial média e da Frequência Cardíaca. A: Pressão arterial média. B: Frequência Cardíaca. Os dados são apresentados em média ± EPM. Grupos: C (n=8), S (n=9), F (n=10), FS (n=9). * p<0.05 vs C; # p<0.05 vs F. .29

Figura 10: Variância do intervalo de pulso no domínio do tempo. Valores obtidos ao final de 8 semanas de protocolo expressos em média ± EPM nos grupos C (n=5), S (n=6), F (n=9), FS (n=6).30

Figura 11: A. Componente oscilatório de baixa frequência (BF) em valores absolutos: Modulação simpática cardíaca. B. Componente oscilatório de alta frequência (AF) em valores absolutos: Modulação parassimpática cardíaca. Variabilidade do intervalo de pulso no domínio da frequência. Valores expressos em média ± EPM nos grupos C (n=5), S (n=6), F (n=9), FS (n=6).....31

Figura 12: Variabilidade do intervalo de pulso no domínio da frequência em valores relativos. **A.** Componente oscilatório de baixa frequência (BF): Modulação simpática cardíaca. **B.** Componente oscilatório de alta frequência (AF): Modulação parassimpática cardíaca. Valores expressos em média ± EPM nos grupos C (n=5), S 2% (n=6), F (n=9), FS 2% (n=6).....32

Figura 13: Variabilidade da pressão arterial sistólica no domínio do tempo analisada pelo desvio padrão (DP). Valores obtidos ao final de 8 semanas de protocolo expressos em média \pm EPM nos grupos C (n=5), S 2% (n=6), F (n=9), FS 2% (n=6)33

Figura 14: Componente oscilatório de baixa frequência (BF) da variabilidade da pressão arterial sistólica no domínio do tempo: Modulação simpática vascular ao final de 8 semanas de protocolo expressos em média \pm EPM nos grupos C (n=5), S (n=6), F (n=9), FS (n=6).....33

Figura 15: Quantificação da atividade da ECA. A:Atividade da ECA no coração. B: Atividade da ECA no Rim Direito (RD). Os dados são apresentados em média \pm EPM. Grupos: C (n=13), S (n=9), F (n=6), FS(n=4). * p<0.05 vs C.....34

Figura 16: Quantificação dos níveis das Angiotensinas no homogenato de coração e rim direito obtidos ao final do protocolo dos animais dos diferentes grupos de estudo. **A.** Ang1-7 do coração; **B.** Ang 1-7 do rim direito; **C.** Ang II do coração; **D.** Ang II do rim direito; **E.** Ang I do coração; **F.** Ang I do rim direito. Valores expressos em média \pm EPM nos grupos C (n=10), S 2% (n=10), F (n=5), FS 2% (n=6). 36

Lista de Quadros

Quadro 1: Sumário dos resultados metabólicos e bioquímicos dos 3 grupos experimentais comparados com os animais do grupo controle. (=) valores semelhantes vs C; (+) valores superiores vs C; (-) valores inferiores vs C.37

Quadro 2: Sumário dos resultados da Função Cardiovascular dos 3 grupos experimentais comparados com os animais do grupo controle. (=) valores semelhantes vs C; (+) valores superiores vs C; (-) valores inferiores vs C.....38

Quadro 3: Sumário dos resultados dos componentes do Sistema Renina Angiotensina dos 3 grupos experimentais comparados com os animais do grupo controle. (=) valores semelhantes vs C; (+) valores superiores vs C; (-) valores inferiores vs C.....39

Lista de abreviaturas e siglas

Abs: absoluto

ADH: hormônio antidiurético

AF: Banda de alta frequência

Ang (1-12): Angiotensina 1-12

Ang (1-7): Angiotensina 1-7

Ang I: Angiotensina I

Ang II: Angiotensina II

Ang III: Angiotensina III

Ang IV: Angiotensina IV

AT1: Receptor tipo 1 para angiotensina

AT2: Receptor tipo 2 para angiotensina

BLF: Banda de baixa frequência (BF),

C: Grupo Controle

DP PAS: Variabilidade da pressão arterial sistólica no domínio do tempo analisada pelo desvio padrão (DP)

ECA: Enzima Conversora de Angiotensina

ECA2: Enzima conversora de Angiotensina 2

F: Grupo Frutose

FC: Frequência Cardíaca

FFT: transformada rápida de Fourier

FS: Grupo Frutose e Sal

HDL: High density lipid (lipídeo de alta densidade)

HHL: Hipuril-L-His-Leu

HPLC: High Performance Liquid Chromatography, cromatografia de alta performance

IP: intervalo de pulso

Kitt: constante de queda da glicose plasmática

MAS: receptor para Angiotensina 1-7

MBF: Bandas de muito baixa frequência

n.u.: normalizado

NaCl: Cloreto de sódio

NEP: Nephylisin/ endopeptidase neutra

OMS: Organização Mundial de Saúde

PA: Pressão Arterial

PAM: Pressão Arterial Média

PAS: Pressão Arterial Sistólica

PEP: Prolil-endopeptidase

PON1: paraoxonase 1

RD: Rim direito

RMSSD: raiz quadrada da soma das diferenças sucessivas entre intervalos RR

S: Grupo Sal

SM: Síndrome Metabólica

SRA: Sistema Renina Angiotensina

TTG: Teste de Tolerância à Glicose

Zphe-HL: Z-Phe-His-Leu

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Referencial teórico.....	3
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. Objetivo principal.....	13
2.2. Objetivos Específicos.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Amostra.....	14
3.2. Grupos Experimentais.....	14
3.3. Indução do modelo experimental de síndrome metabólica.....	15
3.4. Desenho Experimental.....	15
3.5. Avaliações Metabólicas.....	16
3.5.1. Avaliação em Gaiola Metabólica	16
3.5.2. Determinação da glicemia e tolerância à glicose (TTG).....	17
3.5.3. Teste de resistência à insulina.....	17
3.5.4. Análises Bioquímicas.....	18
3.6. Avaliação Hemodinâmica	18
3.6.1. Cateterização da Artéria e Veia Femorais.....	18
3.6.2. Registro da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC)....	18
3.6.3. Variabilidade do intervalo de pulso e da pressão arterial nos domínios do tempo e frequência.	19
3.7. Eutanásia.....	20
3.8. Componentes do Sistema Renina Angiotensina.....	20
3.8.1. Avaliação da atividade da ECA tecidual.....	20

3.8.2. Quantificação das angiotensinas por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)	21
3.8.3. Dosagem de proteína.....	22
3.9. Análise estatística.....	22
4.0.RESULTADOS.....	23
4.1. Composição Corporal.....	23
4.2. Avaliação metabólica.....	25
4.2.1. Glicemia basal e Teste de Tolerância a glicose.....	26
4.2.2. Teste de Tolerância a insulina.....	27
4.2.3. Avaliações Bioquímicas.....	28
4.3. Avaliação hemodinâmica.....	29
4.3.1. Pressão Arterial e Frequência Cardíaca.....	29
4.3.2. Variabilidade da frequência cardíaca expressa pelo intervalo de pulso (IP) no domínio do tempo (variância) e da frequência (análise espectral, transformada rápida de Fourier-FFT)	30
4.4. Componentes do SRA.....	34
4.4.1. Atividade da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA).....	34
4.4.2. Quantificação das angiotensinas por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) no homogenato do coração e rim direito	35
5.0. SUMÁRIO DE RESULTADOS.....	37
6. DISCUSSÃO.....	40
6.1. Avaliação metabólica.....	41
6.2. Avaliação hemodinâmica.....	43
7. CONCLUSÃO.....	49
8. REFERÊNCIAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são uma das principais causas de mortes em todo o mundo. O perfil da mortalidade de grande parcela dos países atuais vem mudando gradativamente com a diminuição de doenças infecciosas e parasitárias, e o aumento significativo de doenças crônicas, tais como doenças coronarianas, hipertensão arterial e diabetes mellitus (RIBEIRO *et al.*, 2012). Estima-se que em 2008 elas foram responsáveis por 48% da mortalidade mundial relacionada a doenças não transmissíveis. Esses dados estão vinculados a fatores de risco como por exemplo tabagismo, sedentarismo, disposição hereditárias e obesidade (LOPES *et al.*, 2001; (WHO), 2013).

No Brasil, pesquisas apontam que entre cada 100 mil casos de mortes, 304 mortes estão relacionadas a problemas cardiovasculares. Do ponto de vista epidemiológico, a associação de fatores de risco cardiovasculares em um mesmo indivíduo tem grande importância, uma vez que com esse tipo de associação aumenta o risco de mortalidade em cerca de 2,5 vezes (GUIMARÃES, 2004; CARDIOLOGIA, 2005).

O termo síndrome metabólica (SM) é utilizado para definir a associação de fatores de riscos metabólicos em conjunto com alterações relacionadas à insulina e a cardiopatias (ECKEL *et al.*, 2005; WILLIS *et al.*, 2012). Segundo a *International Diabetes Federation (IDF)* (2006) e a I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica (I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica, 2005), a presença desta síndrome pode aumentar a mortalidade total em cerca de 1,5 vezes, e a cardiovascular em cerca de 2,5 vezes. Dentre os principais componentes para definir a SM estão: obesidade central, pressão arterial elevada, aumento de triglicérides, alteração na glicemia de jejum e redução nos níveis de HDL - colesterol (LAKKA *et al.*, 2002; GIRMAN *et al.*, 2004; METABÓLICA(ABESO), 2009).

Considerada uma doença da civilização moderna, estudos mostram que a SM está intimamente relacionada ao sedentarismo e aos maus hábitos alimentares, evidenciados pela popularização dos *fast-food* e pela mudança da dieta alimentar para uma com alto teor calórico. A existência deste novo estilo de vida observado em

faixas etárias cada vez mais jovens, estão relacionados com a presença precoce de fatores de risco em adultos, justificando a necessidade das mais diferentes abordagens de investigação visando estabelecer estratégias preventivas e de tratamento para esta doença (OLIVEIRA; HAFFNER *et al.*, 1992; ISOMAA *et al.*, 2001; ZIMMET *et al.*, 2001; MISRA *et al.*, 2010; MOTTILLO *et al.*, 2010; WILLIS *et al.*, 2012). Recentemente, um levantamento feito por De Carvalho Vidigal *et al.* (2013), mostrou uma alta prevalência de síndrome metabólica na população adulta brasileira ($\approx 29\%$), se equiparando a países como os Estados Unidos, o que determina um importante agravamento à saúde, visto que ocasiona implicações diretas no custo médico-social envolvendo complicações vasculares, cardíacas, renais e cerebrais.

Estudos relacionam a crescente incidência de distúrbios metabólicos e cardiovasculares com o aumento do consumo de frutose e sal na dieta da população (STRAZZULLO *et al.*, 2001; FARAH, V. *et al.*, 2006; WIERNSPERGER *et al.*, 2010; FRISOLI *et al.*, 2012; SIEVENPIPER *et al.*, 2012). A fim de mimetizar respostas fisiológicas da SM e da hipertensão humana, modelos experimentais que utilizam o tratamento com frutose e/ou sal têm sido muito empregados nos últimos anos, possibilitando assim, uma investigação sobre essas patologias com um controle maior de suas variáveis (RAYSSIGUIER *et al.*, 2006; SANCHEZ-LOZADA *et al.*, 2007).

1.1. Referencial teórico

A frutose é um monossacarídeo encontrado em vegetais que possui caráter doce 1,7 vezes maior do que a sacarose. Devido ao seu baixo custo de produção, é utilizado em larga escala pela indústria alimentícia como adoçante, observado com o aumento de até 250% de seu consumo nos últimos 15 anos (BARREIROS, 2005; NAKAGAWA *et al.*, 2006). De fato, o alto consumo de frutose na alimentação tem crescido drasticamente no mundo ocidental em razão do aumento da comercialização de produtos industrializados, da expansão de redes classificadas como *fast-food* e de mudança desfavoráveis no estilo de vida (ELLIOTT *et al.*, 2002; BARREIROS, 2005; BASCIANO *et al.*, 2005). Esse aumento da ingestão estimula a formação de lipídeos por meio dos compostos intermediários como o glicerol e gliceraldeído no metabolismo da frutose levando a um aumento significativo na prevalência de casos com disfunções cardiometabólicas, como por exemplo, resistência à insulina, obesidade, dislipidemia, hipertensão e disfunção renal, aumentando o risco de doenças cardiovasculares na população (ELLIOTT *et al.*, 2002; BARREIROS, 2005; BASCIANO *et al.*, 2005; (WHO), 2011).

O conjunto dessas alterações metabólicas induzidas pelo alto consumo de frutose pode levar à presença do quadro clínico de síndrome metabólica determinando uma importante perda na qualidade de vida do indivíduo, uma vez que pode levar a uma alta morbimortalidade associada ao desenvolvimento da doença. Sendo assim, tal fato representa um agrave para o setor de saúde pública, tendo em vista que o tratamento desta doença e/ou de suas de complicações possui um impacto econômico importante em função do elevado custo ao governo, pois ocasiona a perda de produtividade no trabalho, a aposentadoria precoce e o aumento no número de internações em unidades de saúde especializada ((WHO), 2013).

Diferentemente da glicose, a frutose não desencadeia a secreção de insulina e leptina, ao mesmo tempo em que estimula a liberação de outros hormônios ligados ao apetite. Isto leva a um ganho de peso e ao desenvolvimento de obesidade, vinculada então aos riscos da SM (TEFF *et al.*, 2004). Além disso, o seu metabolismo pode inibir a formação da enzima fosfofrutoquinase, responsável pela

conversão da frutose-6 fosfato em frutose-1,6-difosfato (figura 1). Esse processo eleva a formação de aldeídos, promovendo alterações no endotélio como aumento da resistência vascular periférica e diminuição da produção de óxido nítrico (VASDEV *et al.*, 2004; WYLIE-ROSETT *et al.*, 2004).

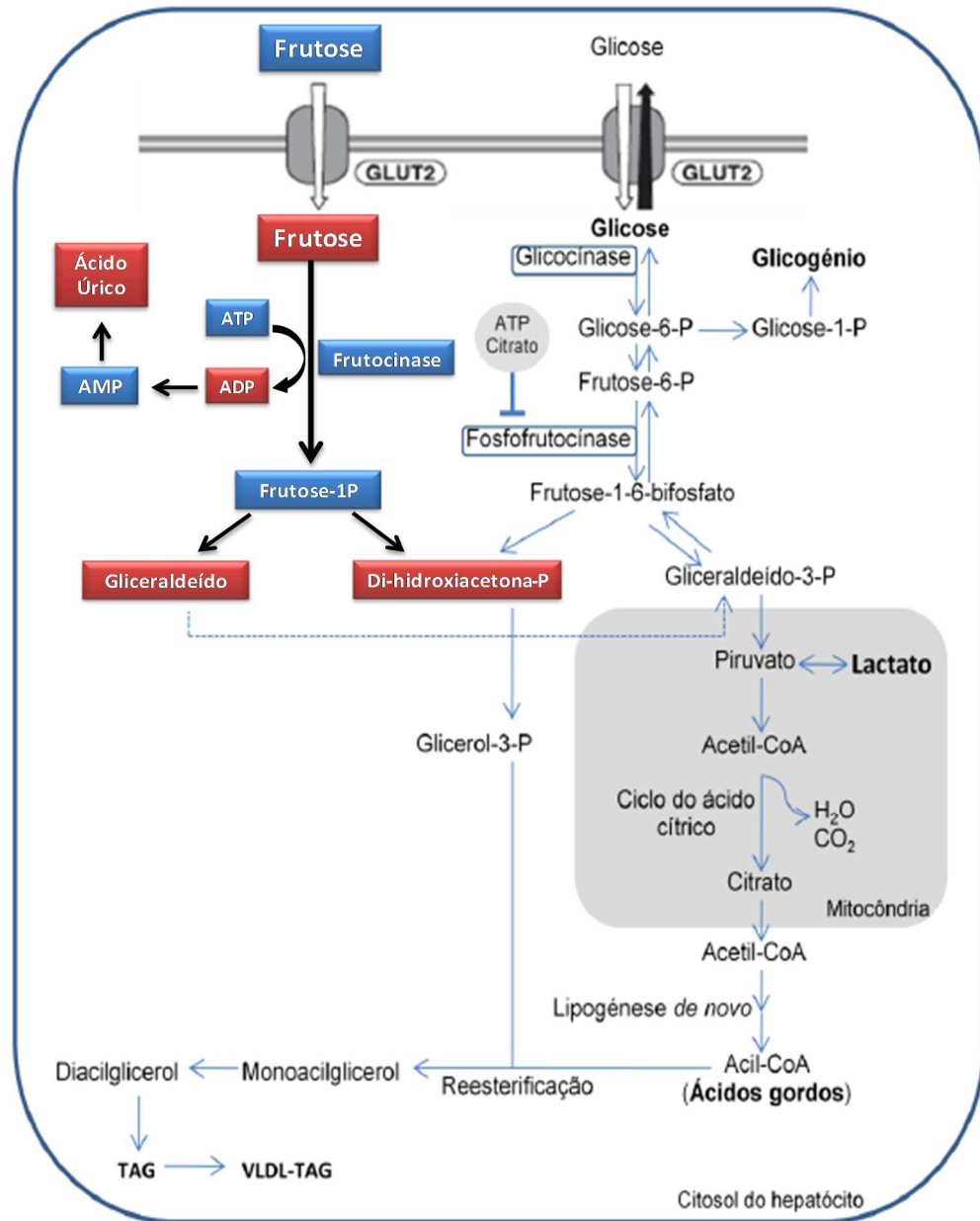


Figura 1: Ilustração esquemática do metabolismo hepático da frutose e glicose (modificado de (FERREIRA, 2010)).

Pesquisas realizadas com seres humanos mostraram que o consumo de frutose pode induzir ganho de peso, redução da sensibilidade à insulina, dislipidemia

e aumento da pressão arterial (PA) (ELLIOTT *et al.*, 2002; BREMER *et al.*, 2012). Existem indícios que alegam uma relação com o crescimento do consumo de frutose e um aumento nos índices de obesidade e síndrome metabólica, principalmente nas faixas etárias infanto-juvenis (OLIVEIRA *et al.*, 2009; BREMER & LUSTIG, 2012).

