

NEREIDA KILZA DA COSTA LIMA

**SOBRECARGA SALINA CRÔNICA EM RATOS WISTAR
ELEVA A PRESSÃO ARTERIAL E AUMENTA O
METABOLISMO DA GLICOSE, SEM MODIFICAR A
SENSIBILIDADE À INSULINA.**

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

**SÃO PAULO
1995**

NEREIDA KILZA DA COSTA LIMA

**SOBRECARGA SALINA CRÔNICA EM RATOS WISTAR
ELEVA A PRESSÃO ARTERIAL E AUMENTA O
METABOLISMO DA GLICOSE, SEM MODIFICAR A
SENSIBILIDADE À INSULINA.**

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

Área de concentração: Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Joel C. Heimann

SÃO PAULO
1995

**Aos meus pais e irmãos,
pelos ensinamentos de vida, incentivo e apoio.**

**Ao Moisés,
que, desde o início, esteve ao meu lado,
em todos os sentidos.**

**À Luísa, minha filha,
pelas horas que eram só suas.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Joel Claudio Heimann**, pela orientação sempre coerente e amiga, em tempo integral, que preparou-me para a realização deste trabalho e para a continuação do meu desenvolvimento científico.

Ao Prof. Dr. **Fabio Bessa Lima** e à Prof^a. Dr^a. **Naomi Shionomiya Hell**, pela co-orientação fundamental para a realização desta tese e por terem tornado possível nossa ampla utilização do Laboratório de Endocrinologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) - USP.

À bióloga **Elisabete Alcântara dos Santos**, pela parceria constante em todos os procedimentos e pelas dosagens de eletrólitos e creatinina.

Ao técnico **Walter Campestre**, pela dedicação no cuidado diário dos animais que participaram dos experimentos realizados.

A todos os membros do Laboratório de Endocrinologia do ICB-USP, especialmente à bióloga **Maristela Mitiko Okamoto**, à pós-graduanda **Dóris Hissako Matsushita** e ao técnico **Manuel José de Oliveira**, pela disposição em colaborar nas várias etapas deste trabalho, além das dosagens de glicose e insulina.

Ao Prof. Dr. **Romeu Rodrigues de Souza**, às biólogas **Deolinda Maria Cardoso de Sequeira** e **Elisabete Aparecida dos Santos Menah**, à patologista Dr^a **Denise Maria Avancini Costa Malheiros** e à técnica **Marinete Miristene dos Santos**, pela participação solícita neste trabalho.

Aos professores, pós-graduandos e funcionários do Laboratório de Fisiopatologia Renal e do Serviço de Nefrologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina - USP, pelo interesse e amizade demonstrados.

Ao Prof. Dr. **Urbano Pasini**, Ex-Diretor do Centro de Saúde Escola “Geraldo de Paula Souza” da Faculdade de Saúde Pública - USP, e ao Prof. Dr. **Cláudio Gastão Junqueira de Castro**, atual Diretor desta instituição, pela atenção e apoio dados.

À **FAPESP, FINEP, CAPES e SANDOZ Foundation for Gerontological Research**, pelo apoio financeiro e à **Biobrás Bioquímica do Brasil S.A.**, pelo fornecimento gratuito de insulina.

Aos animais de laboratório, por sua participação essencial nos caminhos dos homens.

À inspiração divina e àqueles que envelhecem, esperando que este estudo possa, de alguma forma, ser luz.

SUMÁRIO

Resumo

1	INTRODUÇÃO	1
2	MATERIAIS E MÉTODOS	5
2.1	Protocolo experimental	5
2.2	Procedimentos realizados	6
2.2.1	Pressão arterial caudal (PAc) e peso	6
2.2.2	Gaiola metabólica	7
2.2.3	Teste de tolerância à glicose intravenoso (ivGTT)	7
2.2.4	Estudos “in vitro”	8
2.2.4.1	Isolamento de adipócitos	8
2.2.4.2	Captação de 2-deoxi-D-glicose (2-DG)	9
2.2.4.3	Oxidação de glicose	10
2.2.4.4	Incorporação de glicose em lípidos	11
2.2.4.5	Densidade e afinidade de receptores de insulina	12
2.2.5	Teste de tolerância à insulina (ITT)	13
2.3	Determinações bioquímicas	14
2.4	Tratamento estatístico e cálculos	15
3	RESULTADOS	17
4	DISCUSSÃO	39
4.1	Materiais e métodos	39

4.2	Resultados	42
5	CONCLUSÕES	55
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
	Summary	

Resumo

Durante o processo de envelhecimento humano, há aumento da pressão arterial e da prevalência de distúrbios do metabolismo de carboidratos, tais como: resistência à ação da insulina na captação de glicose, intolerância à glicose e diabetes mellitus tipo II. Questiona-se a existência de uma associação de causa-efeito entre hipertensão arterial e resistência à insulina ou se apenas há concomitância eventual entre os dois fenômenos, com potencial ação amplificadora de um sobre o outro. Por outro lado, sabendo-se que o sal participa do aumento pressórico com a idade, torna-se importante o conhecimento de seu papel na sensibilidade à insulina durante o envelhecimento. O objetivo deste estudo, portanto, foi avaliar o papel do sal na pressão arterial, metabolismo da glicose e resistência à insulina durante o envelhecimento de ratos. Utilizaram-se ratos Wistar machos que foram submetidos, logo após o desmame, à dieta hipossódica (0,15% de NaCl) ou hipersódica (7,94% de NaCl) mantidas até 72 semanas de idade. Em um subgrupo de animais em cada dieta, procedeu-se à inversão das mesmas após 48 semanas de vida. Em animais jovens e idosos, procedeu-se à medida da pressão arterial, peso, massa renal e ventricular esquerda, ao teste de tolerância à glicose intravenoso, ao teste de tolerância à insulina e aos estudos "in vitro" de captação e metabolização da glicose, além da

avaliação da densidade de receptores em adipócitos isolados. Houve maior pressão arterial em dieta hipersódica ao longo do tempo ($p=0,017$), mas a mesma não se elevou com a idade ($p=0,994$). O peso foi maior sob restrição salina, elevando-se com a idade ($p<0,001$). A massa renal e a massa ventricular esquerda foram maiores em dieta hipersódica. As elevações da pressão, massa renal e ventricular esquerda foram revertidas com a inversão de dietas. Observou-se menor insulinemia no teste de tolerância à glicose em vigência de sobrecarga salina. Entretanto, a sensibilidade à insulina foi igual entre dietas em ratos jovens (verificada em adipócitos isolados) e em ratos velhos (verificada no teste de tolerância à insulina). A captação e metabolização da glicose foram maiores em adipócitos de ratos em dieta hipersódica, devido a uma maior entrada de glicose independente da ação da insulina. A densidade de receptores de insulina também foi maior neste grupo, talvez por uma “upregulation”, a partir da menor insulinemia. Com a idade, a tolerância à glicose diminuiu, sendo, no entanto, maior no grupo em sobrecarga salina, talvez pela existência da maior captação basal de glicose neste grupo. Concluindo-se, o presente estudo evidenciou maior pressão arterial em dieta hipersódica, sem haver diferença na sensibilidade à insulina em relação à restrição salina, seja em animais jovens ou idosos. Neste modelo, portanto, não houve associação entre maior pressão arterial e resistência à insulina. Ocorreu, no entanto, maior captação insulino-independente de glicose associada à sobrecarga salina, fato desconhecido até o momento.

Summary

During the human aging process, it is observed an increase in arterial pressure and a higher prevalence of carbohydrate metabolism disorders, like insulin resistance on glucose uptake, glucose intolerance, and diabetes mellitus type II. It is an open question if there is a cause-effect association between hypertension and insulin resistance or if there is only an eventual concomitance between the two phenomena, with potential amplifier action of each other. On the other hand, as salt takes part in the blood pressure increase along lifetime, it is important to know its role on insulin sensitivity during aging. The purpose of the present study was to evaluate the salt effect on arterial pressure, glucose metabolism, and insulin resistance in rats during aging. Male Wistar rats were fed, from weaning, with a low (NaCl 0,15%) or high salt (NaCl 7,94%) diet until they were 72 weeks old. A subgroup of animals on each diet had their diets inverted after the 48th week of age. In young and old animals, arterial blood pressure, weight, kidney and left ventricular mass were measured; intravenous glucose tolerance test, insulin tolerance test, "in vitro" studies (glucose uptake and metabolism, and insulin receptors density) were evaluated. Blood pressure was increased on high salt diet during the whole study ($p=0.017$), without a time effect ($p=0.994$). The weight was higher on salt restriction, rising during the aging

process ($p < 0,001$). Kidney and left ventricular mass were higher on high salt diet. Blood pressure, kidney and left ventricular mass increases were reverted with the inversion of diets. Lower insulin levels were observed on high salt diet during intravenous glucose tolerance test. However, insulin sensitivity was the same on both diets in young (noticed in the isolated adipocytes study) and also in old rats (noticed in the insulin tolerance test). The glucose uptake and metabolism were higher on high salt diet due to an insulin-independent glucose uptake. Insulin receptor density was higher also on high salt diet, perhaps by an upregulation due to the lower insulin levels. Along aging, glucose tolerance decreased on both diets, but it was higher in the group under salt overload, perhaps due to the higher basal glucose uptake in this group. In conclusion, higher blood pressure on high salt diet, with no differences of insulin sensitivity between high and low salt diet, were observed either in young or old rats. In this model, therefore, there was no association between blood pressure levels and insulin resistance. A higher insulin-independent glucose uptake was associated to salt overload, what was not previously reported.

1- INTRODUÇÃO

No homem, durante o processo de envelhecimento, há aumento da pressão arterial^{1,2} e da prevalência de distúrbios do metabolismo de carboidratos, ou seja, da resistência à insulina com hiperinsulinemia secundária, da intolerância à glicose e do diabetes mellitus tipo II³. Entenda-se resistência à insulina como o estado no qual tem-se menor ação periférica da mesma na captação de glicose⁴.

Vários estudos demonstram a associação de hipertensão arterial com resistência à insulina. WELBORN et al⁵. correlacionaram, pela primeira vez, em 1966, hipertensão arterial essencial com maiores insulinemias obtidas durante testes de tolerância à glicose. Posteriormente, surgiram evidências epidemiológicas⁶ e clínicas⁷ deste vínculo. Observa-se, em revisões sobre o assunto, que a hipertensão arterial essencial é mais prevalente em pacientes com alterações do metabolismo da glicose⁸. Por outro lado, pacientes hipertensos primários, mesmo não obesos, tendem a apresentar maior resistência à captação de glicose mediada pela insulina, com hiperinsulinemia secundária e hipertrigliceridemia^{9,10}. Em modelos de hipertensão animal, como o rato espontaneamente hipertenso (SHR)¹¹ e o rato Dahl sal-sensível¹², também verifica-se diminuição da sensibilidade à insulina, com menor captação de glicose

em adipócitos isolados destes animais.

Tem-se questionado se a elevação da pressão arterial ao longo da vida poderia ser secundária à hiperinsulinemia. O efeito hipertensínógeno da insulinemia elevada é atribuído ao aumento da reabsorção renal de sódio, estimulação do sistema nervoso simpático, alterações na concentração intracelular de íons com elevação de cálcio e diminuição de magnésio, além de proliferação das células musculares lisas vasculares subintimais^{8,9,13}. Em modelos experimentais, utilizando-se ratos Sprague-Dawley, pode-se obter hipertensão induzida por dieta rica em carboidratos, com hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia, sendo que o ganho de peso é semelhante ao dos animais normotensos em dieta padrão¹⁴. Atribuindo o efeito primário ou desencadeador de hiperinsulinemia, intolerância à glicose, alterações lipídicas e hipertensão arterial à resistência à insulina, REAVEN¹⁵ deu o nome de Síndrome X a esta associação de fatores de risco cardiovasculares.

