

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Pós-graduação em Saúde  
Área de concentração em Saúde Brasileira

Hussen Machado

**EFEITO DA DIETA HIPERLIPÍDICA NA MORFOLOGIA E  
HEMODINÂMICA RENAL DE RATOS WISTAR**

Juiz de Fora  
2012

**HUSSEN MACHADO**

**EFEITO DA DIETA HIPERLIPÍDICA NA MORFOLOGIA E  
HEMODINÂMICA RENAL DE RATOS WISTAR**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde – Área de concentração em Saúde Brasileira do Programa de Pós Graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Saúde.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Vera Maria Peters

Co-orientador: Prof. Dr. Rogério Baumgratz de Paula

Juiz de Fora  
2012

**HUSSEN MACHADO**

**EFEITO DA DIETA HIPERLIPÍDICA NA MORFOLOGIA E  
HEMODINÂMICA RENAL DE RATOS WISTAR**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde – Área de concentração em Saúde Brasileira do Programa de Pós Graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Saúde.

**Aprovada em 14 de dezembro 2012**

---

**Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves**  
Universidade de Brasília - UNB

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helady Sanders Pinhero**  
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

---

**Prof. Dr. Antônio Salustiano Machado**  
Quiral Química do Brasil S.A.

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Eliza Andreazzi**  
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Martha de Oliveira Guerra**  
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

*A Santuzza, pela ajuda, compreensão e paciência.  
Aos meus pais Milton e Marion, pelo apoio e amor incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

Aos mentores espirituais, cujas inspirações muito contribuíram para que os desígnios de Deus se concretizem em minha vida.

À professora Dr<sup>a</sup>. Vera Maria Peters, pela confiança, paciência e orientação.

*“Umam são mulheres; algumas professoras; poucas são mestres.*

*Às primeiras escutam-se; as segundas respeitam-se; as últimas seguem-se”.*

À professora Dr<sup>a</sup>. Martha Guerra de Oliveira, exemplo de sinceridade, amizade e seriedade profissional.

*“Os melhores professores são aqueles que se fazem de ponte e convidam seus alunos a atravessá-la; depois de facilitada a travessia, eles se desfazem com prazer, incentivando seus alunos a construírem suas próprias pontes”.*

Ao professor Dr. Rogério Baumgratz de Paula, pela exigência e rigor que contribuíram para meu crescimento profissional.

À professora Dr<sup>a</sup>. Helady Sanders Pinheiro, pela colaboração imprescindível na conclusão desse trabalho.

À Marcella, pela amizade e enorme dedicação para a realização de nosso trabalho.

Ao Leonardo, Lorena, Pedro, Ana Paula e Flávia, pela amizade ao longo de nossa formação.

À Santuzza, pela paciência e carinho diário. Obrigado por sempre acreditar em mim e em nosso sucesso.

A todos os estagiários e funcionários do CBR, que muito contribuíram para a realização desta obra.

Ao Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora(CBR/UFJF), pelo fornecimento das instalações, laboratórios, modelo experimental, funcionários e toda a logística para o desenvolvimento do projeto.

À Rede Mineira de Toxicologia e Farmacologia (TOXIFAR/Fapemig) pelo financiamento do projeto.

À Pós-graduação em Saúde da Universidade Federal e Juiz de Fora.

A todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram na realização deste trabalho.

Os meus sinceros agradecimentos!

## Resumo

**Introdução:** O tratamento da hipertensão arterial (HA) em indivíduos com síndrome metabólica (SM) é um desafio, uma vez que terapias não medicamentosas são de difícil implementação e o tratamento farmacológico ideal não está totalmente estabelecido. **Objetivo:** O presente trabalho objetivou avaliar o bloqueio do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) na pressão arterial (PA), na função e na morfologia renais em modelo experimental de SM, induzida por dieta hiperlipídica. **Material e métodos:** Ratos Wistar receberam ração hiperlipídica a partir da quarta semana de vida, por 20 semanas. Os grupos tratados receberam Losartana (10mg/kg/dia), Espironolactona (40mg/Kg/dia) ou quercetina (10mg/kg/dia), por gavagem, a partir da oitava semana de vida. Avaliou-se semanalmente o peso corporal e a PA de cauda por pletismografia. Ao final do experimento, foram realizados testes orais de tolerância à glicose, perfil lipídico, clearance de creatinina, medida direta da PA e análise morfométrica de área e volume glomerular. **Resultados:** A administração de dieta hiperlipídica se associou ao desenvolvimento de SM, caracterizada por acúmulo central de gordura, hipertensão arterial, hiperglicemia e hipertrigliceridemia. Nesse modelo, não foram observadas alterações da histomorfometria glomerular. O bloqueio do receptor AT<sub>1</sub> da angiotensina II preveniu o desenvolvimento da HA. O bloqueio mineralocorticoide não apresentou eficácia anti-hipertensiva, porém se associou à redução da gordura abdominal. A quercetina, por sua vez, não alterou de forma significativa o perfil nutricional, metabólico e pressórico dos animais. **Conclusão:** Ratos Wistar alimentados com dieta hiperlipídica

desenvolveram Síndrome Metabólica, porém não foram observadas alterações morfológicas e funcionais renais.

**Palavras chave:** Obesidade; Síndrome Metabólica; Hipertensão; Sistema renina angiotensina aldosterona; Modelo animal.



## ABSTRACT

**Introduction:** The treatment of arterial hypertension (AH) in patients with metabolic syndrome (MS) is a challenge, since non drug therapies are difficult to implement and optimal pharmacological treatment is not fully established.

**Objectives:** The present study had as objective to evaluate the blockade of the rennin angiotensin aldosterone system (RAAS) in blood pressure (BP) in renal function and morphology in an experimental model of MS induced by high fat diet.

**Material e methods:** Wistar rats were fed on high fat diet from the fourth week of life, for 20 weeks. The groups received Losartan (10mg/Kg/day), Spironolactone (40mg/Kg/day) or Quercetin (10mg/Kg/day) from the eighth week of life. We weekly evaluated the body weight and BP by tail plethysmography. At the end of the experiment oral glucose tolerance, lipid profile, creatinine clearance tests, and the direct measurement of BP were performed. A morphometric kidney analysis was performed.

**Results:** The administration of high-fat diet was associated with the development of MS, characterized by central fat accumulation, hypertension, hyperglycemia and hypertriglyceridemia. In this model there were no changes in renal histomorphometry. The blockade of angiotensin II receptor AT1 prevented the development of hypertension. The mineralocorticoid blockage did not have antihypertensive efficacy but was associated with reduction of abdominal fat. Quercetin, in turn, does not significantly alter animals nutritional, pressure and metabolic profile.

**Conclusion:** Wistar rats fed high fat diet developed metabolic syndrome but no changes were observed morphological and functional kidney.

**Keywords:** Obesity; Metabolic Syndrome; Hypertension; Renin Angiotensin System; animals Model

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO-----	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1. Síndrome metabólica-----	15
2.2. Prevalência da síndrome metabólica-----	17
2.3. O rim na síndrome metabólica-----	20
2.4. Síndrome metabólica e as alterações na hemodinâmica renal----	22
2.5. Tratamento da síndrome metabólica-----	25
3. HIPÓTESE-----	29
4. OBJETIVO-----	30
4.1. Objetivos específicos -----	30
5. MATERIAL E MÉTODOS	
5.1. Parecer do comitê de ética em experimentação animal-----	31
5.2. Animais-----	31
5.3. Grupo e desenho experimental-----	31
5.4. Determinação da Síndrome Metabólica	
5.4.1. Obesidade-----	33
5.4.2. Acúmulo de gordura abdominal-----	34
5.4.3. Pressão arterial	
5.4.3.1. Método indireto-----	34
5.4.3.2. Método direto-----	34
5.4.4. Lipídios-----	35
5.4.5. Teste de tolerância oral à glicose-----	36
5.4.6. Função renal-----	36
5.4.7. Morfologia Renal-----	36
5.4.8. Eutanásia-----	38
5.4.9. Análise estatística-----	38
6. RESULTADOS e DISCUSSÃO-----	39
6.1. ARTIGO 1-----	40
“Efeito da Quercetina em ratos Wistar com Síndrome Metabólica”	
6.2. ARTIGO 2-----	41

	“Dissociação da resposta anti-hipertensiva e metabólica à losartana e espironolactona em ratos com síndrome metabólica experimental”	
6.3.	ARTIGO 3-----	42
	“Flavonoides e seu potencial terapêutico”	
6.4.	ARTIGO 4-----	43
	“Implantação e padronização da técnica de aferição indireta da pressão arterial em ratos Wistar da colônia do Centro de Biologia da Reprodução (CBR)”.	
6.5.	APRESENTAÇÃO EM CONGRESSO-----	44
7.	COMENTÁRIOS FINAIS-----	45
8.	CONCLUSÃO-----	46
9.	REFERÊNCIAS-----	47
10.	APÊNDICE	
10.1.	Artigo 1-----	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

BRA-	Bloqueador do receptor de angiotensina
C <sub>CR</sub> -	Clearance de creatinina
CR-	Creatinina
CURES-	Cennai Urban Rural Epidemiology Study
DRC-	Doença renal crônica
FC-	Frequência cardíaca
HA-	Hipertensão arterial
IDF-	International Diabetes Federation
IECA-	Inibidor da enzima conversora de angiotensina
IMC-	Índice de Massa Corporal
MC-	Microalbuminúria
NCEP-ATPIII-	National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III
NHANES-	National Health and Nutrition Examination Survey
PAD-	Pressão arterial diastólica
PAP-	Pressão arterial pulsátil
PAS-	Pressão arterial sistólica
RI-	Resistência insulínica
SM-	Síndrome metabólica
SRAA-	Sistema renina angiotensina aldosterona
TFG-	Taxa de Filtração Glomerular
TG-	Tufo glomerular
TOTG-	Teste oral de tolerância à glicose
VG-	Volume glomerular
WHO-	World Health Organization

## 1. INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica (SM) é uma desordem multifatorial de alta prevalência, que se manifesta por anormalidades fisiológicas e bioquímicas, caracterizada pela associação de três ou mais comorbidades que incluem obesidade central, hipertensão arterial (HA), intolerância à glicose, aumento nos níveis de triglicérides e redução nos níveis de colesterol HDL (NCEP-ATPIII, 2001). Em conjunto, estes fatores resultam em elevado risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e lesão renal, sendo este risco proporcional ao número de componentes da SM (CHEN, 2004; DAS; PAL; GHOSH, 2012).

Sua incidência na população vem crescendo e estima-se que 23,7% dos americanos adultos sejam portadores da SM (FORD; GILES; DIETZ, 2002). No Brasil, a ocorrência desse agravamento também é, constantemente, superior a 20,0% (DORO et al., 2006; SALAROLI et al., 2007). O interesse no estudo da relação entre SM e comprometimento da função renal de indivíduos obesos deve-se à frequente associação de obesidade abdominal com diabetes mellitus e hipertensão arterial, principais causas de doença renal crônica (DRC) em todo o mundo (CHOBANIAN et al., 2003; LIM et al., 2011).

Até o momento, não existe tratamento específico para SM, no entanto, acredita-se que a abordagem terapêutica de seus componentes poderia reduzir o risco cardiovascular. Idealmente, este tratamento deveria se basear na redução ponderal, contudo, o índice de sucesso desta medida terapêutica é baixo, o que demanda a instituição de tratamento específico da dislipidemia, da resistência insulínica e da pressão arterial (I-DBSM, 2005; EZEQUIEL et al., 2012). Nessa população, o tratamento medicamentoso da HA tem como

objetivo reduzir a morbidade e a mortalidade cardiovascular e renal, além de prevenir o agravamento metabólico (I-DBSM, 2005).

Evidências clínicas e experimentais, do bloqueio do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), sugerem a participação efetiva desse sistema na gênese da HA e da lesão renal na SM (DE PAULA; SILVA; HALL, 2004; LUBSEN et al., 2005). Essa estratégia parece ser promissora, uma vez que estudos mostraram atenuação de outros componentes da SM, por exemplo, da hipertrigliceridemia, com o bloqueio do SRAA (COSTA et al., 2010). Todavia, os estudos disponíveis não permitem generalizar o uso de bloqueadores do SRAA como estratégia no tratamento da HA associada à SM (I-DBSM, 2005; CAPRIO et al., 2011).

Deste modo, a utilização de modelos experimentais constitui uma alternativa para ampliar o conhecimento sobre os diferentes esquemas de tratamento hipotensor na SM. Portanto, julgamos relevante avaliar o bloqueio do SRAA sobre a pressão arterial, função e morfologia renais, em modelo experimental de SM induzida por dieta hiperlipídica.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Síndrome Metabólica

A Síndrome Metabólica (SM) é um transtorno complexo, representado por um conjunto de fatores de risco cardiovascular, usualmente relacionados à deposição central de gordura e a resistência à insulina (I-DBSM, 2005, DAS; PAL; GHOSH, 2012).

Analisando a evolução conceitual da SM, evidencia-se que diversos critérios e pontos de corte nos parâmetros de diagnóstico têm sido propostos. As diferentes definições para a SM confrontaram-se com difíceis questões: a) quais componentes deveriam ser incluídos; b) qual a importância a ser dada a cada um deles; c) quais métodos deveriam ser utilizados para mensurá-los; d) quais pontos de corte deveriam ser usados para se definir cada uma das anormalidades. Contudo, permaneceram em consenso para diagnóstico da SM a dislipidemia (aumento nos níveis de triglicérides e redução nos níveis de HDL colesterol), hipertensão arterial, obesidade abdominal e alterações na homeostase da glicose (KAHN et al., 2005).

Todos estes questionamentos evidenciam o interesse pelo assunto e a necessidade de se entender melhor a SM, o que constitui um avanço para a prevenção de doenças cardiovasculares (SAAD; ZANELLA; FERREIRA, 2006).

As três principais definições da SM que têm sido propostas tanto na pesquisa como na prática clínica são: World Health Organization (WHO), *National Cholesterol Education Program (NCEP) - Adult Treatment Panel III (ATP III)* e International Diabetes Federation (IDF) (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação da Síndrome Metabólica



	WHO (1998)	NCEP-ATP III (2005 revisado)	IDF (2005)
Absolutamente Necessário	Resistência insulínica (ATG, AGJ, DT <sub>2</sub> , RI)	-----	Obesidade central
Critério	RI ou diabetes, mais 2 anormalidades entre 5	No mínimo 3 anormalidades entre 5	Obesidade, mais 2 anormalidades entre 4
Obesidade	Razão cintura/quadril > 0,9 (masculino) > 0,85 (feminino) ou IMC > 30 Kg/m <sup>2</sup>	Circunferência cintura > 88 cm (feminino) > 102 cm (masculino)	Requerimento obrigatório
Hiperglicemia	Resistência Insulínica obrigatória	Glicose de jejum ≥ 100 mg/dL ou tratamento farmacológico	Glicose de jejum ≥ 100 mg/dL
Dislipidemia	TG ≥ 150 mg/dL ou C-HDL: < 35 mg/dL (masculino) < 39 mg/dL (feminino)	TG ≥ 150 mg/dL ou tratamento farmacológico	TG ≥ 150 mg/dL ou tratamento farmacológico
Dislipidemia critério secundário	-----	C-HDL: < 40 mg/dL (masculino) < 50 mg/dL (feminino) ou tratamento farmacológico	C-HDL: < 40 mg/dL (masculino) < 50 mg/dL (feminino) ou tratamento farmacológico
Hipertensão	≥ 140/90 mmHg	> 130 mmHg sistólica ou > 85 mmHg diastólica ou tratamento farmacológico	> 130 mmHg sistólica ou > 85 mmHg diastólica ou tratamento farmacológico
Outros critérios	Microalbuminúria*		

WHO, World Health Organization; NCEP-ATP III, *National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III*; IDF, International Diabetes Federation. ATG, alteração na tolerância a glicose; AGJ, alteração na glicose de jejum; DT<sub>2</sub>, diabetes tipo II; RI, resistência insulínica; \*Excreção urinária de albumina ≥20µg/min ou razão albumina creatinina ≥30mg/g.

Mesmo que, as três principais definições reconheçam a SM como uma entidade clínica associada a múltiplos fatores de risco para doença cardiovascular, um exame cuidadoso indica muitas semelhanças e disparidades importantes.

A definição da WHO, inclui pessoas com alto risco de desenvolver diabetes e indivíduos com diagnóstico de diabetes do tipo 2, além de incluir a microalbuminúria, associando, assim, a SM com doença renal crônica. Essa definição tem sido criticada por incluir distúrbios do metabolismo glicídico como critérios *sine qua non* para o diagnóstico. Outras críticas referem-se ao teste

oral de tolerância à glicose, exame considerado de baixo valor adicional para prever o risco cardiovascular (GRUNDY et al., 2004).

