

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**EFEITOS DE UMA DIETA HIPERCALÓRICA NA
FUNÇÃO CARDÍACA E NAS ARRITMIAS DE
REPERFUSÃO EM CORAÇÕES ISOLADOS DE
RATOS**

Letícia Firmino Rodrigues

Belo Horizonte
2009

Letícia Firmino Rodrigues

EFEITOS DE UMA DIETA HIPERCALÓRICA NA FUNÇÃO CARDÍACA E NAS ARRITMIAS DE REPERFUSÃO EM CORAÇÕES ISOLADOS DE RATOS

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Doutor Alvair Pinto de Almeida.

Co-orientadora: Profa. Doutora Virgínia Soares Lemos.

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2009

Dedico este trabalho à minha família, em especial, aos meus pais, Gersey e Sandra.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Alvaír Pinto de Almeida, pela oportunidade de fazer parte de sua equipe. Pelo exemplo como mestre e ser humano, pela dedicação incansável ao ensino e à pesquisa, pela contribuição valiosa dada à minha formação, pela oportunidade concedida e pela confiança deste trabalho.

À minha co-orientadora Virgínia Soares Lemos, que com dedicação e paciência, sempre solícita, a me ajudar. Minha eterna gratidão pela confiança em mim depositada, pela motivação constante em toda a caminhada, pela amizade.

Ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia, aos coordenadores professores Frederic Jean Georges Frezard e Maria José Campagnole-Santos.

Às secretárias Celinha e Creuza, pelo apoio.

À equipe dos Laboratórios de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular: Alexandre, Alvarina, Amilton, Bruno, Camila, Carlos, Dênis, Diógenes, Fernando, Grazielle, José Felipe, Josiane, Júlia, Lucas, Luciano, Lúdio, Mariana, Mirna, Pedro, Renata, Sílvia, Thiago e Virgínia Mendes, pela ajuda e coleguismo.

Aos alunos de iniciação científica do laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Mariana e Pedro, que foram fundamentais para a conclusão desse trabalho.

À equipe do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, aos professores Anderson José Ferreira e Gerluza Aparecida Borges Silva, pelo apoio e colaboração no trabalho, ao Chico e aos colegas, pelo apoio.

À professora Leida Maria Botion pela colaboração e apoio, bem como de toda a sua equipe.

As amizades conquistadas no laboratório de Hipertensão Arterial: Carlos, Flavinha, Gigi, Laurina, Juninho, Silvinha, Vanice.

Aos profissionais dos Departamentos de Fisiologia e de Farmacologia, especialmente Adelaide, Betinha, Darcy, Jorge, Leidiane, Rinaldo, Rosy e Zezé, pelo suporte técnico e agradável convivência.

À Capes, pelo recurso financeiro.

Aos membros da banca examinadora, pela atenção.

Aos meus pais Gersey e Sandra, que sempre estiveram ao meu lado, e que nunca mediram esforços em me ajudar. Ao meu irmão Luciano, por ser um exemplo de profissionalismo. Ao meu afilhado Rafael, que é a maior alegria da minha vida. À minha cunhada Vanessa, pela amizade.

As minhas tias, Elsie e Leila, pela força e carinho.

Aos meus tios Murilo e Tânia e primos: Kely, Samuel, Mariana, Kênia, Edson, Guilherme, Murilinho, Alessandra e Izabelle, que foram fundamentais para a conclusão desse trabalho, seja pelo apoio e carinho, mas também pelo incentivo na nova etapa que se inicia. Serei eternamente grata a vocês.

A toda minha família pelo amor, incentivo, compreensão e alegria.

À minha irmã de coração, Mariana, pelo apoio incondicional.

Aos amigos, que também fazem parte da minha família, pelo incentivo, lealdade, amizade e dedicação: Alessandro, Alysson, Bruno, Carolzinha, Érika, Fabiana, Flavinha, Fred, Geraldo, Gigi, Júlio, Karen, Luciana Soares, Lulú, Mari, Silvina e Simone.

Àqueles que contribuíram para realização desse sonho, muito obrigada!

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

"Primeiro aprenda a ser um artesão.
Isso não impedirá você de ser um gênio. "

Eugène Delacroix

RESUMO

Estudos têm sido realizados na tentativa de desenvolver dietas sintéticas que mimetizem o impacto promovido pelo consumo de alimentos contendo alto teor de carboidratos sobre a saúde, bem como as suas implicações sobre o sistema cardiovascular. Diante dessa realidade, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar o efeito de uma dieta hipercalórica na função cardíaca em corações isolados de ratos, seja em condições aeróbicas e durante a isquemia, utilizando o protocolo das arritmias de reperfusão. Ratos Wistar machos com 4 semanas de vida foram divididos em dois grupos: 1º Grupo Controle (ração Nuvilab) e 2º Grupo Dieta hipercalórica (33% de leite condensado, 33% de ração, 7% de açúcar e 27% de água). Os animais foram tratados durante 5 e 10 semanas. Os seguintes parâmetros foram avaliados: o ganho de peso dos animais semanalmente, até a data do sacrifício, pressão arterial sistólica, registro eletrocardiográfico, dosagens bioquímicas e análise morfométrica do ventrículo esquerdo. Os corações foram canulados e perfundidos com solução de Krebs-Ringer pelo sistema de Langendorff com pressão constante (65 mmHg). A isquemia de reperfusão foi induzida por oclusão da artéria coronária esquerda durante 15 minutos. O ISA (Índice de Severidade de Arritmias) foi avaliado para quantificar as arritmias de reperfusão. Os animais tratados durante cinco semanas apresentaram: aumento de peso corpóreo, aumento dos níveis de triglicérides, aumento da FC (frequência cardíaca) in vivo e in vitro, redução do intervalo QTc (intervalo QT corrigido pela FC), aumento da velocidade de relaxamento (dT/dt-) e de contração (dT/dt+), aumento do fluxo coronariano. O ISA do grupo tratado foi semelhante ao do grupo controle. Os animais tratados durante dez semanas apresentaram aumento do peso corpóreo, aumento dos

níveis de triglicérides e aumento do intervalo QTc. diminuição da tensão sistólica no basal. A dieta durante dez semanas também induziu diminuição da tensão sistólica, diminuição da $dT/dt+$ e $dT/dt-$ no período basal, diminuição do fluxo coronariano no basal e reperfusão. O ISA do grupo tratado foi menor quando comparado ao do grupo controle. Os animais alimentados com dieta hipercalórica durante cinco semanas apresentaram melhora do desempenho cardíaco e tendência a irreversibilidade das arritmias de reperfusão devido ao aumento do peso do coração e maior sensibilidade aos receptores β adrenérgicos. O prejuízo do desempenho cardíaco e a reversibilidade as arritmias de reperfusão (efeito cardioprotetor) dos animais alimentados durante dez semanas se deve a diminuição da sensibilidade aos receptores β adrenérgicos, e conseqüentemente, aumento da sensibilidade aos receptores muscarínicos.

ABSTRACT

Many studies have tried to develop synthetic diets which mimic the impact in health, additionally in the cardiovascular system, promoted by high carbohydrate diets. Therefore, the goals of the present study were to evaluate the effects of a hypercaloric diet on cardiac function in isolated rat hearts, with aerobic or anaerobic conditions, using reperfusion arrhythmia protocols. Four weeks old male Wistar rats were divided into two groups: 1st) control group (Nuvilab chow) and 2nd) hypercaloric diet group (consisting of 33% condensed milk, 33% ground chow, 7% sucrose and 27% water). Rats were studied for five and ten weeks. The experiments evaluated weight gain until the sacrifice date, arterial pressure systolic measurement, electrocardiographic registration, biochemical dosages and morphometric analysis. Hearts were perfused according to Langendorff technique and maintained in heated ($37\pm 1^{\circ}\text{C}$) and continuously gassed (95% O₂/5% CO₂) Krebs-Ringer solution at constant pressure (65 mm Hg). Local ischemia was induced by left coronary occlusion during 15 minutes. After ischemia, hearts were reperfused during 30 minutes. To obtain a quantitative measurement, the arrhythmias were graded arbitrarily by their duration, through the arrhythmia severity index (ASI). Animals treated for 5 weeks presented: increased body weight, increased triacylglycerols (TG) levels, increased *in vivo* and *in vitro* heart rate and reduced QTc period. The diet also induced an enhancement in dT/dt⁺ and dT/dt⁻, and in the coronary flow. Treated group and control group presented similar ASI. Animals treated during 10 weeks showed an increased body weight, increased triacylglycerols levels and increased QTc period. The 10-week diet also induced a reduction in