Alterações metabólicas e fisiológicas semelhantes às encontradas na SM humana, como a resistência à insulina, dislipidemia e aumento da pressão arterial foram observadas também em modelos experimentais com tratamento de frutose na dieta alimentar ou na água de beber (DAI & MCNEILL, 1995; SUZUKI *et al.*, 1997; TEFF *et al.*, 2004; FARAH, V. *et al.*, 2006; CUNHA *et al.*, 2007; BRITO *et al.*, 2008; DE MOURA *et al.*, 2009; MORRIS *et al.*, 2012). De fato, pesquisas realizadas anteriormente mostraram uma correlação entre o aumento na ingestão de frutose e o aparecimento de disfunções do sistema cardiovascular e renal (FARAH, V. *et al.*, 2006; CUNHA *et al.*, 2007; BRITO *et al.*, 2008). Além disso, Taghibiglou e cols. (2000) ofereceram uma dieta rica em frutose por um período de 2 semanas para hamsters, e observaram um aumento de triglicérides e ácidos graxos, uma hiperinsulinemia e uma redução na fosforilação de tirosina nos receptores de insulina nas células hepáticas indicando resistência à insulina.

Além das alterações observadas no tratamento crônico de frutose em animais adultos, a frutose introduzida em período inicial de vida também contribui para quadros de obesidade e modificações da resposta e secreção de insulina (PATEL *et al.*, 2009). No entanto, pouco se conhece sobre esses mecanismos. Ao tratar animais recém-desmamados com uma sobrecarga de 10% de frutose por um período de 8 semanas, estudos prévios realizados em nosso laboratório observaram alterações no perfil lipídico e na homeostasia glicêmica; aumento da leptina, hipertrofia dos adipócitos e aumento da massa adiposa visceral (SILVA, 2013). O mesmo modelo experimental foi utilizado em outro estudo (YOKOTA, 2012) onde observou aumento da pressão arterial e da modulação simpática cardiovascular, alterações na função renal e aumento da atividade do sistema renina angiotensina.

Existe um consenso mundial que a homeostase cardíaca é principalmente regulada pela ação da atividade nervosa autonômica (MANCIA *et al.*, 1997; IRIGOYEN *et al.*, 2005). De fato, existem vários estudos demonstrando de forma consistente que o aumento da atividade simpática é diretamente correlacionada ao

aumento do risco cardiovascular, enquanto que uma função vagal preservada ou aumentada tem sido considerada um fator de proteção cardiovascular (KLEIGER *et al.*, 1987); TASKFORCE (1996). Vários trabalhos experimentais e clínicos têm mostrado de maneira categórica que a disautonomia está presente em uma série de patologias cardiovasculares e metabólicas, como por exemplo, a hipertensão arterial, a insuficiência cardíaca, o diabetes e a síndrome metabólica (EWING *et al.*, 1980; ZANCHETTI & MANCIA, 1991; IRIGOYEN & KRIEGER, 1998; LA ROVERE *et al.*, 1998; VINIK *et al.*, 2003; DE ANGELIS *et al.*, 2004; FARAH VDE *et al.*, 2007). Reforçando essa ideia, o estudo ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) forneceu evidências clínicas do valor prognóstico da disfunção autonômica cardiovascular na mortalidade cardíaca pós-infarto do miocárdio (LA ROVERE *et al.*, 1998).

Em humanos saudáveis, a ingestão aguda de frutose aumentou significativamente a frequência cardíaca, pressão arterial, variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) e diminuição da sensibilidade do barorreflexo (BROWN *et al.*, 2008). Estudos desenvolvidos em nosso grupo demonstraram que dietas ricas em frutose induziram disfunção do sistema nervoso em animais adultos de ambos os sexos (FARAH, V. M. *et al.*, 2006; CUNHA *et al.*, 2007; FARAH *et al.*, 2007; BRITO *et al.*, 2008) e verificaram que o consumo crônico de frutose por 8 semanas induziu aumento da pressão arterial associado a disfunção autonômica, caracterizada por aumento da variância e da banda de baixa frequência da pressão arterial sistólica. Além disto, um estudo em camundongos machos adultos submetidos à sobrecarga de frutose por 8 semanas demonstrou intolerância à glicose, além de correlação entre disfunções renais e as alterações cardiovasculares e autonômicas (CUNHA *et al.*, 2007).

Corroborando os resultados obtidos em machos, evidenciamos que a resistência à insulina estava associada à disfunção autonômica (redução do tônus vagal) em ratas adultas fêmeas saudáveis submetidas à sobrecarga de frutose na água de beber (BRITO *et al.*, 2008). Tais dados evidenciam que a sobrecarga de frutose na dieta de ratos ou camundongos adultos induz disfunções na regulação cardiovascular que foram acompanhadas de aumento da pressão arterial, intolerância à glicose e dislipidemia.

Correlações foram demonstradas entre disfunções cardiovasculares, autonômicas e metabólicas em humanos e animais (FARAH, V. M. *et al.*, 2006; VAN GAAL *et al.*, 2006; FARAH *et al.*, 2007; HELLSTROM, 2007; BRITO *et al.*, 2008; GRASSI *et al.*, 2012). Atualmente evidências sugerem que a obesidade visceral e a resistência à insulina aumentam o risco cardiovascular, por mecanismos clássicos (dislipidemia, hipertensão e dismetabolismo da glicose), bem como por alterações na secreção de biomoléculas pelo tecido adiposo, pelos macrófagos infiltrados neste tecido, ou mesmo pelo baço (BOROVIKOVA *et al.*, 2000; WEISBERG *et al.*, 2003; KANDA *et al.*, 2006; ROMEO *et al.*, 2012). Além disso, nosso grupo demonstrou recentemente que existe uma correlação positiva entre o consumo calórico, metabolismo e a adiposidade com o horário da ingestão de frutose (MORRIS *et al.*, 2012).

Entretanto, a maioria dos estudos experimentais, administra a sobrecarga de frutose durante a fase adulta do desenvolvimento dos animais, restando a dúvida de quais seriam as consequências da ingestão de frutose desde a fase infantil e de desenvolvimento, uma vez que se observa o alto consumo de frutose desde o início do desenvolvimento das crianças nas sociedades modernas. Embora se saiba que o risco de doenças cardiovasculares e de diabetes pode ser influenciado pela dieta e pelos hábitos de vida no período de crescimento, como demonstrado por Bell, (2003) onde foi observado que o consumo excessivo de frutose na dieta durante o período de desenvolvimento do indivíduo induz dislipidemia, resistência à insulina e obesidade na fase adulta, não existem dados na literatura correlacionando os efeitos cardiovasculares ou autonômicos do consumo de frutose desde o início do crescimento e desenvolvimento, após o desmame, até a fase adulta em ratos machos.

O conceito de que o sal atua como estressor cardiovascular é amplamente estudado na literatura. A ingestão acentuada de sal induz a um aumento da pressão arterial (COWLEY & ROMAN, 1996; JOHNSON *et al.*, 2002). Coleman e Guyton em 1969 realizaram experimentos com cargas de sódio em cães e com pessoas hipertensos sal-sensíveis e estes estudos permitiram formular a ideia de que, após uma ingestão de sal, o sódio é transportado no plasma, gerando um temporário aumento de volume plasmático e seu balanço de sódio é normalizado através de uma natriurese realizada principalmente no rim. (COLEMAN & GUYTON, 1969).

Entretanto este mecanismo de pode sofrer alterações que prejudicam a excreção adequada do sódio, provocando um aumento no volume extracelular no débito cardíaco e na perfusão tecidual. Essas mudanças estimulam respostas autorreguladoras como vasoconstrição, aumento da resistência periférica e consequentemente aumento da pressão arterial (PA).

Muitos estudos demonstram a relação direta da ingestão de sal e a elevação da PA e outras consequências distintas que variam de acordo com a população e o desenho experimental. O INTERSALT foi um importante estudo mundial que avaliou 10.079 indivíduos de 52 cidades ao redor do mundo e que demonstrou uma significativa correlação entre ingestão de sal, aumento da PA e idade. Estimou-se que o aumento de 6g/dia na ingestão de sal em 30 anos conduz a um aumento na PAS em 9 mmHg (INTERSALT, 1988). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o consumo de sal diário recomendado é de 5 gramas. No Brasil, dados de 2008/2009 mostram que a média do consumo de sal da população está muito acima do recomendado (11,38g/dia) ABIA (2013).

O cloreto de sódio assim como a água são elementos essenciais à existência da vida, vez que são fundamentais na manutenção da volemia celular, fazendo parte, portanto do meio intracelular como descrito por Claude Bernard. A manutenção da pressão osmótica do líquido intersticial é diretamente dependente da concentração de sódio neste ambiente (FONTELES, 2007). O aumento da ingestão de sal concomitantemente ao aumento da ingestão hídrica leva à uma expansão do volume corporal e sua retenção, gerando um quadro hipertensivo caso ocorra uma baixa excreção renal destes elementos (SMITH, 1959). De fato, a maioria dos tipos de hipertensão altera a PA através do mecanismo de reabsorção renal de volume e de sódio, promovendo uma elevação da PA (COWLEY & ROMAN, 1996). Esses dados sugerem um papel dominante do rim na regulação da PA e sua participação fundamental no desenvolvimento e na manutenção da hipertensão.

Certas pesquisas sugerem que a hipertensão induzida pelo tratamento com frutose pode ser estimulada também através do aumento da reabsorção de sal no intestino delgado (MADERO *et al.*, 2011). Estudos experimentais sugerem uma importante associação entre resistência à insulina e o consumo de sódio na fisiopatogênese da hipertensão arterial sistêmica. Em ratos Dahl, modelos de

pressão arterial sensíveis ao sal demonstram que a resistência à insulina precede a elevação da pressão arterial e que a sobrecarga de sódio antecipa o surgimento da hipertensão arterial sistólica (SHEHATA, 2009), sugerindo que modificações na ingestão de sódio podem provocar efeitos importantes no metabolismo da glicose.

O sódio possui uma importância sobre a atividade do Sistema Renina-Angiotensina (SRA), como por exemplo, a influência do sódio na secreção de renina para o plasma (IRIGOYEN *et al.*, 2005). Vander em 1967 descreveu a relação concentração de sódio x secreção de renina, onde propôs que o aumento do sódio tubular era detectado através de células da mácula densa, que sinalizariam para as células granulares reduzir a secreção de renina, e vice-versa (SCHNERMANN, 1998). Essa resposta pode ser claramente observada em avaliações agudas (CHOLEWA & MATTSON, 2001), porém poucas evidências mostram qual que um mecanismo de ativação contínua da mácula densa seja o responsável pela redução da taxa de secreção, dos estoques de renina e de sua síntese durante uma sobrecarga salina crônica (PERSSON, 2003).

Sendo assim, com o acréscimo de sal na dieta rica em frutose, espera-se um efeito sinérgico em relação aos parâmetros cardiovasculares e lesões teciduais em um órgão alvo tal como o rim, o que de fato já é observado em pesquisas realizadas em seres humanos e em modelos experimentais (VAN DEN MEIRACKER, 1995; SHINOZAKI *et al.*, 2004; RAYSSIGUIER *et al.*, 2006; SANCHEZ-LOZADA *et al.*, 2007). Dornas *et al.*(2012) observou que a associação crônica de frutose e sal apresenta redução de paraoxonase 1 (PON1), que indicaria um efeito deletério no sistema antioxidante dos animais, importante para prevenção de patologias cardiovasculares. Outros estudos crônicos de dietas hipossódicas e ingestão de frutose por 12 semanas não apresentaram efeito sinérgico dos parâmetros de PA e bioquímicos. Entretanto, apresentaram grandes mudanças no tecido vascular vinculada a uma hipertensão crônica (VASDEV *et al.*, 2007).

A interferência da sobrecarga salina de 1% sob os parâmetros cardiovasculares foi observada recentemente em trabalhos do nosso grupo (ARAUJO, 2015), mostrando um aumento da modulação simpática para a vasculatura e alterações na função cardíaca através de um remodelamento cardíaco associado ao aumento de massa do ventrículo esquerdo. Ressalta-se, porém, que a

associação de frutose e sal no mesmo indivíduo não determinou potencialização nas alterações cardiovasculares descritas previamente. Entretanto, não se sabe se com um aumento desta concentração de sal será observado o mesmo resultado de sinergismo entre esses dois fatores de risco cardiovascular.

Dentre os diversos hormônios cujas vias de sinalização intracelular interagem com as vias de sinalização insulínicas, a Angiotensina II (Ang II) tem despertado grande interesse devido a sua importância significativa na associação clínica entre o diabetes mellitus e hipertensão arterial (VAN GAAL *et al.*, 2006). Além disso, o SRA é um complexo sistema hormonal essencial para os ajustes homeostáticos do equilíbrio hidrossalino, atuando como um mecanismo de conservação de cloreto de sódio e regulação da PA e da atividade inflamatória (INAGAMI, 1994; KOBORI *et al.*, 2007).

Desde os primeiros estudos realizados por Tiegerstedt e Bergman em 1898, houve um grande avanço e refinamento das técnicas utilizadas na pesquisa científica, promovendo inúmeras mudanças na compreensão dos elementos constituintes do SRA. A identificação de novos elementos e vias alternativas do SRA, mostram a sua complexidade e importância para o funcionamento do organismo (figura 2). A Angiotensina II (Ang II), octapeptídeo resultante da conversão da Angiotensina I (Ang I) sob a ação da enzima conversora de angiotensina I (ECA), é descrita como o componente ativo mais potente dentro do SRA, atuando principalmente na resistência periférica vascular, hipertrofia, apoptose celular e na regulação da homeostase cardiovascular (STEPP *et al.*, 2007; BECARI *et al.*, 2011; ZABLOCKI & SADOSHIMA, 2011). Além da Ang II, outros peptídeos bioativos também compõem o SRA, tais como Ang III, Ang IV e Ang (1-7) e a Ang (1-12) (KOBORI *et al.*, 2007; WESTWOOD & CHAPPELL, 2012).

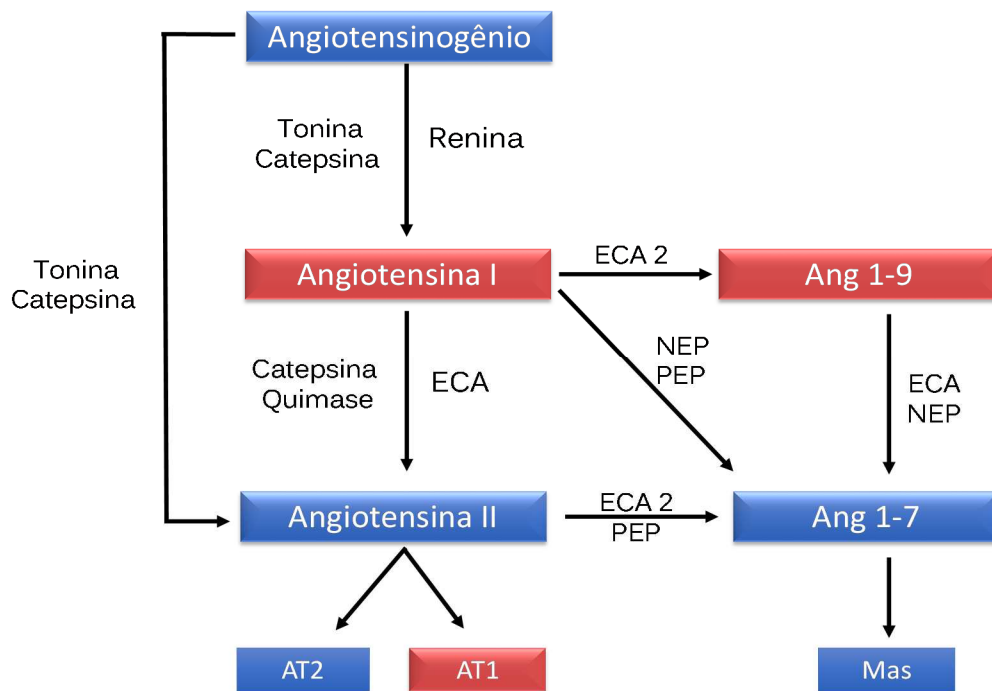


Figura 2: Ilustração esquemática da versão atualizada do SRA e as principais vias de formação das angiotensinas (modificado de (SANJULIANI, 2011; SPETH, 2013). ECA, enzima conversora de angiotensina; ECA2 enzima conversora de angiotensina 2; NEP, Nephylisin/endopeptidase neutra; Ang, angiotensina; Mas, receptor para angiotensina 1-7; AT1, receptor tipo 1 para angiotensina; AT2, receptor tipo 2 para angiotensina; Mas, receptor para Ang 1-7; PEP, prolil-endopeptidase.

Existem estudos que descrevem as propriedades pró-inflamatórias da Ang II, observadas após sua interação com o receptor AT1 (ações vasoconstritoras e pró-inflamatórias), enquanto o AT2 estaria relacionado a efeitos anti-inflamatórios e vasodilatadores (IRIGOYEN, 2003). Produzido localmente, a Ang II influencia o crescimento celular, apoptose, regulação da expressão gênica de substâncias bioativas, migração e diferenciação celular (KIM, 2000; HORIUCHI *et al.*, 2012).

Entretanto, um dos maiores papéis da Ang II está vinculada à regulação hemodinâmica. Ela atua na contratilidade de células musculares lisas e miocárdicas, na estimulação da secreção de aldosterona, na liberação de catecolaminas a partir da medula adrenal e em terminações nervosas do simpático, estimulando o aumento da atividade do sistema nervoso simpático (HORIUCHI *et al.*, 2012). Estudos pré-clínicos e clínicos sobre a investigação dos efeitos farmacológicos da inibição da ECA e do bloqueio de AT1, demonstraram que a Ang II exerce um papel crucial na patogênese da hipertensão arterial e lesão renal através da ativação indevida de receptores AT1 (PAUL *et al.*, 2006). O peptídeo Ang(1-7) possui um importante papel

hipotensor, com características opostas aos efeitos da Ang II. Isto pode indicar que o desequilíbrio entre estes peptídeos pode estar relacionado com diferentes quadros de patologias cardiovasculares (VARAGIC *et al.*, 2008).

Diferentes estudos têm demonstrado que o aumento da frutose na dieta promove ativação do SRA em ratos e camundongos (LARAGH, 1992; SHINOZAKI *et al.*, 2004). Por exemplo, estudos com ratos submetidos a uma dieta rica em frutose tiveram como resultado um aumento da Ang II no plasma e da densidade do receptor AT1 no ventrículo esquerdo, mostrando uma relação do aumento de pressão arterial com a hipertrofia cardíaca (NAVAR & MAJID, 1996; NAVAR & HARRISON-BERNARD, 2000).