A definição da IDF, por outro lado, enfatiza a presença de obesidade central como fator fundamental no diagnóstico da SM, além de fornecer critérios de circunferência da cintura pragmáticos para vários grupos étnicos. No entanto, Lee e cols. (2007) demonstraram que, indivíduos diagnosticados com SM/obesidade central apresentavam risco similar para a ocorrência de doenças isquêmicas do coração, do que aqueles diagnosticados com SM/sem obesidade central. Esses autores sugerem, que a inclusão da obesidade central como um componente essencial para o diagnóstico da SM, como proposto pela IDF, não adiciona valor para a identificação de indivíduos com risco aumentado de doenças isquêmicas do coração.

O NCEP-ATP III é uma das definições mais utilizadas no diagnóstico da síndrome metabólica. Incorpora as principais características da síndrome, como hiperglicemia e/ou resistência à insulina, obesidade visceral, dislipidemia e hipertensão. Outra questão importante, é que nenhum componente é priorizado, evitando a polêmica criada em torno das definições da WHO e IDF. Pela simplicidade e praticidade, é a definição recomendada pela I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica (I-DBSM, 2005).

## **2.2. Prevalência da Síndrome metabólica**

A SM é uma condição que apresenta elevada prevalência, com tendência crescente de ocorrência na população. Do ponto de vista epidemiológico, a SM torna-se ainda mais preocupante considerando-se que a mortalidade

cardiovascular é 2,5 vezes maior nesses indivíduos (LAKKA et al., 2002). Apesar de ser um problema mais evidente em adultos e idosos, crianças e adolescentes têm sido diagnosticadas com SM. Diante das crescentes taxas de obesidade em todo o mundo, existem fortes indícios de que crescentes serão os índices de SM (WHO, 2006; LIM et al., 2011).

Corroborando com esse fato, estudo coreano envolvendo meninos e meninas com idade entre 12 e 19 anos, revelou aumento de prevalência geral da SM de 6,8% em 1998 para 9,2% em 2001, fortemente relacionado ao aumento da obesidade; 50% por cento dos meninos e 40% das meninas encontravam-se obesos e foram diagnosticados com SM (KIM et al., 2007). Estudo americano, analisando 2.430 adolescentes, de mesma faixa etária e ambos os sexos, encontrou prevalência de 30% no diagnóstico de SM (COOK et al., 2003).

Em 2009, foi possível estimar com maior precisão o risco de morte causado pelas doenças crônicas, quando meta-análise de 57 estudos prospectivos, totalizando aproximadamente 900.000 indivíduos (PROSPECTIVE STUDIES COLLABORATION, 2009), encontrou que, em ambos os sexos, a mortalidade foi menor em indivíduos com IMC entre 22,5 e 25 Kg/m<sup>2</sup>. Acima dessa faixa, o risco associado é aditivo, ou seja, quanto maior o IMC, maior a mortalidade. Um aumento de 5 Kg/m<sup>2</sup> está associado a um incremento de 30% na mortalidade geral, 40% na mortalidade cardiovascular, 120% na mortalidade por diabetes e 60% na mortalidade por doença renal.

O IDF (2005) estimava que 25% da população mundial adulta tem SM. A prevalência da SM varia nos diferentes grupos populacionais, em função das características de etnia, faixa etária e proporção entre os gêneros, além dos

critérios utilizados para diagnóstico (OGDEN et al., 2006). Esses fatores de confusão podem ser observados em diferentes estudos, como o Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES), onde a prevalência de SM variou em função do critério de diagnóstico adotado: WHO: 23,2%; NCEP-ATPIII: 18,3% e IDF: 25,8%. Somente 9,5% dos sujeitos foram identificados em todos os três critérios (DEEP et al., 2007).

Avaliando os dados do *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) observou-se que a prevalência de SM foi de 23,7%, variando de acordo com a etnia, sendo de 31,9% nos americanos com ascendência latina; 23,8% em brancos não hispânicos e de 21,6% em indivíduos de origem africana. A maior prevalência foi de 55,2% entre índios americanos, segundo descrição do Strong Heart Study (CHEN et al., 2004).

Em função do gênero e da faixa etária, o estudo InterASIA na China relatou que a prevalência entre as mulheres foi maior do que entre os homens (GU et al., 2005), ocorrendo aumento acentuado da prevalência após 30 anos de idade, em ambos os sexos entre adultos, com um pico para os homens entre 50 e 70 anos e para mulheres entre 60 a 80 anos. Tendências semelhantes foram encontrados em populações europeias e chinesas (CHEN et al., 2004).

Em resumo, os índices de acometimento pela SM variam significativamente entre os diferentes grupos populacionais, uma vez que as prevalências das anormalidades que a compõem dependem de fatores socioeconômicos, culturais, hábitos alimentares, níveis de atividade física, fatores genéticos (CAMERON; SHAWN; ZIMMET, 2004, KIM; HONG, 2010).

No Brasil, a proporção de pessoas acometidas pela SM não foi bem dimensionada, pois não existem estudos realizados com dados representativos

da população. Em inquéritos epidemiológicos isolados, a ocorrência desse agravo no Brasil é, constantemente, superior a 20,0% (BORGES et al., 2007; DORO et al., 2006; SALAROLI et al., 2007). Como demonstrado por Salaroli et al. (2007) que avaliaram 1.663 indivíduos na população da cidade de Vitória (ES) e encontraram uma prevalência de 29,8% em ambos os sexos.

### **2.3. O rim na Síndrome Metabólica**

Inicialmente, o conceito de SM foi correlacionado a um conjunto de fatores que predisponha o indivíduo a riscos cardiovasculares, usualmente relacionados à deposição central de gordura e à resistência à insulina. No entanto, devido à relação existente entre doença renal e risco cardiovascular, não é surpreendente que a SM constitua um fator de risco para a nefropatia. (CHEN et al., 2004; KINCAID-SMITH., 2004; LEE, 2010).

Os primeiros relatos da associação entre obesidade e lesão renal datam da década de 70. Nessa época, foi demonstrado que pacientes obesos desenvolviam proteinúria, glomerulomegalia e glomeruloesclerose segmentar e focal (WEISINGER et al., 1974). Durante 30 anos, esse tema permaneceu em aberto devido a conclusões divergentes quanto à associação entre ganho ponderal e nefropatia. Em 2000, o departamento de Patologia da Universidade de Columbia, reavivou a discussão ao reavaliar 6618 biópsias renais, realizadas entre os anos de 1986 e 2000. Nesse estudo, os autores observaram aumento de 2% no número de glomerulopatias relacionadas à obesidade, a partir de 1996 até 2000 (KAMBHAM et al., 2001).

Na mesma vertente, estudo japonês envolvendo mais de 300.000 pacientes entre os anos de 1964 e 1985, demonstrou forte correlação entre obesidade e

DRC, ao observar que quanto maior o IMC, maior o risco do desenvolvimento da doença renal (HSU et al., 2006). Essa correlação também foi observada em estudo animal, onde a obesidade associou-se à glomerulomegalia, expansão da cápsula de Bowman, proliferação celular, espessamento de membrana basal tubular e expansão da matriz mesangial (HENEGAR et al., 2001; DE PAULA et al., 2004).

Tomando por base a hipótese da associação entre SM e doença renal, estudo de coorte de 7.800 pacientes acompanhados pelo NHANES III por um período de 21 anos, encontrou que o risco de desenvolvimento da DRC foi 2,6 vezes maior em indivíduos portadores de SM. Além da associação entre SM e DRC, constatou-se que, quanto maior o número de componentes da SM presentes, maior o risco de desenvolvimento da DRC (*Odds Ratio* 1,89 – 5,85), mesmo com a exclusão de indivíduos diabéticos (CHEN et al.; 2004). Kurella e cols. (2005) relataram resultados similares, em estudo de coorte de grande base populacional, onde descrevem aumento no risco de DRC em portadores de SM, mesmo após ajuste de indivíduos portadores de diabetes e hipertensão.

Embora o resultado desses estudos demonstrem positiva associação entre SM e disfunção renal, é difícil definir relação de causa e efeito, devido à complexidade de suas interrelações, uma vez que as comorbidades que compõem a SM, individualmente ou associadas de forma sinérgica, predis põem o indivíduo a risco de desenvolvimento da doença renal (AGRAWAL et al., 2009).

## 2.4 Síndrome Metabólica e as alterações na hemodinâmica renal.

A obesidade pode ser definida, de forma resumida, como o grau de armazenamento de gordura no organismo, que acomete a saúde devido sua relação com anomalias metabólicas, inflamatórias e hemodinâmicas (WHO, 1995). Operacionalmente, a obesidade é diagnosticada pelo parâmetro estipulado pela WHO, o índice de massa corporal (IMC) obtido pela relação entre peso corpóreo (kg) e estatura ( $m^2$ ) dos indivíduos. Através deste parâmetro são considerados obesos os indivíduos cujo IMC encontra-se igual ou superior a  $30 \text{ kg/m}^2$  (WHO, 1998).

A obesidade, *per se*, vem sendo descrita como um fator independente para o desenvolvimento de lesão renal. Mesmo as classes leve e moderada de obesidade podem ocasionar o desenvolvimento de glomerulopatia, que é clínica e morfológicamente indistinguível daquela observada na mórbida (HALL, 2004). O excesso de peso corporal está associado com mudanças renais estruturais e funcionais, tais como aumento da taxa de filtração glomerular (TFG), fluxo plasmático renal e microalbuminúria (HALL, 2004; CHAGNAC et al., 2003).

Chi-Yuan *et al.* (2006) observaram que, independente da presença da SM, quanto maior o IMC, maior o risco para DRC. Com base nesses achados, os autores questionam o papel da SM, isoladamente, na gênese de lesão renal. Contudo, é preciso lembrar que, frequentemente, a obesidade se encontra associada à SM e que tanto o sobrepeso quanto a obesidade são importantes fatores de risco para o desenvolvimento do DRC (EZEQUIEL *et al.*; 2012).

Partindo-se do princípio que a microalbuminúria é reflexo das alterações na filtração glomerular, é de se supor que a hemodinâmica renal tenha um papel fundamental na lesão renal de obesos. De fato, essas alterações têm sido descritas em humanos e animais (MULYADI et al., 2001; FERREIRAL et al., 2011). Estudo realizado em indivíduos com sobrepeso e obesidade, demonstrou que a presença da obesidade andróide implicou em risco 18 vezes maior de microalbuminúria em relação a eutróficos controle, ao passo que naqueles com distribuição ginecóide, este risco foi quatro vezes maior (MULYADI et al., 2001).

A obesidade está diretamente relacionada ao aumento na reabsorção tubular de sódio e a alterações na natriurese pressórica. Nestes casos, o tecido adiposo abdominal, em excesso, promoveria aumento da pressão intrarrenal, resultando em menor fluxo sanguíneo renal na *vasa recta*, aumentando assim, a reabsorção de sódio. Além disso, devido à baixa complacência da cápsula renal, uma maior compressão do sistema de filtração glomerular levaria a aumento da pressão arterial, como medida compensatória. Em longo prazo, porém, ocorreria aumento na TFG e conseqüente lesão renal (HALL et al., 2003; 2004).

Embora os mecanismos responsáveis pelo aumento na TFG em indivíduos obesos não tenham sido completamente elucidados, o mecanismo de *feedback* da mácula densa parece importante. Em fase inicial, o ganho excessivo de peso corporal aumenta a reabsorção de sódio pelos segmentos tubulares anteriores à mácula densa. Assim, o hipofluxo de sódio na mácula densa resulta em ativação do *feedback* tubuloglomerular, ocasionando vasoconstrição das artérias aferentes e aumento na secreção de renina, apesar da retenção de



sódio e expansão do volume extracelular (HALL et al., 2003). Entretanto, em longo prazo, o rim sofreria os efeitos da hiperfiltração glomerular, que resultaria em lesão glomerular, diagnosticada pela microalbuminúria (GROSS et al., 2005).

Outro mecanismo, provavelmente envolvido na retenção de sal associada à obesidade, é a hiperatividade do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA). Tanto em homens como em roedores, o tecido adiposo sintetiza todos os elementos do SRAA, com funções essenciais no equilíbrio hidromineral e cardiovascular (KLOET; KRAUSE; WOODS, 2010). Estudo com mulheres obesas demonstrou que a perda de peso corporal em 5% se associou a reduções de 27% nos níveis séricos de angiotensinogênio, 43% de renina, 31% de aldosterona e 12% na atividade da enzima conversora de angiotensinogênio, além de redução significativa na pressão arterial. (ENGELI et al., 2005). Ainda em seres humanos com SM, a administração de espironolactona, um inibidor competitivo da aldosterona, em monoterapia, reduziu a pressão arterial de modo significativo, sugerindo a importância clínica desse sistema hormonal na HA neste contexto (COSTA et al., 2010).

Ademais, estudos recentes sugerem que a aldosterona induziria lesão vascular e HA apenas na vigência do consumo aumentado de sódio. O sódio atua sinergisticamente na ativação do receptor mineralocorticóide (RM) pela aldosterona, aumentando a expressão de citocinas e mediadores pró-inflamatórios como Cox-2, MCP-1 e osteopontina, responsáveis pelo desenvolvimento de microalbuminúria, vasculopatia e HA (FUJITA, 2010). Rocha e cols. (2002) demonstraram que a ativação dos RM pela administração concomitante de aldosterona e sódio agravou a intensidade das lesões

coronarianas e da HA em ratos Sprague-Dawley; entretanto, na ausência de um dos agonistas ou na presença de um antagonista mineralocorticoide, menor ação vasculotóxica e hipertensiva foi observada.

Complementarmente, a hiperatividade simpática é uma característica comum à obesidade em humanos e em modelos animais. O aumento da atividade simpática pode elevar a pressão arterial, via vasoconstrição periférica e aumento da reabsorção tubular renal de sódio, além de preceder e desencadear alterações na atividade do SRAA (RAHMOUNI et al., 2005).

Evidências indicam que a hiperatividade simpática na obesidade está diretamente correlacionada com os altos níveis de leptina. Além de seus efeitos no controle do apetite e no metabolismo, a leptina age diretamente no hipotálamo aumentando a atividade simpática (CARVALHEIRA et al., 2005). Em adição, a leptina poderia atuar diretamente no rim, aumentando o estresse oxidativo e desencadeando estímulos simpáticos (BELTOWSKI et al., 2004).

Outro mecanismo envolvido na ativação simpática seria a hiperinsulinemia (RAHMOUNI et al., 2005). Dados do *Normative Aging Study* demonstraram associação entre IMC e concentrações séricas de noradrenalina em indivíduos hiperinsulinêmicos, pressupondo, em obesos, a participação da insulina na ativação adrenérgica (WARD; SPARROW; LANDSBERG, 1996; EIKELIS et al., 2003).

## **2.5. Tratamento da Síndrome Metabólica**

Fundamentalmente, a SM é consequência de distúrbios na homeostase energética. Unger (2003) descreve a SM como uma “falha no sistema de homeostase intracelular de lipídios”, o que predispõem indivíduos obesos a

lipotoxicidade. Considerando que a SM está intimamente relacionada à resistência à insulina (REAVEN, 2002, DAS; PAL; GHOSH, 2012), que por sua vez está relacionada à obesidade, principalmente a obesidade abdominal (RIBEIRO FILHO et al., 2006), o primeiro tratamento consiste na redução do peso corporal associada à prática regular de atividade física (GRUNDY et al., 2004).

Tendo em vista, que a redução ponderal é a principal ferramenta terapêutica para SM, Brambilla et al. (2011) relataram que a dieta e a atividade física tem efeitos diferentes na composição corporal, com ambos contribuindo para a perda de gordura, mas somente a atividade física aumenta a massa muscular e conseqüentemente tem um efeito direto na função metabólica, expressa por mudanças nos fatores de risco cardiovascular.

Todavia, as medidas não farmacológicas frequentemente são de difícil implementação uma vez que, estão associadas à prática regular de exercícios físicos e o tratamento medicamentoso da SM ainda não está totalmente estabelecido (I-DBSM, 2005). Assim sendo, muitos pacientes com SM necessitam de tratamento medicamentoso integrado, abrangendo simultaneamente cada um dos seus componentes (GRUNDY et al., 2004; ISRAILI et al., 2007; LEE, 2010).