Alternativamente, é proposto que a elevação da pressão arterial seja a alteração primária do binômio hipertensão-resistência à insulina. Devido à hipertensão ocorrem constrição arteriolar, rarefação de capilares e redução do fluxo sanguíneo na musculatura esquelética, o que acarretaria diminuição do aporte da insulina e conseqüente menor ação da mesma nestes tecidos^{16,17}. Apoiando esta proposição, observa-se a co-existência de hipertensão arterial e menor número de fibras do tipo 1 (ricamente vascularizadas e sensíveis à insulina) nos músculos esqueléticos¹⁷. Por outro lado, sabe-se que a elevação da pressão arterial ao longo da vida depende da quantidade de sal consumido, havendo

aumento discreto da pressão arterial, ou mesmo ausência de elevação, em populações com reduzida ingestão salina^{18,19}. Faz-se a hipótese, portanto, de que o aumento pressórico desencadeado pelo excesso de ingestão salina seja responsável pelo aparecimento de alterações na sensibilidade à insulina.

Verificam-se, ainda, em indivíduos normotensos, filhos de hipertensos, em relação àqueles sem antecedentes de hipertensão na família, menor sensibilidade à insulina²⁰ e níveis mais elevados de pressão arterial²¹, mesmo não sendo ainda considerados hipertensos pelos critérios atuais²². Esta concomitância de fenômenos sugere uma possível base intrínseca (genética) para a associação entre a resistência à insulina e a elevação da pressão arterial num mesmo indivíduo²³, sem necessariamente haver uma relação causal entre ambas, podendo existir ação amplificadora da hiperinsulinemia sobre a hipertensão e/ou desta última sobre a resistência à insulina¹⁶.

Apesar de todas as possíveis formas de associação entre hipertensão arterial e resistência à insulina recém - expostas, este vínculo não é um fenômeno de reconhecimento uniforme na literatura pertinente. Existem estudos cujos resultados são desfavoráveis à presença desta associação, tanto em humanos²⁴, como em animais²⁵.

Sabe-se que a resistência à insulina sofre influência de diversos fatores, entre os quais a angiotensina II²⁶, o conteúdo salino da dieta²⁷, a idade²⁸, a etnia²⁹, etc. Talvez a variabilidade destes fatores seja uma explicação para os diferentes resultados observados nos trabalhos que estudaram o vínculo entre resistência à insulina e hipertensão arterial. Por exemplo, se dois estudos que avaliem a

resistência à insulina em grupos semelhantes de indivíduos ou animais, utilizarem dietas com diferentes conteúdos salinos, os resultados obtidos podem ser diferentes.

Outro aspecto que pode influenciar a falta de uniformidade dos resultados obtidos é o relativo a questões de metodologia. Resistência à insulina tem sido quantificada de diversas maneiras, a saber: 1. teste de tolerância à glicose oral ou intravenoso, com dosagens concomitantes de insulina^{30,31}; 2. “clamp” euglicêmico hiperinsulinêmico com doses variáveis de insulina³²; 3. teste de supressão de insulina³³; 4. estudo de captação de glicose em células isoladas^{11,12}; etc. Tal diversidade de metodologias pode explicar a variabilidade nos resultados, principalmente porque se desconhece se os diversos métodos medem o mesmo fenômeno.

De acordo com o exposto, vários são os aspectos ainda não esclarecidos na temática hipertensão arterial e resistência à insulina. Em vista disto, o objetivo do presente estudo foi avaliar, durante o processo de envelhecimento de ratos não geneticamente hipertensos, a pressão arterial, a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina, em situações de restrição e sobrecarga de sal.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Protocolo experimental

Utilizaram-se 96 ratos Wistar albino machos, que, imediatamente após o desmame (com cerca de 21 dias), foram divididos em 2 grupos: o grupo HO, que foi alimentado com dieta hipossódica (0,15% de NaCl - Harlan Teklad, Madison-WI/USA) e o grupo HR, que recebeu dieta hipersódica (7,94% de NaCl). A partir da 48^a semana, parte dos animais do grupo HO tiveram sua dieta alterada para a hipersódica, recebendo a denominação B HR, e parte do grupo HR, para a hipossódica, recebendo a denominação B HO. Os ratos foram acondicionados em gaiolas com 4 animais, recebendo ração e água potável “ad libitum”, em ambiente mantido a 25°C, com ciclos noite-dia fixos (12/12 horas).

Analisaram-se 8 subgrupos de 12 animais, assim distribuídos:

- com 12 semanas de vida, em dieta hipossódica (12 HO);
- com 12 semanas de vida, em dieta hipersódica (12 HR);
- com 48 semanas de vida, em dieta hipossódica (48 HO);
- com 48 semanas de vida, em dieta hipersódica (48 HR);
- com 72 semanas de vida, em dieta hipossódica (72 HO);
- com 72 semanas de vida, em dieta hipersódica (72 HR);
- com 72 semanas de vida, em dieta hipossódica até a 48^a semana de idade e em dieta hipersódica no período restante (72B HR);
- com 72 semanas de vida, em dieta hipersódica até a 48^a semana de ida-

de e em dieta hipossódica no período restante (72B HO).

Os subgrupos acima foram submetidos à medida da pressão arterial, peso, massa renal e massa ventricular esquerda, ao estudo em gaiola metabólica, ao teste de tolerância à glicose intravenoso com dosagens de insulina, aos estudos “in vitro” em adipócitos (captação e metabolização da glicose e determinação da densidade e afinidade dos receptores de insulina) e ao teste de tolerância à insulina, que são detalhados a seguir.

O esquema do protocolo encontra-se na página 16 (Fig. 1).

2.2- Procedimentos realizados

2.2.1- Pressão arterial caudal (PAc) e peso

Estes parâmetros foram avaliados nos 8 subgrupos de animais. Além destas medidas, realizou-se um acompanhamento longitudinal, mês a mês, a partir de 7 semanas de idade, para o qual foram utilizados ratos dos subgrupos 48 HO e 48 HR (de 7 a 48 semanas de idade) e dos subgrupos 72 HO e 72 HR (de 52 a 72 semanas de idade). A pressão arterial caudal foi medida por método auscultatório-oscilométrico, sendo que os valores obtidos correspondem à pressão arterial média³⁴. As medidas foram realizadas em animais acordados, e considerou-se apenas aquelas obtidas em condição de ausência de movimentação espontânea da cauda do animal. Utilizou-se a média de 3 aferições consecutivas, que não diferiam mais do que 5 mmHg da média encontrada.

2.2.2- Gaiola metabólica

Três a 7 dias após a medida da pressão caudal e do peso, 7 a 12 animais de cada subgrupo foram colocados em gaiola metabólica com ração e água, por 24 horas, para determinação da diurese (V) e da excreção urinária de creatinina (UCrV), sódio (UNaV) e potássio (UKV). Através de incisão caudal obteve-se, ao término destas 24 horas, uma amostra de sangue de 1,0 ml para dosagem de creatinina (PCr), sódio (PNa) e potássio (PK) plasmáticos. Calculou-se o “clearance” de creatinina (CICr) a partir dos dados obtidos.

2.2.3- Teste de tolerância à glicose intravenoso (ivGTT)

Este teste foi realizado de 3 a 7 dias após o estudo em gaiola metabólica, em 6 animais de cada subgrupo, em todas as idades, iniciando-se o mesmo às 8:00 da manhã. Os animais, submetidos a jejum prévio de 16 horas, foram anestesiados com pentobarbital (40 mg/kg) intra-peritoneal e submetidos a cateterização da veia jugular direita. Colheu-se amostra de 0,5 mL de sangue para dosagens de glicose e insulina plasmática de jejum. Em seguida, foi injetada, pelo catéter venoso, solução glicosada 50%, na dose de 1,0 mL/kg e procedeu-se à lavagem do catéter com solução salina fisiológica com heparina (20 U/mL). Coletas de sangue aos 5, 15, 30 e 60 minutos foram realizadas para que fossem feitas as mesmas dosagens citadas no tempo zero. A reposição de volume foi realizada com a mesma solução salina com heparina. O catéter foi retirado ao final do experimento, a veia jugular ocluída e a incisão cervical suturada.

2.2.4- Estudos “in vitro”

Uma semana após o estudo “in vivo,” os animais foram sacrificados, sem jejum prévio, às 8:00 horas da manhã, por decapitação, para isolamento de adipócitos da gordura epididimal e para determinação da massa renal direita e da ventricular esquerda. O sangue coletado em seringa com EDTA, após a decapitação, foi utilizado para a dosagem da atividade de renina plasmática (ARP). Com os adipócitos isolados, foram feitos os estudos de captação e oxidação de glicose e incorporação de glicose em lípidos, além da determinação da densidade e da afinidade dos receptores de insulina, os quais serão descritos a seguir.

2.2.4.1- Isolamento de adipócitos

Para a realização dos estudos “in vitro”, foi necessário, inicialmente, proceder ao isolamento de adipócitos.

Após o sacrifício dos animais, a cavidade abdominal foi aberta para a retirada do tecido gorduroso epididimal. De acordo com o método descrito por RODBELL³⁵, este tecido, fragmentado com tesoura, foi mergulhado em solução (pH 7,4, 37°C) composta por colagenase, tampão (HEPES 25 mM) e um meio de cultura (Dulbecco's MEM 1,5 mg/mL e soro albumina bovina-BSA- 4%), sendo esta preparação incubada em banho a 37°C, sob agitação contínua (150 r.p.m.), durante 50 minutos. Ao final deste tempo, o tecido digerido foi filtrado, e os adipócitos coletados foram lavados três vezes com a solução (pH 7,4, 37°C) HHB (HANKS/ HEPES 20 mM/ BSA 1%), contendo 1,0 mM de piruvato de sódio. O

lipócrito da suspensão final foi realizado, permitindo ressuspender os adipócitos na concentração de 5%, quando usualmente obtém-se cerca de 2 a $3 \cdot 10^5$ células/mL. O número de células e o volume celular foi determinado de acordo com DI GIROLAMO et al.³⁶.

2.2.4.2- Captação de 2-deoxi-D-glicose (2-DG)³⁷

Alíquotas de 450 μ L foram retiradas da suspensão acima (com 5% de adipócitos) e transferidas para tubos de ensaio de poliestireno contendo 25 μ L de soluções de insulina em diferentes concentrações (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 10,0 e 25,0 ng/mL). Após 30 minutos de incubação, acrescentou-se 2-DG (glicose modificada que, após captação, é metabolizada somente até 2-DG-6-P) marcada com trício (0,15 μ Ci por tubo, concentração final = 0,1 mM) e transferiram-se alíquotas de 200 μ L destas preparações para microtubos de 400 μ L contendo 100 μ L de óleo de silicone. Exatamente após 3 minutos, interrompeu-se a captação através de centrifugação (11.000 r.p.m. por 6 segundos). A camada superior, que continha as células, ficou separada do tampão pelo óleo e assim foi possível retirar-se os adipócitos e transferí-los para tubos de cintilação, obtendo-se a radioatividade em d.p.m. (contador beta Beckman Instruments Inc., modelo LC6000IC - Fullerton, CA, USA).

Após a incubação com insulina, em um tubo a parte, adicionou-se L-[1- C^{14}]-glicose, que não é captada pelas células, ao invés de 3H -2-DG. Assim, o valor obtido foi descontado de cada tubo-teste, pois a L-glicose funcionou como marcadora da distribuição extra-celular e da captação inespecífica da 2-DG.

Os resultados obtidos foram normalizados por unidade de área de superfície celular e utilizados para a construção de curvas sigmóides, utilizando-se o programa “Graphpad Inplot 4.03”, a partir das quais foram calculadas a captação basal (Capt B) de 2-deoxi-D-glicose, que ocorreu no tubo sem insulina, a captação máxima (Capt Máx), em vigência do uso de insulina, e a Ec50, que é a concentração de insulina responsável por metade da captação máxima de 2-deoxi-D-glicose.