Estudos do nosso grupo descreveram alterações na atividade da ECA e na concentração dos níveis de Ang I, Ang II e Ang (1-7) no soro e em tecido renal em ratos recém-desmamados com sobrecarga de frutose, sugerindo que o aumento da PA deve estar relacionado com a modulação do SRA sistêmico e tecidual. Concluiu-se que vias alternativas na produção de Ang II estão ativadas por mecanismos ainda não estudados nos animais tratados com frutose, tais como a tonina, catepsina e a quimase. Além disso, dados recentemente demonstrados pelo nosso grupo, mostrou que, embora o sal seja capaz de inibir a atividade de renina, a sobrecarga salina por 10 dias à 1% é capaz de aumentar a angiotensina II circulante e a renal (ARAUJO, 2015).

O período de infância e juventude são caracterizados por altas taxas de crescimento e desenvolvimento, o qual a dieta pode influenciar no aumento do risco de doenças cardiovasculares e diabetes na maioridade. Observando que a ingestão crônica de frutose ou de sobrecarga de sal à 1% na maturidade apresenta alterações nos parâmetros cardiovasculares e renais, mas que, ao serem associadas em um mesmo indivíduo provocam mudanças semelhantes, a hipótese do nosso estudo é de que o aumento na concentração de sal para 2% possa exacerbar os efeitos sinérgicos dos fatores de risco cardiovascular na síndrome metabólica e entender o papel do sistema renina angiotensina nesse processo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

Avaliar o efeito da sobrecarga salina de 2% na função cardiovascular em modelo experimental de síndrome metabólica induzida por frutose e investigar o papel do sistema renina angiotensina tecidual.

2.2. Objetivos Específicos

Avaliar o efeito da ingestão de sal (2%) por um período de 10 dias em um modelo experimental de síndrome metabólica induzida através da sobrecarga de frutose por 8 semanas desde o desmame, sobre os seguintes parâmetros:

- Composição corporal: ganho de peso e peso dos tecidos e dos depósitos de gordura
- Avaliações metabólicas: gaiola metabólica, tolerância à glicose, resistência à insulina e perfil bioquímico (glicemia em jejum, concentração de triglicérides e colesterol);
- Pressão Arterial e na Frequência Cardíaca;
- Modulação autonômica cardiovascular;
- Avaliação do SRA na regulação cardíaca: atividade da ECA e quantificação das angiotensinas I, 1-7 e II em homogenatos teciduais de rim e coração.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os protocolos experimentais realizados estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animais adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL), e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (protocolo CEP 0377/12), Campus São Paulo, e pela comissão de Pesquisa e Ética da Universidade Presbiteriana Mackenzie (protocolo nº 087/02/2012).

3.1. Amostra

As amostras foram obtidas através do estudo com ratos Wistar machos recém-desmamados (21 dias de idade), durante 8 semanas e pesando inicialmente entre 50 - 60g. Os animais foram mantidos agrupados no Biotério da Universidade Presbiteriana Mackenzie, em ambiente com temperatura controlada (22° - 25°), ciclo claro-escuro (12/12 horas) e livre acesso à água e ração (ração industrial para ratos e camundongos, NUVILAB CR-1, PR).

3.2. Grupos Experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais:

- Grupo Controle (C): Composto por animais com livre acesso a água por um período 8 de semanas (58 dias de protocolo) a partir do desmame.
- Grupo Frutose (F): Composto por animais com livre acesso a solução de frutose (10 %, D-frutose, Synth), por um período de 8 semanas (58 dias de protocolo) a partir do desmame.
- Grupo Sal (S): Composto por animais com livre acesso a água por um período 8 de semanas (58 dias de protocolo) a partir do desmame. Nos 10 dias restantes do

protocolo (a partir do 47º dia), a água de beber foi trocada por uma solução salina (2%, NaCl, Synth).

- Grupo Frutose e sal (FS): Composto por animais tratados com água contendo frutose (10 %, D-frutose, Synth), por um período de 8 semanas a partir do desmame. Nos 10 dias restantes do protocolo (a partir do 47º dia), os animais receberam livre acesso à solução de frutose acrescido sal (NaCl) a 2%.

3.3. Indução do modelo experimental de síndrome metabólica

O modelo de síndrome metabólica foi induzido através da sobrecarga de frutose (10 %, D-frutose, Synth) na água de beber. O tratamento de frutose foi utilizado a partir do desmame e mantido por 58 dias consecutivos (SUZUKI *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2011; SENADOR *et al.*, 2012)

3.4. Desenho Experimental

Antes do início do protocolo experimental, os animais foram desmamados aos 21 dias de vida, pesados e separados aleatoriamente entre os grupos experimentais. Em seguida, a administração de frutose foi iniciada. A cada semana de protocolo experimental, houve o registro do peso corporal, ingestão hídrica e consumo de ração de 24 horas utilizando balança semi-analítica (Digimed, KN 1000). Avaliações metabólicas e cardiovasculares ocorreram na 8ª semana. No 58º dia de tratamento, os animais foram decapitados para análises posteriores. Importante ressaltar que, os animais que passaram pelos procedimentos de avaliações cardiovasculares, foram eutanasiados através de sobrecarga anestésica e não foram coletados tecidos para dosagens bioquímicas e moleculares. Tais medidas foram realizadas devido ao nível de estresse pós-cirúrgico e utilização de fármacos, que poderia alterar os níveis dos componentes do sistema de renina angiotensina a serem quantificados. A figura 3 representa a sequência experimental do projeto para uma melhor compreensão.

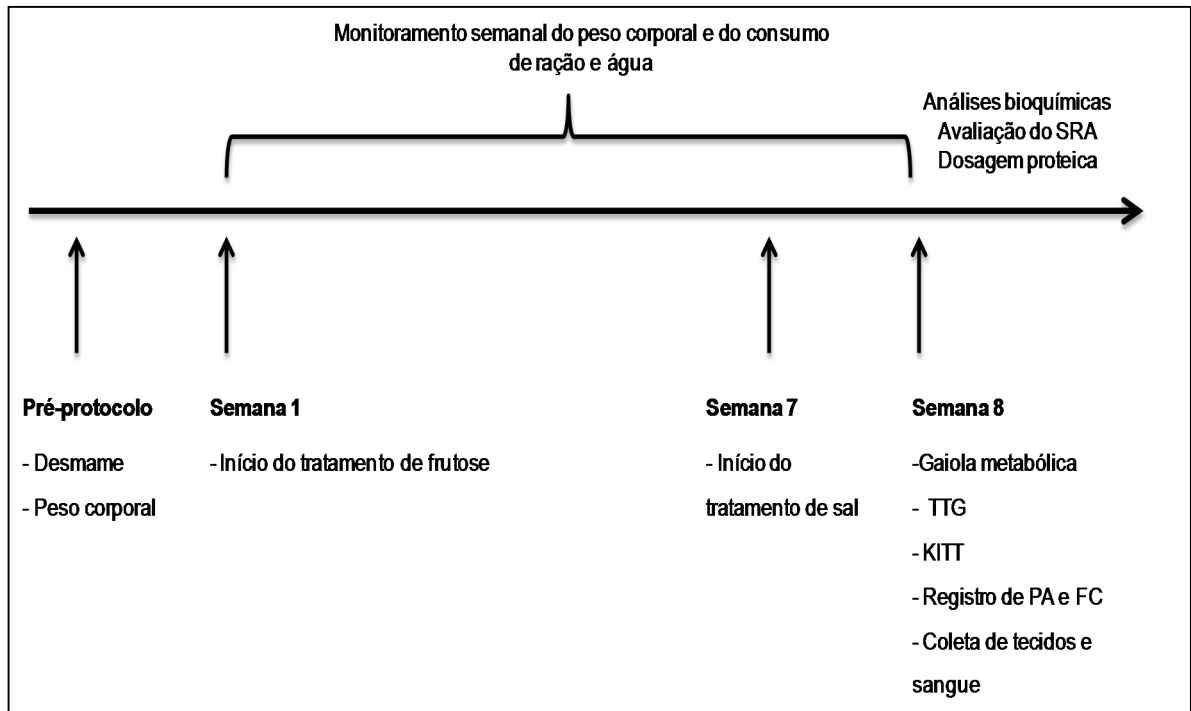


Figura 3: Sequência cronológica dos procedimentos experimentais do estudo que incluiu os grupos Controle (C), Sal (S), Frutose (F) e Frutose Sal (FS).

3.5. Avaliações Metabólicas

3.5.1. Avaliação em Gaiola Metabólica

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas por um período de 24 horas para adaptação e as seguintes 24 horas para obtenção de valores do volume urinário, consumo hídrico e de ração. A urina foi coletada, centrifugada a 5000rpm, 4 Celsius, 10 minutos e armazenada a -20 Celsius para posteriores análises bioquímicas.

3.5.2. Determinação da glicemia e teste de tolerância à glicose (TTG)

A determinação da glicemia foi realizada com os animais em jejum de 12 horas, o qual se retirou uma gota de sangue da cauda que foi introduzida em glicosímetro comercial (Accu-Check Advantage Blood Glucose Monitor, Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN). Em seguida, foi realizado o teste de tolerância à glicose onde, após a obtenção da glicemia basal, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de glicose a 50% e a glicemia foi analisada nos tempos 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração de glicose. A partir dos valores de glicemia obtidos nos tempos, foi calculado a área sob a curva da queda glicêmica pelo tempo.

3.5.3. Teste de resistência à insulina

O teste de resistência à insulina foi realizado após um período de jejum de 4 horas. Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40mg/Kg) e colocados em decúbito dorsal em cama aquecida à 37°C. Os níveis de glicose foram obtidos através da coleta de sangue da cauda do animal utilizando-se um glicosímetro comercial (Accu-Check Advantage Blood Glucose Monitor, Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN). Após obtenção da glicemia basal, a veia caudal foi localizada para administração de insulina de ação rápida (Regular) via endovenosa (0,75 U/Kg). nos tempos 4, 8, 12 e 16 min após a administração de insulina. Os valores de glicemia dos minutos 4 e 16 foram utilizados para calcular a constante de queda da glicose plasmática (Kitt) de acordo com a descrição de (BONORA *et al.*, 1989).

3.5.4. Análises Bioquímicas

Amostras de sangue foram coletadas ao final do protocolo para obtenção do soro para dosagem de colesterol total, triglicérides e creatinina. A determinação de colesterol, triglicérides e creatinina foram realizadas por métodos calorimétricos enzimáticos comerciais (Labtest, BR).

3.6. Avaliação Hemodinâmica

3.6.1. Cateterização da Artéria e Veia Femorais

Para o registro direto da pressão arterial, foi necessário realizar a cateterização da artéria e veia femorais. O procedimento cirúrgico se deu com os ratos anestesiados com uma solução de cloridrato de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (12 mg/kg) via intraperitoneal. Os catéteres consistiram de uma parte mais fina (PE-10), que foi introduzida pela artéria ou veia femoral acessando a aorta ou veia cava inferior, e uma parte mais grossa (PE-50) que foi colocada subcutaneamente até o dorso do animal, entre as escápulas, e então fixada através de pontos cirúrgicos na pele.

3.6.2. Registro da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (FC).

Os registros de PA e FC foram realizados com os ratos acordados e em livre movimentação, e após a estabilização de atividade exploratória do animal (15-20 minutos) os mesmos foram registrados 30 minutos dos sinais de PA.

A medida direta da PA foi obtida através do catéter da artéria femoral conectado a um transdutor de pressão (Hewlett-Packard 1280, EUA) acoplado a um amplificador (AECAD-02PD, Projetos AVS, Brasil). O sinal amplificado foi digitalizado através de uma placa de conversão analógico digital (modelo DI-158, Dataq instruments, USA), com frequência de amostragem de 2000 Hz, instalada em um computador (modelo T23, IBM Thinkpad, Inc). Os dados digitalizados foram então processados através do programa WinDaq (DataQ Instruments, Inc.; USA) e posteriormente analisados (Excel, Microsoft Co. USA) para análise de PA e FC.

3.6.3. Variabilidade do intervalo de pulso e da pressão arterial nos domínios do tempo e da frequência.

Cada ciclo cardíaco obtido previamente através da aquisição da onda de pressão pelo programa Dataquest A.R.T. 4.2., resultou nas medidas de frequência cardíaca, intervalo de pulso (IP), pressão arterial sistólica. A variabilidade de IP no domínio do tempo foi quantificada pela variância total e pela raiz quadrada da soma das diferenças sucessivas entre intervalos RR (RMSSD). Já a variabilidade da pressão arterial no domínio do tempo foi representada pela variância.

Para análise da variabilidade de IP e da pressão no domínio da frequência, as séries temporais foram armazenadas em forma de texto para posterior análise pelo programa Cardioseries 2.4. Utilizando-se da transformada rápida de Fourier (FFT) para decomposição dos sinais da onda em espectros de potência.

As potências para as bandas de muito baixa frequência (MBF) foram definidas como inferiores a 0.20Hz, as de baixa frequência (BF), representando a modulação simpática, foram fixadas entre 0.20-0.75Hz e alta frequência (AF), correspondente com modulação vagal, em 0.75-4,0 Hz. Este estudo não aborda as faixas de muito baixa frequência por não estarem muito bem definidas pela literatura (Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology, 1996). Cada uma foi calculada pela integração da potência nas bandas de interesse e apresentadas como valores absolutos e normalizados. Para normalização as potências das bandas de BF e AF foram subtraídas da potência na banda MBF e sua soma foi considerada a totalidade de todas as bandas (PAGANI *et al.*, 1986; PAGANI *et al.*, 1988).

3.7. Eutanásia

Ao final da 8 semana de tratamento, os animais em jejum de 12 horas, foram eutanasiados por decapitação através de guilhotina própria para o procedimento. Amostras de sangue total foram coletas para posteriores avaliações bioquímicas. Os órgãos e tecidos de interesse como a gordura epididimal e retroperitoneal foram retirados, pesados em balança digital analítica e estocados para futuras análises. O procedimento de decapitação foi utilizado afim de evitar a interferência do anestésicos na veracidade dos resultados obtidos para a avaliação dos componentes do SRA.

As amostra de sangue total foram coletadas em tubos específicos para obtenção de soro onde após a coleta foram mediatamente centrifugadas a 4°C, 12000 rpm por 10 minutos. O soro e o plasma foram então coletados e armazenados em freezer a -80°C. Os tecidos coração e rim direito foram emergidos em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenados em freezer a -80°Celsius.

3.8. Componentes do SRA

3.8.1. Determinação da atividade da ECA tecidual

A atividade da ECA tecidual foi quantificada pelo método de fluoremetria em colaboração com a Dra. Fernanda Aparecida Ronchi no laboratório de Rim e Hormônios da Profa. Dra. Dulce Elena Casarini, Departamento de Medicina, Disciplina de Nefrologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

A atividade da ECA foi determinada fluorimetricamente utilizando-se como substratos Hipuril-L-His-Leu (HHL) (5 mM) e Z-Phe-His-Leu (Zphe-HL) (1mM). O tampão padrão utilizado para os ensaios será o fosfato de potássio 100 mM pH 8,3, contendo NaCl 300mM e ZnSO₄ 0,1mM.

Alíquotas de 10 µL de cada homogenato dos tecidos de interesse foram incubadas, a 37° C, com 200 µL do substrato ZPhe-HL e HHL, durante um período de 10 minutos para os tecidos, sendo que as reações enzimáticas foram

interrompidas com 1,5 mL de NaOH 0,28 N. O dipeptídeo His-Leu liberado foi acoplado ao marcador fluorescente orto-ftaldialdeído (20 mg/mL, em metanol), sendo a reação fluorimétrica interrompida após 10 minutos pela adição de 200 µL HCl 3N. A seguir, a leitura da fluorescência (excitação: 360 nm; emissão: 500 nm) foi feita no espectrofluorímetro (Hitachi) (RONCHI *et al.*, 2007). A atividade enzimática foi normalizada através da quantificação proteica de cada amostra.

3.8.2. Quantificação das angiotensinas por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

A quantificação das angiotensinas (Ang I, Ang II e Ang1-7) foi realizada pelo método de cromatografia líquida de alta performance em colaboração com a Dra. Fernanda Barrinha Fernandes no laboratório de Rim e Hormônios da Profa. Dra. Dulce Elena Casarini, Departamento de Medicina, Disciplina de Nefrologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo.

A extração de angiotensinas foi realizada a partir do homogenato do rim direito e coração dos animais. Foram utilizados 0,15-0,2g de cada tecido adicionados ao tampão fosfato de sódio 100 mM, sacarose 340 mM, NaCl 300 mM, pH 7,2. As amostras foram concentradas em colunas C18 Sep-Pak, ativadas com metanol (5 mL), tetrahidrofurano (5 mL), hexano (5 mL), metanol (5 mL) e água (10 mL). Após a aplicação das amostras e lavagem das colunas com água (10 mL), os peptídeos de interesse foram eluídos com etanol, ácido acético e água (90:4:6). Os eluatos foram então liofilizados e redissolvidos em 500µL de fase móvel A: 5% ACN (50 mL) em 0,1% de ácido ortofosfórico (1 mL), num volume final de 1L, e filtrados com membrana 0,22 µm antes de serem submetidos à HPLC.

O peptídeo foi separado em uma coluna de fase reversa Aquapore ODS 300 (250 x 4,6 mm), 7 µ, utilizando gradiente linear de 5% a 35% de fase móvel B (95% Acetonitrila em H₃PO₄ 0,1%), sob um fluxo de 1,5 mL/min por 40 min. A coluna de HPLC foi calibrada utilizando padrões sintéticos e a detecção do peptídeo foi analisada em absorvância de 214 nm. Os resultados foram expressos em ng/mL e corrigidos pelo peso do tecido. Os cálculos foram efetuados a partir de uma curva padrão de concentração conhecida (ALMEIDA, *et al.*, 2006).

3.8.3. Dosagem de proteína

A determinação da concentração proteica dos extratos de tecidos foi realizada através do método de Bradford (1976) (Bio-Rad Protein Assay), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

3.9. Análise estatística

Todos os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. A análise estatística comparativa foi feita utilizando o software STATISTIC 6.0 através da análise de variância (ANOVA) de duas vias para todos os parâmetros, seguido do post hoc de Bonferroni. Diferenças que apresentaram probabilidade de acaso menores que 5% ($p \leq 0,05$) foram consideradas significativas.

4.0. RESULTADOS

4.1. Composição Corporal

Os animais dos grupos de estudo iniciaram o protocolo experimental com pesos semelhantes entre si, e no final da oitava semana, observou-se que os grupos tratados com sal apresentaram uma diminuição de peso em relação aos grupos C e F (Figura 4).