A utilização de modelos experimentais de SM constitui uma alternativa para estudo de mecanismos causais e para a avaliação do tratamento com medicações anti-hipertensivas. Dentre estes modelos, os que são induzidos por modificações dietéticas são os que melhor reproduzem as alterações metabólicas da SM, incluindo dislipidemia, hipertensão arterial, intolerância à

glicose e hiperinsulinemia (TOSHIHARU et al., 1996; DOBRIAN et al., 2000; SHEN et al., 2004)

Chen et al, (2004), observaram que a HA e o DM foram as características associadas à SM que predisõem o indivíduo a maior risco do desenvolvimento de microalbuminúria. Diagnóstico esse, também demonstrado, na associação entre obesidade neuroendócrina e hipertensão arterial, em ratos Wistar e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) onde, alterações morfológicas e funcionais nos glomérulos foram observadas, sendo a hipertensão um fator de agravo (FERREIRA et al., 2011).

Um dos maiores desafios para o clínico refere-se ao tratamento da HA em indivíduos com SM. Alguns autores preconizam o uso de diuréticos, o que pode interferir em parâmetros metabólicos, enquanto outros sugerem a importância de fármacos que não interfiram nesses parâmetros, tais como os bloqueadores dos canais de cálcio e os inibidores do SRAA (LUBSEN et al., 2005; WILLIAMS et al., 2008).

As drogas inibidoras do SRAA, como os inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECAs) e os bloqueadores de receptores da angiotensina (BRAs), são mais eficazes do que as outras classes de anti-hipertensivos, principalmente na nefropatia diabética, mas também em hipertensos não diabéticos. O efeito renoprotetor dos IECAs e dos BRAs pode ser devido a sua ação glomerular, ao causar vasodilatação da arteríola eferente, com consequente queda da pressão intraglomerular, um dos principais determinantes da esclerose glomerular e da excreção protéica (FELDMAN et al., 2008).

Estudo em cães e em ratos Sprague-Dawley, demonstraram que o bloqueio SRAA preveniu o aumento da PA, assim como a lesão vascular induzida pela aldosterona (ROCHA et al., 2002; DE PAULA; SILVA; HALL, 2004) Do mesmo modo, o estudo *Rales* demonstrou que o tratamento com Espironolactona em baixa dose (25 mg/dia), se associou à melhoria nos sintomas de pacientes com insuficiência cardíaca grave, diminuição de hospitalizações e mortalidade (PITT et al., 1999).

O bloqueio do SRAA parece eficaz para o controle da HA, bem como da hipertrigliceridemia e da resistência insulínica (COSTA et al., 2010). Sarzani e cols. (2008) observaram boa resposta anti-hipertensiva associada à baixa frequência de efeitos adversos. Todavia, os estudos disponíveis não apresentam poder estatístico para generalização dessa estratégia no tratamento da HA associada à SM.

Por outro lado, estudos sugerem que dietas ricas em flavonoides têm a propriedade de reduzir o risco de doenças degenerativas, tais como os eventos coronários, as doenças cardiovasculares, a dislipidemia e o diabetes (PEREZ-VIZCAINO et al., 2010). Os flavonoides, entre eles a quercetina, estão amplamente distribuídos nas plantas e encontram-se presentes em quantidades consideráveis em frutas e vegetais (BIRT; HENDRICH; WANG, 2001). A quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavona), possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e vasodilatadoras, que em estudos em animais e humanos parece eficaz no tratamento das comorbidades que compõem a SM (DUARTE et al., 2001; EDWARDS et al., 2007; MACKRAJ; GOVENDER; RAMESAR, 2008).

### **3. HIPÓTESE**

Ratos Wistar alimentados com dieta hiperlipídica desenvolvem Síndrome Metabólica e apresentam alterações morfológicas e funcionais renais, preveníveis com o bloqueio do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona.

## **4. OBJETIVO GERAL**

Avaliar parâmetros metabólicos, morfológicos e funcionais renais de ratos Wistar após indução de Síndrome Metabólica, submetidos ao bloqueio do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona.

### **4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 4.1.1. Reproduzir experimentalmente a SM em ratos Wistar.
- 4.1.2. Verificar a presença de lesão renal no modelo.
- 4.1.3. Avaliar se há resposta diferente com bloqueio de receptores AT<sub>1</sub> e mineralocorticoide.
- 4.1.4. Julgar o efeito anti-hipertensivo da quercetina

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Parecer do comitê de ética em experimentação animal**

O protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, certificado pelo protocolo N<sup>o</sup> 001/2009 - CEEA. A utilização e manejo dos animais foram conduzidos de acordo com as regras do “*International Council for Laboratory Animal Science*”.

### **5.2. Animais**

Foram utilizados 60 ratos Wistar, machos, com quatro semanas de idade, pesando  $55 \pm 3$  g (média  $\pm$  DP), fornecidos pelo Centro de Biologia da Reprodução (CBR), da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos de 12 animais, em gaiolas de polipropileno, nas medidas de 41x34x16cm, cinco animais por gaiola, com cama de maravalha, mantidos em armários climatizados, em ambiente com ciclo de iluminação claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada ( $23 \pm 2$  °C) e umidade de ( $55 \pm 10\%$ ). No período de experimentação, os animais receberam água e ração *ad libitum*.

### **5.3. Grupos e desenho experimental**

No grupo controle (C), os animais foram alimentados com dieta comercial Nuvital<sup>®</sup> (Nuvilab, Colombo PR, Brasil), normocalórica (carboidrato 68%, proteína 19%, lipídios 3,5%, fibras 4,5%, vitaminas e minerais 5%, 370 Kcal/100g) durante vinte semanas. No grupo hiperlipídico (H) os animais foram



alimentados, pelo mesmo tempo, com dieta hiperlipídica pré-fabricada (Pragsoluções Comércio e Serviços Ltda, Jaú SP, Brasil), contendo: carboidrato 35%, proteína 19%, lipídios 36,5%, fibras 4,5%, vitaminas e minerais 5%, 520 Kcal/100g. Abaixo, composição nutricional da dieta hiperlipídica.

Tabela 1: Composição nutricional da dieta hiperlipídica (g/kg)

Ingredientes	Gramas/Kg
Amido de milho	200
Farelo de soja	300
Banha	190
Ac. Graxo saturado	158,5
Ac. Graxo insaturado	70
Fibra	30
L cistina	3,88
Cloreto colina	2,58
BHT (antioxidante)	0,014
Mix mineral*	35
Mix vitamínico#	10
TOTAL	999,974
Kcal Total:	5240
Kcal Lipídio	65%

\* Mix Mineral (g/kg mix) contém: 30,5g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 65,2g NaCl; 105,7g KCl; 200,2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 38,8g MgCO<sub>3</sub>.Mg(OH)<sub>2</sub>.3H<sub>2</sub>O; 40g FeC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>.5H<sub>2</sub>O; 516,4g CaCO<sub>3</sub>; 0,8g KI; 0,9 g NaF; 1,4g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; 0,4g MnSO<sub>4</sub> e 0,05g CoNO<sub>3</sub>. # Mix Vitamínico (g/kg mix) contém: 3g Tiamina mononitrato; 3g riboflavina; 3,5g piridoxina HCl; 15g nicotinamida, 8g pantotenato de cálcio, 1g ácido fólico; 0,1g biotina; 0,005g cianocobalamina; 0,013g acetomenaphtone, 0,6g acetato de vitamina A, 25g D-RRR- acetato tocoferol e 10g cloreto de colina.

Nos grupos hiperlipídico/Losartana (H+L), hiperlipídico/Quercetina (H+Q) e hiperlipídico/Espironolactona (H+E) os animais receberam a mesma dieta do grupo (H) e, a partir da oitava semana de vida, os animais do grupo H+L receberam 10mg/kg/dia de Losartana (Merck S.A, Rio de Janeiro RJ, Brasil), os animais do grupo H+Q receberam 10mg/kg/dia de Quercetina (Sigma Aldrick, Germany) e os animais do grupo H+E receberam 40mg/kg/dia de

Espironolactona (Pfizer S.R.L, Buenos Aires, Argentina) por gavagem, durante dezesseis semanas.

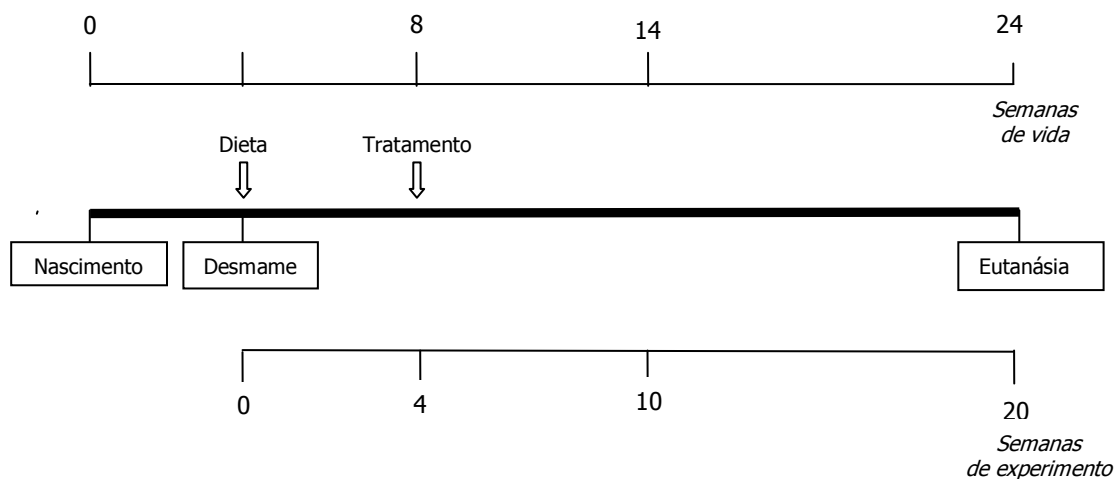


Figura 1- Desenho experimental

## 5.4. Determinação da Síndrome Metabólica

### 5.4.1. Acúmulo de gordura visceral

Uma vez por semana, durante 20 semanas de experimento, o consumo energético e o peso corporal (g) dos animais foram avaliados, individualmente, nos diferentes grupos. Considerou-se os animais como obesos quando a diferença de peso entre os grupos com dieta hiperlipídica (H, H+L, H+Q e H+E) foi significativa em relação ao grupo controle (C) (NASCIMENTO et al., 2008).

Para o cálculo de consumo alimentar (g) e energético (Kcal/dia), os animais foram pesados e alocados individualmente em gaiolas metabólicas, com quantidades fixas de dieta, uma vez por semana, por um período de 24 horas.

#### **5.4.2. Acúmulo de gordura abdominal**

Ao final do experimento, após eutanásia por exsanguinação, sob anestesia com cetamina, xilazina (König SA<sup>®</sup>, Avellaneda, Argentina), foi realizada lipectomia abdominal bilateral e obteve-se o peso (g) do tecido adiposo retroperitoneal (RET), epididimários (EP) direito e esquerdo. Estes parâmetros foram utilizados como critério de obesidade visceral.

#### **5.4.3. Pressão arterial**

##### **5.4.3.1. Método indireto**

A pressão arterial sistólica foi determinada em mmHg, semanalmente, utilizando o método não invasivo da pletismografia de cauda (Pletismógrafo LE5001; Panlab<sup>®</sup>, Barcelona, Espanha). Após pré-condicionamento na câmara de contenção, os animais foram pré-aquecidos a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos e foram obtidas dez leituras consecutivas. A medida individual da pressão arterial foi calculada pela média das leituras obtidas (MACHADO; GUERRA; PETERS, 2010).

##### **5.4.3.2. Método direto.**

Os animais foram anestesiados com cetamina (90 mg/kg) e xilazina (10mg/kg) (König SA<sup>®</sup>, Avellaneda, Argentina), administrada por via intramuscular.

Após fixação do animal em decúbito ventral, a artéria femoral esquerda foi localizada e dissecada. Com auxílio de linhas de sutura, o fluxo sanguíneo da artéria femoral foi interrompido na altura de sua extremidade distal e proximal. Utilizando-se de tesoura oftalmológica, um pequeno corte foi

realizado na região medial da artéria clampeada, servindo como via para inserção de um cateter de polietileno (PE 10) ligado a outro (PE 50) (Clay Adams, Parsipanny, NJ, EUA), devidamente heparinizados. Após cateterização da artéria com a extremidade PE10, a porção PE50 foi transpassada sob a pele do dorso e exteriorizada na região cervical. Após a cirurgia, os animais foram acondicionados em gaiolas individuais mantidas em estantes climatizadas, durante 24 horas para recuperação.

A cânula, extremidade PE50, foi então conectada a um transdutor de pressão ML865-25T (ADInstruments, Austrália), ligado a um amplificador ETH-400 (CB Sciences, Inc.). Este amplificador, por sua vez, foi conectado a um conversor analógico digital PowerLab/400 (ADInstruments, Austrália). A transferência de dados entre o conversor e o computador foi feita por intermédio de uma placa SCISI, onde o software Chart for Windows<sup>®</sup>, gerava os registros de Pressão Arterial Pulsátil (PAP) a partir dos dados enviados pelo conversor analógico, numa frequência de amostragem de 200 Hz. Os registros da pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e da frequência cardíaca (FC) foram derivados “*on line*” da PAP (ADI Instruments, Austrália).

#### **5.4.4. Lipídeos**

Avaliaram-se os níveis séricos de triglicérides e colesterol total, vinte semanas após o início das dietas, no momento da eutanásia, após 8 horas de jejum, utilizando kits comerciais (Labtest<sup>®</sup>, Lagoa Santa, Brasil) em analisador automático Labmax progress (Labtest<sup>®</sup>, Lagoa Santa, Brasil).

#### **5.4.5. Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)**

Em todos os grupos, foi coletado sangue (jejum de 8 horas) para a dosagem de glicose no T<sub>0</sub> (Tempo zero). Uma solução de glicose a 50% foi administrada por gavagem, na dose de 2g/Kg de peso. Subsequentemente, amostras de sangue foram coletadas nos tempos T<sub>1</sub> (15min), T<sub>2</sub> (30 min), T<sub>3</sub> (60 min) e T<sub>4</sub> (120min) e todas as amostras foram analisadas em glicosímetro (MediSence, Abbot<sup>®</sup>, Chicago, USA). A área sob a curva foi calculada utilizando-se o software Origin 3.5 (Microcal Software, Northhampton, MA).

A glicose sérica foi também dosada no momento da eutanásia, por kits comerciais (Labtest<sup>®</sup>, Lagoa Santa, Brasil), em analisador automático Labmax progress (Labtest<sup>®</sup>, Lagoa Santa, Brasil).

#### **5.5. Função renal**

Após coleta individual de urina (24 horas), o clearance de creatinina (Ccr) foi calculado com base na Cr urinária, Cr sérica, volume de urina em 24h e peso corporal usando a seguinte equação:  $Ccr \text{ (ml/min/kg)} = [Cr \text{ urinária (mg/dL)} \times \text{volume urinário (mL)} / Cr \text{ sérica (mg/dL)}] [1000/\text{peso corporal (g)}] [1/1440 \text{ (min)}]$  (YAMABE, 2007).

As dosagens de creatinina sérica e urinária foram realizadas com Kits comerciais (Labtest<sup>®</sup>, Lagoa Santa, Brasil), em analisador automático Labmax progress (Labtest<sup>®</sup>, Lagoa Santa, Brasil).

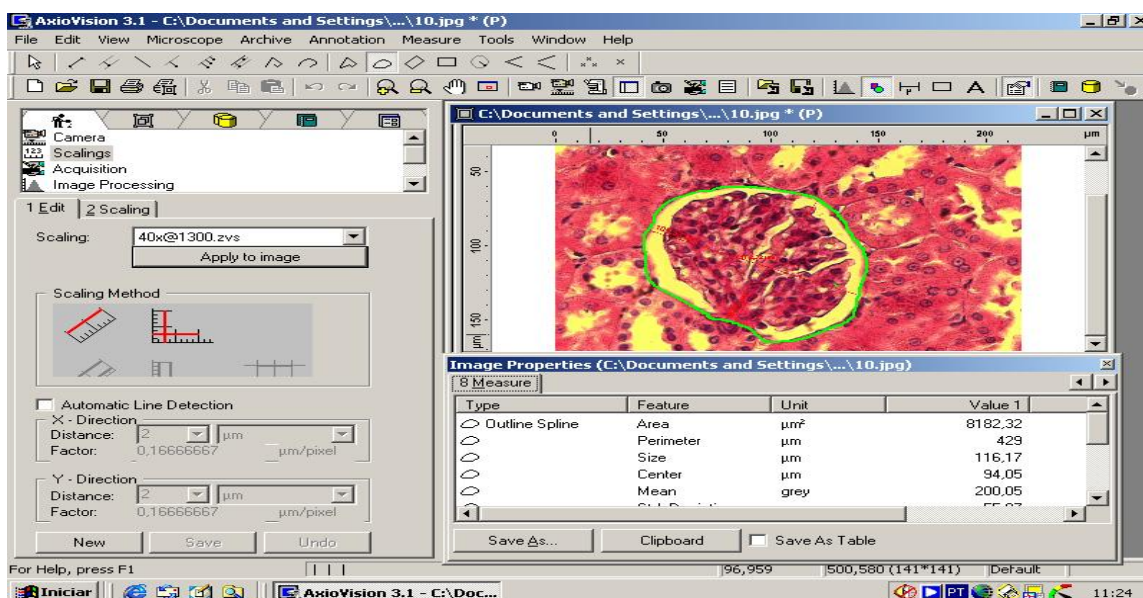
#### **5.6. Morfologia renal**

O rim direito foi seccionado transversalmente, fixado em formalina tamponada a 10% (pH=7.2), posteriormente embebido em parafina e seccionado a 5 micra de espessura. Os cortes foram corados com

hematoxilina-eosina e tricrômico de Gomori, para avaliar a morfologia glomerular.