the systolic tension, reduction in the $dT/dt+$ and $dT/dt-$ in the basal period, a reduction in the coronary flow in basal and reperfusion periods. Treated group presented a significant reduction in ASI compared to control group. The rats treated during 5 weeks showed an improvement of cardiac function and tendency to irreversibility of reperfusion arrhythmias due to increased heart weight and sensitivity of adrenergic receptors. The decrease in cardiac function and reversibility of reperfusion arrhythmias observed in animals treated during 10 weeks was due to reduced sensitivity of adrenergic receptors with a consequent increment in muscarinic receptors sensitivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Avaliação da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca em ratos anestesiados.....	15
Figura 2.	Ilustração do registro eletrocardiográfico e representação do intervalo QT analisado no eletrocardiograma.....	16
Figura 3.	Sistema de perfusão do coração isolado.....	17
Figura 4.	Sistema de perfusão utilizado no laboratório de Fisiologia Cardiovascular (ICB/UFMG).....	18
Figura 5.	Registro da força de contração no período de estabilização, isquemia miocárdica e reperfusão.....	21
Figura 6.	Diagrama esquematizando o protocolo experimental do coração isolado.....	22
Figura 7.	Peso dos animais controle e tratados durante cinco semanas.....	28
Figura8.	Peso corpóreo dos animais controle e tratados durante cinco semanas.....	29
Figura9.	Níveis séricos de glicose dos animais controle e tratados durante cinco e dez semanas.....	30

Figura10.	Níveis séricos de colesterol total dos animais controle e tratados durante cinco e dez semanas.....	31
Figura11.	Níveis séricos de triglicerídeos dos animais controle e tratados durante cinco e dez semanas.....	32
Figura12.	Avaliação da pressão arterial sistólica em ratos anestesiados.....	33
Figura13.	Avaliação da frequência cardíaca IN VIVO em animais controles e tratados durante cinco semanas	34
Figura14.	Avaliação da frequência cardíaca IN VIVO em animais controles e tratados durante dez semanas.....	34
Figura15.	Avaliação da frequência cardíaca IN VIVO em animais controles e tratados durante cinco e dez semanas.....	35
Figura16.	Avaliação da frequência cardíaca IN VITRO em animais controles e tratados durante cinco e dez semanas.....	37
Figura17.	Avaliação da tensão sistólica em animais controles e tratados durante cinco e dez semanas.....	39
Figura18.	Avaliação da tensão diastólica em animais controles e tratados durante cinco e dez semanas.....	40
Figura19.	Avaliação da velocidade de contração em animais controles e tratados durante cinco e dez semanas.....	41

Figura20.	Avaliação da velocidade de relaxamento em animais controles e tratados durante cinco e dez semanas.....	42
Figura21.	Avaliação do fluxo coronariano em animais controles e tratados durante cinco semanas.....	43
Figura22.	Avaliação do fluxo coronariano em animais controles e tratados durante dez semanas.....	44
Figura23.	Avaliação do índice de severidade de arritmias de animais controles e tratados durante cinco e dez semanas.....	45
Figura24.	Avaliação da FC <i>IN VITRO</i> pela administração de acetilcolina (Ach) e isoproterenol (Iso) em animais tratados com dieta hipercalórica durante cinco e dez semanas.....	47
Figura25.	Avaliação do peso dos corações em animais controles e tratados durante cinco semanas.....	48
Figura26.	Avaliação do peso dos corações em animais controles e tratados durante dez semanas.....	49
Figura27.	Avaliação morfológica de corações isolados de animais controles e tratados durante cinco e dez semanas.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela1.	Composição calórica das dietas do grupo controle e do grupo tratado.....	12
Tabela2.	Composição da solução mãe utilizada no preparo da solução nutritiva.....	18
Tabela3.	Composição final, em mM, da Solução de Krebs-Ringer....	19
Tabela4.	Relação entre o tempo de duração das arritmias e o score.	22
Tabela5.	Descrição dos procedimentos realizados para o processo de inclusão dos tecidos.....	24

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACE	→	Artéria coronária esquerda
Ach	→	Acetilcolina
AG	→	Ácidos graxos
AGLs	→	Ácidos graxos livres
ATP	→	Trifosfato de adenosina
bpm	→	Batimentos por minuto
Ca ⁺	→	Íon cálcio
°C	→	grau Celsius
CaCl ₂	→	Cloreto de cálcio
cm	→	centímetro
CO ₂	→	Gás carbônico
dT/dt ⁺	→	Velocidade de contração
dT/dt ⁻	→	Velocidade de relaxamento
ECG	→	Eletrocardiograma
EPM	→	Erro padrão da média
FC	→	Frequência cardíaca
g	→	grama
HE	→	Hematoxilina/Eosina
H ₂ O	→	Molécula de água
Intervalo QTc	→	Intervalo QT corrigido pela frequência cardíaca
i.p	→	intraperitonal
ISA	→	Índice de severidade de arritmias
ISO	→	Isoproterenol
Kcal	→	Kilocaloria

KCl → Cloreto de potássio

KH₂PO₄ → Fosfato de potássio

K-R → Solução de Krebs

M → Molar

Min. → Minuto

MgSO₄ → Sulfato de magnésio

mg/Kg → miligrama por kilograma

ml/min → Milímetro por minuto

mm → Milímetro

mmHg → Milímetros de mercúrio

Na⁺ → Íon sódio

NaCl → Cloreto de sódio

NaHCO₃ → Bicarbonato de sódio

Na⁺ / Ca²⁺ → Trocador sódio/cálcio

Na⁺ / H⁺ → Trocador sódio/hidrogênio

O₂ → Molécula de oxigênio

PAS → Pressão arterial sistólica

PM → Peso Molecular

Receptores β₁ → receptores beta 1 (receptores adrenérgicos)

Receptores M₂ → receptores muscarínicos

SNC → Sistema nervoso central

TG → Triglicerídeo

VD → Ventrículo direito

VE → Ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	2
1.1.	Funções cardíacas sobre condição aeróbica e durante a isquemia parcial do miocárdio	2
1.2.	Sistema cardiovascular e dieta hipercalórica	4
2.	OBJETIVOS	10
2.1.	Objetivo Geral	10
2.2.	Objetivos Específicos	10
3.	MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1.	Materiais.....	12
3.1.1.	Animais	12
3.1.2.	Dieta	12
3.1.3.	Equipamentos: coração isoaldo	13
3.1.4.	Drogas e reagentes.....	13
3.2.	Métodos	14
3.2.1.	Dosagens Bioquímicas	14
3.2.2.	Pletismografia de cauda	14
3.2.3.	Registro eletrocardiográfico no animal <i>IN VIVO</i>	15
3.2.4.	Sistema de perfusão.....	17
3.2.5.	Solução nutritora.....	18
3.2.6.	Preparação do coração isolado.....	19
3.2.7.	Canulação.....	20
3.2.8.	Registros.....	20
3.2.9.	Procedimento para isquemia e reperfusão.....	22
3.2.10.	Avaliação da atividade autonômica cardíaca <i>IN VITRO</i>	23
3.2.11.	Análise morfométrica.....	23
3.3.	Análise estatística.....	26
4.	Resultados.....	28
4.1	Peso dos animais.....	28
4.2.	Parâmetros bioquímicos.....	29
4.3.	Avaliação da PA sistólica	32
4.4.	Registro eletrocardiográfica <i>IN VIVO</i>	33
4.5.	Efeitos da dieta hipercalórica na função cardíaca de ratos tratados com dieta hipercalórica, seja em condições aeróbicas e isquêmica.....	36
4.6.	Avaliação da incidência de arritmias de reperfusão em corações isolados de ratos tratados com dieta hipercalórica.....	44

4.7.	Avaliação da sensibilidade autonômica (%FC) em ratos tratados com dieta hipercalórica.....	46
4.8.	Avaliação do peso dos corações de animais tratados com dieta hipercalórica.....	48
4.9.	Avaliação morfométrica em relação a hipertrofia cardíaca em animais tratados com dieta hipercalórica.....	50
5.	Discussão.....	52
6.	Conclusão.....	60
7.	Referências bibliográficas.....	62

Introdução

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Funções cardíacas sobre condição aeróbica e durante a isquemia parcial do miocárdio

Adaptação é uma característica essencial do coração. O bombeamento cardíaco é regulado mediante a sua carga funcional, através de suprimento energético adequado que seja capaz de suprir as suas necessidades, e assim cumprir um dos seus papéis mais importantes, a função homeostática de nutrição celular (Kudo *et al.*, 1995).