2.2.4.3- Oxidação de glicose³⁸

Os adipócitos obtidos foram lavados e ressuspensos na seguinte solução: NaCl 131,2 mM, KCl 4,7 mM, CaCl₂ 2,1 mM, MgSO₄ 1,5 mM, NaHCO₃ 24,6 mM, KH₂PO₄ 1,1 mM, glicose 2,0 mM e 1% de BSA, em pH 7,4, a 37°C, submetida previamente a fluxo contínuo de uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂. Retiraram-se alíquotas de 900 µL desta preparação, que foram transferidas para tubos plásticos de cintilação de 20 mL contendo 100 µL de tampão, com ou sem insulina (concentração final de 0 ou 50 ng/mL), e D-[¹⁴C]-glicose (concentrações finais de 0,1 µCi/mL e 5 mM de glicose). Os tubos receberam a mistura gasosa de 95% de O₂ e 5% de CO₂, sendo fechados e incubados por 60 minutos, a 37°C, em banho com agitação contínua. Após a incubação, adicionaram-se 300 µL de H₂SO₄ 8M à mistura. O ¹⁴CO₂ liberado das células foi coletado por absorção em papel de filtro (Whatman número 2), previamente impregnado com etalonamina, que estava alojado em um pequeno recipiente plástico na parte superior do tubo. Estes papéis de filtro foram transferidos para tubos de cintilação de vidro e

submetidos à contagem da radioatividade, como descrito anteriormente (item 2.2.4.2). Obtiveram-se, portanto, a oxidação de glicose basal (Oxid B), ou seja, realizada na ausência de insulina, e a oxidação máxima (Oxid Máx), obtida em vigência de insulina na preparação.

2.2.4.4- Incorporação de glicose em lípidos³⁸

Para este procedimento, utilizaram-se os mesmos tubos plásticos de cintilação do ensaio de oxidação de glicose, após coletado o $^{14}\text{CO}_2$ da mistura, para realizar a extração de lípidos. A extração foi feita com o reagente de Dole's (isopropanol:n-heptano: H_2SO_4 a 4,0:1,0:1,0, vol:vol:vol)³⁹. Desta forma, obtiveram-se, na parte superior do tubo, os lípidos diluídos no heptano, possibilitando a pipetagem de alíquotas, que foram transferidas para tubos de cintilação de vidro. Após a contagem da radioatividade, realizada como descrito anteriormente (item 2.2.4.2), calculamos a incorporação basal de glicose em lípidos (Incorp B), que ocorreu na ausência de insulina, e a incorporação máxima de glicose em lípidos (Incorp Máx), na vigência de insulina.

2.2.4.5- Densidade e afinidade de receptores de insulina⁴⁰

Os adipócitos isolados foram lavados e ressuspensos em HHB (pH 7,8, 16°C) na concentração de 10%, e alíquotas de 450 μL foram transferidas para tubos de ensaio plásticos, acrescidas de 25 μL de monoiodo ^{125}I -insulina (insulina de porco, monocomponente-Biobrás, 0,2 ng/mL e 20.000 c.p.m./tubo) e de 25 μL de solução com concentração crescente de insulina fria, de modo a obter-se

concentrações finais de insulina de: 0,2; 100 e 5000 ng/mL. Incubou-se a mistura a 16°C por 3 horas (temperatura que praticamente impede a internalização do complexo insulina-receptor, havendo apenas a ligação de insulina nos receptores da membrana). Ao final deste tempo, realizaram-se a centrifugação de alíquotas em óleo de silicone, a transferência da camada superior de adipócitos para tubos de ensaio e a contagem da radioatividade incorporada (contador gama Abbott Laboratories, modelo AutoLogic - North Chicago, IL, USA).

A partir destas contagens, calcularam-se a quantidade de hormônio ligado e a relação hormônio ligado/hormônio livre. O número de receptores de insulina na preparação estudada foi obtido através da análise de dados de SCATCHARD⁴¹. Construiu-se o gráfico: relação entre insulina ligada e insulina livre (eixo y) versus insulina ligada (eixo x). Obteve-se uma reta cuja intercepção com o eixo x, determinou o número de receptores. Posteriormente, foi calculado o número de receptores por área de membrana celular, ou seja, a densidade de receptores (R). A constante de dissociação para a reação hormônio-receptor (Kd), que avalia a afinidade desta reação (quanto maior o Kd, menor a afinidade), foi obtida através do mesmo gráfico acima descrito, sendo a tangente do ângulo entre a reta e o eixo x.

Na realização dos estudos “in vitro” com adipócitos isolados de animais idosos (48 e 72 semanas), foram encontradas dificuldades técnicas na manipulação do material, pois as células adiposas rompiam-se com facilidade. Optou-se, então, pela realização de outra metodologia, descrita a seguir.

2.2.5- Teste de tolerância à insulina (ITT)

Foram submetidos a este estudo os ratos com 72 semanas (com e sem inversão de dietas). Para a realização deste estudo, manteve-se o catéter venoso utilizado no ivGTT, que foi exteriorizado após seu término, perfundido diariamente com solução de heparina (20 U/mL) e preenchido, após cada perfusão, com solução de heparina (50 U/mL) e penicilina cristalina (100.000 U/mL). Setenta e duas horas após o ivGTT, sem jejum prévio, às 8:00 da manhã, com o animal anestesiado com pentobarbital intravenoso (20 mg/kg), colheu-se 0,4 mL de sangue para dosagem de glicose e injetou-se, a seguir, insulina na dose de 0,25 UI/kg. Novas amostras de 0,4 mL para dosagens de glicose foram colhidas após 10, 20, 60 e 90 minutos. O catéter venoso foi mantido até o dia do sacrifício, sem lavagens, somente para evitar nova manipulação do animal.

2.3- Determinações bioquímicas

A creatinina urinária e a plasmática foram dosadas pelo método de Heinegard - Tiderstrom modificado⁴².

O sódio e o potássio urinários e plasmáticos foram dosados através de espectrofotometria de chama (fotômetro de chama Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos, modelo FC 280 - São Paulo, SP, Brasil).

O sangue para determinação da glicose e da insulina plasmática foi

colhido em microtubos contendo 50 µl de heparina, acondicionados em gelo. Após centrifugação, o plasma foi armazenado a -20°C. A dosagem da glicemia foi realizada pelo método enzimático da glicose oxidase⁴³ e a da insulina plasmática, por método de radioimunoensaio⁴⁴.

A atividade de renina plasmática (ARP) foi determinada por radioimunoensaio, utilizando-se um “kit” comercial (INCSTAR Corporation - Stillwater, MN, USA).

2.4- Tratamento estatístico e cálculos

Todos os valores são expressos como média e desvio padrão da média.

Utilizou-se o teste “t” de Student para variáveis não pareadas, com distribuição bicaudal, para avaliar as diferenças entre as médias dos resultados obtidos nos grupos HO e HR. Este teste também foi aplicado na comparação da pressão arterial dos subgrupos 72 HO com 72B HO e 72 HR com 72B HR.

As áreas abaixo das curvas das glicemias (AG) e insulinemias (AI) obtidas nos ivGTTs de cada animal foram calculadas utilizando-se o programa “GraphPad InPlot - 4.03”. Obteve-se a relação entre estas áreas (AI/AG).

Utilizou-se a análise de variância de dois caminhos para avaliar as diferenças de médias no estudo longitudinal das AGs, AIs, AI/AGs, pressões arteriais e pesos.

Para o ITT, calculou-se a diferença entre as glicemias do tempo 10 e

tempo zero, bem como a diferença entre as glicemias do tempo 20 e tempo zero, para cada rato. Obteve-se a área acima da curva determinada por estas diferenças (ATTI), utilizando o mesmo programa acima mencionado.

Erro α menor do que 5% foi aceito para rejeitar a hipótese de nulidade.

3- RESULTADOS

As figuras referidas no texto encontram-se no final deste capítulo.

A pressão arterial caudal foi maior em ratos que recebiam dieta hipersódica, do que naqueles submetidos à restrição salina, nos momentos dos estudos com ratos de 12 e 72 semanas ($p < 0,001$ e $p = 0,003$, respectivamente) (Tab. 1). Tal diferença não foi observada na medida verificada na 48^a semana ($p = 0,211$). No entanto, observando-se as aferições mensais do estudo longitudinal (Tab. 1), vê-se que, numericamente, a PAc sempre foi maior no grupo HR e que, na maior parte das vezes, esta diferença foi significativa. Analisando-se estes dados obtidos em conjunto, ao longo do tempo, confirmou-se o efeito da dieta hipersódica em elevar a PAc (ANOVA, $p = 0,017$) (Fig. 2). Não foi observado nenhum efeito da idade sobre a pressão arterial em ambas as dietas (ANOVA, $p = 0,994$). Nos subgrupos que tiveram suas dietas invertidas após 48 semanas de

idade, observou-se maior pressão arterial na vigência da dieta hipersódica administrada tardiamente (72B HR- 159±18 mmHg), do que na situação de restrição salina, após longo período de sobrecarga (72B HO- 134±17 mmHg), sendo esta diferença significativa ($p=0,005$) (Tab. 1 e Fig. 3). A comparação entre os subgrupos 72 HO e 72B HO mostrou não haver diferenças entre as PAcS (125±13, n=7, 72 HO versus 134±17, n=11, 72B HO - $p=0,250$), o mesmo verificando-se entre os subgrupos 72 HR e 72B HR (162±23, n=7, 72 HR versus 159±18, n=9, 72B HR - $p=0,681$) (Fig. 3).

Tab. 1: Pressão arterial caudal (mmHg) de ratos Wistar submetidos à dieta hipossódica (HO) ou hipersódica (HR).

IDADE (semanas)	subg	HO			HR			p
		média	DP	n	média	DP	n	
7	48	113	9	12	121	12	12	0,096
12	12	119	7	12	142	11	12	<0,001
12	48	127	10	10	141	14	12	0,013
16	48	124	9	12	134	11	11	0,027
20	48	132	9	12	143	14	12	0,042
24	48	135	8	12	142	17	12	0,178
28	48	135	11	12	144	11	12	0,050
32	48	128	10	12	141	11	12	0,005
36	48	124	12	12	133	15	12	0,100
40	48	114	6	12	129	13	12	0,001
44	48	133	13	12	140	20	12	0,272
48	48	128	9	12	134	16	12	0,211
52	72	133	23	12	136	17	12	0,693
56	72	134	37	10	155	25	9	0,170
60	72	131	10	8	167	28	9	0,009
64	72	119	17	8	162	28	9	0,002
68	72	122	9	7	155	25	7	0,008
72	72	125	13	7	162	23	7	0,003
72 (B)	72B	134	17	11	159	18	9	0,005

B - ratos que tiveram suas dietas invertidas com 48 semanas de idade.

Subg - subgrupos, DP - desvio padrão, n - número de animais, p - HR vs. HO.

O valor de p foi calculado através do teste "t" de Student não pareado.

O peso encontrado foi maior nos ratos submetidos à restrição salina nas idades de 12 e 48 semanas ($p=0.013$ e $p=0,006$, respectivamente), não sendo esta diferença significativa com 72 semanas ($p=0.073$) (Tab. 2). A avaliação longitudinal dos dados apresentados confirmou maior peso no grupo HO (ANOVA, $p<0,001$) e elevação do mesmo, com a idade, nas duas dietas (ANOVA, $p<0,001$) (Fig. 2). Nos subgrupos 72B, com inversão de dietas após 48 semanas de vida, não se verificou diferença entre os pesos (658 ± 44 , $n=9$, HR versus 629 ± 81 , $n=11$, HO - $p=0,348$).

Tab. 2: Peso (g) de ratos Wistar submetidos à dieta hipossódica (HO) ou hipersódica (HR).

IDADE (semanas)	subg	HO			HR			p
		média	DP	n	média	DP	n	
7	48	186	17	12	170	18	12	0,038
12	12	373	34	12	340	25	12	0,013
12	48	358	42	12	326	19	12	0,022
16	48	433	56	12	384	22	12	0,009
20	48	465	54	12	407	25	12	0,003
24	48	524	80	12	431	28	12	0,001
28	48	551	90	12	443	31	12	<0,001
32	48	573	97	12	463	34	12	0,001
36	48	596	99	12	484	42	12	0,002
40	48	603	103	12	501	45	12	0,005
44	48	619	110	12	513	48	12	0,006
48	48	629	111	12	524	47	12	0,006
52	72	615	59	12	493	81	12	<0,001
60	72	659	60	8	569	74	9	0,015
64	72	652	67	8	571	76	9	0,034
68	72	655	74	8	554	82	7	0,027
72	72	648	86	8	564	78	7	0,073
72 (B)	72B	629	81	11	658	44	9	0,348

B - ratos que tiveram suas dietas invertidas com 48 semanas de idade.