A área glomerular foi quantificada na coloração de hematoxilina-eosina no aumento de 400x. Selecionaram-se apenas glomérulos em que se identificou o polo vascular no corte estudado, para medições de área, a fim de garantir que os glomérulos medidos fossem seccionados em planos similares. As imagens glomerulares foram digitalizadas usando microscópio óptico Zeiss Axiophot, equipado com câmera Axicam MRc (Carl Zeiss®). Após a digitalização, o tufo glomerular foi identificado e a área foi calculada, utilizando o *software* de análise (Optimas 5.1; Optimas Corporation, Seattle, WA). Vinte glomérulos corticais foram medidos em cada animal, seis animais por grupo (Figura 2).

Figura 2- Perímetro externo, entre os limites cápsula de Bowman (H&E). A imagem da tela do computador demonstra as ferramentas do programa Zeiss utilizado na morfometria.



O volume glomerular (VG) foi calculado a partir da área transversal do tufo glomerular (TG), utilizando a fórmula  $(VG) = \beta/\kappa (TG)^{3/2}$  onde  $\beta=1,38$

coeficiente da esfera e  $\kappa=1,1$  coeficiente de distribuição de tamanho (YAMABE et al., 2007).

### **5.7. Eutanásia**

Os animais foram eutanasiados com sobredose do anestésico cetamina (90 mg/kg ip.) e do sedativo cloridrato de xilazina (10 mg/kg ip.) (König SA<sup>®</sup>, Avellaneda, Argentina). Seguido de exsanguinação total e deslocamento cervical.

### **5.8. Análise estatística**

Os resultados são apresentados como média e desvio padrão. A normalidade da amostra foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os grupos controle e hiperlipídico foram comparados pelo teste t de Student. Os grupos hiperlipídicos foram comparados pelo teste de variância ANOVA bicaudal e teste de Dunnet . O nível de significância assumido foi  $p<0,05$ . O programa SPSS 15.0 foi usado em todas as análises

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão serão apresentados sob a forma de artigos, submetidos aos periódicos “Jornal Brasileiro de Nefrologia” e “Food and Chemical Toxicology”. Deste modo, nos artigos intitulados, “Dissociação da resposta anti-hipertensiva e metabólica à losartana e espironolactona em ratos com síndrome metabólica experimental” e “Efeito da Quercetina em ratos Wistar com Síndrome Metabólica” encontram-se os principais resultados obtidos no presente estudo, bem como sua discussão.

Além disso, o presente estudo originou:

- Um artigo de revisão, intitulado “Flavonoides e seu potencial terapêutico”, que foi publicado no Boletim do Centro de Biologia da Reprodução, v. 27, p. 33-39, 2008 (apêndice).
- Um artigo, intitulado “Implantação e Padronização da Técnica de Aferição Indireta da Pressão Arterial em Ratos Wistar da Colônia do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução” na Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais, v.2, p. 60-61, 2010 (apêndice).
- Apresentação de trabalho, na forma de pôster, no XXVI Congresso Brasileiro de Nefrologia, intitulado “Dissociação da resposta anti-hipertensiva e metabólica à losartana e espironolactona em ratos com síndrome metabólica experimental”.



## 6.1. Artigo 1:

### EFEITO DA QUERCETINA EM RATOS WISTAR COM SÍNDROME METABÓLICA

#### Resumo:

**Introdução:** O tratamento da síndrome metabólica (SM) é um desafio, uma vez que terapias não medicamentosas são de difícil implementação e o tratamento farmacológico ideal não está totalmente estabelecido. **Objetivo:** Avaliar o efeito da quercetina na pressão arterial (PA), dislipidemia, acúmulo de gordura visceral e na função e morfologia renais em modelo experimental de SM induzida por dieta hiperlipídica. **Métodos:** Ratos Wistar receberam ração hiperlipídica a partir da quarta semana de vida, por 20 semanas. O grupo tratado recebeu quercetina a partir da oitava semana de vida. Avaliou-se semanalmente o peso corporal e a PA de cauda por pletismografia. Ao final do experimento foram realizados testes de tolerância oral a glicose, perfil lipídico, clearance de creatinina, medida direta da PA, análise morfométrica renal. **Resultados:** A administração de dieta hiperlipídica se associou ao desenvolvimento de SM, caracterizada por acúmulo central de gordura, hipertensão arterial, hiperglicemia e hipertrigliceridemia. Nesse modelo não foram observadas alterações da histomorfometria renal. A quercetina não apresentou eficácia no tratamento das comorbidades que compõem a SM. **Conclusão:** A administração crônica diária da quercetina em modelo experimental de SM induzida por dieta hiperlipídica não alterou de forma significativa o perfil nutricional, metabólico e pressórico dos animais.

## 6.2. Artigo 2:

ARTIGO ORIGINAL | ORIGINAL ARTICLE

### Dissociação da resposta anti-hipertensiva e metabólica à losartana e espironolactona em ratos com síndrome metabólica experimental

Dissociation of antihypertensive and metabolic response to losartan and spironolactone in experimental rats with metabolic syndrome

**Autores**  
Hussein Machado<sup>1</sup>  
Helady Sanders Pinheiro<sup>1</sup>  
Marcelle Martins Terra<sup>1</sup>  
Martha de Oliveira Guerra<sup>1</sup>  
Rogério Baumgratz de Paula<sup>1</sup>  
Vera Maria Peters<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora.

**RESUMO**

**Introdução:** O tratamento da hipertensão arterial (HA) em indivíduos com síndrome metabólica (SM) é um desafio, uma vez que terapias não medicamentosas são de difícil implementação e o tratamento farmacológico ideal não está totalmente estabelecido. **Objetivo:** Avaliar o bloqueio do sistema renina-angiotensina aldosterona (SRAA) na pressão arterial (PA), na função e na morfologia renais em modelo experimental de SM induzida por dieta hiperlipídica. **Métodos:** Ratos Wistar receberam ração hiperlipídica a partir da quarta semana de vida, por 20 semanas. Os grupos tratados receberam Losartana ou Espironolactona a partir da oitava semana de vida. Avaliou-se semanalmente o peso corporal e a PA de cada por plethysmografia. Ao final do experimento, foram realizados testes de tolerância oral à glicose, perfil lipídico, clearance de creatinina, medida direta da PA, análise morfométrica renal. **Resultados:** A administração de dieta hiperlipídica se associou ao desenvolvimento de SM, caracterizada por acúmulo central de gordura, hipertensão arterial, hiperglicemia e hipertrigliceridemia. Neste modelo não foram observadas alterações da histomorfometria renal. O bloqueio do receptor AT1 da angiotensina II (Ang II) preveniu o desenvolvimento da HA. O bloqueio mineralocorticoide não apresentou eficácia anti-hipertensiva, porém, associou-se à redução da gordura abdominal. **Conclusão:** A dissociação da resposta anti-hipertensiva aos bloqueios dos receptores da Ang II e mineralocorticoide indica a participação da Ang II na gênese da HA associada à obesidade. A redução da obesidade central com a Espironolactona sugere a presença de efeito adipogênico mineralocorticoide.

**Palavras-chave:** animais, hipertensão, obesidade, sistema renina-angiotensina, síndrome x metabólica.

**ABSTRACT**

**Introduction:** The treatment of arterial hypertension (AH) in patients with metabolic syndrome (MS) is a challenge, since non drug therapies are difficult to implement and optimal pharmacological treatment is not fully established. **Aim:** To assess the blockade of the renin-angiotensin aldosterone system (RAAS) in blood pressure (BP) in renal function and morphology in an experimental model of MS induced by high fat diet. **Method:** Wistar rats were fed on high fat diet from the fourth week of life, for 20 weeks. The groups received Losartan or Spironolactone from the eighth week of life. We weekly evaluated the body weight and BP by tail plethysmography. At the end of the experiment oral glucose tolerance, lipid profile, creatinine clearance tests, and the direct measurement of BP were performed. A morphometric kidney analysis was performed. **Results:** The administration of high-fat diet was associated with the development of MS, characterized by central fat accumulation, hypertension, hyperglycemia and hypertriglyceridemia. In this model there were no changes in renal histomorphometry. The blockade of angiotensin II (Ang II) receptor AT1 prevented the development of hypertension. The mineralocorticoid blockade did not have antihypertensive efficacy but was associated with reduction of abdominal fat. **Conclusion:** The dissociation of the antihypertensive response to the blockades of Ang II receptors and mineralocorticoid indicates the involvement of Ang II in the pathogenesis of hypertension associated with obesity. Reduction of central obesity with Spironolactone suggests the presence of mineralocorticoid adipogenic effect.

**Keywords:** animals, hypertension, metabolic syndrome x, obesity, renin-angiotensin system.

Data de submissão: 29/03/2012.  
Data de aprovação: 11/08/2012.

Correspondência para:  
Hussein Machado.  
Centro de Biologia da Reprodução-  
CBR, Universidade Federal de Juiz  
de Fora,  
Rua José Lourenço Kelmeç  
sh, Campus Universitário, São  
Pedro, Juiz de Fora, MG, Brasil.  
CEP: 36038-900.  
E-mail: husseinmachado@ufjf.br

14

### 6.3. Artigo 3:

## Flavonóides e seu potencial terapêutico

### *Flavonoids and potential therapeutic*

Hussen Machado\*

Tanus Jorge Nagem\*\*

Vera Maria Peters\*

Cristiane Sampaio Fonseca\*

Tânia Toledo de Oliveira\*\*\*

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução, Juiz de Fora*, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

**Resumo:** Entre os fitoterápicos atualmente estudados, os flavonóides têm merecido destaque em virtude de sua ampla gama de ações terapêuticas já demonstradas tanto experimentalmente quanto em humanos. Seu uso para tratamento de sintomas da menopausa tem levado ao consumo indiscriminado, por mulheres nessa faixa de idade e, além disso foram demonstrados efeitos antimicrobiano, antiviral, antiulcerogênico, antineoplásico, antioxidante, antihepatotóxico, antihipertensivo, hipolipidêmico, antiinflamatório, antiplaquetário. Dessa forma, pareceu importante apresentar informações sobre os flavonóides, abordando sua ocorrência na natureza, estrutura química, atividade biológica e mecanismo de ação.

**Palavras-chave:** Flavonóides. Fitoterápico.

#### **FLAVONÓIDES ORIGEM, OCORRÊNCIA NA NATUREZA, FUNÇÃO NAS PLANTAS**

Em 1930 uma nova substância química foi isolada de laranjas e acreditava-se tratar de mais um novo membro da família das vitaminas e essa substância foi designada como vitamina P; verificando-se mais tarde tratar-se de um flavonóide. Os flavonóides representam um dos grupos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem vegetal e são amplamente distribuídas no reino vegetal. Com poucos relatos em algas, alguns representantes foram identificados em briófitas, existindo apenas um relato de ocorrência em fungos. Em pteridófitas também foram encontrados, mas sua variabilidade estrutural

é pequena. Todavia estão presentes em abundância nas angiospermas, apresentando nesse grupo enorme diversidade estrutural (SIMÕES et al., 2000).

A distribuição dos flavonóides nos vegetais depende de diversos fatores de acordo com a fila/ordem/família do vegetal, bem como da variação das espécies. Geralmente, flavonóides encontrados nas folhas podem ser diferentes daqueles presentes nas flores, nos galhos, raízes e frutos. O mesmo composto ainda pode apresentar diferentes concentrações dependendo do órgão vegetal em que se encontra (SIMÕES et al., 2000). É importante ressaltar que fatores abióticos naturais como a radiação solar, raios UV, períodos de seca ou chuva, nutrientes e estações do ano influenciam no metabolismo e na produção destes compostos e ainda, fatores artificiais, como poluentes, podem interferir também

\* Universidade Federal de Juiz de Fora / Juiz de Fora – MG.

\*\* Universidade Federal de Viçosa / Viçosa – MG.

\*\*\* Universidade Federal de Ouro Preto / Ouro Preto – MG.

## 6.4. Artigo 4:

60

ARTIGO ORIGINAL

RIEE  
REVISTA INTERDISCIPLINAR DE ESTUDOS EXPERIMENTAIS

### IMPLANTAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE AFERIÇÃO INDIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL EM RATOS WISTAR DA COLÔNIA DO BIOTÉRIO DO CENTRO DE BIOLOGIA DA REPRODUÇÃO (CBR)

*ESTABLISHMENT OF STANDARDIZATION AND GAUGING TECHNIQUE OF INDIRECT BLOOD PRESSURE IN RATS OF WISTAR THE COLONY CENTER FOR BIOLOGY OF REPRODUCTION (CBR)*

*Huusen Machado\*, Martha de Oliveira Guerra\*\*, Vera Maria Peisen\*\*\**

A manutenção da pressão arterial (PA) em níveis adequados é essencial para a homeostase do organismo. Na experimentação animal, o método mais utilizado para monitorização da pressão arterial de forma não invasiva é a pletismografia de cauda (MALKOFF, 2005).

Essa técnica apresenta vantagens como não ser invasiva, não exigir recursos cirúrgicos, permitir aferições repetidas de pressão arterial durante experimentos de curta ou longa duração, baixo custo comparado a técnicas de telemetria, além de ser utilizada como forma de triagem da hipertensão arterial (KURTZ et al., 2005).

Uma variedade de técnicas tem sido oferecida por diferentes pesquisadores com o objetivo de minimizar o estresse animal e melhorar a confiabilidade de aferição, incluindo tamanho adequado do contensor, temperatura de aquecimento corporal, condicionamento animal, utilização de um único técnico para realização das aferições, equipamentos livres de odores e limitação do campo visual animal (BUNAG, 1983; MENETON et al., 2000).

Um contensor de tamanho apropriado é essencial para medições de pressão arterial. O contensor deve proporcionar conforto ao animal, criando assim, um ambiente de baixo estresse e permitindo ao pesquisador observar constantemente o comportamento animal. Se o contensor apresentar um pequeno diâmetro, o espaço lateral limitará a respiração animal, que procurará compensar o incômodo alongando-se, gerando assim alterações no fluxo respiratório, além de uma movimentação excessiva da cauda (MALKOFF, 2005).

Outro fator importante para medidas consistentes de pressão arterial é a temperatura corporal do animal. A termo-regulação é o método pelo qual o animal diminui a sua temperatura corporal dissipando o calor através do aumento do fluxo sanguíneo caudal. A

temperatura de aferição da pressão arterial de forma indireta varia de acordo com o protocolo utilizado, mas deve permanecer entre 30°C e 35°C para não causar um superaquecimento do animal, gerando assim aumento do nível respiratório e maior estresse. (MENETON et al., 2000; WHITESALL et al, 2004).

Uma vez aquecidos, os animais devem ser cuidadosamente manuseados de forma a entrarem espontaneamente no sistema de contenção (Figura 1), a qual é coberta por uma toalha vermelha para redução de seu campo visual - a cor vermelha não é identificada pelo animal.



Figura 1: Contensor (seta clara), Manguito (seta escura) e sensor (estrela) colocados na cauda do animal.

A maioria dos protocolos recomenda a média de 3 a 10 aferições por animal para obter-se a média da pressão arterial. A prática de inspecionar os resultados e descartar valores inconsistentes antes da média final gera um viés e deve ser evitada a menos que, um resultado inconsistente seja comprovadamente causado por problema técnico. Para minimizar as chances de influenciar os resultados, é aconselhável que o técnico execute e analise os resultados em duplo cego (BLAND; ALTMAN, 1986; KURTZ et al., 2005).

Correspondence author: Huusen Machado, Universidade Federal de Juiz de Fora, Centro de Biologia da Reprodução, Campus Universitário, Caixa Postal 328, CEP 360001-970, Juiz de Fora, MG, Brasil. huusen@clck21.com.br.

\* Farmacêutico-bioquímico. Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Saúde, área de concentração: Saúde Brasileira - UFJR huusen@clck21.com.br.

\*\* Pesquisador do Centro de Biologia da Reprodução. martha.guerra@ufjf.edu.br.