O coração tem uma alta demanda energética, as quais normalmente se relaciona com o metabolismo de carboidratos e ácidos graxos (AG) (Dyck *et al.*, 2002), sendo que esses dois substratos representam as maiores fontes de energia para o coração. Sob condições aeróbicas, 50-70% da energia total é obtida através dos ácidos graxos livres (AGLs), e o restante, pela glicose (Sambandam & Lopaschusk, 2003). O metabolismo de AGLs e glicose primariamente na mitocôndria requerem uma grande quantidade de oxigênio (Dyck *et al.*, 2002).

Há casos em que o coração necessita lidar com um aporte restrito de oxigênio para o músculo, como por exemplo, durante a isquemia. Dessa maneira, o miocárdio se adapta rapidamente a mudança do metabolismo aeróbico para o anaeróbico. Tanto a oxidação dos AGLs e da glicose diminui e a produção de ATP fica prejudicada. A glicólise que representa a menor fonte de ATP para o coração aeróbico (cerca de 10%) torna-se a principal fonte para o fornecimento de ATP para o coração durante a isquemia. Apesar da via glicolítica se tornar fundamental para a manutenção de um nível crítico de ATP necessário para as funções cardíacas vitais como canais iônicos, função

contrátil e integridade celular, essa mudança pode comprometer a eficiência cardíaca durante a isquemia e reperfusão aeróbica subsequente (Pôrto, 2007).

Em dependência da magnitude da isquemia, há um acúmulo intracelular de lactato e prótons, como conseqüente queda do pH e desequilíbrio iônico. O acúmulo de H^+ leva ao aumento intracelular de Na^+ via trocador Na^+/H^+ e subsequente acúmulo intracelular de Ca^{2+} via trocador Na^+/Ca^{2+} . Esse acúmulo intracelular de Na^+ e Ca^{2+} resulta em menor eficiência das proteínas contráteis, assim como prejuízo do desempenho cardíaco na reperfusão e podendo acarretar em morte celular (Sambandam & Lopaschusk, 2003).

Entretanto, quando a lesão do miocárdio é reversível, ocorre uma rápida recuperação da oxidação dos AGLs durante a reperfusão e este torna-se uma fonte dominante de energia, gerando um pool de ATP para o coração.

As conseqüências da reperfusão coronariana, tanto espontaneamente quanto em intervenções experimentais ou clínicas, dependem da gravidade e da duração da isquemia preexistente.

Quando a reperfusão é estabelecida no período em que os miócitos e a microvasculatura ainda estiverem na fase de lesão reversível, a morte celular é evitada e a estrutura celular e as funções contráteis e metabólicas são recuperadas. Contrariamente, se os miócitos estiverem lesados irreversivelmente pela isquemia, a restauração do fluxo resulta não em recuperação celular, mas em edema de miócitos, liberação de enzimas intracelulares, sobrecarga de cálcio, redução persistente da contratilidade e eventual necrose em pelo menos uma parte do tecido. Esses fenômenos, denominados lesões de reperfusão, possuem relevância clínica, o que implica a possibilidade de melhora da recuperação miocárdica com intervenções

específicas aplicadas anteriormente ou no momento da reperfusão (Ferrari *et al.*, 1998; Fozzard, 1991).

Foram identificados quatro tipos de lesão de reperfusão: (1) lesão letal de cardiomiócitos, (2) lesão microvascular, (3) disfunção mecânica reversível e (4) arritmias de reperfusão, os quais podem ocorrer tanto juntos quanto separadamente (Dhalla *et al.*, 2000).

As arritmias de reperfusão, estudadas no presente estudo, são definidas como sendo distúrbios de ritmo que se originam em consequência da restauração parcial ou total do fluxo coronariano no miocárdio que passou por um período de isquemia regional ou global (Manning & Hearse, 1984). Surtos de taquicardia ventricular e, ocasionalmente, fibrilação ventricular, podem ocorrer segundos após a reperfusão. As extra-sístoles ventriculares e o ritmo idioventricular acelerado também são comumente observados (Braunwald, 1996). Vários modelos experimentais têm sido utilizados no estudo dessas arritmias, por ser este um achado clínico freqüente que merece atenção especial em cardiologia (Manning & Hearse, 1984).

1.2. Sistema cardiovascular e dieta hipercalórica

Atualmente a sociedade ocidental convive com um estilo de vida sedentário associado à ingestão de alimentos de alto teor calórico (Knudson *et al.*, 2007), gerando um balanço energético positivo (energia consumida é maior que a energia gasta) (Bowers *et al.*, 2004).

Lipídios é a forma primária de armazenamento de energia em mamíferos e é largamente encontrado no tecido adiposo branco sobre a forma de triglicérides. O depósito de lipídios inicialmente resultam em aumento no

tamanho das células de gordura, e tardiamente, ocorrerá aumento do número de células de gordura, resultando em hiper celularidade, que representa um sinal típico da obesidade (Bowers *et al.*, 2004).

Naderali *et al.*, 2004 descreveram a obesidade como o principal fator de risco para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares. Em 1950 a obesidade foi associada ao sistema cardiovascular, mas os estudos clínicos desenvolvidos na época apenas examinavam dados de anatomia, nutrição, metabolismo e aspectos endócrinos relacionados à patologia.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, as doenças cardiovasculares apresentam uma incidência elevada em todo o mundo, representando um grave problema de saúde pública, pois acometem uma parcela considerável da população mundial e apresentam elevado custo médico-social (III Diretrizes sobre dislipidemias e aterosclerose, 2001).

A partir da década de 60, as doenças cardiovasculares superaram as infecto-contagiosas como primeira causa de morte no Brasil (IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2002).

Muitos modelos de animais têm sido estudados na tentativa de esclarecer os mecanismos que contribuem para a disfunção cardíaca em obesos (Abel *et al.*, 2008). Modelos genéticos de obesidade em roedores tais como o camundongo *ob/ob*, o rato obeso Zucker e ratos obesos espontaneamente hipertensos têm sido utilizados na pesquisa cardiovascular (Carrol *et al.*, 2006). Entretanto, esses modelos podem não exibir as mesmas anormalidades que acometem humanos obesos, como a hipertensão, hiperglicemia, hiperinsulinemia e hipertrofia cardíaca. Em contraste os modelos de dieta que induzem obesidade em cachorros e coelhos têm demonstrado

estudos promissores do sistema cardiovascular, pois são capazes de mimetizar efeitos fisiológicos semelhantes ao que ocorre em humanos (Carrol *et al.*, 2006). Dentre essas dietas, tem destaque uma dieta hipercalórica, tendo como grande parte de suas calorias o carboidrato, correspondendo a 65.0%; proteínas, 16.2% e gordura, 15.7% (De Lima., 2008).

Os triglicerídeos (TAG) representam a principal forma de armazenamento energético proveniente dessa dieta, ocorrendo esse depósito principalmente no tecido branco e em menor escala no marron e músculos (Sell *et al.*, 2004).

O aumento da deposição lipídica ocorre a partir do surgimento da resistência insulínica, desviando dessa maneira, a utilização de glicose pelos tecidos resistentes à insulina para a síntese da TAG no tecido adiposo. Alguns estudos mostram que o consumo calórico diário da dieta hipercalórica é maior do que o gasto energético total diário do organismo, o que gera um balanço energético positivo, e esse por sua vez, modificam áreas do sistema nervoso central (SNC), promovendo alterações no tônus autonômico simpático para regiões periféricas (De Lima., 2008). No caso do tecido adiposo branco visceral de ratos, a hiperatividade simpática, induz a uma maior mobilização lipídica, e dessa maneira, aumenta a concentração de ácidos graxos livres no plasma (Frayan *et al.*, 1994; Hoffstedt *et al.*, 1996).

De Lima *et al.*, 2008 demonstrou que a obesidade induzida pela dieta hipercalórica em ratos Wistar promoveu um desbalanço autonômico, promovendo uma diminuição da sensibilidade ao baroreflexo e esse achado relaciona-se com o grau de obesidade.

Segundo Naderali *et al.*, 2001, ratos machos Wistar tratados com a mesma dieta hipercalórica durante 16 semanas apresentaram aumento dos níveis plasmáticos de leptina.

A leptina é um peptídeo secretado pelo tecido adiposo branco e ao ser liberado, age no hipotálamo para exercer a sua função em relação ao controle do balanço energético (aumento da energia gasta em detrimento da energia intacta), através do aumento da ativação simpática do tecido adiposo marrom (tecido relacionado com o metabolismo da termogênese). Além disso, a leptina exerce influência sobre a função renal (aumento da atividade do nervo simpático renal) e ação sobre o sistema cardiovascular em animais experimentais mediada pelo SNS (Alvarez *et al.*, 2002).