Subg - subgrupos, DP - desvio padrão, n - número de animais, p - HR vs. HO.

O valor de p foi calculado através do teste "t" de Student não pareado.

Os resultados obtidos em gaiola metabólica confirmaram as dietas

recebidas, com UNaV significativamente maior em dieta hipersódica ($p > 0,0001$ em 12, 48 e 72 semanas e $p = 0,002$ entre os subgrupos 72B), não havendo diferenças na excreção urinária de 24 horas de potássio em todos os momentos estudados ($p > 0,05$) (Tab. 3).

Tab. 3: Excreção urinária de 24 horas de sódio (UNaV - mEq) e potássio (UKV - mEq) de ratos Wistar submetidos à dieta hipossódica (HO) ou hipersódica (HR).

IDADE (semanas)	UNaV						UKV					
	HO			HR			HO			HR		
	média	DP	n	média	DP	n	média	DP	n	média	DP	n
12	0,28	0,13	12	12,93 [#]	3,34	11	0,91	0,31	12	1,05	0,16	11
48	0,09	0,06	8	12,28 [#]	3,14	8	0,67	0,19	8	0,77	0,13	8
72	0,15	0,09	7	15,21 [#]	7,91	7	0,63	0,08	7	0,99	0,44	7
72 (B)	0,84	1,37	7	11,77 ^φ	7,12	8	1,09	0,20	8	0,82	0,35	8

B - ratos que tiveram suas dietas invertidas com 48 semanas de idade.

DP - desvio padrão, n - número de animais, # - $p < 0,001$ e $φ$ - $p = 0,002$, HR vs. HO.

O sódio e o potássio plasmáticos foram iguais entre os grupos HO e HR, em todas as idades ($p > 0,05$) (Tab. 4).

Tab. 4: Sódio (PNa - mEq/L) e potássio (PK - mEq/L) plasmáticos de ratos Wistar submetidos à dieta hipossódica (HO) ou hipersódica (HR).

IDADE (semanas)	PNa						PK					
	HO			HR			HO			HR		
	média	DP	n	média	DP	n	média	DP	n	média	DP	n
12	141	4	12	141	3	11	3,8	0,4	12	3,6	0,3	11
48	147	2	8	149	3	8	3,4	0,3	8	3,6	0,2	8
72	144	6	6	149	7	5	3,3	0,3	6	3,9	1,0	5
72 (B)	140	4	8	143	3	8	3,5	0,5	8	3,6	0,8	8

B - ratos que tiveram suas dietas invertidas com 48 semanas de idade.

DP - desvio padrão, n - número de animais, $p > 0,05$, HR vs. HO, em todos os subgrupos.

O volume urinário de 24 horas foi maior nos animais do grupo HR, nos

momentos dos estudos de 12, 48 e 72 semanas ($p < 0,001$), sendo igual nos subgrupos que foram submetidos à inversão de dietas ($p = 0,156$) (Tab. 5). Os “clearances” de creatinina foram maiores na vigência de dieta hipersódica com 12 ($p < 0,0001$) e com 48 ($p = 0,003$) semanas. Não houve diferença dos CICr nos animais com 72 semanas de idade ($p = 0,41$), bem como no grupo 72B ($p = 0,087$) (Tab. 5).

Tab. 5: Volume urinário de 24 horas (V - mL) e “clearance” de creatinina (CICr - mL/min) de ratos Wistar submetidos à dieta hipossódica (HO) ou hipersódica (HR).

IDADE (semanas)	HO		V				HO		CICr			
	média	DP	n	média	DP	n	média	DP	n	média	DP	n
12	10	3	12	37 [#]	7	11	1,49	0,38	12	2,41 ^ϕ	0,47	11
48	8	2	8	36 [#]	5	8	1,49	0,45	8	2,00 [¶]	0,22	8
72	8	3	7	57 [#]	21	7	2,59	0,79	6	3,00	0,92	7
72 (B)	27	18	8	41	19	8	2,31	0,95	6	2,76	0,88	6

B - ratos que tiveram suas dietas invertidas com 48 semanas de idade.

DP - desvio padrão, n - número de animais, # - $p < 0,001$ e ϕ - $p < 0,0001$ e ¶ - $p = 0,012$, HR vs. HO.

A massa renal foi maior no grupo HR, em todas as idades, quando comparada com o grupo HO (12: $p < 0,001$, 48: $p < 0,001$ e 72: $p = 0,002$), enquanto a massa ventricular esquerda somente esteve mais elevada nos animais sob dieta hipersódica após 48 semanas (12: $p = 0,32$, 48: $p = 0,002$ e 72: $p = 0,023$) (Tab. 6 e Fig. 4). Os grupos submetidos à inversão de dietas com 48 semanas, não apresentaram diferenças de mR ou mVE ao serem estudados com 72 semanas de idade ($p = 0,565$ e $p = 0,313$, respectivamente) (Tab. 6 e Fig. 4).

Tab. 6: Massa renal (mR - mg/g) e massa ventricular esquerda (mVE - mg/g) de ratos Wistar submetidos à dieta hipossódica (HO) ou hipersódica (HR).

IDADE (semanas)	mR						mVE					
	HO			HR			HO			HR		
	média	DP	n	média	DP	n	média	DP	n	média	DP	n
12	3,1	0,2	6	4,4 [#]	0,4	6	2,2	0,1	6	2,3	0,2	6
48	2,3	0,3	6	3,5 [#]	0,2	6	1,6	0,1	6	2,0 ^ϕ	0,2	6
72	2,4	0,6	6	4,1 ^ϕ	0,8	6	1,7	0,4	6	2,2 [¶]	0,3	6
72 (B)	3,5	0,7	6	3,3	0,5	6	1,9	0,2	6	1,8	0,3	6

B - ratos que tiveram suas dietas invertidas com 48 semanas de idade.

DP - desvio padrão, n - número de animais, # - $p < 0,001$, ϕ - $p = 0,002$, ¶ - $p = 0,023$, HR vs. HO.

Houve diferença na atividade de renina plasmática ($\text{ng.ml}^{-1}.\text{h}^{-1}$) entre dietas, sendo menor no grupo HR em todas as idades: 12 ($0,4 \pm 0,3$, $n=5$, HR versus $4,2 \pm 1,1$, $n=8$, HO - $p < 0,001$), 48 ($2,4 \pm 3,1$, $n=6$, HR versus $26,5 \pm 9,9$, $n=6$, HO - $p < 0,001$), 72 ($1,1 \pm 0,8$, $n=5$, HR versus $4,2 \pm 1,1$, $n=5$, HO - $p = 0,001$) e 72B ($0,5 \pm 0,7$, $n=6$, HR versus $2,7 \pm 1,3$, $n=6$, HO - $p = 0,006$).

As áreas abaixo das curvas das glicemias obtidas nos testes de tolerância à glicose mostraram-se diferentes apenas com 72 semanas de idade, sendo maior no grupo HO ($p = 0,032$) (Tab. 7 e Fig. 7). As áreas abaixo das curvas das insulinemias dosadas durante o ivGTT foram estatisticamente diferentes com 12 e 72 semanas, sendo maiores em vigência de dieta hipossódica ($p = 0,023$ e $p < 0,001$, respectivamente) (Tab. 7, Fig. 5 e Fig. 7). A relação AI/AG nestes subgrupos mostrou-se maior nos ratos em dieta hipossódica (12 semanas: $p = 0,037$ e 72 semanas: $p = 0,002$) (Tab. 8 e Fig. 9). Nos animais de 48 semanas, AG, AI e AI/AG não diferiram entre dietas ($p = 0,076$, $p = 0,526$ $p = 0,783$, respectivamente) (Tab.7, Tab. 8, Fig.6 e Fig.9). Nos subgrupos 72B, não encontramos as diferenças entre AG, AI e AI/AG detectadas com 72 semanas sem

inversão de dietas ($p=0,113$, $p=0,244$ e $p=0,672$, respectivamente) (Tab. 7, Tab.8, Fig. 8 e Fig.9).

A análise longitudinal dos dados obtidos nos ivGTTs de 12, 48 e 72 semanas evidenciou elevação da AG ($p<0,001$), da AI ($p<0,001$) e da AI/AG ($p<0,001$) durante o envelhecimento, bem como maiores AG, AI e AI/AG em dieta hipossódica ($p=0,007$, $p<0,001$ e $p=0,004$, respectivamente) (Fig. 10).

Tab. 7: Área abaixo da curva de glicemias (AG - mg.min.dL⁻¹) e área abaixo da curva de insulinemias (AI - μ UI.min.mL⁻¹) durante testes de tolerância à glicose (i.v.) realizados em ratos Wistar submetidos à dieta hipossódica (HO) ou hipersódica (HR).

IDADE (semanas)	AG						AI					
	HO		n	HR		n	HO		n	HR		n
média	DP	média		DP	média		DP	média		DP		
12	10342	692	5	10399	1527	5	2585	541	6	1727 ^φ	481	5
48	14390	1784	6	12537	1127	5	6361	1973	6	5755	550	5
72	20044	1252	4	16567 [¶]	2438	6	11115	1731	4	5510 [#]	752	5
72 (B)	14621	2079	7	16631	2116	6	6238	1227	6	7544	2330	5

B - ratos que tiveram suas dietas invertidas com 48 semanas de idade.

DP - desvio padrão, n - número de animais, # - $p<0,001$, ϕ - $p=0,023$, ¶ - $p=0,032$, HR vs. HO.

Tab. 8: Relação entre as áreas abaixo das curvas de insulinemias e glicemias (AI/AG) durante testes de tolerância à glicose (i.v.) realizados em ratos Wistar submetidos à dieta hipossódica (HO) ou hipersódica (HR).

IDADE (semanas)	HO			HR			p
média	DP	n	média	DP	n		
12	0,26	0,05	5	0,17	0,06	5	0,037
48	0,44	0,14	6	0,46	0,05	5	0,783
72	0,56	0,10	4	0,33	0,04	5	0,002
72 (B)	0,44	0,11	6	0,47	0,13	5	0,672

B - ratos que tiveram suas dietas invertidas com 48 semanas de idade.

DP - desvio padrão, n - número de animais, p - HR vs. HO.

No ITT realizado em animais de 72 semanas de idade, as áreas acima das

curvas da queda das glicemias, em relação ao basal, nos 20 minutos iniciais, foram iguais para os grupos HO e HR ($p=0,205$) (Tab. 9 e Fig. 11). Os animais de 72 semanas com inversão de dietas também não apresentaram diferenças entre grupos ($p=0,221$) (Tab. 9 e Fig. 11).

Tab. 9: Área acima da curva da queda da glicemia (ATTI - $\text{mg}\cdot\text{min}\cdot\text{dL}^{-1}$) durante testes de tolerância à insulina realizados em ratos Wistar submetidos à dieta hipossódica (HO) ou hipersódica (HR).

IDADE (semanas)	HO			HR			p
	média	DP	n	média	DP	n	
72	1208	307	5	880	435	5	0,205
72 (B)	857	131	8	943	110	6	0,221

B - ratos que tiveram suas dietas invertidas com 48 semanas de idade.

DP - desvio padrão, n - número de animais, p - HR vs. HO.

O estudo “in vitro”, realizado com 12 semanas, mostrou maior captação basal de 2-deoxi-D-glicose (que independe de insulina) no grupo HR ($p<0,001$), bem como maior captação máxima da mesma ($p<0,001$) (Tab. 10 e Fig. 12). Porém a E_{c50} , que é a concentração de insulina responsável por metade do efeito máximo da captação de glicose, foi igual nos grupos HO e HR ($p=0,967$) (Tab. 10 e Fig. 13). A densidade de receptores de insulina foi maior nos adipócitos de ratos do grupo HR ($p=0,004$), sendo a constante de dissociação insulina-receptor também maior nestes animais, ou seja, menor afinidade presente ($p=0,019$) (Tab. 10 e Fig. 12).