\*\*\* Pesquisador do Centro de Biologia da Reprodução. peisen.vera@ufjf.edu.br.

Received: 05/2010

Accepted: 08/2010

## 6.5. Apresentação em congresso:



## 7. COMENTÁRIOS FINAIS

No presente estudo, a administração de dieta rica em lipídios, por um período de 20 semanas, induziu obesidade central, hipertrigliceridemia, alterações glicídicas e hipertensão arterial em ratos Wistar, achados compatíveis com diagnóstico da SM.

Não foram observadas alterações na função renal, avaliada pela creatinina e pela depuração de creatinina, bem como na histologia renal. Entretanto, uma nefropatia mais incipiente, não pode ser descartada visto que não foram avaliados, no presente trabalho, indicadores de lesão em fase mais precoce, como a expressão de mediadores inflamatórios, de fatores de crescimento e de proteínas marcadores de transição epitélio-mesenquimal.

O bloqueio do SRAA em ratos Wistar com SM demonstrou ser uma medida eficaz na redução da pressão arterial, quando o bloqueio se dá ao nível de receptores da angiotensina II. Porém, a mesma eficácia hipotensora não foi observada no bloqueio de receptores mineralocorticóides, que tiveram por outro lado sua atividade adipogênica inibida, o que preveniu o acúmulo de gordura abdominal.

A administração crônica diária do flavonoide quercetina em ratos Wistar com SM não alterou de forma significativa o perfil nutricional, metabólico e pressórico dos animais.

## **8. CONCLUSÃO**

Ratos Wistar alimentados com dieta hiperlipídica desenvolveram Síndrome Metabólica, porém não foram observadas alterações morfológicas e funcionais renais.



## 9. REFERÊNCIAS

AGRAWAL, V. et al. Impact of treating the metabolic syndrome on chronic kidney disease. **Nat Rev Nephrol**, v. 5, p. 520–8, 2009.

BELTOWSKI, J.; WOJCICKA, G.; MARCINIAK, A. et al. Oxidative stress, nitric oxide production, and renal sodium handling in leptin-induced hypertension. **Life Sci**, v. 74, p. 2987–3000, 2004.

BIRT DF, HENDRICH S, WANG W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoides and isoflavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**,v. 90, p. 157-77, 2001.

BORGES, P. K. et al. Prevalence and characteristics associated with metabolic syndrome in Japanese-Brazilians with and without periodontal disease. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 3, p. 657-668, 2007.

BRAMBILLA, P.; POZZOBON, G.; PIETROBELLI, A. Physical activity as the main therapeutic tool for metabolic syndrome in childhood. **International Journal of Obesity**. v.35, p.16–28, 2011.

CAMERON, A.J.; SHAW, J.E.; ZIMMET, P.Z. The Metabolic Syndrome: Prevalence and worldwide populations. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 33, n. 2, p. 351-375, 2004.

CAPRIO, M. et al. Antiadipogenic Effects of the Mineralocorticoid Receptor Antagonist Drosiprenone: Potential Implications for the Treatment of Metabolic Syndrome. **Endocrinology**, v. 152, p. 113-125, 2011.

CARVALHEIRA, J.B. et al. Cross-talk between the insulin and leptin signaling systems in rat hypothalamus. **Obes Res**, v.13, p. 48-57, 2005.

CHAGNAC, A. et al. The effects of weight loss on renal function in patients with severe obesity. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, n. 6, p. 1480-1486, 2003.

CHI-YUAN, H.S.U. et al. Body mass index and risk for end-stage renal disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 144, p. 21-28, 2006.



CHEN, J. et al. The metabolic syndrome and the risk for chronic kidney disease in US adults. **Ann Intern Med**, v. 140, p. 167-174, 2004.

CHOBANIAN, A. V. et al. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1206-52, Dec, 2003.

COOK, S. et al. Prevalence of a metabolic syndrome phenotype in adolescents. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, v. 157, p. 821-827, 2003.

COSTA, M.B. et al. Aldosterone antagonist decreases blood pressure and improves metabolic parameters in obese patients with the metabolic syndrome. **J Clin Hypertens**, v. 12, p. 753-755, 2010.

DAS, M.; PAL, S.; GHOSH, A. Family history of type 2 diabetes and prevalence of metabolic syndrome in adult Asian Indians. **Journal of Cardiovascular Disease Research**, v. 3, n.2, p. 104–108, 2012.

DE PAULA, R.B.; SILVA, A.A.; HALL, J.E. Aldosterone antagonism attenuates obesity-induced hypertension and glomerular hyperfiltration. **Hypertension**, v. 43, p. 1-7, 2004.

DEEPA, M. et al. Prevalence of the metabolic syndrome using WHO, ATP III and IDF definitions in Asian Indians: the Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES-34). **Diabetes/ Metabolism Research and Reviews**, v. 23, n. 2, p. 127-134, 2007.

DOBRIAN, A.D. et al. Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity. **Hypertension**, v. 35, p. 1009-1015, 2000.

DORO, A. R. et al. Analysis on the association of physical activity with metabolic syndrome in a population-based study of Japanese-Brazilians. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 6, p. 1066-1074, 2006.

DUARTE, J et al. Effects of chronic quercetin treatment on hepatic oxidative status of spontaneously hypertensive rats. **Mol Cell Biochem**, v. 221, p. 155–160, 2001.

EDWARDS, R.L, et al. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. **J Nutr**, v.137, p. 2405–2411, 2007.

EIKELIS, N. et al. Interactions between leptin and the human sympathetic nervous system. **Hypertension**, v. 41, p. 1072-1079, 2003.

ENGELI, S. et al. Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. **Hypertension**, v. 45, p.356-62, 2005.

EZEQUIEL, D.G.A.; COSTA, M.B.; CHAOUBAH, A.; DE PAULA, R.B. Efeito da perda de peso sobre a hemodinâmica renal em portadores da síndrome metabólica. **J Bras Nefrol**, v. 34, p. 36-42, 2012.

FELDMAN, D.L. et al. Effects of aliskiren on blood pressure, albuminuria and (Pro) renin receptor expression in diabetic TG (mRen-2)27 rats. **Hypertension**, v.52, p.130-136, 2008.

FERREIRA, L.B. et al. Effects of the overlapping between an experimental model of neuroendocrine obesity with arterial hypertension under blood pressure, body weight and metabolic and renal parameters in rats. **J Bras Nefrol**, v. 33, p. 338-344, 2011.

FORD, E.S.; GILES, W.H.; DIETZ, W.H. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: Findings from the third national health and nutrition examination survey. **JAMA**, v. 287, p. 356–359, 2002.

FUJITA, T. Mineralocorticoid Receptors, Salt-Sensitive Hypertension, and Metabolic Syndrome. **Hypertension**, v. 55, p. 813-818, 2010.

GROSS, J.L. et al. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. **Diabetes Care**, v. 28, p. 164-176, 2005.

GRUNDY, S. et al. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung and Blood Institute/American Heart Association Conference on scientific issues related to definition. **Circulation**, v. 109, p. 433-438, 2004.

GU, L. et al. Prevalence of the metabolic syndrome and overweight among adults in China. **Lancet**, v. 22, p. 1398-405, 2005.

HALL, J. E. et al. Impact of the obesity epidemic on hypertension and renal disease. **Curr Hypertens Rep**, v. 5, n. 5, p. 386-392, 2003.

HALL, J. E. et al. Is obesity a major cause of chronic kidney disease? **Adv Ren Replace Ther**, v. 11, n. 1, p. 41-54, 2004.

HENEGAR, J.R. et al. Functional structural changes in the kidney in the early stages of obesity. **J Am Soc Nephrol**, v. 12, p. 1211–1217, 2001.

HSU C.Y. et al. Body mass index and risk for end stage renal disease. **Ann Intern Med**, v. 144, p. 21–28, 2006.

IDF, 2005, p. 2, a partir <http://www.idf.org/webdata/docs/MetSyndromefinal.pdf>  
Acessado em 29 de outubro de 2006.

I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. **Arq Bras Cardiol**, v. 84, p. 1-28, 2005.

ISRAILI, Z.H. et al. Metabolic syndrome: treatment of hypertensive patients. **American Journal of Therapeutics**, v. 14, n. 4, p. 386-402, 2007.

KAHN, R.; BUSE, J.; FERRANNINI, E.; STERN, M. American Diabetes Association; European Association for the Study of Diabetes. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. **Diabetes Care**, v. 28, n. 9, p. 2289–2304, 2005.

KAMBHAM, N. et al. Obesity-related glomerulopathy: An emerging epidemic. **Kidney Int**, v. 59, p. 1498-1509, 2001.

KIM, H.M. et al. Prevalence of de metabolic syndrome in Korean adolescents aged 12-19 years from de Korean National Health and Nutrition Examination Survey 1998 and 2001. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 75, p. 111-114, 2007.

KIM, K.; HONG, S.A.; KIM, M.K. Trends in nutritional inequality by educational level: a case of South Korea. **Nutrition**, v.26, p.791–798, 2010.

KINCAID-SMITH, P. Hypothesis: Obesity and the insulin resistance syndrome play a major role in end-stage renal failure attributed to hypertension and labeled 'hypertensive nephrosclerosis. **J Hypertens**, v. 22, p. 1051–1055, 2004.

KLOET, A.D.; KRAUSE, E.G.; WOODS, S.C. The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. **Physiol Behav**, v. 100, p. 525-534, 2010.

KURELLA, M.; LO, J.C.; CHERTOW, G.M. Metabolic syndrome and the risk for chronic kidney disease among nondiabetic adults. **J Am Soc Nephrol**, v. 16, p. 2140- 2148, 2005

LAKKA, H.M. et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. **JAMA**, v. 288, n.21, p. 2709-2716, 2002.

LEE, K. Cardiovascular risk prevalence, awareness, treatment, and control from 1998 to 2007 in Koreans. **Asia Pac J Clin Nutr**, v.19, p.261–265, 2010.

LEE, J. S. et al. Effective cut-off values of waist circumference to detect the clustering of cardiovascular risk factors of metabolic syndrome in Japanese men and women. **Diabetes & Vascular Disease Research**, v. 4, n. 4, p. 340-345, Dec. 2007.

LIM, S.; SHIN,H.; SONG, H.J. et al. Increasing prevalence of metabolic syndrome in Korea: the Korean national health and nutrition examination survey for 1998–2007. **Diabetes Care**, v. 34, n. 6, p. 1323–1328, 2011.

LUBSEN, J. et al. Action (A Coronary disease Trial Investigating Outcome with Nifedipine GITS) investigators. Effect of long-acting nifedipine on mortality and cardiovascular morbidity in patients with symptomatic stable angina and hypertension: the ACTION trial. **J Hypertens**, v. 23, p. 641-648, 2005.

MACHADO, H.; GUERRA, M.O.; PETERS, V. Implantação e padronização da técnica de aferição indireta da pressão arterial em ratos Wistar da colônia do biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR). **RIEE**, v. 2, p.60-1, 2010.

MACKRAJ I, GOVENDER T, RAMESAR S. The antihypertensive effects of quercetin in a salt sensitive model of hypertension. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 5, p. 239–45, 2008.

MULYADI, L. et al. Body fat and total body fat as risk factors for microalbuminuria in the obese. **Ann Nutr Metab**, v.45, p. 67-71, 2001.

NASCIMENTO, A.F. et al. Misclassification probability as obese or lean in hypercaloric and normocaloric diet. **Biol Res**, v. 41, p. 253-9, 2008.

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III): Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. **Circulation**, v. 106, p. 3143–342, 2002.

OGDEN, C. L. et al. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. **Jama**, v. 295, n. 1, p. 1549-1555, 2006.

PEREZ-VIZCAINO F.; Duarte J. Flavonols and cardiovascular disease. **Molecular Aspects of Medicine**. 2010; 31: 478–94.

PITT B, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. **N Engl J Med** 1999;341:709-17.

PROSPECTIVE STUDIES COLLABORATION.; WHITLOCK, G.; LEWINGTON, S.; SHERLIKER, P.; CLARKE, R.; EMBERSON, J.; HALSEY, J.; QIZILBASH, N.; COLLINS, R.; PETO, R. Body-mass index and cause specific mortality in 900.000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. **Lancet**, v. 373, p. 1083-1096, 2009.

RAHMOUNI, K. et al. Obesity-associated hypertension: new insights into mechanisms. **Hypertension**, v. 45, p. 9-14, 2005.

REAVEN, G.M. Metabolic Syndrome: pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease. **Circulation**, v.116, p.286-88, 2002.

RIBEIRO FILHO, F.F. et al. Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 230-38, 2006.

ROCHA, R. et al. Selective Aldosterone Blockade Prevents Angiotensin II/Salt-Induced Vascular Inflammation in the Rat Heart. **Endocrinology**, v.143, p. 4828-4836, 2002.

SARZANI, R. et al. "Renin angiotensin system, natriuretic peptides, obesity, metabolic syndrome, and hypertension: an integrated view in humans," **Journal of Hypertension**, vol. 26, no. 5, pp. 831–843, 2008.

SAAD, M.J.A.; ZANELLA, M.T.; FERREIRA, S.R.G. Síndrome metabólica: ainda indefinida, mas útil na identificação do alto risco cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.50, n.2, p.161-2, 2006.

SALAROLI, L. B. et al. Prevalence of metabolic syndrome in population based study, Vitória, ES-Brazil. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 51, n. 7, p. 1143-1152, 2007.

SHEN,C.; ZHU, Z.; YAN, Z.; NI, Y. P-513: High fat plus high salt diet induced metabolic syndrome in wistar rat. **Am J Hypertens**, v. 17, p. 220-235, 2004.

THE ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group. Major outcome in high-risk hypertensive patients to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs. diuretic. The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). **JAMA**, v.228, p. 2981-2997, 2002.

TOSHIHARU, A. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 31, p. 27-35. 1996.

UNGER, R.H: Lipid overload and overflow: Metabolic trauma and the metabolic syndrome. **Trends Endocrinol Metab**, v. 14, p. 398–403, 2003.

VIGITEL BRASIL 2010: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. - Brasília:

Ministério da Saúde, 2011.152 p.: il. - (Série G. Estatística e Informação em Saúde).

WARD, K.; SPARROW, D.; LANDSBERG, L. Influence of insulin, sympathetic nervous system activity and obesity on BP. The Normative Aging Study. **J Hypertens**, v. 14, p. 301-330, 1996.

WEISINGER, J.R. et al. The nephritic syndrome: a complication of massive obesity. **Ann Intern Med**, v. 81, p. 440-447, 1974.

WHO. Obesity : preventing and managing the global epidemic, in report of WHO Consultation on Obesity. Geneva : World Health Organization, 1998.

WHO. Physical status: The use and interpretation of anthropometry, in report of WHO technical report series. Geneva: World Health Organization, n.845, 1995.

WILLIAMS, S.A. et al. Trophy Study Investigators. An evaluation of the effects of an angiotensin receptor blocker on health-related quality of life in patients with high-normal blood pressure (prehypertension) in the Trial of Preventing Hypertension (TROPHY). **J Clin Hypertens**, v. 10, p. 436-442, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION / WHO. Obesity and overweight: what are overweight and obesity? Geneva: World Health Organization, 2006. Disponível em: [Http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html). Acesso em: 14 jan. 2012.

YAMABE, N. et al. Beneficial effect of corni fructus, a constituent of hachimi-jio-gan, on advanced glycation end-product-mediated renal injury in streptozotocin-treated diabetic rats. **Biol Pharm Bull**, v. 30, p. 520-6, 2007.

## 10. APÊNDICES

### Artigo 1

DISSOCIAÇÃO DA RESPOSTA ANTI-HIPERTENSIVA E METABÓLICA À  
LOSARTANA E EPIRONOLACTONA EM RATOS COM SÍNDROME  
METABÓLICA EXPERIMENTAL.

DISSOCIATION OF ANTIHYPERTENSIVE AND METABOLIC RESPONSE TO  
LOSARTAN AND SPIRONOLACTONE IN EXPERIMENTAL RATS WITH  
METABOLIC SINDROME.

#### Descritores

Obesidade; Síndrome X Metabólica; Hipertensão; Sistema Renina  
Angiotensina; Modelos animais.