Estudos recentes têm sido realizados, relacionando esta dieta hipercalórica com o sistema vascular, na qual os animais tratados com essa dieta desenvolvem disfunção endotelial (Naderali *et al.*, 2004).

Naderali *et al.*, 2001 avaliou ratos machos wistar tratados com dieta hipercalórica durante 16 semanas, constatando nesses animais um ganho superior de peso, aumento dos níveis plasmáticos de TAG e ácidos graxos (AG) não esteroidais, quando comparados ao grupo controle. Além disso, os animais tratados apresentaram prejuízo do relaxamento vascular, devido principalmente à disfunção endotelial gerada pela obesidade.

Naderali & Williams., 2003 trataram ratos machos Wistar por três dias com a dieta hipercalórica. Os animais tratados apresentaram aumento dos níveis plasmáticos de TAG e ácidos graxos não esteroidais, mas não apresentaram diferença com relação ao ganho de peso corpóreo quando comparados aos animais do grupo controle. O autor constatou que o

tratamento desses animais com a dieta hipercalórica por um curto período de tempo induziu disfunção arterial dependente e independente de endotélio.

A literatura científica descreve os efeitos da dieta hipercalórica sobre o sistema vascular, sendo que até a presente data, nenhum estudo com essa dieta foi realizado com o intuito de avaliar a função cardíaca, mediante condições aeróbicas e/ou anaeróbicas, tornando o estudo da mesma relevante.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos de uma dieta hipercalórica na função cardíaca, bem como o efeito sobre as arritmias de reperfusão em corações isolados de ratos.

2.2. Objetivos específicos

- Parâmetros avaliados na função cardíaca e pelo protocolo das arritmias de reperfusão: tensão sistólica e diastólica, frequência cardíaca (FC), velocidade de contração ($dT/dt+$) e relaxamento ($dT/dt-$), fluxo coronariano.
- Avaliar o efeito da dieta hipercalórica em relação aos parâmetros bioquímicos (triglicerídeos, glicose, colesterol total).
- Avaliar o efeito da dieta hipercalórica sobre a pressão arterial sistólica (PAS).
- Avaliação do registro eletrocardiográfico *in vivo* em animais tratados com dieta hipercalórica.
- Avaliação da FC *in vitro* pela administração de acetilcolina (Ach) e isoproterenol (Iso) em animais tratados com dieta hipercalórica.
- Avaliação dos parâmetros morfológicos (peso e hipertrofia cardíaca) em corações de ratos tratados com dieta hipercalórica.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com idade de quatro semanas, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas/ UFMG. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com controle de temperatura e luz (14 horas luz, das 06 às 20h), e livre acesso à água e ração.

3.1.2. Dieta

A dieta foi administrada durante cinco e dez semanas.

Os animais foram separados em dois grupos:

- Grupo controle: ração Nuvilab, com livre acesso a água.
- Grupo tratado: dieta hipercalórica, com livre acesso a água.

Tabela 1: Composição calórica das dietas.

Composição	Dieta Controle	Dieta hipercalórica
Densidade calórica (Kcal/100g)	292	318
Carboidrato (%)	57,5	68
Proteína (%)	30	16
Lipídeo (%)	12,5	16
Umidade (%)	12,5	27

Dieta controle (g/100g de dieta)-Ração NUVILAB: carboidrato, 44g; proteína, 22g; lipídeo, 4g / Dieta hipercalórica (g/100g de dieta): composição da ração NUVILAB associada ao leite condensado – Moça (Nestlé) (carboidrato, 57g; proteína, 7g; lipídeo, 8g; sacarose (carboidrato, 99g; proteína, 0g; lipídeo, 0g). (De Lima., 2008).

3.1.3. Equipamentos: Coração isolado

- Sistema de Langendorff para coração isolado
- Eletrocardiógrafo (CARDIOFAX, NIHON KOHDEN)
- Transdutor de força cardíaca (Biopac System, Inc., Santa Bárbara, CA, EUA)
- Microcomputador contendo o sistema de aquisição de dados Acqknowledge
- Balança analítica PRECISION PR-100 (Spec)
- Balança analítica AM 5500 AUTOMARTE (Marte)
- Bomba de vácuo Q-355 B (Quimis)
- Centrífuga refrigerada
- Centrífuga evaporadora (Eppendorf, Alemanha)
- Agitador magnético (Fisatom)
- Agitador de tubos (Quimis)
- Filtro EXPRESSTM 0.22 μ m (Millipore)
- Material e instrumental cirúrgico
- Guilhotina manual
- Vidraria e material de laboratório

3.1.4. Drogas e reagentes

- NaHCO₃ PM 84,01 (Synth, Brasil)
- CaCl₂ . 2H₂O PM 147,02 (Nuclear, Brasil)
- KCl PM 74,55 (Synth, Brasil)
- NaCl PM 58,44 (Merck, Alemanha)
- KH₂PO₄ PM 136,09 (Synth, Brasil)
- MgSO₄ . 7H₂O PM 246,47 (Synth, Brasil)
- Dextrose anidra PM 180,16 (Synth, Brasil)
- Benzoginoestril (SARSA- Hoechst Marion Roussel)
- Ácido etilenodinitrilotetraacético (EDTA) (Merck, Alemanha)
- Fenilmetilsulfonil fluorídrico (PMSF) (Sigma, EUA)
- Pepstatin A (Sigma, EUA)
- Albumina Bovina (BSA) PM 203,43 (Sigma, USA)
- Carbogênio (White Martins)
- Ketamina (116 mg/Kg) e xilazina (5,75 mg/Kg)

- Isoproterenol (agonista de receptores β -adrenérgicos) e acetilcolina (agonista de receptores colinérgicos), ambos na dose de 10^{-6} M.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Dosagens Bioquímicas

A concentração de colesterol, glicose e triglicerídeos plasmático foram quantificados através do kit enzimático KATAL (Belo Horizonte, MG).

3.2.2. Pletismografia de cauda

A pressão arterial sistólica (PAS) de animais tratados durante cinco e dez semanas foram avaliadas por meio de método não invasivo (pletismografia de cauda), de acordo com metodologia descrita por Whitesall *et al.*,2004. Os animais foram previamente aclimatados por três dias consecutivos, ao contensor no qual eram mantidos durante a avaliação da pressão arterial. Os dados foram registrados em um computador contendo o sistema de aquisição da Windaq e avaliados pelo software Dataq (XBP1000; Kent Scientific, Torrington, CT).

Um manguito colocado em torno da cauda do animal foi insuflado a um valor superior à pressão arterial, interrompendo a pulsasão e, ao ser desinsuflado as pulsações retornavam. O retorno das ondas pulsáteis captadas por um sensor, eram registradas como sendo o valor da PAS (Figura.1).

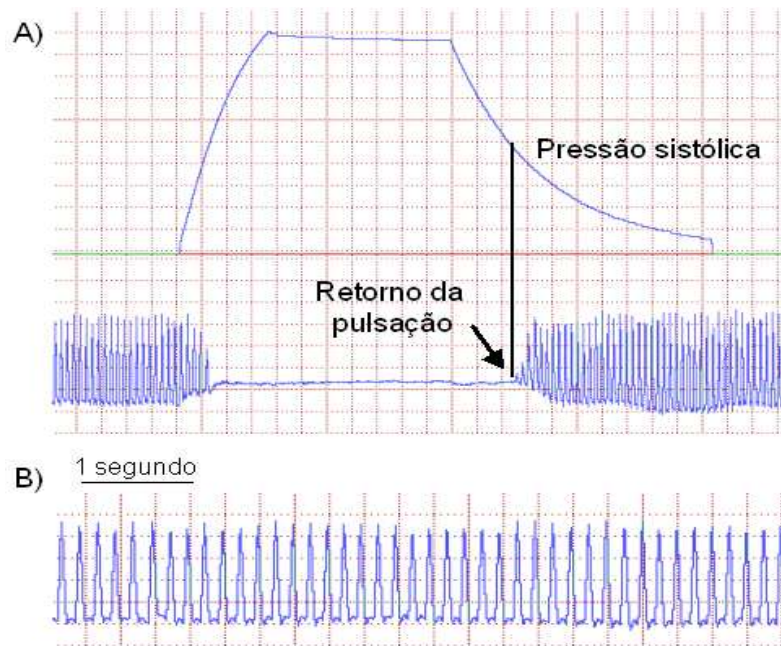


Figura 1: Avaliação da pressão arterial sistólica (A) e freqüência cardíaca (B) por meio de ondas pulsáteis captadas por meio de um sensor acoplado a cauda do animal, após a desinsuflação do manguito o retorno das ondas pulsáteis correlacionam-se com a pressão arterial sistólica.