Tab. 10: Volume do adipócito (VA - μm^3), captação basal (Capt B - $\text{pmol}\cdot 3\text{ min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$) e máxima (Capt M - $\text{pmol}\cdot 3\text{ min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$) de 2-deoxi-D-glicose, E_{c50} (ng/mL), densidade de receptores de insulina (R - n^2/nm^2) e constante de dissociação insulina-receptor (Kd - nM) medidos em adipócitos de ratos Wistar de 12 semanas submetidos à dieta hipossódica (HO) ou hipersódica

(HR).

IDADE (semanas)	HO			HR			p
	média	DP	n	média	DP	n	
VA	243	33	6	233	35	6	0,615
Capt B	2,1	0,6	6	5,1	1,0	6	<0,001
Capt M	6,1	1,7	6	12,3	1,1	6	<0,001
Ec50	0,56	0,16	6	0,56	0,24	6	0,967
R	3,5	1,8	6	8,1	2,4	6	0,004
Kd	1,4	0,3	6	2,2	0,6	6	0,019

Ec50 - concentração de insulina responsável por metade do efeito máximo de captação da ³H-2-deoxi-D-glicose, DP - desvio padrão, n - número de animais, p - HR vs. HO.

A oxidação da glicose e a incorporação da mesma em lípidos foram maiores em adipócitos do subgrupo 12 HR, dados que estão de acordo com a maior captação de glicose neste subgrupo (Oxid B: p<0,001, Oxid Máx: p<0,001, Incorp B: p=0,001 e Incorp Máx: p=0,002) (Tab. 11 e Fig.14).

Tab. 11: Oxidação basal (Oxid B - nmol.h⁻¹) e oxidação máxima (Oxid Máx - nmol.h⁻¹) de glicose e incorporação basal (Incorp B - nmol.h⁻¹) e máxima (Incorp Máx - nmol.h⁻¹) de glicose em lípidos, normalizados para 10⁵ adipócitos de ratos Wistar de 12 semanas submetidos à dieta hipossódica (HO) ou hipersódica (HR).

IDADE (semanas)	HO			HR			p
	média	DP	n	média	DP	n	
Oxid B	3,1	1,1	6	10,9	2,5	6	< 0,001
Oxid Máx	4,7	1,8	6	14,9	2,2	6	< 0,001
Incorp B	7,8	2,3	6	14,3	2,7	6	0,001
Incorp Máx	10,5	4,1	6	20,7	4,1	6	0,002

DP - desvio padrão, n - número de animais, p - HR vs. HO.

4- DISCUSSÃO

Com o objetivo de apresentar uma discussão mais didática, este capítulo foi dividido em dois ítems distintos: materiais e métodos; e resultados.

4.1- Materiais e métodos

A escolha de animais não selecionados geneticamente para hipertensão arterial baseou-se no fato de serem normotensos quando jovens e apresentarem, em alguns estudos, aumento da pressão arterial durante o envelhecimento^{45,46}, à semelhança do ser humano^{1,2}.

Os animais foram estudados até 18 meses de idade ou 72 semanas, pois tem-se considerado que ratos mais jovens, de 12 meses ou 48 semanas, ainda estariam na “meia-idade”⁴⁷.

Sobrecarga e restrição salina intensas foram introduzidas com a finalidade de obter-se um modelo de hipertensão sal-dependente e seu controle, bem como para avaliar-se o efeito do sal na sensibilidade à insulina. A dieta hipossódica continha, no entanto, a quantidade de sal suficiente para o crescimento e desenvolvimento normal dos animais⁴⁸.

Para a avaliação da função renal, optou-se pelo “clearance” de creatinina, que, apesar de ser menos preciso do que o “clearance” de inulina na avaliação da filtração glomerular de ratos, apresenta a vantagem de permitir que os animais estejam acordados durante o estudo em gaiola metabólica⁴⁹. Além disto, após a realização do “clearance” de inulina, é necessário que se sacrifiquem os animais, o que elevaria o número de ratos estudados. A função renal foi avaliada neste

estudo apenas para excluir-se a possibilidade de aumento da pressão dos animais por insuficiência renal, bem como para possibilitar uma comparação entre os grupos HO e HR.

Tendo em vista as várias metodologias disponíveis para o estudo da resistência à insulina, abordadas na introdução, optou-se por utilizar mais de uma forma de avaliação para cada subgrupo estudado.

O teste de tolerância à glicose intravenoso com concomitantes dosagens de insulina apresenta a vantagem, em relação ao teste oral, de não ser influenciado por variações na absorção da glicose administrada. Sabe-se que dieta rica em sal aumenta a absorção de glicose no tubo digestivo, interferindo no teste de tolerância à glicose oral⁵⁰. Por outro lado, o ivGTT, assim como o oral, está sujeito à interferências causadas por problemas de secreção de insulina pelo pâncreas e alterações da metabolização da mesma no fígado ou rins⁴. No entanto, optou-se pela utilização deste procedimento por ser de fácil realização e permitir, independentemente da avaliação de resistência à insulina, estudar, como o próprio nome diz, a tolerância à glicose destes animais ao longo do envelhecimento.

Os estudos “in vitro” permitem uma avaliação precisa da sensibilidade à insulina na captação de glicose pela célula, uma vez que todos os parâmetros envolvidos são controlados: quantidade de insulina do meio, quantidade de glicose marcada disponível, número de células da preparação, etc. Por outro lado, pelo fato da sensibilidade à insulina não ser igual em todos os tecidos⁵¹, os resultados obtidos com o estudo de adipócitos podem não refletir necessariamente o animal como um todo.

Houve problemas técnicos nos estudos dos adipócitos isolados de animais com 48 e 72 semanas de idade. As células apresentavam-se frágeis, rompendo-se ao longo do experimento, o que interferiu nos resultados. Tal fragilidade não era esperada, pois em outros estudos realizados com adipócitos de ratos idosos das cepas Fischer⁵² e Long-Evans⁵³ não foi descrita dificuldade semelhante. Nesta cepa de ratos, esta maior fragilidade poderia ser consequência do próprio envelhecimento ou do fato das células apresentarem volume aumentado pelo grande acúmulo de gordura.

A partir da detecção da dificuldade na manipulação dos adipócitos, optou-se pela realização do teste de tolerância à insulina nos animais dos subgrupos 72 HO, 72 HR, 72B HO e 72B HR. Este teste não tem sido recomendado em humanos devido ao risco de hipoglicemia⁵¹, mas em animais, com a dose de insulina utilizada, não observou-se esta complicação. O ITT, nos vinte minutos iniciais, evidencia o efeito da insulina administrada em reduzir a glicemia, sem ainda estarem presentes os mecanismos contra-reguladores, que proporcionam o retorno da glicemia aos valores basais. Comparando-se a queda da glicemia de dois grupos submetidos à mesma infusão de insulina, pode-se avaliar a sensibilidade à mesma. Assim como no ivGTT, a metabolização mais rápida ou mais lenta da insulina administrada pode interferir nos resultados.

4.2- Resultados

Foi constatada maior pressão arterial a partir da 12^a semana de idade (9 semanas de dieta) nos animais submetidos à sobrecarga salina. Este aumento da pressão arterial foi corrigido com dieta hipossódica, mesmo sendo esta última introduzida somente quando os animais tinham um ano de vida. Da mesma forma, animais mantidos em dieta hipossódica até um ano de idade, apresentaram elevação da PAc após 6 meses de dieta hipersódica, com níveis pressóricos semelhantes aos dos ratos que permaneceram 18 meses com sobrecarga salina. Portanto, o cloreto de sódio, na quantidade fornecida, foi responsável pelo aumento da PAc.

Os resultados publicados na literatura não são uniformes em relação ao aumento da pressão arterial em humanos ou animais normotensos submetidos a sobrecargas salinas. Há trabalhos que não mostram elevação da pressão arterial após administração de sal^{54,55}. Note-se, entretanto, que a sensibilidade ao efeito hipertensor do sal varia entre seres humanos⁵⁶⁻⁵⁸ e entre animais de experimentação⁵⁹ e que o tempo de administração da sobrecarga e a intensidade da mesma podem interferir nos resultados obtidos. LUFT et al.⁶⁰ mostraram aumento da pressão arterial em todos os indivíduos normais submetidos a grandes sobrecargas de sal. De forma semelhante, no presente trabalho, a sobrecarga salina administrada foi intensa, precocemente introduzida e mantida por longo período, o que pode explicar a elevação de PAc.

Como citado na introdução deste estudo, a pressão arterial eleva-se com a idade, sendo esta elevação dependente de sal¹⁸. Através da avaliação estatística utilizada, não se detectou aumento pressórico ao longo da vida dos

animais em dieta hipersódica ou hipossódica. No entanto, ao observar-se a curva do estudo longitudinal (Fig. 2), verifica-se uma tendência à elevação da pressão arterial em dieta hipersódica após a 56^a semana (14^o mês). Talvez o tempo de observação não tenha sido suficiente para detectar as alterações da pressão arterial, que poderiam evidenciar-se mais tardiamente.

O peso dos animais estudados foi maior em dieta hipossódica. Este trabalho não visou especificamente responder à esta questão, porém observou-se que o consumo de dieta hipersódica por rato foi menor do que o consumo de dieta hipossódica, ao longo do período do estudo. Além disto, houve maior ingestão hídrica em gaiola metabólica no grupo HR e, ao sacrificar-se estes animais, observou-se distensão gástrica por grande quantidade de líquido. Sem a pretensão de discutir-se os mecanismos da fome, faz-se a conjectura de que o ganho de peso tenha sido menor em animais submetidos à dieta hipersódica devido à necessidade de ingestão de grandes quantidades de água, o que poderia saciar, parcialmente, a fome dos mesmos.

A excreção urinária de sódio de 24 horas comprovou a substancial diferença na ingestão deste íon. A excreção de potássio de 24 horas foi igual entre os grupos HO e HR, o que confirma não haver diferenças entre dietas e exclui a possibilidade do mesmo ter participado na diferença de pressão arterial encontrada entre os grupos.

Houve maior filtração glomerular em vigência de sobrecarga salina nos animais de 12 e 48 semanas. Enquanto alguns estudos descreveram este efeito com a administração de dieta hipersódica⁵⁴, outros não detectaram alterações⁵⁵.

Não houve queda da função glomerular até a idade estudada de 18 meses, concordando com a referência de começarem as alterações de filtração, nesta cepa, somente após 21 meses de vida⁶¹.

Maior massa renal foi observada, em todas as idades, nos animais submetidos à dieta hipersódica. Tal efeito foi revertido no subgrupo que, após 1 ano, passou a receber dieta hipossódica. Sabe-se que a hipertrofia renal acompanha situações de aumento da filtração renal, como ocorre durante o crescimento de um ser⁶². A maior filtração glomerular determinada pela sobrecarga salina poderia ser responsável pelo aumento de massa renal. No entanto, não houve diferença entre os “clearances” de creatinina de animais com 72 semanas de idade, onde também observa-se aumento da massa renal em dieta hipersódica. IWASE et al.⁵⁵ verificaram aumento da massa renal e microalbuminúria em animais submetidos à sobrecarga salina por 8 semanas, sem hiperfiltração ou aumento da pressão arterial, atribuindo ao sal tal efeito lesivo. No presente estudo, a sobrecarga salina crônica pode ter fornecido estímulo trófico renal independente do efeito de maior filtração glomerular.