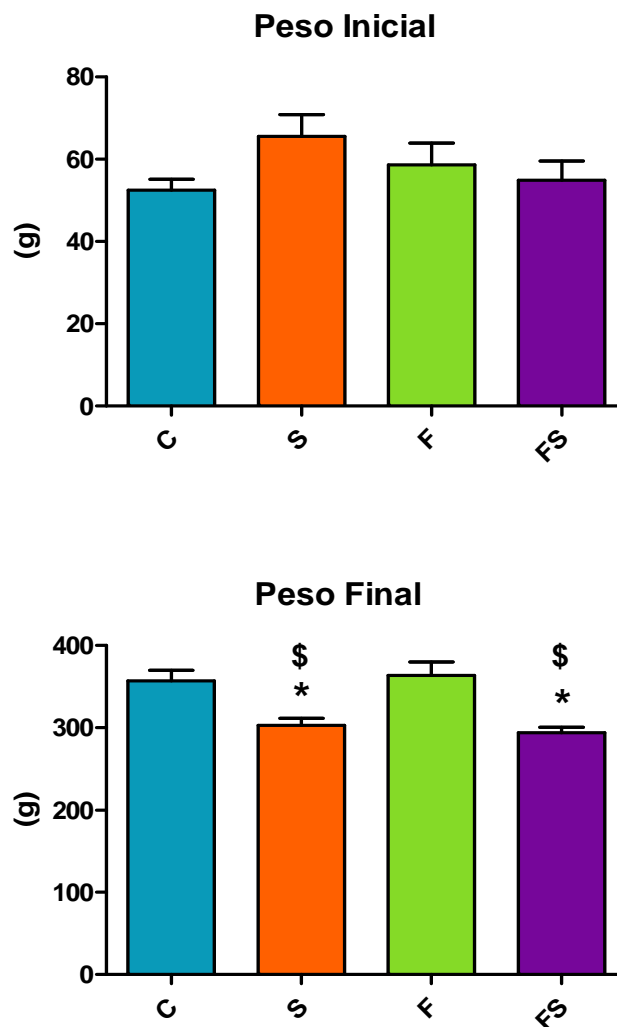


Figura 4: Valores do peso corporal inicial e final dos animais do protocolo de oito semanas dos diferentes grupos experimentais: C=Controle (n= 25), S=Sal (n=27), F=Frutose (n=17), FS=Frutose e Sal (n=27). * $p < 0.01$ vs C; \$ $p < 0.01$ vs F.

A respeito do ganho de peso (Peso final-peso inicial), demonstrado na figura 5, os grupos S ($200\pm 7.3\text{g}$) e FS ($215\pm 6.9\text{g}$) apresentaram perda de peso significativa em relação aos grupos C ($265\pm 8.7\text{g}$) e F ($263\pm 10.1\text{g}$).

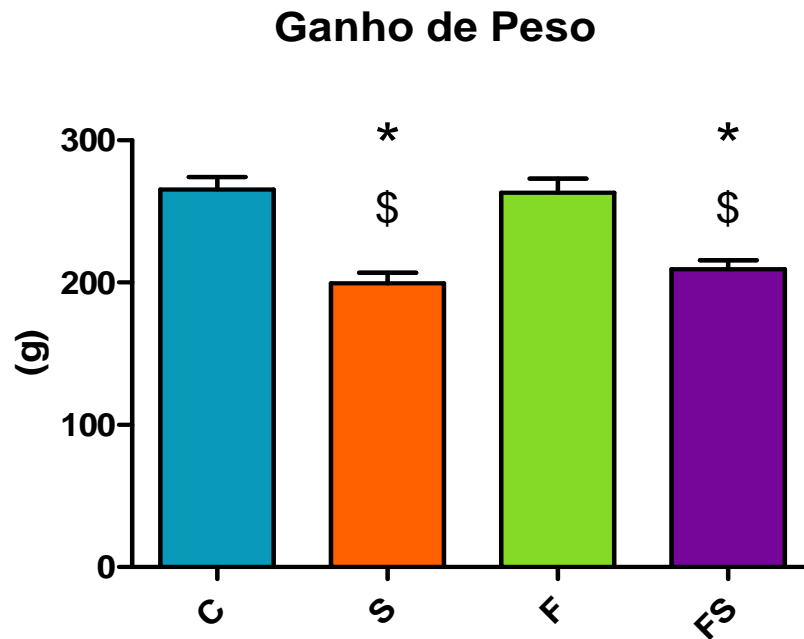


Figura 5: Ganho de peso dos animais dos diferentes grupos de estudo submetidos ao protocolo experimental. C (n= 25), S (n=27), F (n=17), FS (n=27). * $p < 0.01$ vs C; \$ $p < 0.01$ vs F.

A Tabela 1 apresenta os valores corrigidos do peso dos órgãos pelo peso corporal obtidos no momento da eutanásia. Sucintamente, houve aumento da quantidade de gordura retroperitoneal e epididimal no grupo F, e uma redução no grupo S.

Tabela 1: Peso corporal, peso corrigido de gordura retroperitoneal, gordura epididimal, coração e rim direito dos animais submetidos ao protocolo experimental

	C	S	F	FS
Peso Corporal (g)	357±12.7	303 ± 8.6#*	364 ± 16.5	294 ± 6.7#*
Gordura Retroperitoneal (g.10³)	9 ±1.1	3.9 ± 0.5#*	13 ± 1.1#	7.5 ± 0.8*\$
Gordura Epididimal. (g.10³)	5.7±0.5	3.9 ± 0.4	8.5 ± 0.8\$#	6.1 ± 0.3*\$
Coração (g.10³)	3.6 ± 0.1	3.6 ± 0.1	3.3 ± 0.1	3.6 ± 0.1
Rim Direito (g10³)	3.8 ± 0.1	4.1 ± 0.1	3.6 ± 0.1	3.9 ± 0.1

Os resultados são apresentados em média ± EPM. Grupos: C (n=17), S (n=21), F (n=17), FS (n=22). #p<0.01 vs C, * p<0.05 vs F, \$ p<0.05 vs S.

4.2. Avaliação metabólica

Para compreender melhor os mecanismos envolvidos na evolução do peso corporal, foram estudados fatores como ingestão alimentar, hídrica e volume de urina excretada. A Tabela 2 ilustra os valores de consumo de ração, ingestão hídrica e urina excretada em 24 horas entre os grupos estudados na última semana de protocolo experimental.

Tabela 2: Valores de consumo de ração, ingestão hídrica e urina excretada em 24 horas dos grupos C(n=10), S(n=5), F(n=7) e FS(n=4).

	Consumo de Ração (g)	Ingestão Hídrica (mL)	Urina Excretada (mL)
C	9.4±1.7	24±2.5	6±0.7
S	2.7±0.5*	60±20.9*	35±12.7*
F	5.9±1.3*	65±7.3*	34±5.1*
FS	2.0±0.4*	88±9.5*	63±9.0*

Valores em média ± EPM. * p<0.05 vs C.

4.2.1. Glicemia Basal e Teste de Tolerância a glicose

A glicemia basal foi realizada em jejum de 12 horas nos grupos S (87±5.7 mg/dL) e FS (85±1.8 mg/dL) apresentou-se diminuída em relação aos grupos C (100±2.9 mg/dL) e F (99±3.3 mg/dL) (Figura 6).

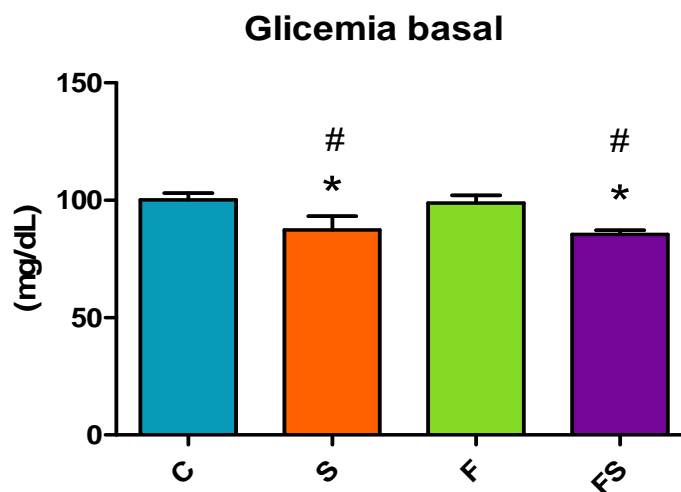


Figura 6: Glicemia basal dos animais dos grupos submetidos ao protocolo experimental. C (n=11), S (n=6), F (n=11), FS (n=8). *p<0.05 vs C; #p<0.05 vs F.

A Figura 7 apresenta os valores de área sobre a curva obtidos através do teste de tolerância à glicose (TTG) realizado na última semana de experimento. Observa-se que o grupo C (131 ± 7.2 mg/dL/min) apresenta uma área sobre a curva menor em relação ao F (173 ± 2.7 mg/dL/min) e S (167 ± 6.0 mg/dL/min), enquanto FS (215 ± 15 mg/dL/min) foi significativamente maior do que C, F e S.

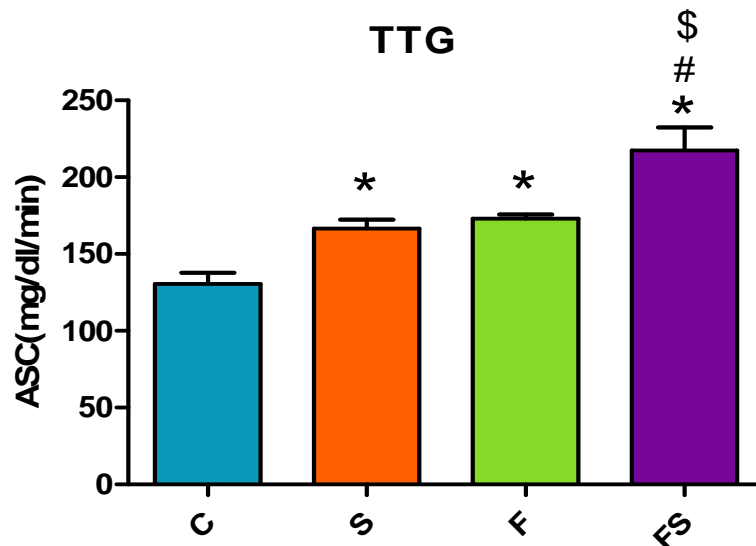


Figura 7: Área sob a curva (mg/dL/min) obtidas no TTG dos animais C (n=11), S (n=6), F (n=11), FS (n=8). * $p < 0.01$ vs C; # $p < 0.01$ vs F; \$ $p < 0.01$ vs S.

4.2.2. Teste de Tolerância a insulina

A Figura 8 apresenta os valores da constante do decaimento da glicose plasmática durante o teste de tolerância a insulina. Houve uma diminuição na constante de decaimento no grupo F (3.6 ± 0.2 mg/dL/min) em relação ao C (4.6 ± 0.2 mg/dL/min).

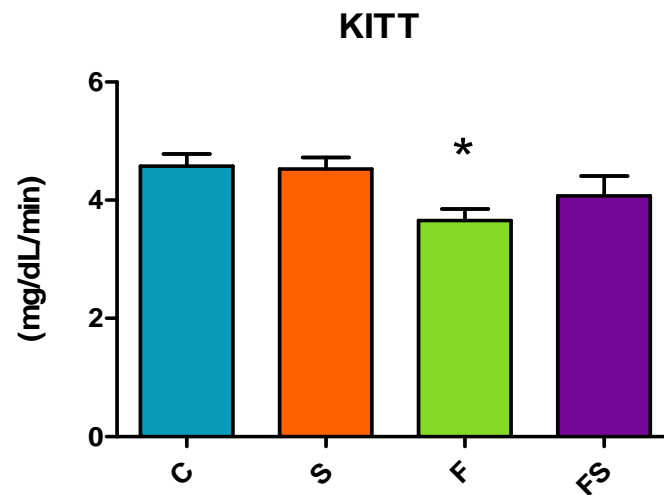


Figura 8: Teste de tolerância à glicose - Kitt. C (n=13), S (n=4), F (n=9), FS (n=6). * $p < 0.01$ vs C.

4.2.3. Avaliações Bioquímicas

Os valores de triglicérides, creatinina e do colesterol total foram obtidos através das amostras de soro coletadas ao final do protocolo (tabela 3). O grupo F apresentou valores de triglicérides significativamente maiores do que C e S.

Tabela 3: Valores de triglicérides, colesterol total, e creatinina dos animais dos grupos estudados.

	C	S	F	FS
Triglicérides (mg/dL)	41±4.0	35±1.9	64±6.2#	46±2.6
Colesterol Total (mg/dL)	69±4.9	66±2.1	79±2.5	66±3.3
Creatinina sérica (mg/dL)	0.43±0.06	0.47±0.11	0.48±0.01	0.47±0.02

Os dados são apresentados em média ± EPM. Grupos: C (n=5), S (n=5), F (n=5), FS (n=5). \$ $p < 0.05$ vs S; # $p < 0.05$ vs C.

4.3. Avaliação hemodinâmica

4.3.1. Pressão Arterial e Frequência Cardíaca

Observou-se que todos os animais dos grupos tratados com frutose e/ou sal apresentaram aumento significativo na pressão arterial média (PAM) ao compararmos com grupo C. (Figura 9A). Na figura 9B, observou-se uma redução da frequência cardíaca dos animais em S em relação a C e F.

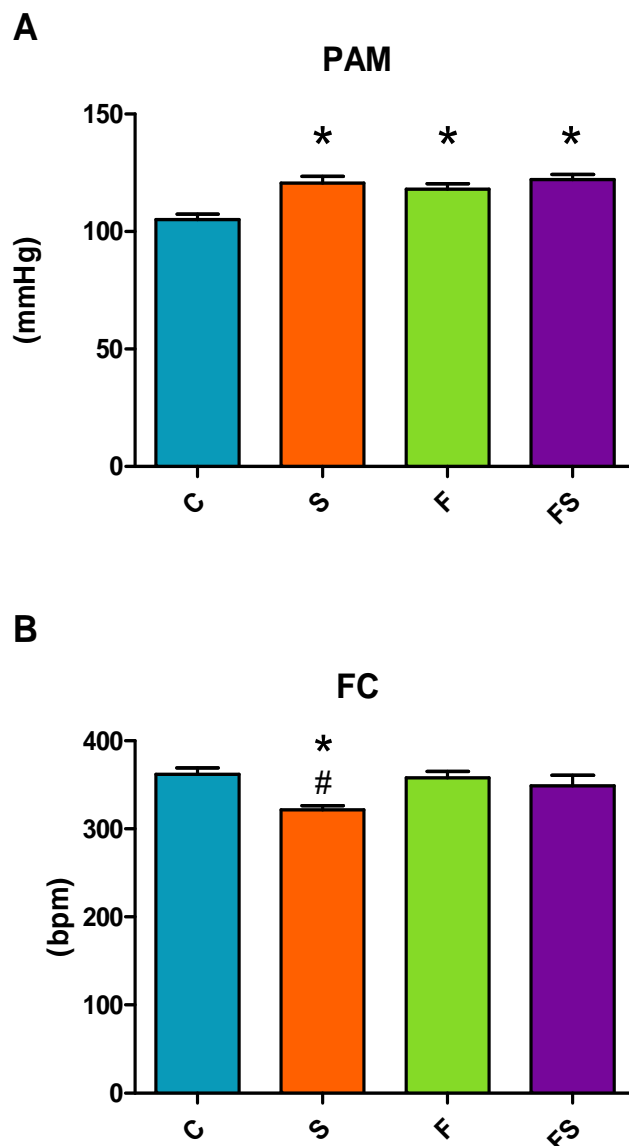


Figura 9: Análise da Pressão Arterial média e da Frequência Cardíaca. **A:** Pressão arterial média. **B:** Frequência Cardíaca. Os dados são apresentados em média \pm EPM. Grupos: C (n=8), S (n=9), F (n=10), FS (n=9). * $p < 0.05$ vs C; # $p < 0.05$ vs F.

4.3.2. Variabilidade da frequência cardíaca expressa pelo intervalo de pulso (IP) no domínio do tempo (variância) e da frequência (análise espectral, transformada rápida de Fourier- FFT)

A figura 10 apresenta valores da variância da frequência cardíaca no domínio do tempo sem diferenças significativas entre os grupos C ($28 \pm 6.3 \text{ ms}^2$), S ($25 \pm 2.6 \text{ ms}^2$), F ($33 \pm 3.8 \text{ ms}^2$) e FS ($26 \pm 2.7 \text{ ms}^2$).

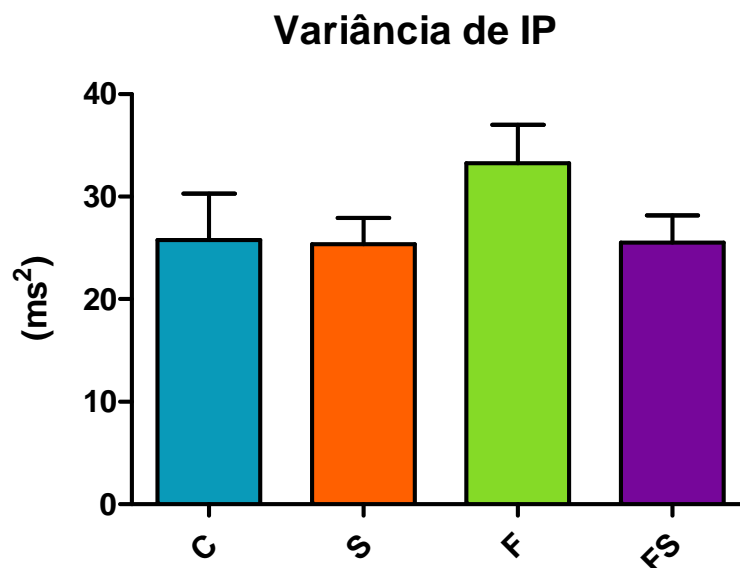


Figura 10: Variância do intervalo de pulso no domínio do tempo. Valores obtidos ao final de 8 semanas de protocolo expressos em média \pm EPM nos grupos C (n=5), S (n=6), F (n=9), FS (n=6).

A avaliação pela análise espectral das bandas de baixa frequência (BF), de alta frequência (AF) (Figura 11) do tacograma, consideradas como índice da modulação do simpático e parassimpático cardíaco respectivamente, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados. Entretanto, os dados sugerem uma diminuição das bandas nos grupos tratados com sal.