3.2.3 Registro eletrocardiográfico no animal IN VIVO

Ratos Wistar controle e tratados foram anestesiados com Ketamina (116 mg/Kg. ip) e xilazina (5,75 mg/Kg. ip), e em seguida realizado tricotomia da região torácica e dorsal para implantação de eletrodos para a captação do sinal eletrocardiográfico. Os eletrodos da região torácica eram posicionados na derivação DII e o da região dorsal utilizado como terra.

A atividade elétrica foi registrada através de um eletrocardiógrafo com fios bipolares colocados diretamente na superfície do átrio direito e ventrículo esquerdo.

A freqüência cardíaca foi calculada a partir das medidas diretas da força contrátil (Figura 2A). O intervalo Q-T (Figura 2B) foi medido do início do

complexo QRS ao final da onda T. O intervalo QT foi avaliado, sendo corrigido pela FC, intervalo denominado como QTc. Esse período corresponde a FC dividido pela raiz quadrada do período R-R. Esse período nos informa o tempo de despolarização seguida da repolarização do ventrículo, mediante correção pela FC.

Os registros foram analisados por três vezes em dias diferentes, pelo mesmo avaliador. A utilização de duas linhas imaginárias que se cruzam foi o recurso utilizado para a determinação do ponto final de ondas de difícil visualização. Foram descartados todos os registros de difícil análise.

A aquisição dos sinais foi realizada por um sistema de conversão analógico-digital. Os sinais foram enviados a um amplificador (*Biopac System*, Santa Bárbara, USA) e em seguida registrados em um computador contendo um *software* de aquisição de dados (*Acknowledge*).

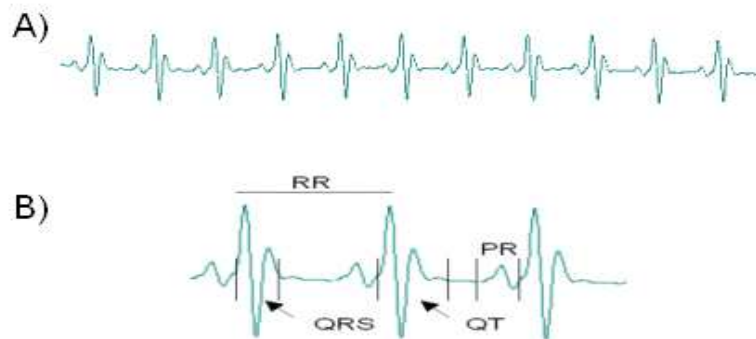


Figura 2: (A). Registro eletrocardiográfico registrado em animais controle
(B). Representação do intervalo QT analisado no eletrocardiograma.

3.2.4. Sistema de Perfusão

O sistema de perfusão utilizado, ilustrado na figura 3, é uma adaptação do descrito por Goes *et al.*, 1993, o qual é constituído por um tubo de vidro de aproximadamente 12 mm de diâmetro e de 90 cm de altura. Na extremidade inferior, o tubo é conectado a uma agulha de aço inoxidável. O tubo de vidro é ligado a um reservatório de solução nutritora, cujo suporte regulável permite o ajuste da pressão de perfusão, que foi mantida constante (65 mmHg) durante todo o experimento. O tubo de vidro é envolto por uma jaqueta de água em circulação aquecida a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. A oxigenação é feita diretamente no interior do tubo, por meio de uma entrada localizada na base deste, a qual é conectada à saída da válvula reguladora do cilindro de carbogênio, possibilitando assim o borbulhamento de mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) na solução nutritora.

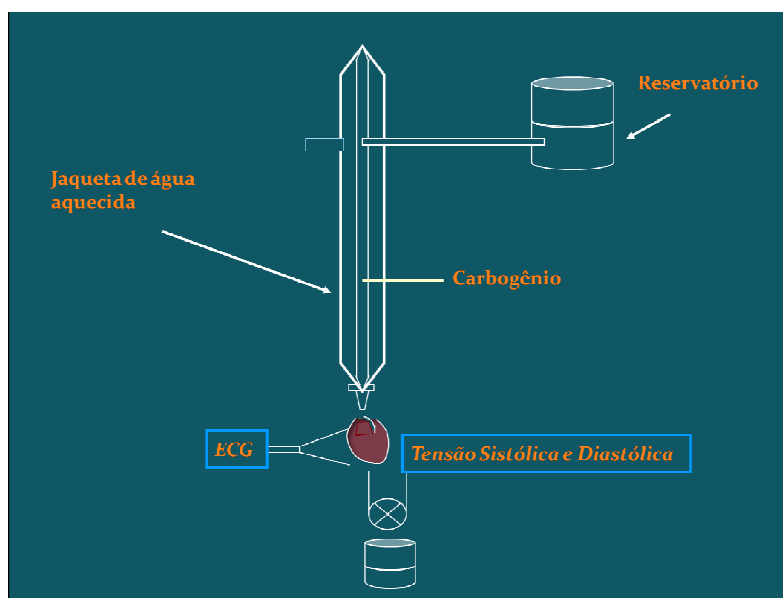


Figura 3: Sistema de perfusão do coração isolado. Esquema representativo.



Figura 4: Sistema utilizado no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do ICB/UFMG.

3.2.5. Solução nutritora

A solução nutritora utilizada na perfusão dos corações foi a Solução de Krebs-Ringer (Solução K-R), tendo a composição apresentada na tabela 2. Cada litro desta solução foi feito a partir de 50 ml de uma solução mãe (tabela 3), 2,2 g de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e 2,1 g de glicose, preparado e filtrado antes de cada experimento.

Tabela 2: Composição da solução mãe utilizada no preparo da solução nutritora.

COMPOSTO	QUANTIDADE
NaCl	138,4 g
KCl	7,0 g
KH_2PO_4	3,2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	5,8 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	7,4 g
H_2O deionizada q.s.p	1000 ml

Tabela 3: Composição final, em mM, da Solução de Krebs-Ringer.

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO EM mM
NaCl	118,41
KCl	4,69
KH ₂ PO ₄	1,17
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,17
CaCl ₂ . 2H ₂ O	2,51
Dextrose anidra	11,65
NaHCO ₃	26,24

3.2.6. Preparação do coração isolado

Os animais foram sacrificados por decapitação. Em seguida, foi feita a toracotomia, as cartilagens costoadriais foram abertas em ambos os lados e o esterno rebatido para cima. Sucessivamente, foi realizada a secção da veia cava inferior, a veia cava superior, as artérias aorta e pulmonar, a traquéia, o esôfago, bem como a parte dos pulmões, retirando-se assim o coração em bloco. Após retirado, o coração foi colocado em um béquer contendo solução nutritiva oxigenada e em temperatura de aproximadamente 37° C, e conseqüentemente, transferido para a placa de Petri que continha solução nutritiva oxigenada e em temperatura de aproximadamente 4° C. O resfriamento tem por objetivo diminuir o metabolismo do miocárdio e o consumo de O₂ nos instantes anteriores à canulação do coração. Depois de transferido para a placa de Petri, os restos de tecido pulmonar e vascular, da traquéia e do esôfago que acompanhavam o coração foram removidos (Ferreira *et al*, 2001).

3.2.7. Canulação

A aorta ascendente foi seccionada na altura de sua primeira ramificação (tronco braquicefálico) e seu coto foi fixado com linha na ponta da cânula de aço inoxidável “25” acoplada ao sistema de perfusão, visando sempre à integridade da válvula aórtica. Em seguida, os restos de tecidos ainda aderidos ao coração foram cuidadosamente removidos. O tempo gasto desde o sacrifício até a montagem da preparação foi o menor possível (aproximadamente 3 minutos). Foram aguardados 40 minutos para a estabilização da preparação.

3.2.8. Registros

Os seguintes registros foram realizados:

A) Força de Contração

Para o registro da força contrátil, um pequeno gancho de aço inox foi fixado ao ápice do ventrículo esquerdo e conectado ao transdutor de força por meio de uma linha passada através de uma roldana. Uma tensão de aproximadamente $1,0 \pm 0,2$ g foi aplicada ao coração (tensão diastólica), a qual foi mantida durante todo o período de estabilização. Por meio das ondas de tensão foi avaliado as derivadas da tensão em relação ao tempo, que se correlacionam com a velocidade de contração ($dT/dt +$) e velocidade de relaxamento ($dT/dt -$).