A massa ventricular esquerda foi maior em vigência de sobrecarga salina nas avaliações dos animais com 48 e 72 semanas, não sendo detectadas diferenças com 12 semanas de idade. BAOXUE; FRANS⁶³, no entanto, mostraram aumento na massa ventricular esquerda em ratos Wistar submetidos à dieta hipersódica (8% de NaCl) da quarta à oitava semana de vida, sem elevação da pressão arterial neste período. Além do conhecido efeito da hipertensão arterial na hipertrofia cardíaca⁶⁴, tal estudo sugere, como em outros trabalhos em

humanos^{65,66}, que o sal também interfere no aumento de massa ventricular, independentemente da elevação pressórica. A dieta hipersódica poderia induzir a proliferação celular através do aumento da densidade de receptores alfa-1 no coração ou através da liberação de fatores de crescimento celular⁶³. Por outro lado, a restrição salina pode reduzir a massa ventricular em hipertrofia secundária à hipertensão arterial⁶⁷. Quando invertermos as dietas após um ano de vida, a diferença entre as massas ventriculares esquerdas deixou de existir, possivelmente por decréscimo da mVE no subgrupo 72B HO, que passou a receber dieta hipossódica, e elevação da mVE no subgrupo 72B HR, que iniciou dieta hipersódica após a 48^a.semana.

A atividade de renina plasmática foi menor em dieta hipersódica do que em dieta hipossódica, confirmando o que se conhece da literatura⁶⁸.

O estudo “in vitro” realizado com animais com 12 semanas de idade mostrou maior captação de glicose em adipócitos do grupo HR, tanto na condição basal, que ocorreu sem insulina no meio, como na presença de insulina. Porém, a EC_{50} calculada a partir da curva dose-resposta de captação de glicose foi igual nos dois grupos. A EC_{50} , que é a concentração de insulina responsável por metade da captação máxima, mede, segundo outros trabalhos⁶⁹, a sensibilidade à insulina. A sensibilidade à insulina, portanto, foi igual na condição de restrição ou sobrecarga salina crônica. Note-se que as curvas dose-resposta dos grupos HO e HR são semelhantes e paralelas, apenas começando a partir de valores iniciais (basais) diferentes (Fig. 13). A maior captação de glicose em adipócitos de ratos em dieta hipersódica deveu-se, então, à maior entrada de glicose independente da

ação da insulina. Este dado não era conhecido até o momento, e este estudo não permitiu nenhuma verificação dos mecanismos envolvidos. Pode-se conjecturar, no entanto, que o sal, direta ou indiretamente, tenha promovido o aumento da concentração celular de proteínas transportadoras de glicose, que independem da ação de insulina, os GLUT 1. Estes transportadores fazem parte da constituição da membrana celular de adipócitos e fibras musculares, mas usualmente são responsáveis por discreta captação de glicose. A maior parte da glicose captada pelos adipócitos ocorre, habitualmente, através dos transportadores GLUT 4, que são deslocados para a membrana celular após a ligação da insulina ao seu receptor e conseqüente ativação de substratos intracelulares⁷⁰.

A oxidação de glicose e a incorporação de glicose nos lípidos intracelulares confirmaram os resultados obtidos no estudo da captação de glicose. Nestes dois ensaios houve aumento da metabolização basal da glicose, no grupo HR. Em outras palavras, a glicose captada, independentemente da ação da insulina, foi oxidada e incorporada em lípidos.

A maior densidade de receptores de insulina encontrada nos adipócitos dos ratos em dieta hipersódica pode ter ocorrido por um mecanismo de “upregulation”. Como a glicose entrou nas células de forma independente da insulina, a glicemia foi reduzida, o pâncreas passou a secretar menos insulina, a insulinemia reduziu-se, e o número de receptores de insulina na membrana elevou-se.

A afinidade dos receptores pela insulina, menor no grupo HR (maior constante de dissociação insulina-receptor), foi um dado observado, que poderia

denotar menor sensibilidade do receptor à insulina neste grupo. Porém os valores dos Kds obtidos foram numericamente próximos e a metodologia utilizada para sua determinação foi pouco precisa. Portanto não se considerou o Kd na avaliação da sensibilidade à insulina, mas, simplesmente, como uma característica dos receptores estudados.

A tolerância à glicose foi normal nos animais com 12 semanas de idade, porém, mais uma vez concordando com o exposto acima, houve menor insulinemia no grupo HR. Apesar das insulinemias menores no grupo HR, as glicemias foram normais e semelhantes às verificadas no grupo HO. Tal constatação poderia sugerir menor resistência à insulina associada à sobrecarga salina. Contudo, o estudo “in vitro” realizado nos mesmos animais mostrou sensibilidade à insulina igual nos dois grupos.

Analisando-se estas duas metodologias em conjunto, faz-se necessário discutir os possíveis mecanismos envolvidos na diferença de insulinemia entre grupos, verificada no ivGTT, já que não se detectou alteração da sensibilidade à insulina “in vitro”. Os níveis de insulina plasmática são influenciados pela produção pancreática e pela metabolização da mesma. MELAND et al.⁷¹ verificaram maior produção de insulina em pacientes hipertensos recebendo restrição salina. Tal fato poderia explicar os maiores níveis de insulina circulante no grupo HO. Quanto à metabolização da insulina, sabe-se que a angiotensina II⁷² diminui o fluxo sanguíneo para o fígado, que é o principal órgão onde este processo ocorre⁷³. No presente estudo, a atividade do sistema renina-angiotensina estava diminuída nos animais em dieta hipersódica, o que poderia ser responsável pelo aumento do

“clearance” de insulina nestes ratos, com conseqüente diminuição da insulinemia. A favor deste mecanismo, EGAN et al.⁷⁴ constataram diminuição da insulina circulante com o uso de inibidor da enzima de conversão da angiotensina I em hipertensos em dieta hipossódica. Quando maior quantidade de insulina tem acesso ao fígado, há uma situação de menor resistência hepática à insulina⁷⁵, havendo maior metabolização da glicose e inibição da neoglicogênese, ou seja, diminuição da glicemia.

Com o envelhecimento dos animais, houve maior intolerância à glicose, detectada através do aumento das áreas abaixo das curvas das glicemias nos ivGTTs dos grupos HO e HR (Fig. 10). Observou-se também aumento das áreas abaixo das curvas das insulinemias em ambos os grupos. Tal elevação das insulinemias foi concomitante à piora da tolerância à glicose. Além disto, o aumento da relação AI/AG, com o tempo, em ambos os grupos, evidencia maior aumento proporcional nas insulinemias do que nas glicemias. Em associação, estes achados sugerem aumento da resistência à insulina ao longo do período de estudo. Todavia, não foram realizados procedimentos que pudessem confirmar ou não esta conjectura. A diminuição da sensibilidade à insulina ao longo da vida ocorre em seres humanos^{76,77} e animais⁵², porém discute-se o papel do envelhecimento, por si só, na acentuação da resistência à insulina. Sabe-se que, durante o envelhecimento, a porcentagem do peso corpóreo composta por tecido adiposo aumenta no homem⁷⁸ e em ratos⁷⁹. Talvez este aumento do tecido adiposo seja o verdadeiro responsável pela maior resistência à insulina. REAVEN

et al.⁴⁷ demonstraram que ratos Sprague-Dawley submetidos à restrição calórica não apresentaram alterações de sensibilidade à insulina com o envelhecimento.

Durante o envelhecimento, a intolerância à glicose, representada pelo aumento das AGs, foi menor em dieta hipersódica do que em restrição salina (Fig. 10). Talvez este fato tenha ocorrido devido à maior captação celular insulino-independente no grupo HR. Por outro lado, as insulinemias e as relações AI/AGs também foram menores neste grupo, durante o período de estudo, o que poderia sugerir maior sensibilidade à insulina. No entanto, nos animais de 72 semanas, que foram avaliados com ITT, não houve diferença de sensibilidade à insulina entre os grupos HO e HR.

As diferenças observadas entre as AIs e as relações AI/AG dos grupos HO e HR na avaliação longitudinal (Fig. 10) e com 72 semanas (Fig. 7) podem ter ocorrido, como discutido anteriormente, por menor produção pancreática de insulina ou maior metabolização da mesma no grupo HR. Observe-se que a menor AG neste grupo concorda com a existência de outra forma de captação de glicose que não dependa da insulina. No grupo com 72 semanas de idade submetido à inversão de dietas após um ano de vida, as AGs e AIs igualaram-se, confirmando o efeito das dietas nos resultados descritos acima. O ITT mostrou sensibilidade à insulina igual nos subgrupos 72B HO e 72B HR.

As áreas abaixo das curvas de glicemias e insulinemias dos ivGTTs realizados com animais de 48 semanas foram numericamente maiores em dieta hipossódica, mantendo a tendência observada nas outras idades, porém não foi atingida significância estatística.

Analisando em conjunto os resultados obtidos neste estudo, os animais que receberam dieta hipersódica tiveram maior pressão arterial, sem que houvesse diferença de sensibilidade à insulina em relação ao grupo HO. Tal achado não confirma uma das supostas formas de associação entre hipertensão arterial e resistência à insulina, onde o aumento de pressão ocasionaria a alteração de ação da insulina, por piorar o acesso da mesma aos tecidos^{16,17}. Neste modelo de hipertensão, houve inclusive indícios de comprometimento cardiovascular, com aumento da massa ventricular esquerda e detecção de lesões glomerulares e intersticiais isquêmicas em alguns ratos do grupo HR (dado não referido). Da mesma forma como foi encontrado neste estudo, resistência à insulina não está presente em outras situações de hipertensão, como a renovascular⁸⁰. Não se pode concluir, a partir do descrito, que não haja influência da pressão arterial na sensibilidade à insulina, porém a primeira, por si só, não parece determinar a segunda em qualquer circunstância.

Por outro lado, verificou-se provável aumento da resistência à insulina durante o processo de envelhecimento (menor tolerância à glicose e maiores insulinemias), sem que houvesse elevação da pressão arterial detectável até a idade estudada de 72 semanas. Este achado demonstrou uma situação onde um possível aumento da resistência à insulina não gerou elevação da pressão arterial. Tal fato é contrário à idéia de que a resistência à insulina seja o evento primário nesta associação¹⁵. Também em patologias como o insulinoma, não se verifica hipertensão arterial em vigência de insulinemias elevadas⁸¹. Mais uma vez, não se pode excluir que, em algumas situações, como, por exemplo, no modelo de

administração de frutose a ratos, a piora da resistência à insulina possa induzir o aumento de pressão arterial. Nestes animais, observou-se que não ocorria elevação da pressão arterial, quando inibia-se a hiperinsulinemia utilizando-se somatostatina⁸².

O presente estudo mostrou, portanto, ausência de associação entre resistência à insulina e aumento da pressão arterial. Provavelmente, para que a mesma ocorra, seja necessário haver uma associação de determinados genes, uma base intrínseca, que não está presente em todos os animais ou indivíduos. Note-se que, mesmo entre hipertensos essenciais, onde a associação com resistência à insulina é freqüentemente observada, há indivíduos que não apresentam quaisquer alterações neste sentido⁸³.

Em relação ao papel do sal neste contexto, observou-se melhora do metabolismo da glicose, com maior captação de glicose insulino-independente, em vigência de sobrecarga de sal, sem alteração na sensibilidade à insulina. Vários estudos que avaliam resistência à insulina sob dietas com diferentes conteúdos salinos reportam maior insulinemia de jejum⁸⁴ ou durante GTT³⁰ em vigência de restrição salina, como foi encontrado no presente estudo. No entanto, a conclusão de que haja maior resistência à insulina nestas situações pode não ser verdadeira, uma vez que as metodologias utilizadas não descartam alterações de secreção e metabolização de insulina. Por outro lado, há estudos onde descreve-se maior resistência à insulina em dieta hipersódica, em indivíduos normotensos²⁷, utilizando-se o “clamp” euglicêmico hiperinsulinêmico, fato não observado em hipertensos⁸⁵. Em outro trabalho que utiliza a mesma metodologia, indivíduos

normotensos apresentam-se mais sensíveis à insulina após três dias de dieta hipersódica, em relação à restrição salina, não havendo mais diferenças de sensibilidade após 7 dias destas dietas⁸⁶. Portanto, além da variedade de metodologias e casuísticas utilizadas, fatores como conteúdo salino da dieta e tempo de administração diferem de trabalho para trabalho, tornando-se difícil comparar resultados.