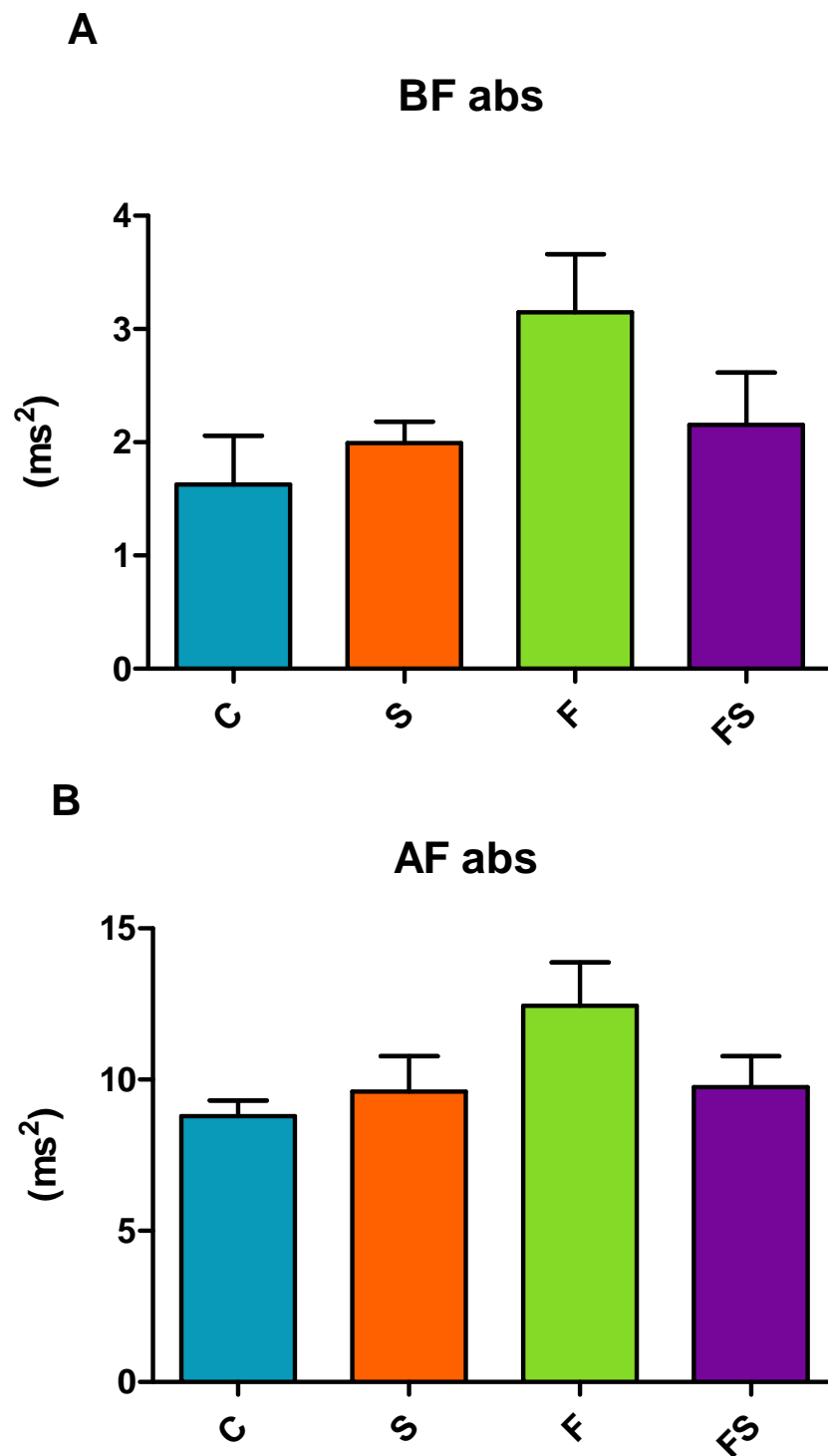


Figura 11: **A.** Componente oscilatório de baixa frequência (BF) em valores absolutos: Modulação simpática cardíaca. **B.** Componente oscilatório de alta frequência (AF) em valores absolutos: Modulação parassimpática cardíaca. Variabilidade do intervalo de pulso no domínio da frequência. Valores expressos em média \pm EPM nos grupos C (n=5), S (n=6), F (n=9), FS (n=6)

Ao analisar os índices de BF e AF normalizados, as diferenças entre os grupos ficam menores do que os valores absolutos observados anteriormente nos diferentes grupos de estudo (figura 12).

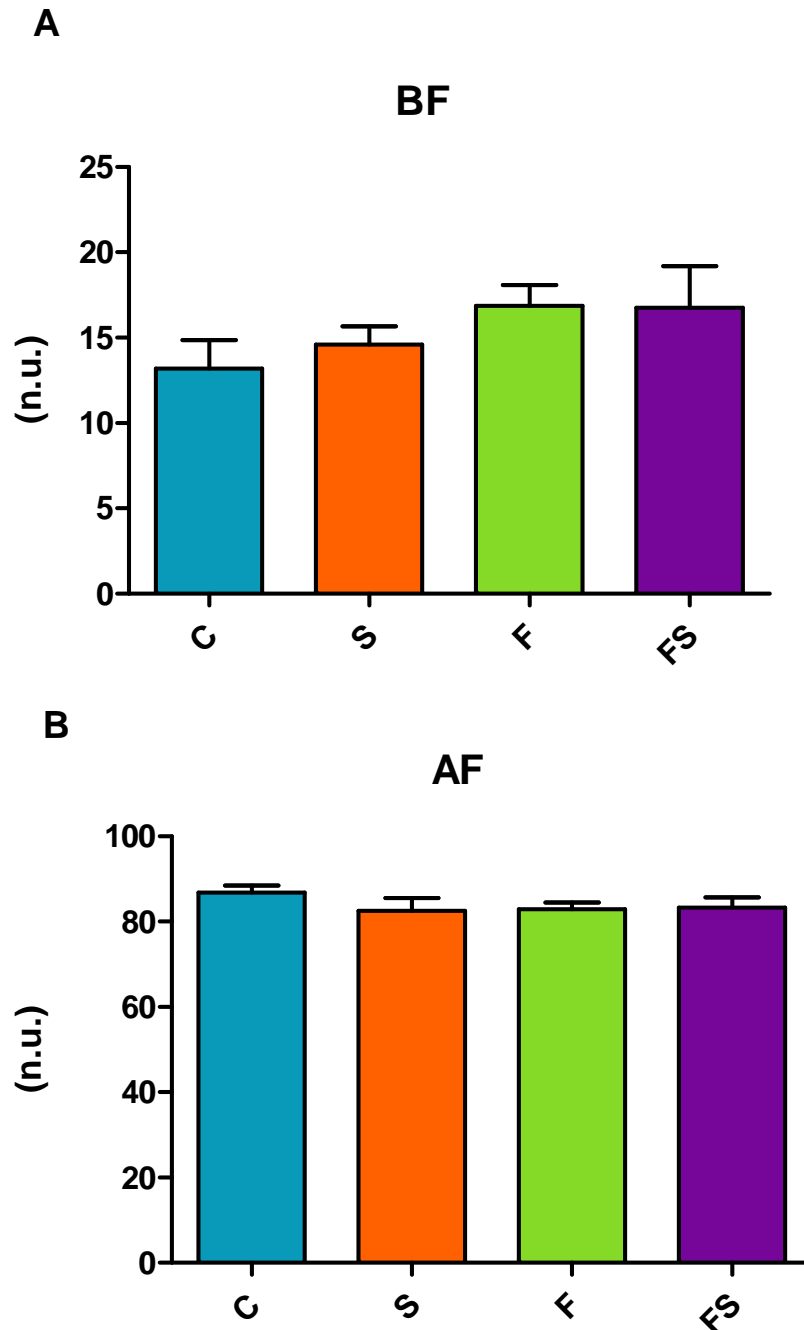


Figura 12: Variabilidade do intervalo de pulso no domínio da frequência em valores relativos. **A.** Componente oscilatório de baixa frequência (BF): Modulação simpática cardíaca. **B.** Componente oscilatório de alta frequência (AF): Modulação parassimpática cardíaca. Valores expressos em média \pm EPM nos grupos C (n=5), S (n=6), F (n=9), FS (n=6)

A variabilidade da pressão arterial no domínio do tempo também não apresentou diferenças entre os grupos. (figura 13).

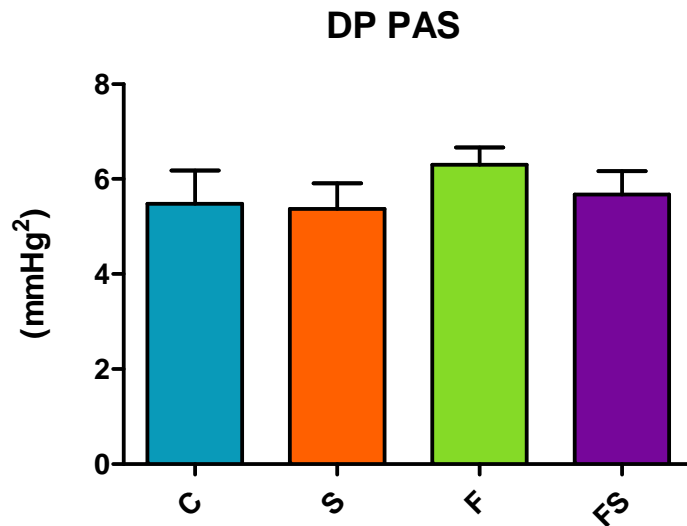


Figura 13: Variabilidade da pressão arterial sistólica no domínio do tempo analisada pelo desvio padrão (DP). Valores obtidos ao final de 8 semanas de protocolo expressos em média \pm EPM nos grupos C (n=5), S (n=6), F (n=9), FS (n=6)

Na Figura 14, podemos observar a avaliação da análise espectral da banda BF da PA. Não foi observado diferença significativa entre os grupos.

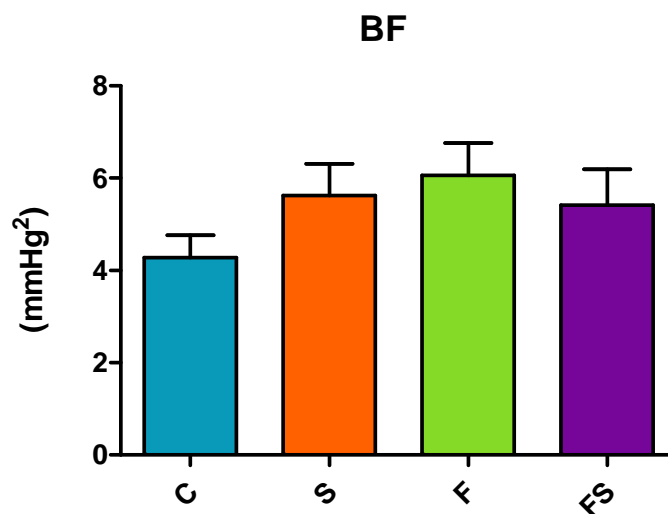


Figura 14: Componente oscilatório de baixa frequência (BF) da variabilidade da pressão arterial sistólica no domínio do tempo: Modulação simpática vascular ao final de 8 semanas de protocolo expressos em média \pm EPM nos grupos C (n=5), S (n=6), F (n=9), FS (n=6).

4.4. Componentes do SRA

4.4.1. Atividade da Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA)

Os resultados da atividade da ECA estão ilustrados na Figura 15. Ao observamos a atividade no tecido renal direito (RD), o valor detectado para o grupo S (4.5 ± 0.57 mU/mg prot) apresenta um aumento em relação ao C (2.4 ± 0.22 mU/mg prot). No coração não foi observado diferença significativa entre os grupos.

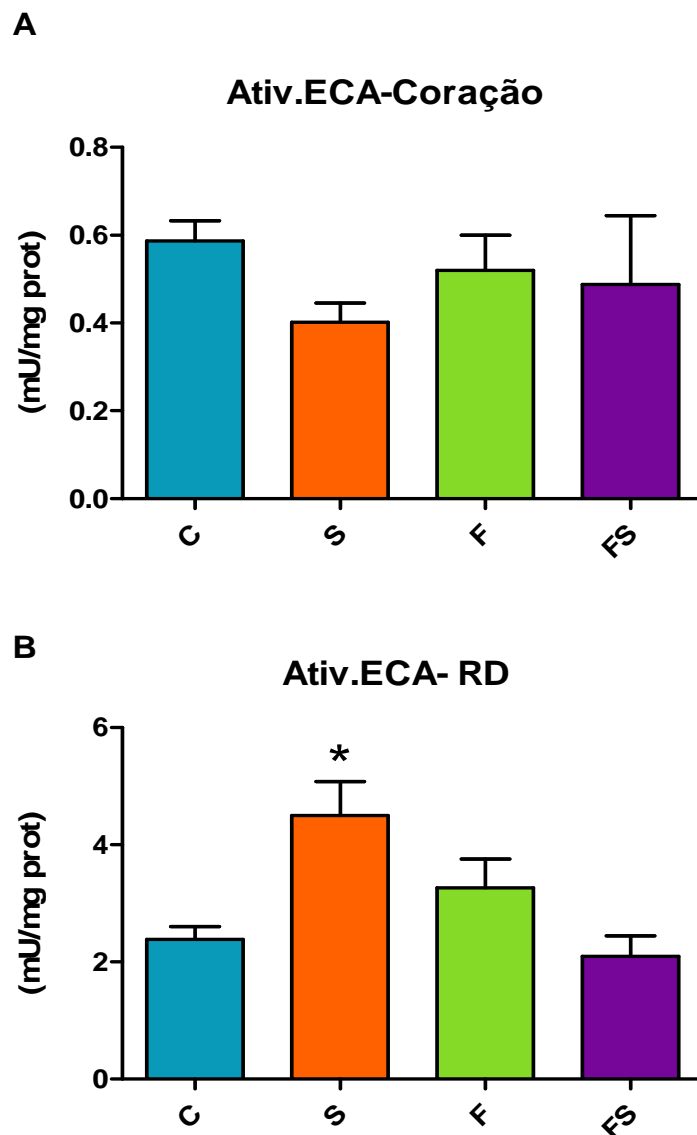


Figura 15: Quantificação da atividade da ECA. A: Atividade da ECA no coração. **B:** Atividade da ECA no Rim Direito (RD). Os dados são apresentados em média \pm EPM. Grupos: C (n=13), S (n=9), F (n=6), FS(n=4). * $p < 0.05$ vs C.

4.4.2. Quantificação das angiotensinas por Cromatografia Líquida de Alta Performance(HPLC) no homogenato do coração e rim direito

A quantificação das angiotensinas por HPLC mostrou alterações nos níveis desse peptídeo nos tecidos dos grupos tratados. No coração, a Ang 1-7 está significativamente reduzida no grupo FS em relação aos grupos C, S e F, enquanto a concentração de Ang I foi menor no grupo S e apresentou-se aumentada nos grupos tratados com F. Este aumento significativo dos grupos F e FS foi observado também na quantificação de Ang II (Figura 16).

Assim como no coração, no rim direito, os grupos F e FS apresentaram aumento expressivo da concentração das angiotensinas I e II em relação aos grupos C e S (Figura 16). Já na análise da Ang 1-7 nesse mesmo tecido, foi observado que todos os grupos tratados apresentaram aumento significativo em relação ao C. Cabe ressaltar que os grupos S e FS apresentaram uma quantidade de Ang 1-7 expressivamente maior do que F (figura 16).

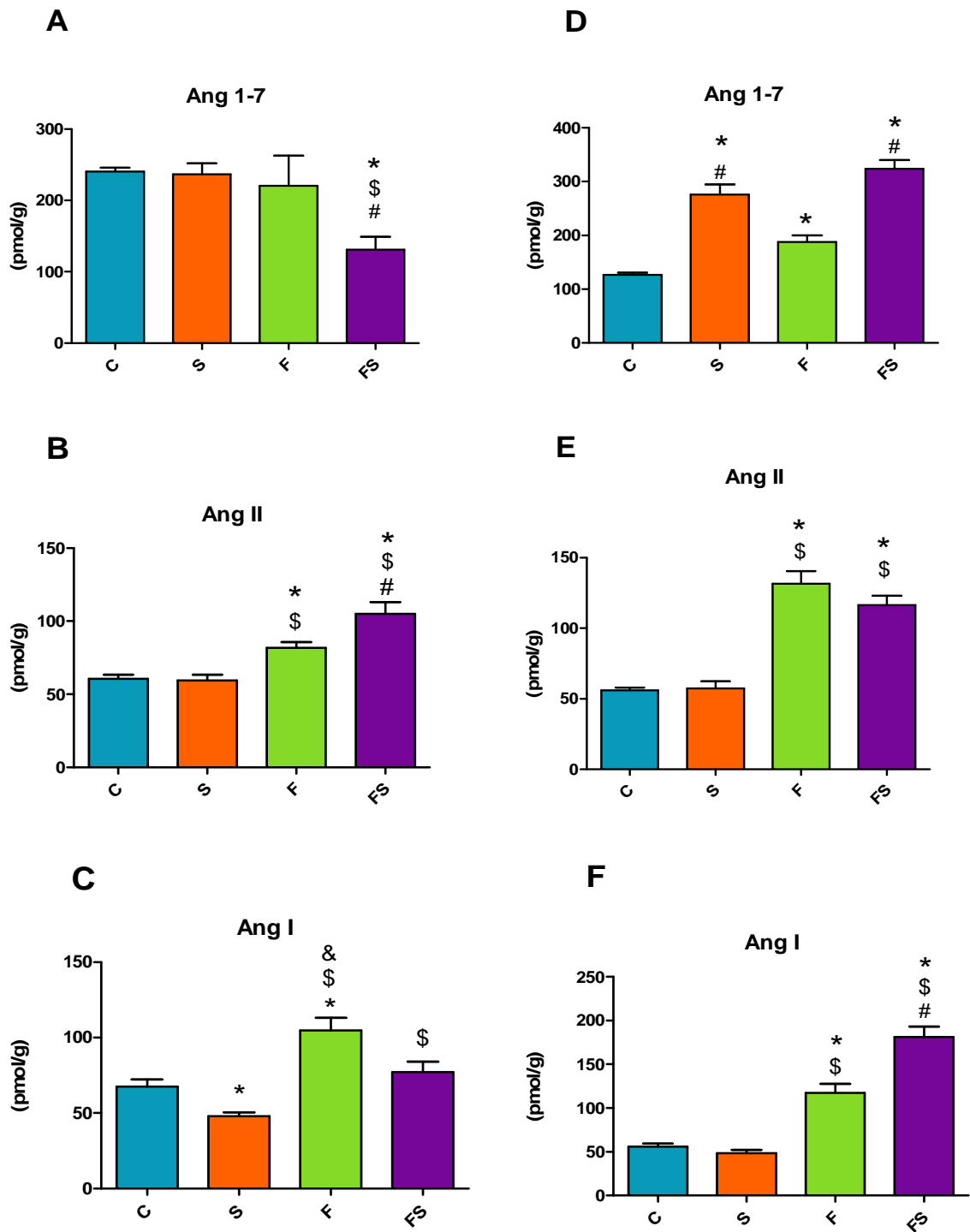


Figura 16: Quantificação dos níveis das Angiotensinas no homogenato de coração e rim direito obtidos ao final do protocolo dos animais dos diferentes grupos de estudo. **A.** Ang1-7 do coração; **B.** Ang 1-7 do rim direito; **C.** Ang II do coração; **D.** Ang II do rim direito; **E.** Ang I do coração; **F.** Ang I do rim direito. Valores expressos em média \pm EPM nos grupos C=Controle (n=10), S=Sal 2% (n=10), F=Frutose (n=5), FS=Frutose e Sal 2% (n=6).