#### Resumo (Português)

**Introdução:** O tratamento da hipertensão arterial (HA) em indivíduos com síndrome metabólica (SM) é um desafio, uma vez que terapias não medicamentosas são de difícil implementação e o tratamento farmacológico ideal não está totalmente estabelecido. **Objetivo:** Avaliar o bloqueio do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) na pressão arterial (PA), na função e na morfologia renais em modelo experimental de SM induzida por dieta hiperlipídica. **Métodos:** Ratos Wistar receberam ração hiperlipídica a partir da quarta semana de vida, por 20 semanas. Os grupos tratados receberam Losartana ou Espironolactona a partir da oitava semana de vida. Avaliou-se semanalmente o peso corporal e a PA de cauda por pletismografia. Ao final do experimento foram realizados testes de tolerância oral a glicose, perfil lipídico, clearance de creatinina, medida direta da PA, análise morfométrica renal. **Resultados:** A administração de dieta hiperlipídica se associou ao desenvolvimento de SM, caracterizada por acúmulo central de gordura, hipertensão arterial, hiperglicemia e hipertrigliceridemia. Nesse modelo não



foram observadas alterações da histomorfometria renal. O bloqueio do receptor AT1 da angiotensina II (Ang II) preveniu o desenvolvimento da HA. O bloqueio mineralocorticóide não apresentou eficácia anti-hipertensiva, porém se associou à redução da gordura abdominal. Conclusão: A dissociação da resposta anti-hipertensiva aos bloqueios dos receptores da Ang II e mineralocorticóide, indica a participação da Ang II na gênese da HA associada à obesidade. A redução da obesidade central com a Espironolactona sugere a presença de efeito adipogênico mineralocorticóide.

## **Introdução**

A obesidade é considerada uma epidemia mundial que ocorre em virtude de mudanças econômicas, sociais e demográficas correntes nas diferentes populações. A Organização Mundial da Saúde estima que, atualmente, existam aproximadamente 400 milhões de indivíduos obesos no mundo e que sua prevalência vem aumentando substancialmente nas últimas décadas<sup>1,2</sup>.

A obesidade é uma doença multifatorial, relacionada a fatores hereditários e, principalmente, a hábitos alimentares inadequados. Esse perfil de modificações no padrão nutricional culmina em um balanço energético positivo, agravado pela associação com o sedentarismo que, em conjunto, contribuem para o desenvolvimento da síndrome metabólica<sup>3</sup>.

O tecido adiposo acumulado é um órgão metabolicamente ativo, que secreta várias substâncias denominadas adipocinas, com ação inflamatória, hormonal e hemodinâmica. Estas adipocinas, em sua grande maioria, estão relacionadas direta ou indiretamente, a processos que contribuem para o desenvolvimento de aterosclerose, hipertensão arterial (HA), resistência insulínica (RI), diabetes mellitus (DM) e dislipidemia, ou seja, representam o elo entre adiposidade e síndrome metabólica<sup>4,5</sup>. Esta é caracterizada pela associação de três ou mais comorbidades que incluem obesidade central, hipertensão arterial, intolerância à glicose, aumento nos níveis de triglicérides e redução nos níveis de colesterol HDL<sup>6,7</sup>. Em conjunto, estes fatores resultam em elevado risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) e

lesão renal, sendo este risco proporcional ao número de componentes da SM<sup>8,9</sup>.

Até o momento não existe tratamento específico para SM, no entanto, acredita-se que a abordagem de seus componentes poderia reduzir o risco cardiovascular. Idealmente, este tratamento deveria se basear na redução ponderal, uma vez que esta representa a medida mais eficaz na prevenção do DM, redução do colesterol e dos triglicérides, redução da RI e dos níveis pressóricos<sup>10</sup>. Contudo, o índice de sucesso desta medida terapêutica é baixo, o que demanda a instituição de tratamento específico da dislipidemia, da RI e da HA<sup>11</sup>.

Um dos maiores desafios para o clínico refere-se ao tratamento da HA em indivíduos com SM. Conforme citado, as medidas não farmacológicas frequentemente são de difícil implementação e o tratamento medicamentoso ainda não está totalmente estabelecido<sup>11</sup>. Alguns autores preconizam o uso de diuréticos, o que pode interferir em parâmetros metabólicos, enquanto outros sugerem a importância de fármacos que não interfiram nesses parâmetros, tais como os bloqueadores dos canais de cálcio e os inibidores do SRAA<sup>12,13,14</sup>.

Nos últimos anos tem sido sugerida participação da aldosterona na gênese da HA associada à obesidade. Estudo em cães<sup>15</sup> e em ratos Sprague-Dawley<sup>16</sup> demonstraram que o bloqueio desse sistema preveniu o aumento da PA, assim como a lesão vascular induzida pela aldosterona. No entanto, em ambos os estudos, os animais apresentavam balanço positivo de sódio, fator recém-descrito como mediador da ação vasculotóxica da aldosterona<sup>17</sup>.

O bloqueio do SRAA parece eficaz para o controle da HA bem como da hipertrigliceridemia e da RI<sup>18,19</sup>. Todavia, os estudos disponíveis são escassos e envolvem apenas um número pequeno de pacientes, o que, portanto, não permite a generalização dessa estratégia para o tratamento da HA associada à SM<sup>11,20</sup>.

A utilização de modelos experimentais de SM constitui uma alternativa para estudo de mecanismos causais e para a avaliação do tratamento com medicações anti-hipertensivas. Dentre estes modelos, os que são induzidos por modificações dietéticas são os que melhor reproduzem as alterações metabólicas da obesidade humana, incluindo dislipidemia, intolerância à glicose e hiperinsulinemia<sup>21,22,23</sup>.

No presente estudo avaliou-se o bloqueio da angiotensina e da aldosterona sobre a pressão arterial, função e morfologia renais em um modelo experimental de SM induzida por dieta hiperlipídica.

## **Metodologia**

### **Modelo experimental**

Ratos Wistar machos com 4 semanas, fornecidos pelo Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de 12 animais. No grupo controle (C), os animais foram alimentados com dieta comercial Nuvital<sup>®</sup> (Nuvilab, Colombo PR, Brasil), normocalórica (carboidrato 68%, proteína 19%, lipídios 3,5%, fibras 4,5%, vitaminas e minerais 5%, 370 Kcal/100g) durante vinte semanas. No grupo hiperlipídico (H) os animais foram alimentados, pelo mesmo tempo, com dieta hiperlipídica pré-fabricada (PragSoluções Comércio e Serviços Ltda, Jaú SP, Brasil), contendo: carboidrato 35%, proteína 19%, lipídios 36,5%, fibras 4,5%, vitaminas e minerais 5%, 524 Kcal/100g<sup>25</sup>, Tabela 1.

Tabela 1: Composição nutricional da dieta hiperlipídica (g/kg)

Ingredientes	Gramas/Kg
Amido de milho	200
Farelo de soja	300
Banha	190
Ac. Graxo saturado	158,5
Ac. Graxo insaturado	70
Fibra	30
L cistina	3,88
Cloreto colina	2,58
BHT (antioxidante)	0,014
Mix mineral*	35
Mix vitamínico#	10
TOTAL	999,974
Kcal Total:	5240
Kcal Lipídio	65%

\* Mix Mineral (g/kg mix) contém: 30,5g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 65,2g NaCl; 105,7g KCl; 200,2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 38,8g MgCO<sub>3</sub>.Mg(OH)<sub>2</sub>.3H<sub>2</sub>O; 40g FeC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>.5H<sub>2</sub>O; 516,4g CaCO<sub>3</sub>; 0,8g KI; 0,9 g NaF; 1,4g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; 0,4g MnSO<sub>4</sub> e 0,05g CoNO<sub>3</sub>. # Mix Vitamínico (g/kg mix) contém: 3g Tiamina mononitrato; 3g riboflavina; 3,5g

piridoxina HCl; 15g nicotinamida, 8g pantotenato de cálcio, 1g ácido fólico; 0.1g biotina; 0,005g cianocobalamina; 0,013g acetomenaphtone, 0,6g acetato de vitamina A, 25g D-RRR- acetato tocoferol e 10g cloreto de colina.

Nos grupos hiperlipídico/Losartana (H+L) e hiperlipídico/Espironolactona (H+E) os animais receberam a mesma dieta do grupo (H) e a partir da oitava semana de vida, os animais do grupo H+L receberam 10mg/kg/dia de Losartana (Merck S.A, Rio de Janeiro RJ, Brasil) e os animais do grupo H+E receberam 40mg/kg/dia de Espironolactona (Pfizer S.R.L, Buenos Aires, Argentina) por gavagem, uma vez ao dia, durante dezesseis semanas, Figura 1.

Todos os animais foram acompanhados durante vinte semanas. Vinte e quatro horas precedendo a eutanásia, a urina foi coletada em gaiola metabólica e os animais foram submetidos a implante de cateter para medida da pressão arterial direta e teste oral de tolerância à glicose. A eutanásia foi realizada por exsanguinação sob anestesia com cetamina (90 mg/kg ip.) e xilazina (10 mg/kg ip.) (König SA<sup>®</sup>, Avellaneda, Argentina). Foram colhidos sangue e rim no momento da eutanásia, Figura 1.

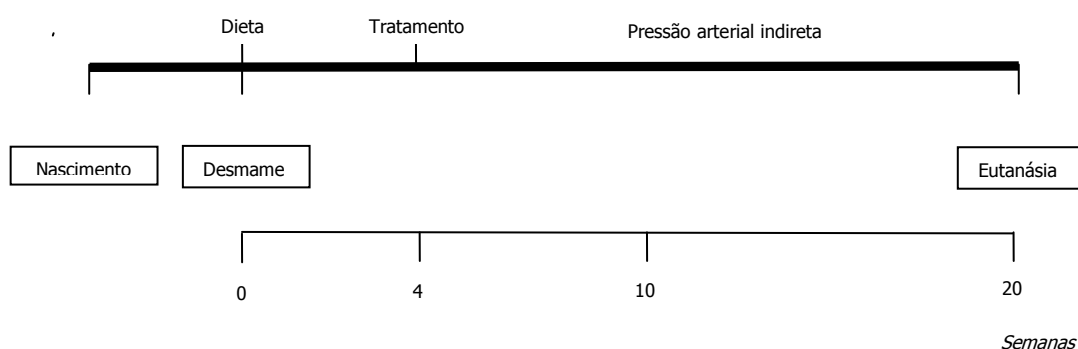


Figura 1. Desenho experimental

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora (N<sup>o</sup> 001/2009).

## **Obesidade**

Consideramos os animais como obesos quando a diferença de peso entre os grupos com dieta hiperlipídica (H, H+L e H+A) foi significativa em relação ao grupo controle (C)<sup>24,25</sup>. Decorridas 20 semanas de experimento, após eutanásia com cetamina, xilazina e exsanguinação, foi realizada lipectomia abdominal bilateral e obteve-se o peso (g) do tecido adiposo retroperitoneal (RET), epididimários (EP) direito e esquerdo. Estes parâmetros foram utilizados como critério de obesidade visceral<sup>24</sup>.

Para o cálculo de consumo alimentar (g) e energético (Kcal/dia), os animais foram pesados e alocados individualmente em gaiolas metabólicas, com quantidades fixas de dieta, uma vez por semana, por um período de 24 horas.

## **Pressão arterial**

### ***Método indireto***

A pressão arterial sistólica (PAS) foi determinada em mmHg, semanalmente, utilizando o método não invasivo da pletismografia de cauda (Pletismógrafo LE5001; Panlab<sup>®</sup>, Barcelona, Espanha). Após pré-condicionamento na câmara de contenção, os animais foram pré-aquecidos a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos e foram obtidas dez leituras consecutivas. A medida individual da pressão arterial foi calculada pela média das leituras obtidas<sup>26</sup>.

### ***Método direto***

As medidas diretas de PAS e pressão arterial diastólica (PAD) foram obtidas em mmHg, vinte semanas após o início do experimento, por canulação da artéria femoral direita, realizada sob anestesia com cetamina (90 mg/kg ip.) e xilazina (10 mg/kg ip.) (König SA<sup>®</sup>, Avellaneda, Argentina). Vinte e quatro horas após a cirurgia, o registro da pressão arterial foi realizado pelo método da pressão arterial pulsátil, utilizando-se o transdutor de pressão ML865-25T (ADInstruments<sup>®</sup>, Sydney, Austrália)<sup>27</sup>.

## **Lipídeos**

Avaliaram-se os níveis séricos de triglicérides e colesterol total, vinte semanas após o início das dietas, no momento da eutanásia, após 8 horas de jejum, utilizando kits comerciais (Labtest<sup>®</sup>, Lagoa Santa, Brasil).

### **Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)**

Dezenove semanas após início da dieta, em todos os grupos, foi coletado sangue da cânula de medida da pressão arterial (jejum de 8 horas) para a dosagem de glicose no T<sub>0</sub> (Tempo zero). Solução de glicose a 50% foi administrada por gavagem, na dose de 2g/Kg de peso. Subsequentemente, amostras de sangue foram coletadas nos tempos T<sub>1</sub> (15 min), T<sub>2</sub> (30 min), T<sub>3</sub> (60 min) e T<sub>4</sub> (120 min) e todas as amostras foram analisadas em glicosímetro (MediSence, Abbot<sup>®</sup>, Chicago, USA). A área sob a curva foi calculada utilizando-se o software Origin 3.5 (Microcal Software, Northhampton, MA)<sup>28</sup>.

A glicose sérica foi também dosada no momento da eutanásia, por kit comercial (Labtest<sup>®</sup>, Lagoa Santa, Brasil).

### **Função renal**

No término do experimento, em todos os grupos, no momento da eutanásia, foi coletado sangue (jejum de 8 horas) para dosagem sérica da creatinina (Cr). A creatinina urinária foi dosada na urina de 24h colhida em gaiola metabólica neste mesmo ponto. Os ensaios foram realizados com Kits comerciais (Labtest<sup>®</sup>, Lagoa Santa, Brasil), em analisador automático Labmax progress (Labtest<sup>®</sup>, Lagoa Santa, Brasil).

Após coleta individual de urina (24 horas), o clearance de creatinina (Ccr) foi calculado com base na Cr urinária, Cr sérica, volume de urina em 24h e peso corporal usando a seguinte equação:  $Ccr \text{ (ml/min/kg)} = [Cr \text{ urinária (mg/dL)} \times \text{volume urinário (mL)} / Cr \text{ sérica (mg/dL)}] [1000/\text{peso corporal (g)}] [1/1440 \text{ (min)}]$ <sup>29</sup>.

### **Morfologia renal**

O rim direito foi seccionado transversalmente e fixado em Formol Cálcio de Backer, posteriormente embebido em parafina e seccionado a 5µm de espessura, e corados com hematoxilina-eosina, para avaliar a morfologia glomerular.

Foram avaliadas por morfometria a área e volume glomerulares. A área glomerular foi quantificada no aumento de 400x. Selecionaram-se apenas glomérulos em que se identificou o polo vascular no corte estudado para medições de área, para garantir que os glomérulos medidos fossem seccionados em planos similares. As imagens glomerulares foram digitalizadas usando microscópio óptico Zeiss Axiophot HBO50, equipado com câmera Axicam ICc3 (Carl Zeiss®, Jena, Alemanha). Após a digitalização, o tufo glomerular foi identificado e a área foi calculada em  $\mu\text{m}^2$  utilizando o software de análise (Optimas 5.1; Optimas Corporation, Seattle, WA). Vinte glomérulos corticais foram medidos em cada animal, seis animais por grupo. O volume glomerular (VG) foi calculado a partir da área transversal do tufo glomerular (TG), utilizando a fórmula -  $VG = \beta/k (TG)^{3/2}$  onde  $\beta=1,38$  coeficiente da esfera e  $k=1,1$  coeficiente de distribuição de tamanho<sup>30</sup>.

### **Análise estatística**

Os resultados são apresentados como média e desvio padrão. A distribuição da amostra foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnoff. Os grupos controle e hiperlipídico foram comparados pelo teste t de Student. Os grupos hiperlipídicos foram comparados pelo teste de variância ANOVA bicaudal, post hoc pelo teste de Dunnet. O nível de significância assumido foi  $p < 0,05$ . O programa SPSS 15.0 foi usado em todas as análises (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

### **Resultados**

#### **Obesidade e síndrome metabólica**

A despeito da diferença da composição dietética, com maior percentagem de lipídeos nos grupos H, a ingestão energética foi semelhante entre os grupos (Tabela 1). Ao longo das 20 semanas de estudo todos os animais ganharam peso. Na 10<sup>ª</sup> semana de experimento, os animais do grupo H apresentaram ganho de peso 17,5% superior ao grupo C ( $p < 0,001$ ). A partir deste ponto os grupos H, H+L e H+E mantiveram-se com peso superior ao grupo C, não diferindo entre si. Ao final do experimento, essa porcentagem

atingiu 22,8% superior ao grupo C nos três grupos experimentais ( $p < 0,001$ , Figura 2).

Além do aumento no peso corporal, os grupos H, H+E e H+L desenvolveram acúmulo de gordura visceral e epididimária ao final do experimento (Tabela 2). Comparando os grupos, apenas o grupo H+E apresentou acúmulo de gordura retroperitoneal menor  $11,0 \pm 2,3$  vs  $14,8 \pm 3,1$  g quando comparado ao grupo H ( $p < 0,01$ ).