Apesar de ter aumentado a captação de glicose insulino-independente, melhorando o metabolismo da glicose, a sobrecarga salina não deve ser entendida como benéfica a estes animais. Nos animais submetidos à dieta hipersódica, houve aumento da pressão arterial, maior massa ventricular esquerda, lesões renais isquêmicas em alguns animais, bem como observou-se o dobro de mortalidade espontânea ao longo do período de estudo.

Em resumo, sobrecarga salina intensa, de introdução precoce e mantida por longo período, elevou a pressão arterial de ratos Wistar albino, sendo tal aumento revertido com a introdução tardia de restrição salina. Na condição de dieta hipersódica, em relação à restrição salina, observou-se menor peso corpóreo, maior massa renal e maior massa ventricular esquerda, estando esta última presente apenas a partir da 48^a semana. Estas diferenças citadas não mais existiram após a inversão das dietas. Não houve aumento da pressão arterial atribuível ao envelhecimento, durante as 72 semanas estudadas.

Quanto ao metabolismo da glicose, houve associação de dieta hipersódica e menor insulinemia “in vivo”. Ao longo do envelhecimento, a tolerância à glicose foi maior em animais em sobrecarga salina, do que naqueles em restrição de sal.

No entanto, não se encontraram diferenças entre os grupos HO e HR quanto à sensibilidade à insulina avaliada em ratos jovens e idosos. No estudo “in vitro” feito em adipócitos de animais com 12 semanas, na situação de sobrecarga de sal, foi possível detectar-se uma captação de glicose aumentada, independente da ação da insulina. Tal fato poderia explicar o maior metabolismo da glicose nestes animais. O maior número de receptores de insulina verificado no grupo HR pode ter decorrido de uma “upregulation” a partir dos menores níveis insulinêmicos.

5- CONCLUSÕES

Sobrecarga salina intensa, de início precoce, mantida cronicamente durante o processo de envelhecimento de ratos Wistar, promoveu, em relação à restrição salina:

1) Aumento da pressão arterial, que não se acentuou com o envelhecimento e que foi corrigido com a introdução de dieta hipossódica após um ano de vida;

2) Menor peso, que não mais foi verificado quando os animais tiveram suas dietas invertidas após a 48^a semana de idade;

3) Maior massa renal (com 12, 48 e 72 semanas de idade) e maior massa ventricular esquerda (com 48 e 72 semanas de idade), com reversão deste efeito no subgrupo submetido à inversão de dietas;

4) Menores níveis de insulina durante o ivGTT (com 12 e 72 semanas), fato revertido pela introdução de dieta hipossódica após a 48^a semana de idade;

5) Menor intolerância à glicose com o envelhecimento;

6) Igual sensibilidade à insulina em ratos jovens, no estudo “in vitro”, e em ratos idosos, no ITT;

7) Maior captação de glicose insulino-independente em adipócitos isolados de ratos com 12 semanas de idade;

8) Maior densidade de receptores de insulina na membrana celular desses adipócitos.

Neste modelo experimental, não houve associação entre elevação dos níveis pressóricos e resistência à insulina.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-KANNEL, W.B.; GORDON, T. Evaluation of cardiovascular risk in the elderly: The Framingham study. **Bull. N. Y. Acad. Med.**, v.54, p.573-91, 1978.
- 2-LANDAHL, S.; BENGTSSON, C.; SIGURDSSON, J.A.; SVANBORG, A.; SVÅRDSUDD, K. Age-related changes in blood pressure. **Hypertension**, v.8, p.1044-49, 1986.
- 3-LIPSON, L.G. Diabetes in the elderly: diagnosis, pathogenesis, and therapy. **Am. J. Med.**, v.80, p.10-21, 1986. Supplement 5A.
- 4-MORRIS, A.D.; CONNELL, J.M.C. Insulin Resistance and Essential Hypertension: Mechanisms and Clinical Implications. **Am. J. Med. Sci.**, v.307, p.S47-S52, 1994. Supplement 1.
- 5-WELBORN, T.A.; BRECKENRIDGE, A.; RUBINSTEIN, A.H.; DOLLERY, C.T.; RUSSELL FRASER, T. Serum-insulin in essential hypertension and in peripheral vascular disease. **Lancet**, v.18, p.1336-7, 1966.
- 6-MODAN, M.; HALKIN, H.; ALMOG, S.; LUSKY, A.; ESHKOL, A.; SHEFI, M.; SHITRIT, A.; FUCHS Z. Hyperinsulinemia. A link between hypertension obesity and glucose intolerance. **J. Clin. Invest.**, v.75, p.809-17, 1985.
- 7-FERRANNINI, E.; BUZZIGOLI, G.; BONADONNA, R.; GIORICO, M.A.; OLEGGINI, M.; GRAZIADEI, L.; PEDRINELLI, R.; BRANDI, L.; BEVILACQUA, S. Insulin resistance and essential hypertension. **N. Engl. J. Med.**, v.317, p.350-7, 1987.
- 8-FERRARI, P.; WEIDMANN, P. Insulin, insulin sensitivity and hypertension. **J. Hypertens.**, v.8, p.491-500, 1990.
- 9-O'HARE, J.A. The enigma of insulin resistance and hypertension. Insulin resistance, blood pressure, and the circulation. **Am. J. Med.** , v.84, p.505-10, 1988.
- 10-REAVEN, G.M. Relationship between insulin resistance and hypertension. **Diabetes Care**, v.14, p.33-8, 1991. Supplement 4.

- 11-REAVEN, G.M.; CHANG, H.; HOFFMAN, B.B.; AZHAR S. Resistance to insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes isolated from spontaneously hypertensive rats. **Diabetes**, v.38, p.1155-60, 1989.
- 12-REAVEN, G.M.; TWERSKY, J.;CHANG, H. Abnormalities of carbohydrate and lipid metabolism in Dahl rats. **Hypertension**, v.18, p.630-5, 1991.
- 13-VARRICCHIO, M.; PAOLISSO, G.; TORELLA, R.; D'ONOFRIO, F. Diabetes and hypertension in the elderly. **J. Hypertens.**, v.6, p.S41-4, 1988.
- 14-HWANG, I-S.; HO, H.; HOFFMAN, B.B.; REAVEN, GM. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. **Hypertension**, v.10, p.512-6, 1987.
- 15- REAVEN, G.M. Banting Lecture 1988: role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v.37, p.1595-607, 1988.
- 16-FERRANNINI, E. Insulin and blood pressure: possible role of hemodynamics. **Clin. Exper. Hypertens.**, v.A14, p.271-84, 1992.
- 17-JULIUS, S.; GUDBRANDSSON, T.; JAMERSON, K.; SHAHAB, S.T.; ANDERSSON, O. The hemodynamic link between insulin resistance and hypertension. **J. Hypertens.**, v.9, p.983-6, 1991.
- 18-STAMLER, J.; ROSE, G.; STAMLER, R.; ELLIOTT, P.; DYER, A.; MARMOT, M. INTERSALT study findings. Public health and medical care implications. **Hypertension**, v.14, p.570-7, 1989.
- 19-OLIVER, W.J.; COHEN, E.L.; NEEL, J.V. Blood pressure, sodium intake, and sodium related hormones in the Yanomamo Indians, a "no-salt" culture. **Circulation**, v.52, p.146-51, 1975.
- 20-OHNO, Y.; SUZUKI, H.; YAMAKAWA, H.; NAKAMURA, M.; OTSUKA, K.; SARUTA, T. Impaired insulin sensitivity in young, lean normotensive offspring of essential hypertensives: possible role of disturbed calcium metabolism. **J. Hypertens.**, v.11, p.421-6, 1993.
- 21-BEATTY, O.L.; HARPER, R.; SHERIDAN, B.; ATKINSON, A.B.; BELL, P.M. Insulin resistance in offspring of hypertensive parents. **B. M. J.**, v.307, p.92-6, 1993.
- 22-JOINT NATIONAL COMMITTEE ON DETECTION, EVALUATION, AND TREATMENT OF HIGH BLOOD PRESSURE. The fifth report of the joint national committee on detection, evaluation, and treatment of high blood

- pressure (JNC V). **Arch. Intern. Med.**, v.153, p.154-83, 1993.
- 23-WEISSER, B.; GRÜNE, S.; SPÜHLER, T.; KISTLER, T.; VETTER, W. Plasma insulin is correlated with blood pressure only in subjects with a family history of hypertension or diabetes mellitus: results from 11 001 participants in the Heureka Study. **J. Hypertens.**, v.11, p.S308-9, 1993. Supplement 5.
- 24-MULLER, D.C.; ELAHI, D.; PRATLEY, R.E.; TOBIN, J.D.; ANDRES, R. An epidemiological test of the hyperinsulinemia-hypertension hypothesis. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.76, p.544-8, 1993.
- 25-VETTOR, R.; CUSIN, I.; GANTEN, D.; ROHNER-JEANRENAUD, F.; FERRANNINI, E.; JEANRENAUD, B. Insulin resistance and hypertension: studies in transgenic hypertensive TGR(mREN-2)27 rats. **Am. J. Physiol.**, v.267, p.R1503-9, 1994.
- 26-TOWNSEND, T.R.; DIPETTE, D.J. Pressor doses of angiotensin II increase insulin-mediated glucose uptake in normotensive men. **Am. J. Physiol.**, v.265, p.E362-6, 1993.
- 27-DONOVAN, D.S.; SOLOMON, C.G.; SEELY, E.W.; WILLIAMS, G.H.; SIMONSON, D.C. Effect of sodium intake on insulin sensitivity. **Am. J. Physiol.**, v.264, p.E730-4, 1993.
- 28-REAVEN, G.M.; CHEN, N.; HOLLENBECK, C.; CHEN, Y.-D.I. Effect of age on glucose tolerance and glucose uptake in healthy individuals. **Am. Geriatr. Soc.**, v.37, p. 735-40, 1989.
- 29-SVEC, F.; NASTASI, K.; HILTON, C.; BAO, W.; SRINIVASAN, S.R.; BERENSON, G.S. Black-white contrasts in insulin levels during pubertal development. The Bogalusa Heart Study. **Diabetes**, v.41, p.313-7, 1992.
- 30-IWAOKA, T.; UMEDA, T.; INOUE, J.; NAOMI, S.; SASAKI, M.; FUJIMOTO, Y.; GUI, C.; IDEGUCHI, Y.; SATO, T. Dietary NaCl restriction deteriorates oral glucose tolerance in hypertensive patients with impairment of glucose tolerance. **Am. J. Hypertens.**, v.7, p.460-3, 1994.
- 31-ADER, M.; BERGMAN, R.N. Importance of transcapillary insulin transport to dynamics of insulin action after intravenous glucose. **Am. J. Physiol.**, v.266, p.E17-E25, 1994.
- 32-FRONTONI, S.; OHMAN, L.; HAYWOOD, J.R.; ROSSETTI, L. Increased insulin sensitivity in the high sodium one-kidney, one figure-8 hypertensive rat. **Hypertension**, v.20, p.192-8, 1992.