5.0. SUMÁRIO DE RESULTADOS

Nos quadros abaixo sumarizamos os resultados obtidos dos animais dos grupos tratados ao final do protocolo experimental.

Quadro 1: Sumário dos resultados metabólicos e bioquímicos dos 3 grupos experimentais comparados com os animais do grupo controle. (=) valores semelhantes vs C; (+) valores superiores vs C; (-) valores inferiores vs C.

	Grupo Sal	Grupo Frutose	Grupo Frutose e Sal
Peso inicial	=	=	=
Peso Final	-	=	-
Delta Peso	-	=	-
Gordura Retroperitoneal	-	+	-
Gordura Epididimal	=	+	+
Consumo Hídrico	+	+	+
Volume Urinário	+	+	+
Ingesta de Ração	-	-	-
Glicemia Basal	-	=	-
TTG	+	+	+
KITT	=	-	=
Colesterol Total	=	=	=
Triglicérides	=	+	=

Quadro 2: Sumário dos resultados da Função Cardiovascular dos 3 grupos experimentais comparados com os animais do grupo controle. (=) valores semelhantes vs C; (+) valores superiores vs C; (-) valores inferiores vs C.

	Grupo Sal	Grupo Frutose	Grupo Frutose e Sal
PAM	+	+	+
FC	-	=	=
VAR Freq.	=	=	=
BF abs.	=	=	=
AF abs.	=	=	=
BF (n.u)	=	=	=
AF (n.u)	=	=	=
SP PAS	=	=	=
BF PAS	=	=	=

Quadro 3: Sumário dos resultados dos componentes do Sistema Renina Angiotensina dos 3 grupos experimentais comparados com os animais do grupo controle. (=) valores semelhantes vs C; (+) valores superiores vs C; (-) valores inferiores vs C.

	Grupo Sal	Grupo Frutose	Grupo Frutose e Sal
Ativ. ECA(coração)	=	=	=
Ativ. ECA (rim direito)	+	=	=
Ang 1-7 (coração)	=	=	-
Ang II (coração)	=	+	+
Ang I (coração)	-	+	+
Ang1-7 (rim direito)	+	+	+
Ang II (rim direito)	=	+	+
Ang I (rim direito)	=	+	+

6. DISCUSSÃO

A incidência de doenças cardiovasculares e metabólicas no mundo atual é preocupante para as entidades governamentais pelo seu alto impacto econômico e social, por ocasionar um aumento da utilização dos serviços de saúde pública, aposentadorias e mortalidades precoces. Consequentemente, diversas investigações a respeito destas doenças tais como a síndrome metabólica estão sendo realizadas através de diferentes abordagens, visando não somente o tratamento, mas também novas práticas preventivas e melhor compreensão dessas doenças e suas interações com o meio. O principal objetivo do nosso estudo foi avaliarmos o efeito da sobrecarga salina de 2% na função cardiovascular e o papel do sistema renina angiotensina tecidual em animais induzidos a síndrome metabólica com a ingestão crônica de frutose.

O presente estudo confirma os resultados obtidos em trabalhos anteriores assim como de nosso grupo, onde a administração de frutose na água de beber por 8 semanas resultou em um quadro experimental semelhante à síndrome metabólica observada em humanos, tendo em vista ter sido capaz de promover alterações metabólicas como aumento significativo da massa adiposa, hipertrigliceridemia, resistência à insulina, e alterações cardiovasculares como elevação da pressão arterial e aumento na variabilidade da PA (DAI & MCNEILL, 1995; SUZUKI *et al.*, 1997; TEFF *et al.*, 2004; FARAH, V. *et al.*, 2006; CUNHA *et al.*, 2007; BRITO *et al.*, 2008; SENADOR *et al.*, 2012).

A maioria dos estudos que utilizam a ingestão de frutose como modelo experimental realiza o tratamento ou já na fase adulta dos animais, ou avaliam os efeitos da frutose na prole de mães tratadas (IYER & KATOVICH, 1996; ELLIOTT *et al.*, 2002; BRITO *et al.*, 2008; REGNAULT *et al.*, 2013; O'SULLIVAN T *et al.*, 2014). Importante salientar que a sobrecarga de frutose deste trabalho iniciou-se a partir do desmame e seguiu até a fase adulta. Dessa forma, permitimos que o contato com a frutose aconteça na fase de grande crescimento e desenvolvimento dos animais, assemelhando-se a realidade da ingestão de frutose desde a fase infantil até a adulta nos seres humanos.

No estudo realizado, demonstramos que a frutose aumentou os depósitos de gordura retroperitoneal e epididimal, sem alterar o ganho de peso corporal ao final do protocolo. Esses resultados corroboram com resultados anteriores em modelos experimentais (FARAH, V. *et al.*, 2006; FARAH *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2011; DE ANGELIS *et al.*, 2012; ARAUJO, 2015). Dados recentes de Morris *et al.* (2012) mostraram um aumento na gordura corporal em camundongos que ingeriram frutose durante o período de inatividade deles, sugerindo uma correlação positiva entre o período da ingestão de frutose e o aumento da adiposidade. Este aumento de adiposidade pode ser decorrente de uma resistência a leptina através da ingestão de frutose, e da fosforilação deste monossacarídeo no fígado, onde produz glicerol-3-fosfato, atuando como substrato para síntese de novos triglicérides (BROWN *et al.*, 2008; BURSAC *et al.*, 2013; BURSAC *et al.*, 2014). Já os grupos tratados com sal apresentam diminuição do peso corporal final. Esta perda de peso induzida decorrente do tratamento com sal já foi observada na literatura (PLETINCK *et al.*, 2010; CRUZ *et al.*, 2011). Interessante destacar que a gordura retroabdominal do grupo Sal encontra-se diminuída, podendo em parte justificar o menor ganho de peso observado nestes animais. Esta redução da gordura nesse grupo pode ser oriunda ou da menor ingestão de ração observada nos animais tratados com sal, e/ou do fato de que este grupo apresentou um aumento significativo na concentração de angiotensina 1-7 tecidual. Marcus *et al.* (2013) ao estudar modelo de síndrome metabólica observou que o tratamento crônico de Ang1-7 reduziu o ganho corporal e uma atenuação da formação de adipócitos nos animais (SANTOS *et al.*, 2005). Assim sendo, a adição de sal no tratamento de frutose foi capaz de impedir o aumento da massa adiposa observada no grupo frutose, mantendo-se similar a encontrada no grupo controle.

6.1. Avaliação metabólica

Os animais dos grupos tratados com frutose e/ou sal apresentaram diminuição similar no consumo de ração, um aumento da ingestão hídrica e de excreção urinária. Esses dados corroboram com trabalhos anteriores que mostram que a ingestão de frutose é acompanhada pela diminuição da ingestão hídrica. O

aumento do consumo hídrico e excreção urinária no grupo com sal era esperado como o observado em estudos com seres humanos e ratos (SANDERS *et al.*, 2005; FRISOLI *et al.*, 2012; ARAUJO, 2015). Este aumento da ingesta hídrica e da excreção urinária pode ser decorrente dos mecanismos de regulação da homeostasia do organismo. A alta ingestão de sal e/ou frutose podem aumentar a osmolaridade sanguínea, estimulando o centro da sede e modificando a liberação do hormônio antidiurético (ADH) afim de auxiliar na eliminação ou o equilíbrio da concentração destes componentes no organismo (COLEMAN & GUYTON, 1969; GUYTON *et al.*, 1972; COLEMAN & GUYTON, 1975; GUYTON *et al.*, 1980).

A ingestão de frutose determinou também intolerância à glicose e um aumento da resistência à insulina como já verificado por outros autores inclusive em trabalhos de nosso grupo (HWANG *et al.*, 1987; BASCIANO *et al.*, 2005; FARAH, V. *et al.*, 2006; CUNHA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2011; DE ANGELIS *et al.*, 2012; ARAUJO, 2014). Os mecanismos que ligam a frutose e as alterações observadas não são claros, entretanto supõe-se que um dos mecanismos envolvidos possa ser o acúmulo de gorduras no organismo, levando ao desenvolvimento de obesidade, vinculada então aos riscos da SM onde são observados alterações da glicose e insulina (TEFF *et al.*, 2004; JOHNSON *et al.*, 2007).

Diferentemente do estudo anterior realizado com sal a 1%, a concentração à 2% de sal na água de beber foi capaz de reduzir a glicemia basal e provocar intolerância à glicose. Iwaoka *et al.* (1988), ao observar humanos com uma dieta hipersódica também relatou diminuição da glicemia de jejum acompanhado de uma queda da curva glicêmica (IWAOKA *et al.*, 1988). Uma redução da resposta a glicemia foi observada também em teste de tolerância à glicose em seres humanos hipertensos com sobrecarga salina (FRISOLI *et al.*, 2012). Estudos mostram uma relação entre o sal e os mecanismos de captação e utilização da glicose, principalmente relacionados com a insulina, entretanto, a literatura apresenta resultados contraditórios a respeito (SHARMA *et al.*, 1991).

Ao adicionarmos o sal na ingesta crônica de frutose no grupo FS, observou-se uma queda da glicemia basal e um aumento expressivo da intolerância à glicose sem alteração do teste de tolerância a insulina. Diferentemente do observado em nosso trabalho, Huang (2006) observou aumento da concentração de glicose e de

insulina plasmática em camundongos tratados com frutose acrescido de sal na dieta. Tal discordância pode ser decorrente das diferenças da administração dos fatores de risco, assim como a espécie estudada e o tempo do protocolo experimental. Sendo assim, estes resultados mostram que a associação de fato promove um quadro clínico diferenciado dos fatores isolados.

Quanto ao perfil lipídico dos animais, o tratamento com frutose resultou em aumento nos triglicérides em comparação com os grupos C e S. Esses resultados confirmam dados anteriores que sugerem que a frutose é mais lipogênica do que a glicose, causando aumento dos níveis circulantes de triglicérides (HALLFRISCH, 1990; MORRIS *et al.*, 2012), enquanto que, o acréscimo de sal na dieta não modificou os níveis observados. Interessante observar que no grupo FS, a frutose contida nessa associação, não foi suficiente para aumentar o nível de triglicérides, trazendo indícios de que nessa situação o sal interfere na formação desta molécula. Tais resultados, embora não inéditos quando analisados no grupo frutose, foram de extrema importância para comprovarmos a eficiência dos nossos tratamentos, e assim caracterizarmos os nossos modelos experimentais. De fato, o tratamento crônico com frutose provoca expressivas alterações metabólicas e bioquímicas como, por exemplo, no perfil lipídico e glicêmico dos animais, e que a associação do sal altera alguns destes parâmetros.

6.2. Avaliação Hemodinâmica

Nossos resultados indicaram que tanto o consumo de frutose como o de sal determinou um aumento da pressão arterial (~15% de aumento), corroborando com dados da literatura. O aumento da pressão arterial tanto em humanos como em animais decorrente do consumo de frutose já está bem estabelecido, assim como em decorrência do sal (HOWE *et al.*, 1985; FARAH, V. *et al.*, 2006; JALAL *et al.*, 2010; MOSTARDA *et al.*, 2012; MARRERO *et al.*, 2014). Em contrapartida, um sinergismo na resposta pressórica ao integrar ambos os moduladores não foi observado no grupo FS. Esses dados estão de acordo com dados anteriores do nosso laboratório onde foi mostrado que a adição de sal de 1% na dieta com frutose não foi capaz de potencializar o efeito pressórico desses dois moduladores. Uma possível explicação

para esse fato pode ser que o mecanismo da gênese do aumento de pressão arterial nesses dois tratamentos seja diferente.

De fato, existem evidências onde o aumento da pressão arterial com a sobrecarga de frutose seja mediado por alterações do controle autonômico cardíaco através de um aumento da atividade simpática, e prejuízo da atividade parassimpática e ativação do SRA (VERMA *et al.*, 1996; VERMA *et al.*, 1999; FARAH, V. *et al.*, 2006; FARAH *et al.*, 2007; BRITO *et al.*, 2008; MORAES-SILVA *et al.*, 2013), enquanto que, no tratamento de sal encontrou-se uma supressão do SRA e modificações na formação de óxido nítrico e de fator transformador de crescimento do tipo β (TGF- β) (BECH *et al.*, 1998; IMIG *et al.*, 1999; YING & SANDERS, 1999).

Os mecanismos pelos quais a frutose é capaz de aumentar a pressão arterial não estão totalmente esclarecidos. Existem evidências sugerindo aumento da atividade do sistema nervoso simpático (HALLFRISCH *et al.*, 1983; VERMA *et al.*, 1999), aumento dos níveis de catecolaminas circulantes (ROSEN *et al.*, 1997) e um aumento da atividade do SRA e, em especial, dos níveis circulantes de Ang II (KOBAYASHI *et al.*, 1993; TRAN *et al.*, 2009a; TRAN *et al.*, 2009b). De fato, os resultados do presente trabalho encontraram aumento da concentração de componentes do SRA, o que sugere uma importante participação desse sistema na gênese da hipertensão observada nesses animais.

No grupo frutose, não foram observadas diferenças na atividade da ECA tecidual (coração e rim direito), apesar da concentração de Ang I aumentada, e de um aumento significativo da Ang II. Assim sendo, nossos resultados corroboram com a literatura onde foi observado um aumento da Ang II induzida pelo consumo de frutose (SANCHEZ-LOZADA *et al.*, 2007). Dessa forma, nossos dados sugerem uma importante participação do SRA na gênese da hipertensão arterial induzida pela frutose como o observado em outros modelos clínicos e experimentais de hipertensão, inclusive na síndrome metabólica experimental (KOBAYASHI *et al.*, 1993; NAVARRO-CID *et al.*, 1996; FARAH *et al.*, 2007; JESSUP *et al.*, 2008; VARAGIC *et al.*, 2008; DRENJANCEVIC-PERIC *et al.*, 2011; DE ANGELIS *et al.*, 2012). Estudos observaram um aumento da reatividade da Ang II em células mesangiais com alta concentração de glicose, e também nos ratos Zucker e homens obesos (SINGH *et al.*, 2003; STEPP *et al.*, 2007).

O aumento da concentração da angiotensina II tanto no rim como no coração do grupo F, sem um aumento da atividade da ECA pode ser decorrente de sua formação por via independente desta enzima, a saber tonina, quimase, elastase, entre outras. Além da formação clássica da Ang I através da renina, estudos identificaram aumento de Ang I e II à partir da angiotensina 1-12 (Ang1-12) (JESSUP *et al.*, 2008). Nagata *et al.* (2006), observou um aumento da expressão de Ang-(1-12) em cardiomiócitos de ratos espontaneamente hipertensos associado a um aumento da Ang II e um aumento da expressão de quimase na hipertrofia cardíaca destes animais (NAGATA *et al.*, 2006; JESSUP *et al.*, 2008; AHMAD *et al.*, 2011b; AHMAD *et al.*, 2013). A quimase é a principal enzima responsável por sintetizar Ang II no coração humano além da ECA, estando envolvida também no remodelamento e dano tecidual durante falha do coração (TAKAI *et al.*, 2010; ZABLOCKI & SADOSHIMA, 2011). Tais informações sugerem que em situações de estresse cardíaco crônico, a quimase e a Ang 1-12 possam estar envolvidas na formação de Ang II independente da ECA.

Com relação ao grupo tratado com sal, houve uma tendência de diminuição da atividade da ECA, refletindo em uma redução da concentração de Ang I no coração, sem apresentar alterações na concentração de Ang 1-7 e II neste órgão. Entretanto, ao observarmos o rim do grupo S, observamos um aumento significativo da atividade da ECA e um expressivo aumento da concentração de Ang 1-7, sem interferir nas concentrações de Ang I e II em relação ao grupo controle. Este dado é muito interessante por indicar um efeito inibitório do sal na geração de Ang II e um estímulo da formação do peptídeo vasodilatador (Ang1-7) para regulação pressórica.

Tais resultados indicam que o SRA apresentam diferentes atividades e concentrações dos seus componentes de acordo com o local de formação e/ou necessidade, como descrito na literatura. A distinção entre SRA circulatório e SRA tecidual permite compreender por exemplo, por que a síntese de Ang II e, provavelmente, de Ang-(1-7) continue mesmo na ausência de Ang I circulante, possibilitando seus efeitos autócrinos e parácrinos (Brewster e Perazella, 2004). Tal consideração origina novas questões, incluindo os possíveis efeitos dessa existência local na regulação cardiovascular.

De fato, estudos mostram uma ação inibitória do sal em relação à renina, o que provocaria a redução da formação de Ang I como observado no trabalho de Meng (1995) que descreveu uma redução da concentração de Ang I sem alterar a concentração de Ang II em ratos tratados com dieta hipersódica (NISHIMURA *et al.*, 1997). Ao estudar ratos tratados com sal 1%, nosso grupo mostrou um aumento da atividade da ECA circulante no grupo, indicando uma possível compensação do aumento da ECA em decorrência à inibição da renina (ARAUJO, 2015). O favorecimento da formação de Ang1-7 em relação a Ang II em determinadas situações ou quadros clínicos, pode provocar uma ação vasodilatadora (RICE *et al.*, 2004). Sendo assim, nossos resultados indicam um desvio da cascata do SRA para formar Ang 1-7. Essa formação da Ang 1-7 neste grupo pode ocorrer através da NEP, onde utiliza a Ang I como principal substrato (RICE *et al.*, 2004). Sendo assim, sugere-se que a baixa presença de Ang I no rim destes animais possa ser respondida pela transformação direta da Ang I em Ang1-7 através da enzima NEP, não favorecendo também a formação de Ang II. Tendo em vista não existirem trabalhos na literatura que relacionem diretamente estes efeitos, torna-se difícil qualquer afirmação.