Tabela 2: Consumo energético, peso do tecido adiposo retroperitoneal e epididimário, nos grupos de estudo.

Variáveis	(C)	(H)	(H+E)	(H+L)
	N=12	N=12	N=12	N=12
Ingestão diária (g/dia)	$17,0 \pm 2,4$	$13,1 \pm 2,3$ *	$13,0 \pm 2,2$	$13,4 \pm 2,2$
Ingestão energética (Kcal/dia)	$63,1 \pm 8,9$	$68,3 \pm 12,1$	$67,6 \pm 11,3$	$69,8 \pm 11,6$
Gordura retroperitoneal (g)	$5,4 \pm 1,8$	$14,9 \pm 3,8$ *	$11,0 \pm 2,3$ #	$14,4 \pm 4,2$
Gordura epididimária (g)	$2,5 \pm 0,6$	$6,6 \pm 1,4$ *	$5,4 \pm 1,0$	$6,9 \pm 1,9$

Dados apresentados em média  $\pm$  desvio padrão. Ingestão diária e energética apresentadas como média das avaliações semanais a partir da 1ª semana do experimento. Gordura epididimária e retroperitoneal pesadas no momento da eutanásia ao final do estudo. Os grupos controle e hiperlipídico foram comparados pelo teste t de Student e os grupos hiperlipídicos entre si por ANOVA e teste de Dunnet. \*  $p \leq 0,05$  vs grupo controle (teste de t Student). #  $p \leq 0,05$  vs grupo hiperlipídico (teste de Dunnet).



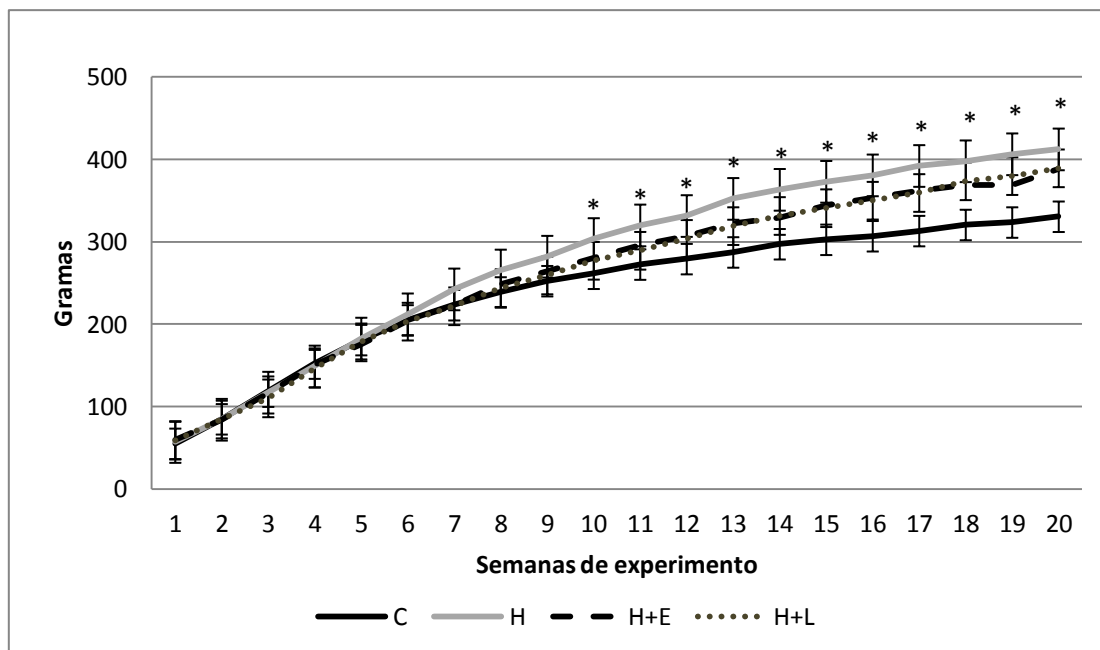


Figura 2: Peso corporal dos grupos estudados. Dados apresentados em média  $\pm$  erro padrão. Peso corporal apresentado como média das avaliações semanais nos diferentes pontos. Os grupos controle e hiperlipídico foram comparados pelo teste t de Student e os grupos hiperlipídicos, entre si, por ANOVA e teste de Dunnet. \*  $p \leq 0,05$  grupo controle vs grupo H (teste de t Student).

A partir da 17<sup>a</sup> semana de experimentação, o grupo H apresentou elevação da PAS (Figura 3). Esse aumento foi confirmado na 20<sup>a</sup> semana após aferição direta da pressão arterial, onde o grupo H apresentou aumento significativo em relação ao grupo C ( $159,0 \pm 10,1$  vs  $118,7 \pm 8,4$  mmHg,  $p < 0,001$ ). O mesmo comportamento foi observado na PAD ( $94,3 \pm 8,5$  vs  $83,2 \pm 6,2$  mmHg,  $p < 0,001$ , Figura 4).

Em relação ao perfil metabólico, observou-se aumento dos níveis de triglicérides nos animais submetidos à dieta hiperlipídica ( $53,8 \pm 12,4$  mg/dL vs  $28,0 \pm 4,8$  mg/dL) nos grupos H e C, respectivamente ( $p \leq 0,001$ ). Os níveis de colesterol não se alteraram ( $67,6 \pm 4,69$  mg/dL vs  $63,2 \pm 9,2$  mg/dL), Tabela 2. A glicemia de jejum não diferiu nos grupos C e H, porém, um aumento significativo da glicemia no grupo H foi observado 120 minutos após sobredose de glicose (Tabela 2). Além disso, a área sob a curva glicêmica do grupo H foi significativamente maior que a do grupo C no TOTG ( $15885 \pm 1837$  vs  $21449 \pm 3692$ ).

## Tratamentos

### **Pressão arterial**

A PAS permaneceu elevada ao longo de todo o experimento nos grupos H e H+E. Por outro lado, no grupo tratado com losartana (grupo H+L), ocorreu redução significativa desta a partir do início do tratamento (Figura 3).

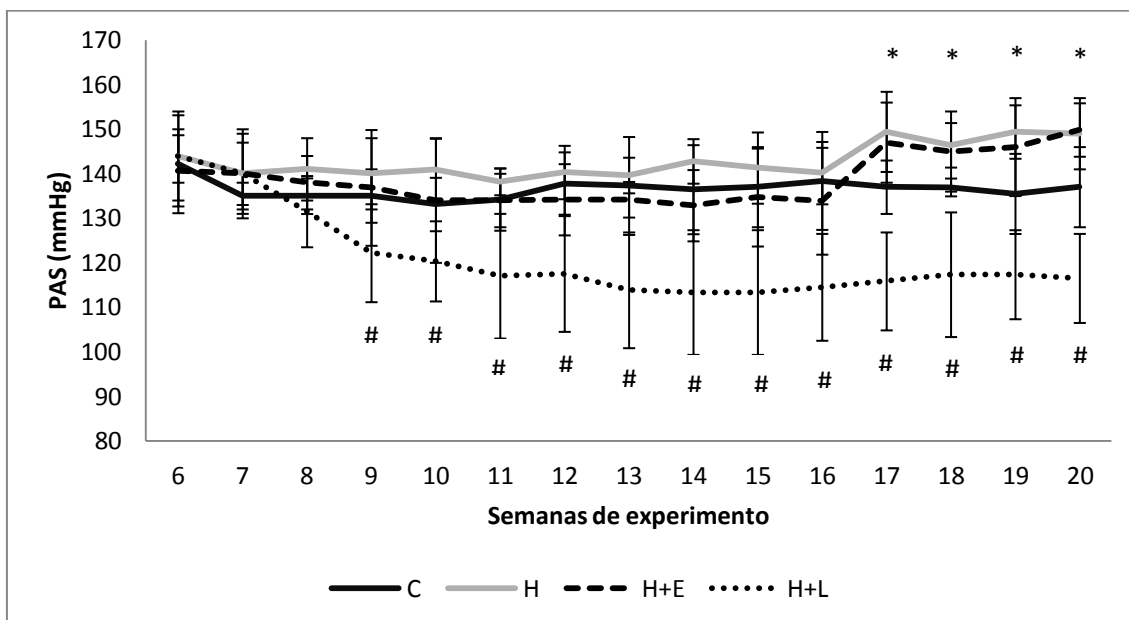


Figura 3: Níveis pressóricos, por medida indireta, dos grupos estudados. Dados apresentados em média  $\pm$  desvio padrão. PAS apresentada como média, da média individual de 10 leituras obtidas. O grupo controle e hiperlipídico foram comparados pelo teste t de Student e os grupos hiperlipídicos, entre si, por ANOVA e teste de Dunnet. \*  $p \leq 0,05$  grupo H vs grupo controle (teste de t Student). #  $p \leq 0,05$  grupo H+L vs grupo hiperlipídico (teste de Dunnet).

Ao final do estudo, quando foi realizada a aferição direta da pressão arterial, os dados obtidos por meio de aferição indireta foram confirmados. Assim, o tratamento com Losartana (grupo H+L), resultou em redução significativa da PAS ( $130,5 \pm 7,9$  vs  $159 \pm 10,1$  mmHg,  $p < 0,001$ ) e PAD ( $83,1 \pm 4,1$ , vs  $94,3 \pm 8,5$  mmHg,  $p < 0,01$ ), quando comparado ao grupo H e o tratamento com Espironolactona não alterou a PAS e a PAD em relação ao grupo H (Figura 4).

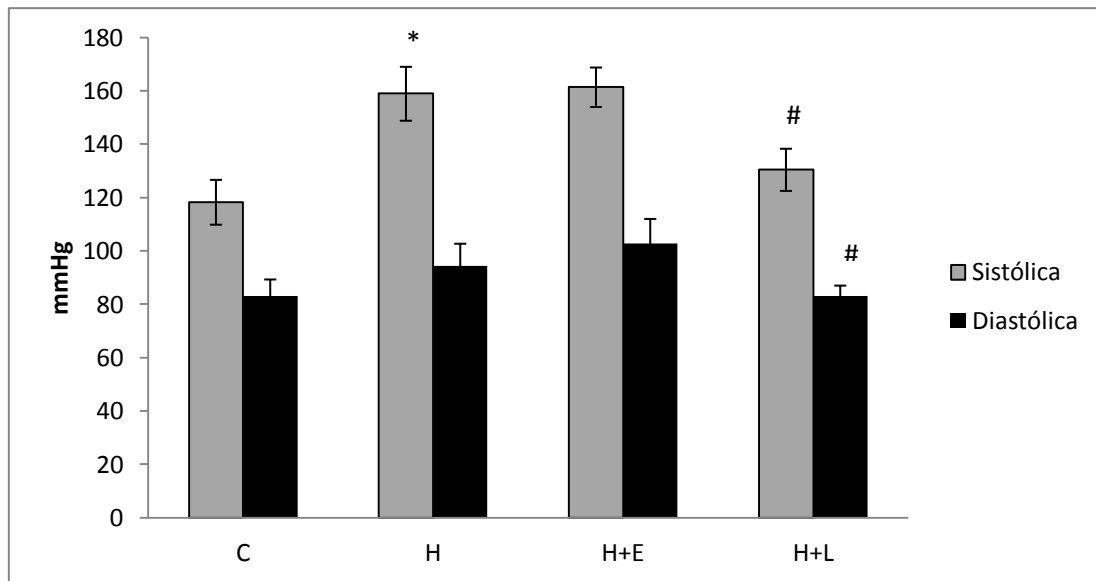


Figura 4: Níveis pressóricos, por medida direta, dos grupos estudados na 20<sup>a</sup> semana de estudo. Dados apresentados em média  $\pm$  desvio padrão. O grupo controle e hiperlipídico foram comparados pelo teste t de Student e os grupos hiperlipídicos, entre si, por ANOVA e teste de Dunnet.\*  $p \leq 0,05$  grupo H vs grupo controle (teste de t Student). #  $p \leq 0,05$  grupo H+L vs grupo hiperlipídico (teste de Dunnet).

### ***Perfil metabólico***

Os níveis de triglicérides não se alteraram com os tratamentos, porém, no grupo H+L observou-se aumento nos níveis do colesterol em comparação ao grupo H ( $p < 0,001$ ), como demonstrado na Tabela 3.

Também não foi observada alteração no perfil glicêmico (glicemia de jejum, área sob a curva glicêmica) nos animais submetidos a tratamento hipotensor. Tabela 3 e Figura 5.

Tabela 3: Colesterol total, triglicérides, área sobre a curva, glicose/jejum e glicose/120 min dos grupos estudados na 20<sup>a</sup> semana de estudo.

Variáveis	(C)	(H)	(H+E)	(H+L)
	N=11	N=9	N=11	N=9
Colesterol Total (mg/dL)	67,6 ± 4,6	63,2 ± 9,2	73,0 ± 21,1	84,3 ± 10,2 <sup>#</sup>
Triglicérides (mg/dL)	28,0 ± 4,8	53,8 ± 12,4 <sup>*</sup>	59,7 ± 14,8	57,3 ± 12,8
Área sob a curva (glic vs. t)	15885 ± 1837	21449 ± 3692 <sup>*</sup>	22329 ± 5597	20097 ± 2786
Glicose/jejum (mg/dL)	142,9 ± 13,3	143,5 ± 20,2	141,6 ± 23,2	137,3 ± 31,0

Glic- Glicemia; t- tempo. Dados apresentados em média ± desvio padrão. O grupo controle e hiperlipídico foram comparados pelo teste t de Student e os grupos hiperlipídicos, entre si, por ANOVA e teste de Dunnet. \* p≤0,05 vs grupo controle (teste de t Student). # p≤0,05 vs grupo hiperlipídico (teste de Dunnet).

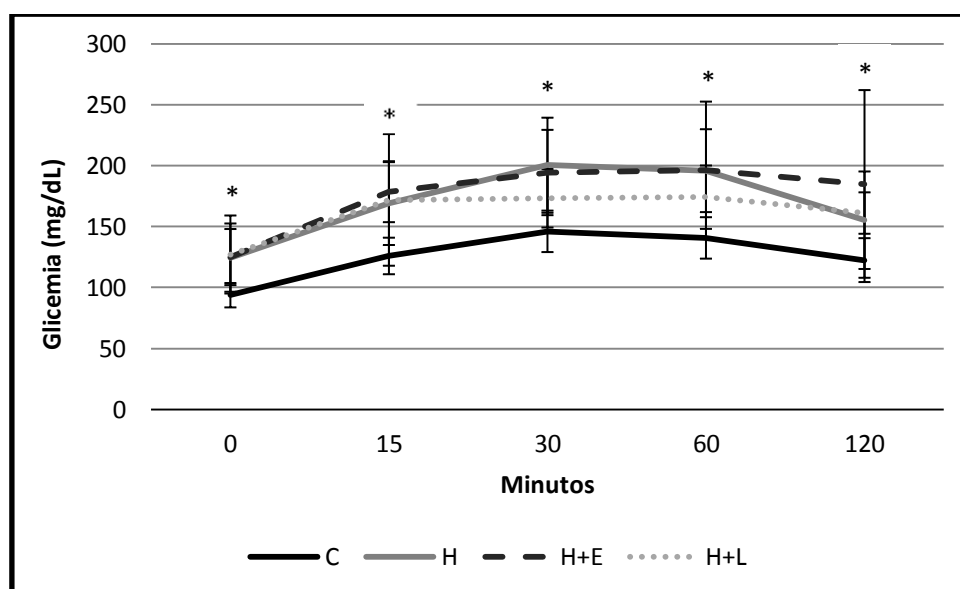


Figura 5: Perfil glicêmico dos grupos estudados, após sobrecarga de glicose. Dados apresentados em média ± desvio padrão. Os grupos controle e hiperlipídico foram comparados pelo teste t de Student e os grupos hiperlipídicos, entre si, por ANOVA e teste de Dunnet. \* p≤0,05 grupo controle vs grupo H (teste de t Student).

### **Função e morfologia renais**

Ao final do estudo, a filtração glomerular avaliada por meio do clearance de creatinina não apresentou alteração significativa entre os grupos. O mesmo foi observado em relação ao volume e área glomerulares (Tabela 4).

Tabela 4: Clearance de creatinina, área do tufo e volume glomerulares dos grupos estudados na 20<sup>a</sup> semana de estudo.