- 33-SHARMA, A.M.; SCHORR, U.; DISTLER, A. Insulin resistance in young salt-sensitive normotensive subjects. **Hypertension**, v.21, p.273-9, 1993.
- 34-ZATZ, R. A low cost tail-cuff method for the estimation of mean arterial pressure in conscious rats. **Lab. Anim. Sci.**, v.40, p.198-201, 1990.
- 35-RODBELL, M. Metabolism of isolated fat cells. I. effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. **J. Biol. Chem.**, v.239, p.375-80, 1964.
- 36-DI GIROLAMO, M.; MEDLINGER, S.; FERTIG, J.W. A simple method to determine fat cell size and number in four mammalian species. **Am. J. Physiol.** v.221, p.850-8, 1971.
- 37-MARSHALL, S.; GARVEY, W.T.; GELLER, M. Primary culture of isolated adipocytes: A new model to study insulin receptor regulation and action. **J. Biol. Chem.**, v.259, p.6376-84, 1994.
- 38-LIMA, F.B.; BAO, S.; GARVEY, W.T. Biological actions of insulin are differentially regulated by glucose and insulin in primary cultured adipocytes. **Diabetes**, v.43, p.53-62, 1994.
- 39-DOLE, V.P.; MEINERTZ, H. Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. **J. Biol. Chem.**, v.235, p.2595-99, 1960.
- 40-MARSHALL, S. Kinetics of insulin receptor internalization and recycling in adipocytes. **J. Biol. Chem.**, v.260, p.4136-44, 1985.
- 41-SCATCHARD, G. The attraction of proteins for small molecules and ions. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, V.51, P.660-72, 1949.
- 42-LOPES, H.J.J.; SOUZA, M.O.; RATTON, V.L.A.; MOREIRA, A.M.B. Nova formulação para o preparo do tampão alcalino utilizado na dosagem de creatinina no sangue e urina. Método de Heinegard-Tiderstrom modificado. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v.21, p.121-25, 1989.
- 43-WASHKO, M.E.; RICE, E.W. Determination of glucose by an improved enzymatic procedure. **Clin. Chem.**, v.7, p.542-5, 1961.
- 44-DESBUQUOIS, B.; AURBACH, G.D. Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays. **J. Clin. Endocrinol.**, v.33, p.732-8, 1971.
- 45-SOLTIS, E.E. Effect of age on blood pressure and membrane-dependent

- vascular responses in the rat. **Circ. Res.**, v.61, p.889-97, 1987.
- 46-BU~NAG, R.D.; TERAVALINEN, T.L. Tail-cuff detection of systolic hypertension in different strains of ageing rats. **Mech. Ageing Dev.**, v.59, p.197-213, 1991. [Resumo em Medline - 1991].
- 47-REAVEN, E.; WRIGHT, D.; MONDON, C.E.; SOLOMON, R.; HO, H.; REAVEN, G.M. Effect of age and diet on insulin secretion and insulin action in the rat. **Diabetes**, v.32, p.175-80, 1983.
- 48-BRENSILVER, J.M.; DANIELS, F.H.; LEFAVOUR, G.S.; MALSEPTIC, R.M.; LORCH, J.A.; PONTE, M.L.; CORTELL, S. Effect of variations in dietary sodium intake on sodium excretion in mature rats. **Kidney Int.**, v.27, p.497-502, 1985.
- 49-LEVINSKY, N.G.; LEVY, M. Clearance techniques. In: ORLOFF, J.; BERLINER, R.W.; GEIGER, S.R., ed. **Handbook of Physiology. Section 8: Renal physiology**. Washington, D.C., American Physiological Society, 1973. p.103-17.
- 50-FERRANNINI, E.; BARRETT, E.; BEVILACQUA, S.; DUPRE, J.; DEFRONZO, R.A. Sodium elevates the plasma glucose response to glucose ingestion in man. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.54, p.455-8, 1982.
- 51-STARKE, A.A.R. Determination of insulin sensitivity: methodological considerations. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v.20, p.S17-S21, 1992. Supplement 11.
- 52-MATTHAEI, S.; BENECKE, H.; KLEIN, H.H.; HAMANN, A.; KREYMAN, G.; GRETEN, H. Potential mechanism of insulin resistance in ageing: impaired insulin-stimulated glucose transport due to a depletion of the intracellular pool of glucose transporters in Fischer rat adipocytes. **J. Endocrinol.**, v.126, p.99-107, 1990.
- 53-CRAIG, B.W.; GARTHWAITE, S.M.; HOLLOSZY, J.O. Adipocyte insulin resistance: effects of aging, obesity, exercise, and food restriction. **J. Appl. Physiol.**, v.62, p.95-100, 1987.
- 54-KIRKENDALL, W.M.; CONNOR, W.E.; ABOUD, F.; RASTOGI, S.P.; ANDERSON, T.A.; FRY, M. The effect of dietary sodium chloride on blood pressure, body fluids, electrolytes, renal function, and serum lipids of normotensive man. **J. Lab. Clin. Med.**, v.87, p.418-34, 1976.

- 55-IWASE, M.; NUNOI, K.; WAKISAKA, M.; WADA, M.; KODAMA, T.; MAKI, Y.; FUJISHIMA, M. Effects of salt loading on glucose tolerance, blood pressure, and albuminuria in rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Metabolism**, v.41, p.966-9, 1992.
- 56-DICHTCHEKENIAN, V.; SEQUEIRA, D.M.C.; ANDRIOLLO, A.; MARCONDES, M.; HEIMANN, J.C. Salt sensitivity in human essential hypertension: effect of renin-angiotensin and sympathetic nervous system blockade - **Clin. Exper. Hypertens.**, v.A11, p.379-87, 1989. Supplement 1.
- 57-HEIMANN, J.C.; DRUMOND, S.; ALVES, A.T.R.; BARBATO, A.J.G.; DICHTCHEKENIAN, V.; MARCONDES, M. Left ventricular hypertrophy is more marked in salt-sensitive than in salt-resistant hypertensive patients. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v.17, p.S122-4, 1991. Supplement 2.
- 58-DICHTCHEKENIAN, V.; GISIGER, S.; QUENTAL, I.; SANTOS, S.R.C.J.; MARCONDES, M.; HEIMANN, J.C. Higher salt consumption, digoxine-like factor, and nifedipine response are associated with salt sensitivity in essential hypertension. **Am. J. Hypertens.**, v.5, p.707-12, 1992.
- 59-DAHL, L.K.; KNUDSEN, K.D.; HEINE, M.A.; LEITL, G.J. Effects of chronic excess salt ingestion. Modification of experimental hypertension in the rat by variations in the diet. **Circ. Res.**, v. 22, p.11-8, 1968.
- 60-LUFT, F.C.; RANKIN, L.I.; BLOCH, R.; WEYMAN, A.E.; WILLIS, L.R.; MURRAY, R.H.; GRIM, C.E.; WEINBERGER, M.H. Cardiovascular and humoral responses to extremes of sodium intake in normal black and white men. **Circulation**, v.60, p.697-706, 1979.
- 61-BAYLIS, C.; FREDERICKS, M.; LEYPOLDT, J.; FRIGON, R.; WILSON, C.; HENDERSON, L. The mechanisms of proteinuria in aging rats. **Mech. Ageing Dev.**, v.45, p.111-26, 1988.
- 62-TUCKER, B.J.; BLANTZ, R.C. Factors determining superficial nephron filtration in the mature, growing rat. **Am. J. Physiol.**, v.232, p.F97-F104, 1977.
- 63-BAOXUE, Y.; LEENEN, F.H.H. Dietary sodium intake and left ventricular hypertrophy in normotensive rats. **Am. J. Physiol.**, v.261, H1397-401, 1991.
- 64-PFEFFER, M.A.; PFEFFER, J.; MIRSKY, I.; IWAI, J. Cardiac hypertrophy and performance of Dahl hypertensive rats on graded salt diets. **Hypertension**, v.6, p.475-81, 1984.
- 65-SCHMIEDER, R.E.; MESSERLI, F.H.; GARAVAGLIA, G.E.; NUNEZ, B.D. Dietary salt intake. A determinant of cardiac involvement in essential

- hypertension. **Circulation**, v.78, p.951-6, 1988.
- 66-DU CAILAR, G.; RIBSTEIN, J.; GROLLEAU, R.; MIMRAN, A. Influence of sodium intake on left ventricular structure in untreated essential hypertensives. **J. Hypertens.**, v.7, p.S258-9, 1989. Supplement .
- 67-LINDPAINTNER, K.; SEN, S. Role of sodium in hypertensive cardiac hypertrophy. **Circ. Res.**, v.57, p.610-7, 1985.
- 68-DAVIS, J.O. The control of renin release. **Am. J. Med.**, v.55, p.333-50, 1973.
- 69-KAHN, C.R. Insulin resistance, insulin sensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction. **Metabolism**, v.27, p.1893-902, 1978. Supplement 2.
- 70-ELSAS, L.J.; LONGO, N. Glucose transporters. **Annu. Rev. Med.**, v.43, p.377-93, 1992.
- 71-MELAND, E.; LAERUM, E.; AAKVAAG, A.; ULVIK, R.J. Salt restriction and increased insulin production in hypertensive patients. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v.54, p.405-9, 1994.
- 72-MESSERLI, F.H.; NOWACZYNSKI, W.; HONDA, M.; GENEST, J.; BOUCHER, R.; KUCHEL, O.; OJO-ORTEGA, J.M. Effects of angiotensin II on steroid metabolism and hepatic blood flow in man. **Circ. Res.**, v.40, p.204-7, 1977.
- 73-PEIRIS, A.N.; MUELLER, R.A.; SMITH, G.A.; STRUVE, M.F.; KISSEBAH, A.H. Splanchnic insulin metabolism in obesity: influence of body fat distribution. **J. Clin. Invest.**, v.78, p.1648-57, 1986.
- 74-EGAN B.M.; STEPNIAKOWSKI, K. Effects of enalapril on the hyperinsulinemic response to severe salt restriction in obese young men with mild systemic hypertension. **Am. J. Cardiol.**, v.72, p.53-7, 1993.
- 75-BABA, T.; NEUGEBAUER, S. The link between insulin resistance and hypertension. Effects of antihypertensive and antihyperlipidaemic drugs on insulin sensitivity. **Drugs**, v.47, p.383-404, 1994.
- 76-BROUGHTON, D.L.; JAMES, O.W.F.; ALBERTI, K.G.M.M.; TAYLOR, R. Peripheral and hepatic insulin sensitivity in healthy elderly human subjects. **Eur. J. Clin. Invest.**, v.21, p.13-21, 1991.
- 77-GUMBINER, B.; THORBURN, A.W.; DITZLER, T.M.; BULACAN, F.; HENRY, R.R. Role of impaired intracellular glucose metabolism in the insulin

- resistance of aging. **Metabolism**, v.41, p.1115-21, 1992.
- 78-JACOB FILHO, W.; SOUZA, R.R. Anatomia e fisiologia do envelhecimento. In: CARVALHO FILHO, E.T.; PAPALÉO NETTO, M., ed. **Geriatría. Fundamentos, clínica e terapêutica**. São Paulo, Livr. Atheneu Editora, 1994. p.31-40.
- 79-LESSER, G.T.; DEUTSCH, S.; MARKOFSKY, J. The rat fat-free body in middle life: continuing growth and histochemical changes. **J. Gerontol.**, v.25, p.108-14, 1970.
- 80-BUCHANAN, T.A.; SIPOS, G.F.; GADALAH, S.; YIP, K-P.; MARSH, D.J.; HSUEH, W.; BERGMAN, R.N. Glucose tolerance and insulin action in rats with renovascular hypertension. **Hypertension**, v.18, p.341-7, 1991.
- 81-SAWICKI, P.T.; BABA, T.; BERGER, M.; STARKE, A. Normal blood pressure in patients with insulinoma despite hyperinsulinemia and insulin resistance. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v.3, p.S64-8, 1992. Supplement 1.
- 82-REAVEN, G.M.; HO, H.; HOFFMANN, B.B. Somatostatin inhibition of fructose-induced hypertension. **Hypertension**, v.14, p.117-20, 1989.
- 83-ZAVARONI, I.; MAZZA, S.; DALL'AGLIO, E.; GASPARINI, P.; PASSERI, M.; REAVEN, G.M. Prevalence of hyperinsulinaemia in patients with high blood pressure. **J. Intern. Med.**, v.231, p.235-40, 1992.
- 84-DEL RÍO, A.; RODRÍGUEZ-VILLAMIL, J.L. Metabolic effects of strict salt restriction in essential hypertensive patients. **J. Intern. Med.**, v.233, p.409-14, 1993.
- 85-GABOURY, C.L.; SIMONSON, D.C.; SEELY, E.W.; HOLLENBERG, N.K.; WILLIAMS, G.H. Relation of pressor responsiveness to angiotensin II and insulin resistance in hypertension. **J. Clin. Invest.**, v.94, p.2295-300, 1994.
- 86-FLISER, D.; FODE, P.; ARNOLD, U.; NOWICKI, M.; KOHL, B.; RITZ, E. The effect of dietary salt on insulin sensitivity. **Eur. J. Clin. Invest.**, v.25, p.39-43, 1995.