Nossos resultados, então, sugerem um aumento da pressão arterial após o tratamento com sal, e que o aumento da Ang 1-7 neste grupo seja um mecanismo protetor, afim de amenizar os efeitos hipertensivos decorrentes da alta concentração do sal no organismo.

Ao adicionarmos a sobrecarga salina nos animais com modelo de síndrome metabólica induzida pela frutose, observa-se um quadro diferenciado. A atividade da ECA não foi diferente no coração, assim como a concentração da Ang I. Em contrapartida, a Ang II encontra-se significativamente aumentada enquanto a Ang1-7 está significativamente reduzida neste tecido. Novamente nossos resultados indicam que os animais tratados com frutose apresentam uma preferência na formação de Ang II através de vias independentes da ECA, podendo utilizar-se de enzimas como a tonina, catepsina G e a quimase (GRISE *et al.*, 1981; BORGES *et al.*, 2003; DAMASCENO *et al.*, 2013; UEHARA *et al.*, 2013). Vale ressaltar que mesmo que a Ang1-7 esteja reduzida do grupo FS em relação aos outros grupos experimentais, os valores observados aproximam-se das concentrações formadas de Ang II.

Assim como no coração, a atividade da ECA no rim nos animais que receberam frutose e sal não foi diferente em relação ao grupo controle. Entretanto, foi observado um aumento significativo das concentrações de Ang I, II e 1-7. Interessante observar que o aumento da concentração de angiotensinas neste grupo foi maior do que o observado nos grupos controle, sal e do grupo frutose, possivelmente estimulado em decorrência da adição do sal no tratamento. Levando-se em conta o aumento deste peptídeos sem aumentar a atividade da ECA, estes dados sugerem uma formação das angiotensinas por vias alternativas independentes da ECA, assim como observado no grupo F. Araujo et al (2015) sugeriu que a associação da frutose e sal 1% por 10 dias determinou um aumento de pressão arterial ativado por outro mecanismo que não a ativação do sistema renina angiotensina. Em contrapartida, nossos estudos sugerem que o aumento da PA no grupo FS possa estar vinculado com a ativação do SRA aonde principalmente no rim, a adição de sal no modelo de síndrome metabólica promoveu uma potencialização do SRA, favorecendo a uma maior formação peptídeos vasoativos Ang II e Ang 1-7, unindo o efeito hipertensivo da ingestão de frutose, e a tentativa do SRA em amenizar o estresse vascular oriundo da sobrecarga salina.

Assim como observado em estudos anteriores, a frutose não foi capaz de modificar a frequência cardíaca. Curiosamente uma redução significativa foi observada no grupo sal em relação ao grupo controle. Este resultado se assemelha com a diminuição da FC observado em ratos com dieta de 8% de sal (MENG *et al.*, 1995), mas contradiz com estudos que mostram ou aumento da frequência cardíaca (CRUZ *et al.*, 2011), ou similaridade aos outros grupos experimentais estudados (AHMAD *et al.*, 2011a; ARAUJO, 2015). Uma possibilidade para explicar essa redução da frequência cardíaca observada nos animais com sobrecarga salina pode ser um efeito decorrente do aumento da Ang1-7 tecidual observada nestes animais um peptídeo vasodilatador que contrapõe as ações da Ang II. A Ang 1-7 possui diversos efeitos no organismo tais como, natriurese e redução da proliferação celular (MOON, 2013). Já a adição de sal no tratamento com frutose não foi capaz de modificar a frequência cardíaca desses animais.

O aumento da pressão arterial induzido tanto pelo tratamento com frutose como o de sal, poderia ser explicado em parte também pelo aumento da atividade do sistema nervoso simpático (HALLFRISCH *et al.*, 1983; ROSEN *et al.*, 1997; VERMA

et al., 1999). No presente projeto avaliamos a modulação autonômica cardiovascular pela análise espectral no domínio do tempo e da frequência. Assim como em trabalhos anteriores, não observamos diferença na variabilidade da frequência cardíaca tanto nos animais que receberam frutose assim como nos que receberam sal (FARAH *et al.*, 2007). Entretanto, diferente do esperado, não foi possível observar aumento da variabilidade da pressão arterial associada ao aumento da pressão arterial em nenhum dos grupos experimentais. De fato, esses resultados diferem de estudos anteriores com tratamento de frutose e sal à 1%, já que observou-se aumento da modulação simpática vascular em decorrência da sobrecarga de frutose (FARAH, V. *et al.*, 2006; MADERO *et al.*, 2011; ARAUJO, 2015). Assim como foi observado no trabalho de De Angelis (2012), houve um aumento na modulação simpática vascular e diminuição do barorreflexo antes mesmo de induzir alterações metabólicas, sugerindo uma importante participação do sistema nervoso simpático induzida pelo consumo de frutose (DE ANGELIS *et al.*, 2012). Um estudo realizado por Gavras & Gavras (2012) comentou que o íon sódio promoveria um aumento da atividade simpática através a maior atuação de receptores simpato-excitatórios, sugerindo uma importante participação do SNS na gênese da hipertensão induzida pelo consumo de sódio. Dessa forma, sugere-se um efeito de contrabalanço entre os fatores de risco e seus efeitos cardiovasculares e metabólicos.

7. CONCLUSÃO

O objetivo do nosso trabalho foi avaliar o efeito da sobrecarga salina de 2% na função cardiovascular em modelo experimental de síndrome metabólica induzida por frutose, e investigar o papel do sistema renina angiotensina tecidual. Nossos resultados mostraram que o consumo isolado de frutose ou sal induziu à alterações corporais, metabólicas e hemodinâmicas distintas, mas que ambas favorecem ao aparecimento da hipertensão arterial. De forma geral, os resultados observados com a associação destes 2 moduladores de risco cardiovascular, frutose e sal, não levaram a um sinergismo das alterações observadas, e sim a uma combinação de disfunções, observados na composição corporal, pressão arterial, e ativação do SRA nos grupos estudados em relação aos animais C. Sobretudo nosso estudo demonstrou a importância das vias paralelas na formação de Ang II e a elevação dos níveis de Ang 1-7 tentando contrapor as ações da Ang II, sugerindo ativação de ACE2.

Dessa forma, os resultados do presente estudo demonstram que a combinação de fatores de risco, frutose e sal, promoveu um quadro de disfunções nos parâmetros metabólicos e cardiovasculares, e que o SRA apresenta um importante papel nos mecanismos de controle da pressão arterial. Sabendo-se que os mecanismos envolvidos no controle da pressão arterial podem ser diferentes na sobrecarga de sal e na de frutose, e portanto, que a associação desses dois fatores acarreta alterações diferenciadas nos ajustes cardiovasculares, esse estudo mostra a necessidade do desenvolvimento de mais estudos que possam contribuir na busca de novos tratamentos e ações preventivas das doenças vinculadas a estes fatores de risco.

8. REFERÊNCIAS

(IDF), I. D. F. The IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome. **International Diabetes Federation Brussels, Belgium**, 2006.

(WHO), W. H. O. Burden: mortality, morbidity and risk factors. Chapter 1, 2011.

World Health Report 2013. <http://www.who.int/whr/2013/report/en/>. 2013.

ABIA, A. B. D. I. D. A.-. Cenário do consumo de sódio no Brasil. <http://www.abia.org.br/sodio/consumobrasil.asp>. 2014: Estudo elaborado com base em dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) p. 2013.

AHMAD, S., *et al.* Chymase-dependent generation of angiotensin II from angiotensin-(1-12) in human atrial tissue. **PLoS One**, v.6, n.12, p.e28501, 2011a.

AHMAD, S., *et al.* Uptake and metabolism of the novel peptide angiotensin-(1-12) by neonatal cardiac myocytes. **PLoS One**, v.6, n.1, p.e15759, 2011b.

AHMAD, S., *et al.* Chymase mediates angiotensin-(1-12) metabolism in normal human hearts. **J Am Soc Hypertens**, v.7, n.2, p.128-36. Mar-Apr, 2013.

ALMEIDA, W.S., *et al.* Escherichia coli lipopolysaccharide inhibits renin activity in human mesangial cells. **Kidney Int**, v.69, n.6, p.974-80. Mar, 2006.

ARAUJO, I., *et al.* Early developmental exposure of high fructose intake in rats with salt stimulation cause cardiac damage **European Journal of Nutrition**, 2015.

BARREIROS, R. C., BOSSOLAN, G., TRINDADE, C.E.P. . Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. **Rev Nutr, Campinas**, v.3, n.18, 2005.

BASCIANO, H., *et al.* Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. **Nutr Metab (Lond)**, v.2, n.1, p.5. Feb 21, 2005.

BECARI, C., *et al.* Alternative pathways for angiotensin II generation in the cardiovascular system. **Braz J Med Biol Res**, v.44, n.9, p.914-9. Sep, 2011.

BECH, J. N., *et al.* Dietary sodium affects systemic and renal hemodynamic response to NO inhibition in healthy humans. **Am J Physiol**, v.274, n.5 Pt 2, p.F914-23. May, 1998.

BELL, R. C., *et al.* Fructose feeding in the suckling-weaning transition in rats: effects on hyperlipidemia in adulthood. **Arch Physiol Biochem**, v.111, n.1, p.17-22. Feb, 2003.

BONORA, E., *et al.* Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J Clin Endocrinol Metab**, v.68, n.2, p.374-8. Feb, 1989.

BORGES, J. C., *et al.* Tonin in rat heart with experimental hypertrophy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.284, n.6, p.H2263-8. Jun, 2003.

BOROVIKOVA, L. V., *et al.* Role of vagus nerve signaling in CNI-1493-mediated suppression of acute inflammation. **Auton Neurosci**, v.85, n.1-3, p.141-7. Dec 20, 2000.

BREMER, A. A. & R. H. LUSTIG. Effects of sugar-sweetened beverages on children. **Pediatr Ann**, v.41, n.1, p.26-30. Jan, 2012.

BREMER, A. A., *et al.* Toward a unifying hypothesis of metabolic syndrome. **Pediatrics**, v.129, n.3, p.557-70. Mar, 2012.

BREWSTER, U.C., PERAZELLA, M.A. Acute interstitial nephritis associated with atazanavir, a new protease inhibitor. **Am J Kidney Dis**, v.44, n.5, p.81-4. Nov; 2004.

BRITO, J. O., *et al.* Parasympathetic dysfunction is associated with insulin resistance in fructose-fed female rats. **Braz J Med Biol Res**, v.41, n.9, p.804-8. Sep, 2008.

BROWN, C. M., *et al.* Sugary drinks in the pathogenesis of obesity and cardiovascular diseases. **Int J Obes (Lond)**, v.32 Suppl 6, p.S28-34. Dec, 2008.

BURSAC, B. N., *et al.* Fructose consumption enhances glucocorticoid action in rat visceral adipose tissue. **J Nutr Biochem**, v.24, n.6, p.1166-72. Jun, 2013.

BURSAC, B. N., *et al.* High-fructose diet leads to visceral adiposity and hypothalamic leptin resistance in male rats--do glucocorticoids play a role? **J Nutr Biochem**, v.25, n.4, p.446-55. Apr, 2014.

CARDIOLOGIA, S. S. B. D. I Diretriz Brasileira de diagnóstico e tratamento da Síndrome Metabólica. **Arq Bras Cardiol.** , v.Apr. ;84(4):28, p., 2005.

CARVALHO, C. R., *et al.* Fructose alters adiponectin, haptoglobin and angiotensinogen gene expression in 3T3-L1 adipocytes. **Nutr Res**, v.30, n.9, p.644-9. Sep, 2010.

CHOLEWA, B. C. & D. L. MATTSON. Role of the renin-angiotensin system during alterations of sodium intake in conscious mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.281, n.3, p.R987-93. Sep, 2001.

COLEMAN, T. G. & A. C. GUYTON. Hypertension caused by salt loading in the dog. 3. Onset transients of cardiac output and other circulatory variables. **Circ Res**, v.25, n.2, p.153-60. Aug, 1969.

COLEMAN, T. G. & A. C. GUYTON. The pressor role of angiotensin in salt deprivation and renal hypertension in rats. **Clin Sci Mol Med Suppl**, v.2, p.45s-48s. Jun, 1975.

COWLEY, A. W., JR. & R. J. ROMAN. The role of the kidney in hypertension. **JAMA**, v.275, n.20, p.1581-9. May 22-29, 1996.

CRUZ, A., *et al.* Effects of clofibrate on salt loading-induced hypertension in rats. **J Biomed Biotechnol**, v.2011, p.469481, 2011.

CUNHA, T. S., *et al.* Relationship between renal and cardiovascular changes in a murine model of glucose intolerance. **Regul Pept**, v.139, n.1-3, p.1-4. Mar 1, 2007.

DAI, S. & J. H. MCNEILL. Fructose-induced hypertension in rats is concentration- and duration-dependent. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v.33, n.2, p.101-7. Apr, 1995.

DAMASCENO, D. D., *et al.* Cardiovascular and electrocardiographic parameters after tonin administration in Wistar rats. **Regul Pept**, v.181, p.30-6. Feb 10, 2013.

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, n.8, p.R950-7. Apr 15, 2012.

DE ANGELIS, K., *et al.* Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. **J Appl Physiol (1985)**, v.96, n.6, p.2174-8. Jun, 2004.

DE CARVALHO VIDIGAL, F., *et al.* Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults: a systematic review. **BMC Public Health**, v.13, p.1198, 2013.

DE MOURA, R. F., *et al.* Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. **Br J Nutr**, v.101, n.8, p.1178-84. Apr, 2009.

DORNAS, W. C., *et al.* Salt overload in fructose-fed insulin-resistant rats decreases paraoxonase-1 activity. **Nutr Metab (Lond)**, v.9, n.1, p.63, 2012.

DRENJANCEVIC-PERIC, I., *et al.* High-salt diet and hypertension: focus on the renin-angiotensin system. **Kidney Blood Press Res**, v.34, n.1, p.1-11, 2011.

ECKEL, R. H., *et al.* The metabolic syndrome. **Lancet**, v.365, n.9468, p.1415-28. Apr 16-22, 2005.

ELLIOTT, S. S., *et al.* Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. **Am J Clin Nutr**, v.76, n.5, p.911-22. Nov, 2002.

EWING, D. J., *et al.* Assessment of cardiovascular effects in diabetic autonomic neuropathy and prognostic implications. **Ann Intern Med**, v.92, n.2 Pt 2, p.308-11. Feb, 1980.

FARAH, V., *et al.* Nocturnal hypertension in mice consuming a high fructose diet. **Auton Neurosci**, v.130, n.1-2, p.41-50. Dec 30, 2006.

FARAH, V., *et al.* Genetic and dietary interactions: role of angiotensin AT1a receptors in response to a high-fructose diet. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.293, n.2, p.H1083-9. Aug, 2007.

FARAH VDE, M., *et al.* Autonomic modulation of arterial pressure and heart rate variability in hypertensive diabetic rats. **Clinics (Sao Paulo)**, v.62, n.4, p.477-82. Aug, 2007.

FARAH, V. M., *et al.* Stress cardiovascular/autonomic interactions in mice. **Physiol Behav**, v.89, n.4, p.569-75. Nov 30, 2006.

FERREIRA, S. S. Frutose e a Síndrome Metabólica. (monografia). Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Licenciatura em Ciências da Nutrição, Universidade do Porto, 2010. 51 p.

FONTELES, M. C. F., L. Uroguanylin and Guanylin: endocrine link between the intestine and kidney for regulation of sodium balance. In: S. a. G. S. (Org.) (Ed.). Seldin and Giebisch's. (Org.). The Kidney: Physiology and Pathophysiology: Elsevier, v.1, 2007. Uroguanylin and Guanylin: endocrine link between the intestine and kidney for regulation of sodium balance, p.463-478. (Seldin and Giebisch's)

FRISOLI, T. M., *et al.* Salt and hypertension: is salt dietary reduction worth the effort? **Am J Med**, v.125, n.5, p.433-9. May, 2012.

GAVRAS, I. & H. GAVRAS. 'Volume-expanded' hypertension: the effect of fluid overload and the role of the sympathetic nervous system in salt-dependent hypertension. **J Hypertens**, v.30, n.4, p.655-9. Apr, 2012.

GIRMAN, C. J., *et al.* The metabolic syndrome and risk of major coronary events in the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) and the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS). **Am J Cardiol**, v.93, n.2, p.136-41. Jan 15, 2004.

GRASSI, G., *et al.* Sympathetic nervous system: role in hypertension and in chronic kidney disease. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v.21, n.1, p.46-51. Jan, 2012.

GRISE, C., *et al.* Formation of angiotensin II by tonin from partially purified human angiotensinogen. **Can J Biochem**, v.59, n.4, p.250-5. Apr, 1981.

GUIMARÃES, G. V., CIOLAC, E.G. Síndrome metabólica: abordagem do educador físico. **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo** v.14, n.4, p.659-70, 2004.

GUYTON, A. C., *et al.* Systems analysis of arterial pressure regulation and hypertension. **Ann Biomed Eng**, v.1, n.2, p.254-81. Dec, 1972.

GUYTON, A. C., *et al.* Salt balance and long-term blood pressure control. **Annu Rev Med**, v.31, p.15-27, 1980.

HAFFNER, S. M., *et al.* Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). **Diabetes**, v.41, n.6, p.715-22. Jun, 1992.

HALLFRISCH, J. Metabolic effects of dietary fructose. **FASEB J**, v.4, n.9, p.2652-60. Jun, 1990.

HALLFRISCH, J., *et al.* Effects of dietary fructose on plasma glucose and hormone responses in normal and hyperinsulinemic men. **J Nutr**, v.113, n.9, p.1819-26. Sep, 1983.

Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. **Eur Heart J**, v.17, n.3, p.354-81. Mar, 1996.

HELLSTROM, H. R. The altered homeostatic theory: A hypothesis proposed to be useful in understanding and preventing ischemic heart disease, hypertension, and diabetes--including reducing the risk of age and atherosclerosis. **Med Hypotheses**, v.68, n.2, p.415-33, 2007.

HORIUCHI, M., *et al.* Regulation of angiotensin II receptors beyond the classical pathway. **Clin Sci (Lond)**, v.123, n.4, p.193-203. Aug 1, 2012.

HOWE, P. R., *et al.* Influence of dietary sodium on blood pressure in baroreceptor-denervated rats. **J Hypertens**, v.3, n.5, p.457-60. Oct, 1985.