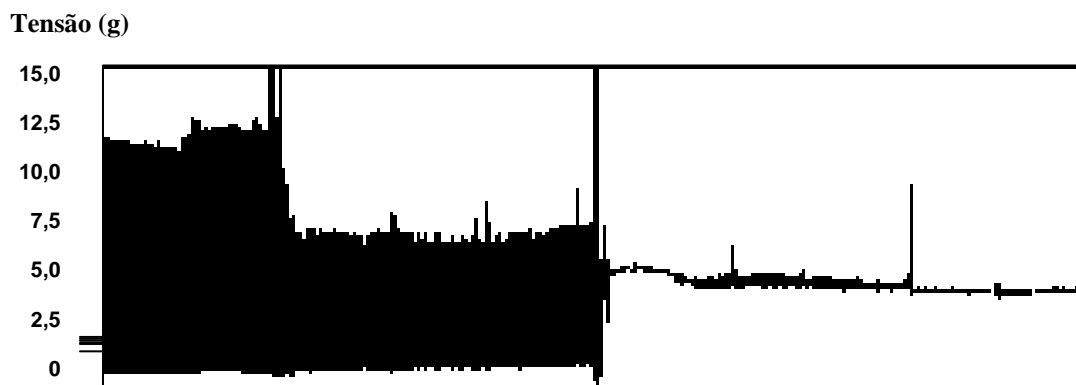


Figura 5: Registro da força de contração no período de estabilização, isquemia miocárdica e reperfusão.

B) Fluxo coronariano (ml/min): foi determinado a cada 5 minutos durante todo o experimento, coletando-se o perfusato durante 1 minuto e definindo o volume em mililitros, com auxílio de uma proveta graduada (10mL).

C) Frequência cardíaca: valores avaliados a partir das ondas de força.

3.2.9. PROCEDIMENTO PARA ISQUEMIA E REPERFUSÃO

Foi utilizada a técnica de isquemia local através da oclusão da artéria coronária esquerda (ACE). Com o auxílio de um porta-agulha, um fio de sutura foi passada envolta da artéria. No momento da oclusão, ou seja, 40 minutos após o período de estabilização, um pedaço de palito de madeira foi colocado sobre a ACE e o fio foi amarrado, pressionando o palito contra a artéria. A queda imediata do fluxo coronariano confirmava o sucesso da oclusão. A isquemia foi mantida durante 15 minutos e a reperfusão foi realizada cortando-se o fio que pressionava o palito contra a artéria (Lubbe *et al*, 1978). O tempo de duração das arritmias foi cronometrado assim que elas iniciavam, ou seja, logo após a reperfusão. O esquema do protocolo do coração isolado pode ser observado na figura 6.

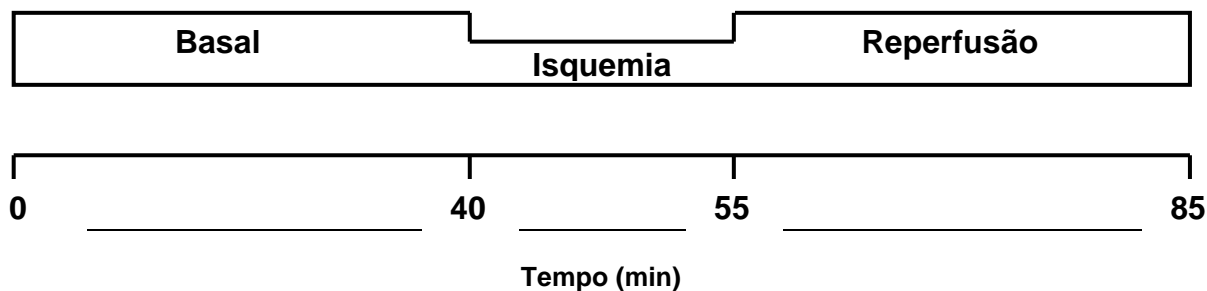


Figura 6: Diagrama esquematizando o protocolo experimental do coração isolado.

Para quantificar as isquemias de reperusão foi atribuído um índice correspondente ao tempo em que o coração permanecia arritmico. Quando o score foi igual a 12 as arritmias foram consideradas irreversíveis (30 minutos). A esse sistema dá-se o nome de Índice de Severidade das Arritmias (ISA) (Neves *et al*, 1997; Ferreira *et al*, 2001).

Tabela 4: Relação entre o tempo de duração das arritmias e o score.

DURAÇÃO DAS ARRITMIAS (MIN)	SCORE (ISA)
Até 3	2
3 a 6	4
6 a 10	6
10 a 15	8
15 a 20	10
20 a 25	11
25 a 30	12 (Irreversíveis)

3.2.10 Avaliação da FC IN VITRO pela administração de acetilcolina (ACh) e isoproterenol (Iso) em animais tratados com dieta hipercalórica

Ratos *Wistar* controle e tratados foram decapitados, sendo em seguida os corações retirados e perfundidos pelo sistema de Langendorff com solução nutritora de Krebs-Ringer.

Após 40 minutos de estabilização foi realizada infusão em bolus (1mL) de Ach e Iso na concentração de 10^{-6} M, com intervalo de 5 minutos entre as aplicações.

A FC foi mensurada mediante a administração de ACh e Iso para que pudéssemos avaliar a resposta dos receptores β -adrenérgicos e dos receptores colinérgicos.

3.2.11. Análise Morfométrica

A hipertrofia cardíaca foi verificada através de dois métodos: índice de massa cardíaca e análise microscópica (Ferreira *et al.*, 2007). Foram selecionados cinco animais de cada grupo para avaliação da hipertrofia cardíaca usando o índice de massa cardíaca e cinco animais de cada grupo para a avaliação microscópica.

Ao final da perfusão, os corações foram dissecados em ventrículo esquerdo (VE), ventrículo direito (VD) e átrios. Em seguida, as câmaras foram pesadas e os pesos dos corações e das câmaras serão corrigidos pelo peso corporal (mg/g). Os VE serão mantidos em fixador (formalina neutro-tamponada 10%) por 24 horas. Ao completar vinte e quatro horas no fixador, os VE foram retirados e divididos. Os cortes corados pela hematoxilina e eosina (HE) foram submetidos à análise morfométrica dos cardiomiócitos.

A hipertrofia cardíaca foi analisada em cortes transversais de ventrículos esquerdos (4 mm) corados com hematoxilina e eosina, como detalhado na tabela 5. O diâmetro dos miócitos foi avaliado em dois cortes por animal usando um micromedidor ocular adaptado ao microscópio de luz (BX 60, Olympus) com 400x de magnificação. Somente cardiomiócitos cortados

longitudinalmente com núcleo e limites celulares visíveis foram analisados (aproximadamente 30 cardiomiócitos por corte). O diâmetro de cada miócito foi medido na região correspondente ao núcleo. A tabela 5 descreve resumidamente o protocolo utilizado no processo de inclusão dos tecidos.

Tabela 5: Descrição dos procedimentos realizados para o processo de inclusão dos tecidos.

DESPARAFINIZAÇÃO	Xilol 1 (30 min, temperatura ambiente)
	Xilol 2 (15 min, temperatura ambiente)
	Xilol 3 (15 min, temperatura ambiente)
HIDRATAÇÃO	Álcool absoluto 1 (2 min, temperatura ambiente)
	Álcool absoluto 2 (2min, temperatura ambiente)
	Álcool absoluto 3 (2 min, temperatura ambiente)
	Álcool 90% (2 min, temperatura ambiente)
	Álcool 80% (2 min, temperatura ambiente)
	Álcool 70% (2min, temperatura ambiente)
Lavagem das lâminas	Água corrente, 20 min, temperatura ambiente

Solução de Hematoxilina	1 min, temperatura ambiente
Lavagem das lâminas:	Água corrente, 20 min, temperatura ambiente.
Solução de Eosina:	40 seg, temperatura ambiente
DESIDRATAÇÃO	Álcool 70% (1min, temperatura ambiente)
	Álcool 80% (1min, temperatura ambiente)
	Álcool 90% (1min, temperatura ambiente)
	Álcool 95% (1min, temperatura ambiente)
	Álcool absoluto 1 (1min, temperatura ambiente)
	Álcool 2 (1min, temperatura ambiente)
	Álcool 3 (1min, temperatura ambiente)
Montagem das lâminas:	Xilol 1 (2 min, temperatura ambiente)
	Xilol 2 (2 min, temperatura ambiente)
	Xilol 3 (10 min, temperatura ambiente)

3.3. Análise estatística

Todos os parâmetros avaliados foram representados como média \pm erro padrão da média (EPM). Para a análise estatística dos resultados dos corações isolados foram realizados os testes ANOVA *Two-way*, seguido do pós-teste de

Bonferroni. O peso dos animais foi avaliado através do Teste ANOVA *One-way* seguido de Newman-Keuls.