Variáveis	(C)	(H)	(H+E)	(H+L)
	N = 11	N = 9	N = 11	N = 9
Clearance Creatinina (mL/min/kg)	3,2 ± 0,5	3,0 ± 0,3	3,5 ± 1,0	3,2 ± 1,2
	N = 6	N = 6	N = 6	N = 6
Área do tufo glomerular (x10 <sup>2</sup> μm <sup>2</sup> )	63 ± 9	59 ± 5	63 ± 11	66 ± 5
Volume glomerular (x10 <sup>4</sup> μm <sup>3</sup> )	64 ± 13	58 ± 13	64 ± 16	68 ± 8

Dados apresentados em média ± desvio padrão. O grupo controle e hiperlipídico foram comparados pelo teste t de Student e os grupos hiperlipídicos, entre si, por ANOVA e teste de Dunnet.

## **Discussão**

A epidemia de obesidade observada nas últimas décadas tem tomado proporções alarmantes. Estima-se que 48% da população brasileira apresenta sobrepeso e cerca de 15% é classificada como obesa<sup>31</sup>. A obesidade cursa com diversas alterações metabólicas, inflamatórias e humorais que se associam ao desenvolvimento de neoplasias, diabetes mellitus, dislipidemia e hipertensão arterial. A maioria dos pacientes com hipertensão apresentam sobrepeso ou obesidade e os resultados de estudos epidemiológicos sugerem que 65% a 75% do risco para a HA essencial humana pode ser diretamente atribuído ao excesso peso corporal<sup>32</sup>.

Nessa população, o tratamento medicamentoso da HA tem como objetivo reduzir a morbidade e a mortalidade cardiovascular e renal, além de prevenir o agravamento metabólico<sup>11</sup>. Algumas evidências clínicas e experimentais com o bloqueio do SRAA sugerem a participação efetiva desse sistema na gênese da HA e da lesão renal<sup>12,15</sup>. Essa estratégia parece ser promissora, uma vez que estudos mostraram atenuação de outros componentes da SM, por exemplo, da hipertrigliceridemia, com o bloqueio do SRAA<sup>12,18</sup>. Todavia, os estudos disponíveis não trazem evidências clínicas suficientes para a generalização dessa estratégia para o tratamento da HA associada a SM por meio da administração de bloqueadores do SRAA. Deste

modo, a utilização de modelos experimentais constitui uma alternativa para o conhecimento sob a eficácia dos vários esquemas de tratamento hipotensor na SM<sup>11,20</sup>.

Há diversos modelos experimentais de obesidade descritos. Estes variam desde modelos genéticos, como ratos Zucker e camundongos *knockout* passando por modelos que utilizam lesão de áreas hipotalâmicas relacionadas ao crescimento e por modelos induzidos por dietas hiperlipídicas em cães, coelhos e camundongos, assim como em ratos Sprague-Dawley<sup>33</sup>.

Por outro lado, em ratos Wistar poucos são os relatos de indução de obesidade com o intuito de estudo da SM<sup>23,34</sup>. No presente estudo, a administração de dieta rica em lipídios por um período de 20 semanas induziu obesidade, hipertrigliceridemia, alterações glicídicas e HA em ratos Wistar, achados compatíveis com diagnóstico da SM. Apesar do consumo energético semelhante, a composição diferenciada da dieta, rica em lipídios, foi responsável pelo surgimento da SM<sup>25</sup>.

A importância da utilização de modelos experimentais que se assemelhem ao perfil da SM observada em seres humanos é inquestionável, dada a escassez de recomendações para o tratamento dessa síndrome em seres humanos. Atualmente, a abordagem terapêutica é realizada com base na tentativa de redução de peso corporal e/ou no tratamento farmacológico das comorbidades que compõem a síndrome. Especificamente em relação à HA associada à obesidade, apesar do relativo conhecimento de seus mecanismos causais o tratamento ainda não está bem estabelecido, não existindo diretrizes específicas para a abordagem da HA nessa população. De modo geral, têm sido preconizadas medicações que não interfiram no perfil metabólico e que contemplem mecanismos fisiopatogênicos, tais como a hiperatividade simpática, a retenção de sódio e o bloqueio do SRAA<sup>11,35</sup>.

No presente estudo, a administração de dieta hiperlipídica e normossódica a ratos Wistar, se associou com o desenvolvimento de HA (Figura 3). Nesses animais, o tratamento com Losartana preveniu o desenvolvimento da HA, achado indicativo da importância do SRAA na gênese da HA de ratos obesos. Esses dados são compatíveis com a literatura e confirmam a importância desse sistema na gênese da HA bem como em sua progressão<sup>36</sup>.

Por outro lado, o tratamento com o antagonista mineralocorticoide não preveniu a elevação da PA associada à SM no presente estudo. Esse dado é discordante de estudo prévio realizado por nosso grupo em cães obesos no qual se demonstrou a importância da aldosterona na gênese da HA associada a obesidade<sup>15</sup>. Também em seres humanos com SM, a administração de espironolactona em monoterapia reduziu a PA de modo significativo, sugerindo a importância clínica desse sistema hormonal na HA neste contexto. Além da redução pressórica, o tratamento associou-se à melhora no perfil glicídico e lipídico, achado clinicamente relevante dadas as características dos indivíduos avaliados<sup>18</sup>.

A discrepância entre o presente estudo e dados de estudos anteriores de nosso grupo poderia ser atribuída a diferenças entre espécies, dietas ou ao tempo de exposição dos animais à obesidade. Outro aspecto que poderia ter interferido nessa dissociação seria a dose de Espironolactona utilizada, que eventualmente poderia ter sido baixa. No entanto essa possibilidade não nos parece provável, uma vez que em estudo anterior observamos redução significativa da PA de indivíduos com SM tratados com apenas 25 a 50 mg de Espironolactona. Nesse estudo, a ação hipotensora foi atribuída a prováveis efeitos não genômicos<sup>18</sup>. Do mesmo modo, que o observado no estudo *Rales* onde se demonstrou que o tratamento com Espironolactona em baixa dose (25 mg/dia) se associou a diminuição de hospitalizações, mortalidade e melhora nos sintomas de pacientes com insuficiência cardíaca grave<sup>40</sup>.

Além disso, estudos recentes sugerem que a aldosterona induziria lesão vascular e HA apenas na vigência do consumo aumentado de sódio. O sódio atua sinergisticamente na ativação do receptor mineralocorticoide (RM) pela aldosterona, aumentando a expressão de citocinas e mediadores pró-inflamatórios com Cox-2, MCP-1 e osteopontina responsáveis pelo desenvolvimento de microalbuminúria, vasculopatia e HA<sup>17</sup>. Rocha e cols. demonstraram que a ativação dos RM pela administração concomitante de aldosterona e sódio agravou a intensidade das lesões coronarianas e da HA em ratos Sprague-Dawley; entretanto, na ausência de um dos agonistas ou na presença de um antagonista mineralocorticoide, menor ação vasculotóxica e hipertensiva foi observada<sup>16</sup>. Considerando que a dieta utilizada no presente estudo foi normossódica, esse fato poderia justificar a ausência de efeito

hipotensor da espironolactona e assim a discrepância entre nossos dados de outros estudos, onde o bloqueio do RM com eplerenone melhorou drasticamente a hipertensão arterial e a proteinúria, além de reverter a lesão dos podócitos em ratos SHR submetidos a dietas hipersódicas<sup>17</sup>. A contrapartida clínica dessa observação pode ser vista em populações de índios Yanomami, onde altas concentrações plasmáticas de aldosterona não são capazes de elevar PA nestes indivíduos devido a uma baixa ingestão de sódio na dieta<sup>37</sup>.

No presente estudo, a administração de Losartana ou Espironolactona não alterou significativamente os perfis metabólicos e glicídicos dos animais. Por outro lado, o grupo tratado com espironolactona apresentou redução significativa de 25% na gordura retroperitoneal. Efeitos semelhantes foram descritos em camundongos C57BL/6 com SM<sup>38</sup>. Nesse estudo, camundongos obesos tratados com Espironolactona apresentaram redução significativa da gordura epididimária. Esse achado foi atribuído à inibição da expansão clonal, da diferenciação e do acúmulo de triglicérides nos adipócitos, bem como pela diminuição na expressão do PPAR $\gamma$  pelo bloqueio dos receptores mineralocorticóides<sup>20,38</sup>.

Não observamos alterações na função renal, avaliada pela creatinina e pela depuração de creatinina, bem como na histologia renal. Estes dados são discordantes de outros autores que descrevem lesão renal em modelos experimentais de obesidade, em geral caracterizadas por aumento da filtração glomerular, proteinúria e aumento do volume glomerular<sup>15,39</sup>. Embora tenha sido avaliada, a proteinúria não foi incluída no estudo por termos encontrado dificuldades técnicas e de interpretação, que inviabilizaram a utilização dos resultados obtidos. Vale por outro lado especular, que a não observação de alterações histológicas glomerulares possa ter sido secundária ao pouco tempo de exposição dos animais à obesidade e aos níveis pressóricos apenas ligeiramente elevados. Essa possibilidade parece provável se considerarmos que o dano renal da obesidade em ratos Wistar ocorre apenas em animais senis<sup>39</sup>. Outra consideração importante é a de que não podemos descartar totalmente uma nefropatia mais incipiente, uma vez que não avaliamos indicadores de lesão em fase mais precoce, como a expressão de mediadores



inflamatórios, de fatores de crescimento e de proteínas marcadores de transição epitélio mesenquimal.

Em conclusão, o bloqueio do SRAA em ratos Wistar com SM demonstrou ser uma medida eficaz na redução da pressão arterial, quando o bloqueio se dá ao nível de receptores da angiotensina II. Porém, a mesma eficácia hipotensora não foi observada no bloqueio de receptores mineralocorticóides, que tiveram por outro lado sua atividade adipogênica inibida, o que preveniu o acúmulo de gordura abdominal.

### **Agradecimentos**

Rede Mineira de Bioterismo e Rede Mineira de Ensaio Toxicológicos e Farmacológicos de Produtos Terapêuticos.

### **Referências**

1. Ogden CL, Carrol MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. JAMA 2006;295:1549-55.
2. World Health Organization. Obesity and overweight: what are overweight and obesity? Report of a WHO Consultation. Geneva; 2006. WHO Technical Report.
3. Klimcakova E, Kovacikova M, Stich V, Langin D. Adipokines and dietary interventions in human obesity. Obes rev 2010;11:446-56.
4. Hall JE. Pathophysiology of obesity hypertension. Curr Hypertens Rep 2000;2: 139-47.
5. Vlasova M, Purhonen AK, Jarvelin MR, Rodilla E, Pascual J, Herzig KH. Role of adipokines in obesity-associated hypertension. Acta Physiol 2010;200:107-27.
6. Simmons RK, Alberti KGMM, Gale EAM et al. "The metabolic syndrome: useful concept or clinical tool? Report of a WHO expert consultation". Diabetologia 2010;53:600-5.
7. Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM. NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and the prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. Diabetes Care 2003;52:1210-4.

8. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T et al. "Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome". *Diabetes Care* 2001;24:683-9.
9. Grundy M, Brewer Jr. HB, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition of Metabolic Syndrome. *Circulation* 2004;109:433-8.
10. Ezequiel DGA, Costa MB, Chaoubah A, de Paula RB. Efeito da perda de peso sobre a hemodinâmica renal em portadores da síndrome metabólica. *J Bras Nefrol* 2012;34:36-42.
11. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. *Arq Bras Cardiol* 2005;84:1-28.
12. The ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group. Major outcome in high-risk hypertensive patients to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs. diuretic. The Antihypertensive and Lipid-Lowering Treatment to Prevent Heart Attack Trial (ALLHAT). *JAMA* 2002;228:2981-97.
13. Williams SA, Michelson EL, Cain VA et al; Trophy Study Investigators. An evaluation of the effects of an angiotensin receptor blocker on health-related quality of life in patients with high-normal blood pressure (prehypertension) in the Trial of Preventing Hypertension (TROPHY). *J Clin Hypertens* 2008;10:436-42.
14. Lubsen J, Wagener G, Kirwan BA, de Brouwer S, Poole-Wilson PA; ACTION (A Coronary disease Trial Investigating Outcome with Nifedipine GITS) investigators. Effect of long-acting nifedipine on mortality and cardiovascular morbidity in patients with symptomatic stable angina and hypertension: the ACTION trial. *J Hypertens* 2005;23:641-8.
15. De Paula RB, Silva AA, Hall JE. Aldosterone antagonism attenuates obesity-induced hypertension and glomerular hyperfiltration. *Hypertension* 2004;43:1-7.
16. Rocha R, Martin-Berger CL, Yang P, Scherrer R, Delyaniand J, McMahon E. Selective Aldosterone Blockade Prevents Angiotensin II/Salt-Induced Vascular Inflammation in the Rat Heart. *Endocrinology* 2002;143:4828-36.
17. Fujita T. Mineralocorticoid Receptors, Salt-Sensitive Hypertension, and Metabolic Syndrome. *Hypertension* 2010;55:813-8.
18. Costa MB, Ezequiel DGA, Lovis JCM, Oliveira MM, de Paula RB. Aldosterone antagonist decreases blood pressure and improves metabolic parameters in obese patients with the metabolic syndrome. *J Clin Hypertens* 2010;12:753-5.

19. Kloet AD, Krause EG, Woods SC. The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. *Physiol Behav* 2010;100:525-34.
20. Caprio M, Antelmi A, Chetrite G et al. Antiadipogenic Effects of the Mineralocorticoid Receptor Antagonist Drosiprenone: Potential Implications for the Treatment of Metabolic Syndrome. *Endocrinology* 2011;152:113-25.
21. Dobrian AD, Davies MJ, Prewitt RL, et al. Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension* 2000;35:1009-15.
22. Toshiharu A, Issei T, Hisashi S, Nobuaki W, Makoto O. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. *Diabetes Res Clin Pract* 1996;31:27-35.
23. Shen C, Zhu Z, Yan Z, Ni Y. P-513: High fat plus high salt diet induced metabolic syndrome in wistar rat. *Am J Hypertens* 2004;17:220-35.
24. Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS et al. Misclassification probability as obese or lean in hypercaloric and normocaloric diet. *Biol Res* 2008;41:253-9.
25. Dourmashkin JT, Chang GQ, Gayles EC et al. Different forms of obesity as a function of diet composition. *Int J Obes* 2005;29:1368-78.
26. Machado H, Guerra MO, Peters V. Implantação e padronização da técnica de aferição indireta da pressão arterial em ratos Wistar da colônia do biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR). *RIEE* 2010;2:60-1.
27. Raji IA, Mugabo P, Obikeze K. Effect of *Tulbaghia violacea* on the blood pressure and heart rate in male spontaneously hypertensive Wistar rats. *J Ethnopharmacol* 2011. [Epub ahead of print].
28. Marchionne EM, Diamond-Stanic MK, Prasonnarong M, Henriksen EJ. Chronic renin inhibition with aliskiren improves glucose tolerance, insulin sensitivity, and skeletal muscle glucose transport activity in obese Zucker rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2012;302:137-42.
29. Yamabe N, Kang KS, Goto E, Tanaka T, Yokozawa T. Beneficial effect of *Corni Fructus*, a constituent of Hachimi-jio-gan, on advanced glycation end-product-mediated renal injury in Streptozotocin-treated diabetic rats. *Biol Pharm Bull* 2007;30:520-6.
30. Zheng S, Noonan WT, Metreveli NS et al. Development of late stage diabetic nephropathy in OVE26 diabetic mice. *Diabetes* 2004;53:3248-57.
31. *Vigitel Brasil 2010: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. - Brasília: Ministério da Saúde, 2011.152 p.: il. - (Série G. Estatística e Informação em Saúde).*

32. Garrison RJ, Kannel WB, Stokes J III, Castelli WP. Incidence and precursors of hypertension in young adults: the Framingham Offspring Study. *Prev Méd* 1987;16:235-51.
33. Panchal SK, Brown L. Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:1-14.
34. Ferreira LB, Cesaretti ML, Voltera AF, Ginoza M, Kohlmann O Jr. Effects of the overlapping between an experimental model of neuroendocrine obesity with arterial hypertension under blood pressure, body weight and metabolic and renal parameters in rats. *J Bras Nefrol* 2011;33:338-44.
35. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq Bras Cardiol* 2010;95:1-51.
36. Hall JE. The kidney, hypertension, and obesity. *Hypertension* 2003;41:625-33.
37. Carvalho JJM, Silva NAS. The Yanomami Indians in the INTERSALT Study. *Arq Bras Cardiol* 2003;80:289-00.
38. Marzolla V, Armani A, Zennaro MC et al. The role of the mineralocorticoid receptor in adipocyte biology and fat metabolism. *Mol Cel Endocrinol* 2012;350:281-8
39. Aguila Mb, Mandarim-De-Lacerda Ca. Effects of chronic high fat diets on renal function and cortical structure in rats. *Exp Toxic Pathol* 2003;55:187-95.
40. Pitt B, Zannad F, Remme JW et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *N Engl J Med* 1999;341:709-17.