HUANG, D. Y., *et al.* Blunted hypertensive effect of combined fructose and high-salt diet in gene-targeted mice lacking functional serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.290, n.4, p.R935-44. Apr, 2006.

HWANG, I. S., *et al.* Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. **Hypertension**, v.10, n.5, p.512-6. Nov, 1987.

I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. Rev Soc Bras Hipert. 17(4) 2005.

IMIG, J. D., *et al.* Renal endosomes contain angiotensin peptides, converting enzyme, and AT(1A) receptors. **Am J Physiol**, v.277, n.2 Pt 2, p.F303-11. Aug, 1999.

INAGAMI, T. The renin-angiotensin system. **Essays Biochem**, v.28, p.147-64, 1994.

INTERSALT. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. Intersalt Cooperative Research Group. **BMJ**, v.297, n.6644, p.319-28. Jul 30, 1988.

IRIGOYEN, M. C. & E. M. KRIEGER. Baroreflex control of sympathetic activity in experimental hypertension. **Braz J Med Biol Res**, v.31, n.9, p.1213-20. Sep, 1998.

IRIGOYEN, M. C., *et al.* Exercise training improves baroreflex sensitivity associated with oxidative stress reduction in ovariectomized rats. **Hypertension**, v.46, n.4, p.998-1003. Oct, 2005.

IRIGOYEN, M. C. L., S. ; DE ANGELIS, K ; MICHELINI, L. C. . Fisiopatologia da hipertensão: O que avançamos? **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v.1, n.1, p.20-45, 2003.

ISOMAA, B., *et al.* Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. **Diabetes Care**, v.24, n.4, p.683-9. Apr, 2001.

IWAOKA, T., *et al.* The effect of low and high NaCl diets on oral glucose tolerance. **Klin Wochenschr**, v.66, n.16, p.724-8. Aug 15, 1988.

IYER, S. N. & M. J. KATOVICH. Fructose feeding in rats is not associated with sodium retention. **Am J Hypertens**, v.9, n.10 Pt 1, p.1018-23. Oct, 1996.

JALAL, D. I., *et al.* Increased fructose associates with elevated blood pressure. **J Am Soc Nephrol**, v.21, n.9, p.1543-9. Sep, 2010.

JESSUP, J. A., *et al.* Localization of the novel angiotensin peptide, angiotensin-(1-12), in heart and kidney of hypertensive and normotensive rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.294, n.6, p.H2614-8. Jun, 2008.

JOHNSON, R. J., *et al.* Subtle acquired renal injury as a mechanism of salt-sensitive hypertension. **N Engl J Med**, v.346, n.12, p.913-23. Mar 21, 2002.

JOHNSON, R. J., *et al.* Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. **Am J Clin Nutr**, v.86, n.4, p.899-906. Oct, 2007.

KANDA, H., *et al.* MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **J Clin Invest**, v.116, n.6, p.1494-505. Jun, 2006.

KIM, S. D. Measurement of the renin-angiotensin system in heart failure. **Biol Res Nurs**, v.1, n.3, p.210-26. Jan, 2000.

KLEIGER, R. E., *et al.* Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. **Am J Cardiol**, v.59, n.4, p.256-62. Feb 1, 1987.

KOBAYASHI, R., *et al.* Role of angiotensin II in high fructose-induced left ventricular hypertrophy in rats. **Hypertension**, v.21, n.6 Pt 2, p.1051-5. Jun, 1993.

KOBORI, H., *et al.* The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. **Pharmacol Rev**, v.59, n.3, p.251-87. Sep, 2007.

LA ROVERE, M. T., *et al.* Baroreflex sensitivity and heart-rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction. ATRAMI (Autonomic Tone and Reflexes After Myocardial Infarction) Investigators. **Lancet**, v.351, n.9101, p.478-84. Feb 14, 1998.

LAKKA, H. M., *et al.* The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. **JAMA**, v.288, n.21, p.2709-16. Dec 4, 2002.

LARAGH, J. H. A decade of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition. **Am J Med**, v.92, n.4B, p.3S-7S. Apr 27, 1992.

LOPES, H. F., *et al.* Hemodynamic and metabolic profile in offspring of malignant hypertensive parents. **Hypertension**, v.38, n.3 Pt 2, p.616-20. Sep, 2001.

MADERO, M., *et al.* Dietary fructose and hypertension. **Curr Hypertens Rep**, v.13, n.1, p.29-35. Feb, 2011.

MANCIA, G., *et al.* Sympathetic activity, blood pressure variability and end organ damage in hypertension. **J Hum Hypertens**, v.11 Suppl 1, p.S3-8. Aug, 1997.

MARCUS, Y., *et al.* Angiotensin 1-7 as means to prevent the metabolic syndrome: lessons from the fructose-fed rat model. **Diabetes**, v.62, n.4, p.1121-30. Apr, 2013.

MARRERO, N. M., *et al.* Salt intake of children and adolescents in South London: consumption levels and dietary sources. **Hypertension**, v.63, n.5, p.1026-32. May, 2014.

MENG, Q. C., *et al.* Effects of dietary salt on angiotensin peptides in kidney. **J Am Soc Nephrol**, v.6, n.4, p.1209-15. Oct, 1995.

METABÓLICA(ABESO), A. B. P. O. E. D. O. E. D. S. Diretrizes brasileiras de obesidade 2009/2010. v.3.ed. - Itapevi, SP : AC Farmacêutica, 2009.

MISRA, A., *et al.* Obesity, the metabolic syndrome, and type 2 diabetes in developing countries: role of dietary fats and oils. **J Am Coll Nutr**, v.29, n.3 Suppl, p.289S-301S. Jun, 2010.

MOON, J. Y. Recent Update of Renin-angiotensin-aldosterone System in the Pathogenesis of Hypertension. **Electrolyte Blood Press**, v.11, n.2, p.41-45. Dec, 2013.

MORAES-SILVA, I. C., *et al.* Preventive role of exercise training in autonomic, hemodynamic, and metabolic parameters in rats under high risk of metabolic syndrome development. **J Appl Physiol (1985)**, v.114, n.6, p.786-91. Mar 15, 2013.

MORRIS, M., *et al.* Timing of fructose intake: an important regulator of adiposity. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.39, n.1, p.57-62. Jan, 2012.

MOSTARDA, C., *et al.* Exercise training prevents diastolic dysfunction induced by metabolic syndrome in rats. **Clinics (Sao Paulo)**, v.67, n.7, p.815-20. Jul, 2012.

MOTTILLO, S., *et al.* The metabolic syndrome and cardiovascular risk a systematic review and meta-analysis. **J Am Coll Cardiol**, v.56, n.14, p.1113-32. Sep 28, 2010.

NAGATA, S., *et al.* Isolation and identification of proangiotensin-12, a possible component of the renin-angiotensin system. **Biochem Biophys Res Commun**, v.350, n.4, p.1026-31. Dec 1, 2006.

NAKAGAWA, T., *et al.* A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. **Am J Physiol Renal Physiol**, v.290, n.3, p.F625-31. Mar, 2006.

NAVAR, L. G. & L. M. HARRISON-BERNARD. Intrarenal angiotensin II augmentation in angiotensin II dependent hypertension. **Hypertens Res**, v.23, n.4, p.291-301. Jul, 2000.

NAVAR, L. G. & D. S. MAJID. Interactions between arterial pressure and sodium excretion. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v.5, n.1, p.64-71. Jan, 1996.

NAVARRO-CID, J., *et al.* Renal and vascular consequences of the chronic nitric oxide synthase inhibition. Effects of antihypertensive drugs. **Am J Hypertens**, v.9, n.11, p.1077-83. Nov, 1996.

NISHIMURA, M., *et al.* Sodium intake regulates renin gene expression differently in the hypothalamus and kidney of rats. **J Hypertens**, v.15, n.5, p.509-16. May, 1997.

O'SULLIVAN T, A., *et al.* Lower fructose intake may help protect against development of nonalcoholic Fatty liver in adolescents with obesity. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.58, n.5, p.624-31. May, 2014.

OLIVEIRA, R. M. S., *et al.* Influência do estado nutricional progresso sobre o desenvolvimento da síndrome metabólica em adultos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.92, p.107-112, 2009.

PAGANI, M., *et al.* Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variabilities as a marker of sympatho-vagal interaction in man and conscious dog. **Circ Res**, v.59, n.2, p.178-93. Aug, 1986.

PAGANI, M., *et al.* Spectral analysis of heart rate variability in the assessment of autonomic diabetic neuropathy. **J Auton Nerv Syst**, v.23, n.2, p.143-53. Aug, 1988.

PATEL, J., *et al.* Evaluation of the chronic complications of diabetes in a high fructose diet in rats. **Indian J Biochem Biophys**, v.46, n.1, p.66-72. Feb, 2009.

PAUL, M., *et al.* Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiol Rev**, v.86, n.3, p.747-803. Jul, 2006.

PERSSON, P. B. Renin: origin, secretion and synthesis. **J Physiol**, v.552, n.Pt 3, p.667-71. Nov 1, 2003.

PLETINCK, A., *et al.* Salt intake induces epithelial-to-mesenchymal transition of the peritoneal membrane in rats. **Nephrol Dial Transplant**, v.25, n.5, p.1688-96. May, 2010.

RAYSSIGUIER, Y., *et al.* High fructose consumption combined with low dietary magnesium intake may increase the incidence of the metabolic syndrome by inducing inflammation. **Magnes Res**, v.19, n.4, p.237-43. Dec, 2006.

REGNAULT, T. R., *et al.* Fructose, pregnancy and later life impacts. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.40, n.11, p.824-37. Nov, 2013.

RIBEIRO, A. G., *et al.* [The promotion of health and integrated prevention of risk factors for cardiovascular diseases]. **Cien Saude Colet**, v.17, n.1, p.7-17. Jan, 2012.

RICE, G. I., *et al.* Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. **Biochem J**, v.383, n.Pt 1, p.45-51. Oct 1, 2004.

ROMEO, G. R., *et al.* Metabolic syndrome, insulin resistance, and roles of inflammation--mechanisms and therapeutic targets. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.32, n.8, p.1771-6. Aug, 2012.

RONCHI, F.A., IRIGOYEN, M.C., CASARINI, D.E. Association of somatic and N-domain angiotensin-converting enzymes from Wistar rat tissue with renal dysfunction in diabetes mellitus. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v.8, n.1, p.34-41. Mar. 2007.

ROSEN, P., *et al.* Experimental benefit of moxonidine on glucose metabolism and insulin secretion in the fructose-fed rat. **J Hypertens Suppl**, v.15, n.1, p.S31-8. Jan, 1997.

SANCHEZ-LOZADA, L. G., *et al.* Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. **Am J Physiol Renal Physiol**, v.292, n.1, p.F423-9. Jan, 2007.

SANDERS, M. W., *et al.* High sodium intake increases blood pressure and alters renal function in intrauterine growth-retarded rats. **Hypertension**, v.46, n.1, p.71-5. Jul, 2005.

SANJULIANI, A. F., TORRES, M.R.S.G., PAULA, L.N., BASSAN, F.B. EIXO RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA: BASES FISIOLÓGICAS E FISIOPATOLÓGICAS. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v.10, n.3, p.20-30, 2011.

SANTOS, R. A., *et al.* Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. **Expert Opin Investig Drugs**, v.14, n.8, p.1019-31. Aug, 2005.

SCHNERMANN, J. Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. **Am J Physiol**, v.274, n.2 Pt 2, p.R263-79. Feb, 1998.

SENADOR, D., *et al.* Effects of restricted fructose access on body weight and blood pressure circadian rhythms. **Exp Diabetes Res**, v.2012, p.459087, 2012.

SHARMA, A. M., *et al.* Salt sensitivity in young normotensive subjects is associated with a hyperinsulinemic response to oral glucose. **J Hypertens**, v.9, n.4, p.329-35. Apr, 1991.

SHEHATA, M. F. Characterization of the epithelial sodium channel alpha subunit coding and non-coding transcripts and their corresponding mRNA expression levels in Dahl R versus S rat kidney cortex on normal and high salt diet. **Int Arch Med**, v.2, n.1, p.5, 2009.

SHINOZAKI, K., *et al.* Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in vascular dysfunction associated with insulin resistance. **Hypertension**, v.43, n.2, p.255-62. Feb, 2004.

SIEVENPIPER, J. L., *et al.* Effect of fructose on body weight in controlled feeding trials: a systematic review and meta-analysis. **Ann Intern Med**, v.156, n.4, p.291-304. Feb 21, 2012.

SILVA, E. D. S. D. Alterações morfológicas e fisiológicas no tecido adiposo branco verificadas na síndrome metabólica induzida por frutose. (monografia). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Curso de Nutrição, Universidade Presbiteriana Mackenzie, 2013. 36 p.

SILVA, R. J., *et al.* Simvastatin-induced cardiac autonomic control improvement in fructose-fed female rats. **Clinics (Sao Paulo)**, v.66, n.10, p.1793-6, 2011.

SINGH, R., *et al.* Mechanism of increased angiotensin II levels in glomerular mesangial cells cultured in high glucose. **J Am Soc Nephrol**, v.14, n.4, p.873-80. Apr, 2003.

SMITH, H. W. The fate of sodium and water in the renal tubules. **Bull N Y Acad Med**, v.35, n.5, p.293-316. May, 1959.

SPETH, R. C., GIESE, M.J. Update on the Renin-Angiotensin System. **J.Pharmacol Clin Toxicol**, v.1, n.1, p.13, 2013.

STEPP, D. W., *et al.* Obesity augments vasoconstrictor reactivity to angiotensin II in the renal circulation of the Zucker rat. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.293, n.4, p.H2537-42. Oct, 2007.

STRAZZULLO, P., *et al.* Relationships between salt sensitivity of blood pressure and sympathetic nervous system activity: a short review of evidence. **Clin Exp Hypertens**, v.23, n.1-2, p.25-33. Jan-Feb, 2001.

SUZUKI, M., *et al.* Effect of an insulin sensitizer, pioglitazone, on hypertension in fructose-drinking rats. **Jpn J Pharmacol**, v.74, n.4, p.297-302. Aug, 1997.

TAGHIBIGLOU, C., *et al.* Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. Evidence for enhanced lipoprotein assembly, reduced intracellular ApoB degradation, and increased microsomal triglyceride transfer protein in a fructose-fed hamster model. **J Biol Chem**, v.275, n.12, p.8416-25. Mar 24, 2000.

TAKAI, S., *et al.* New approaches to blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system: chymase as an important target to prevent organ damage. **J Pharmacol Sci**, v.113, n.4, p.301-9, 2010.

TASKFORCE. Heart rate variability. Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. **Eur Heart J**, v.17, n.3, p.354-81. Mar, 1996.

TEFF, K. L., *et al.* Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. **J Clin Endocrinol Metab**, v.89, n.6, p.2963-72. Jun, 2004.

TRAN, L. T., *et al.* Chronic etanercept treatment prevents the development of hypertension in fructose-fed rats. **Mol Cell Biochem**, v.330, n.1-2, p.219-28. Oct, 2009a.

TRAN, L. T., *et al.* The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. **Mol Cell Biochem**, v.332, n.1-2, p.145-59. Dec, 2009b.

UEHARA, Y., *et al.* Non-ACE pathway-induced angiotensin II production. **Curr Pharm Des**, v.19, n.17, p.3054-9, 2013.

VAN DEN MEIRACKER, A. H. Ambulatory blood pressure monitoring in clinical trials with antihypertensive agents. **Neth J Med**, v.46, n.2, p.99-105. Feb, 1995.

VAN GAAL, L. F., *et al.* Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. **Nature**, v.444, n.7121, p.875-80. Dec 14, 2006.

VARAGIC, J., *et al.* New angiotensins. **J Mol Med (Berl)**, v.86, n.6, p.663-71. Jun, 2008.

VASDEV, S., *et al.* Fructose-induced hypertension in Wistar-Kyoto rats: interaction with moderately high dietary salt. **Can J Physiol Pharmacol**, v.85, n.3-4, p.413-21. Mar-Apr, 2007.

VASDEV, S., *et al.* Prevention of fructose-induced hypertension by dietary vitamins. **Clin Biochem**, v.37, n.1, p.1-9. Jan, 2004.

VERMA, S., *et al.* Sympathectomy prevents fructose-induced hyperinsulinemia and hypertension. **Eur J Pharmacol**, v.373, n.2-3, p.R1-4. Jun 4, 1999.

VERMA, S., *et al.* Defective endothelium-dependent relaxation in fructose-hypertensive rats. **Am J Hypertens**, v.9, n.4 Pt 1, p.370-6. Apr, 1996.

VINIK, A. I., *et al.* Diabetic autonomic neuropathy. **Diabetes Care**, v.26, n.5, p.1553-79. May, 2003.

WEISBERG, S. P., *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, v.112, n.12, p.1796-808. Dec, 2003.

WESTWOOD, B. M. & M. C. CHAPPELL. Divergent pathways for the angiotensin-(1-12) metabolism in the rat circulation and kidney. **Peptides**, v.35, n.2, p.190-5. Jun, 2012.

WIERNSPERGER, N., *et al.* Fructose and cardiometabolic disorders: the controversy will, and must, continue. **Clinics (Sao Paulo)**, v.65, n.7, p.729-38. Jul, 2010.

WILLIS, A., *et al.* Primary prevention of cardiovascular disease using validated risk scores: a systematic review. **J R Soc Med**, v.105, n.8, p.348-56. Aug, 2012.

WYLIE-ROSETT, J., *et al.* Carbohydrates and increases in obesity: does the type of carbohydrate make a difference? **Obes Res**, v.12 Suppl 2, p.124S-9S. Nov, 2004.

YING, W. Z. & P. W. SANDERS. Dietary salt increases endothelial nitric oxide synthase and TGF-beta1 in rat aortic endothelium. **Am J Physiol**, v.277, n.4 Pt 2, p.H1293-8. Oct, 1999.

YOKOTA, R. Efeito do tratamento crônico da frutose na função renal ex-vivo: Participação do Sistema Renina-Angiotensina. Escola Paulista de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional, Universidade Federal de São Paulo, 2012. 114 p.

ZABLOCKI, D. & J. SADOSHIMA. Knocking out angiotensin II in the heart. **Curr Hypertens Rep**, v.13, n.2, p.129-35. Apr, 2011.

ZANCHETTI, A. & G. MANCIA. Cardiovascular reflexes and hypertension. **Hypertension**, v.18, n.5 Suppl, p.III13-21. Nov, 1991.

ZIMMET, P., *et al.* Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v.414, n.6865, p.782-7. Dec 13, 2001.