Para análises da PAS, FC, intervalo QT, peso do coração, dosagens bioquímicas e análise morfométrica foi utilizado o teste *t*-student não pareado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Os cálculos e análises estatísticas foram realizados utilizando-se o programa Graph Pad Prism 4.0.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Peso dos animais

Para avaliar se os animais tratados com dieta hipercalórica estavam aumentando de peso ao longo de cinco e dez semanas, em relação aos animais controle, o peso desses animais foram mensurados a cada semana de tratamento.

A figura 7 mostra o peso dos animais do grupo controle e dos tratados durante cinco semanas. Podemos observar o aumento do peso do grupo controle e do grupo tratado quando avaliado entre o início e o término do tratamento. Quando avaliado o peso dos animais ao término do tratamento, percebemos um maior aumento do peso dos animais tratados em relação aos animais controles.

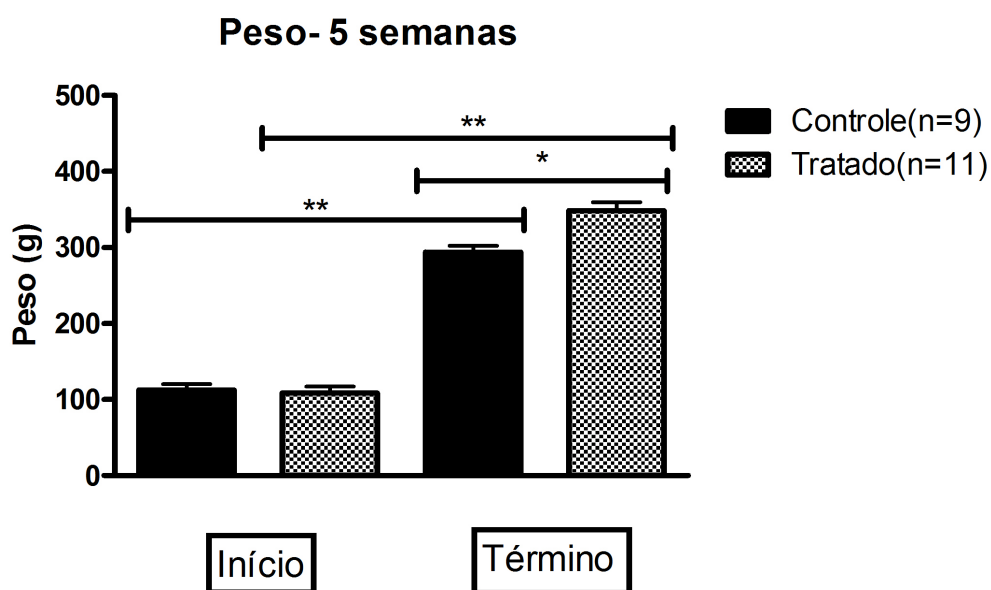


Figura 7: Peso dos animais controle e dos tratados durante cinco semanas. Os valores representam a média \pm EPM * $P < 0,01$; ** $P < 0,05$ comparado ao controle (Teste ANOVA *One-way* seguido de Newman-Keuls).

A figura 8 mostra o peso dos animais controle e dos tratados durante dez semanas. Podemos também observar, assim como no grupo de cinco semanas, o aumento do peso dos animais controles e dos animais tratados, quando avaliado entre o início e o término do tratamento. Quando avaliado o peso ao término do tratamento, percebemos um maior aumento de peso dos animais tratados quando comparados com seus respectivos controles.

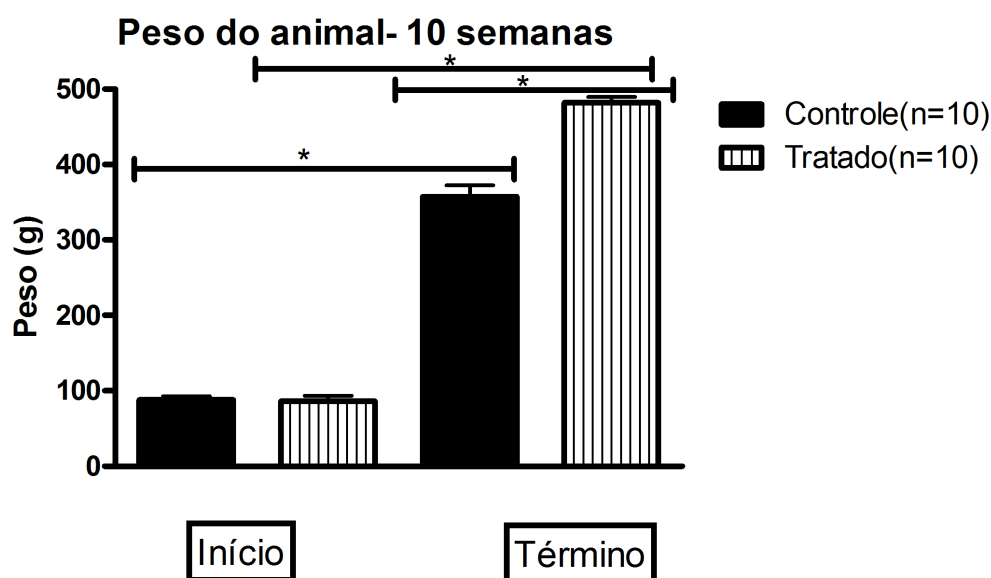


Figura 8: Peso dos animais controle e dos tratados durante dez semanas. Os valores representam a média \pm EPM * $P < 0,01$ comparado ao controle (Teste ANOVA *One-way* seguido de Newman-Keuls).

4.2. Parâmetros Bioquímicos

As figuras 9, 10 e 11 mostram os níveis séricos de glicose, colesterol total e TAG dos grupos estudados, respectivamente. Não foi observado variações nos níveis séricos de glicose e colesterol total dos grupos tratados durante cinco (Fig. 9A e Fig. 10A) e dez semanas (Fig.9B e Fig. 10B) em relação aos seus respectivos controles.

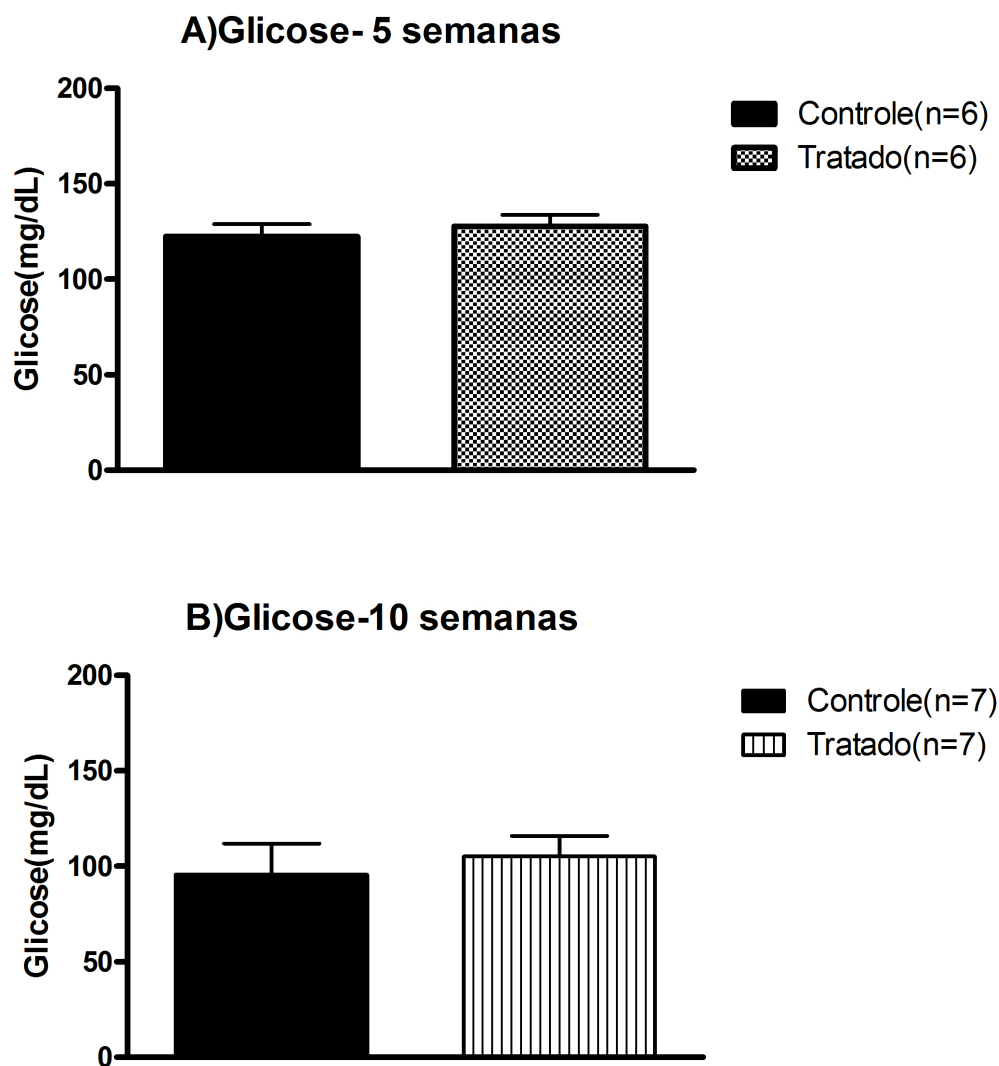


Figura 9: Níveis séricos de glicose dos animais do grupo controle e tratados durante cinco (A) e dez semanas (B).

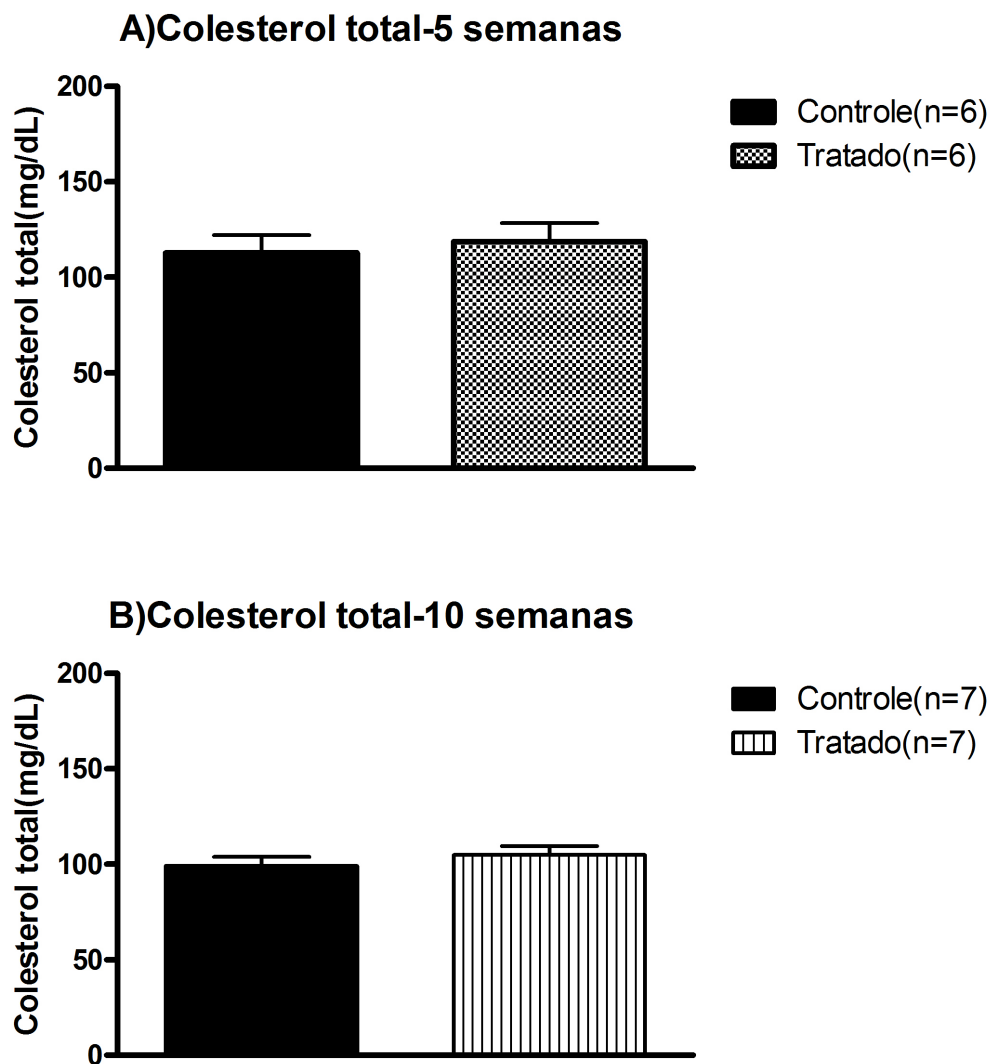


Figura 10: Níveis séricos de colesterol total dos animais do grupo controle e tratados durante cinco (A) e dez semanas (B).

Já o tratamento dos animais durante cinco (Fig.11A) e dez semanas (Fig.11B) aumentaram a concentração de TAG em relação aos animais controles.

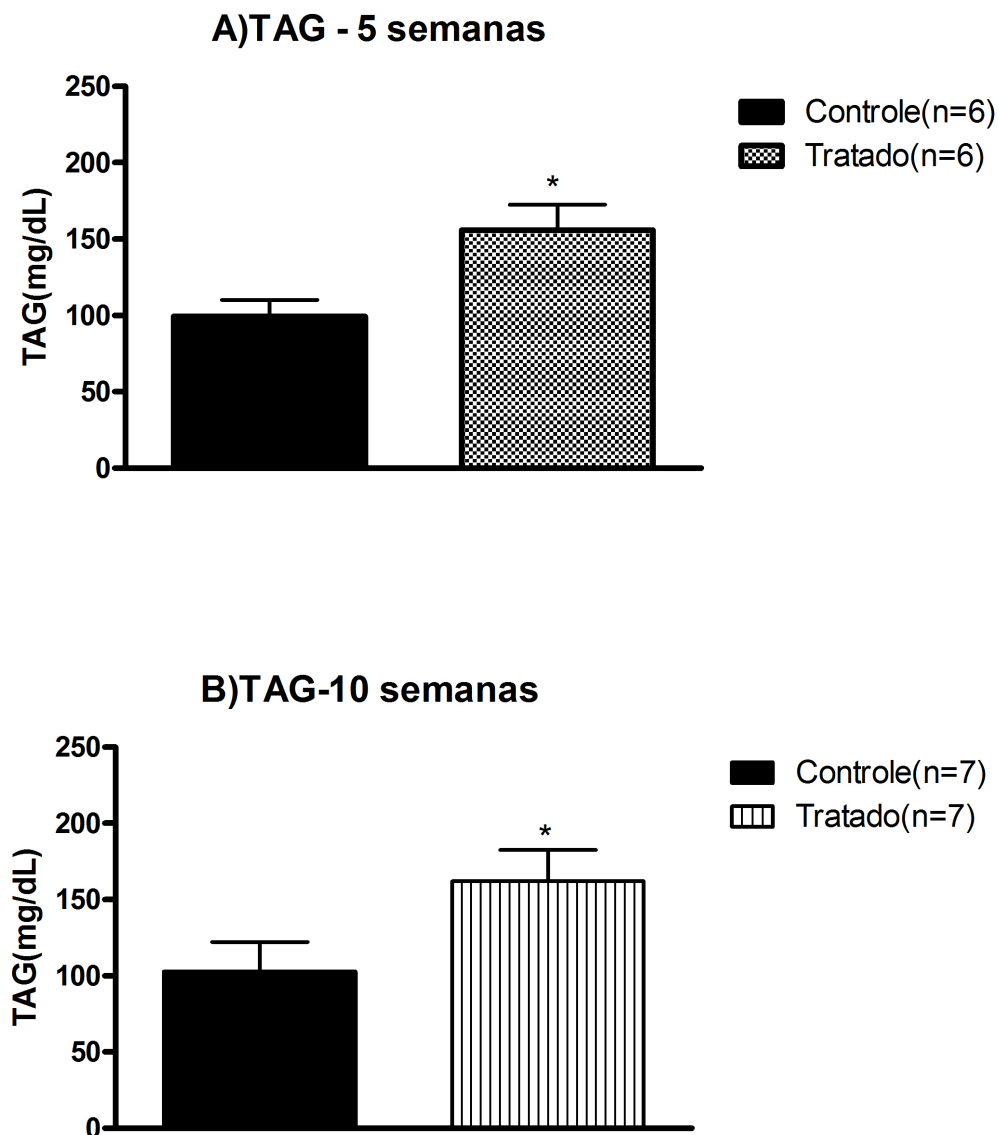


Figura 11: Níveis séricos de TAG dos animais do grupo controle e tratados durante cinco (A) e dez semanas (B). Os valores representam a média \pm EPM * $P < 0,05$ comparado ao controle (Teste t de Student).

4.3. Avaliação da pressão arterial sistólica em ratos anestesiados

A pressão arterial sistólica aferida por peltismografia não apresentou diferença significativa entre os animais controles e os animais tratados durante cinco e dez semanas (Fig. 12).