

**Instituto Presbiteriano Mackenzie**  
**Fundo Mackenzie de Pesquisa**  
**MACKPESQUISA**

**RELATÓRIO FINAL PROJETO MACKPESQUISA**

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA NAS  
FUNÇÕES RENAL E CARDIOVASCULAR ASSOCIADAS AO  
CONSUMO CRÔNICO DE UMA DIETA HIPERLIPÍDICA EM  
RATOS.**

**Líder:** Profa Dra. Patrícia Fiorino  
**Associados:** Profa. Dra. Vera Farah  
Prof. Dr. Jan Carlo Morais Delorenzi  
Prof. Dr. Manassés C. Fonteles

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS**  
**São Paulo, 2012**

## **1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA**

Dados recentes da literatura mostram um aumento importante da prevalência da obesidade em todo o mundo, o que determina seu caráter epidemiológico. Estima-se que cerca de 7% da população mundial está obesa e 15 a 20% com sobrepeso (SPEISER et al., 2005). De forma alarmante, o número de pacientes com doença renal crônica (DRC) e insuficiência renal terminal (IRT) tem aumentado progressivamente com o aumento na incidência de obesidade. (USRDS, 2009)

No Brasil, estudos realizados em algumas cidades brasileiras mostram que o sobrepeso e a obesidade já atingem 30% ou mais das crianças e adolescentes (BALABAN et al., 2001; SOUZA LEÃO et al., 2003; COSTA et al., 2006). O aumento da prevalência de obesidade nos grupos mais jovens é alarmante estando associada principalmente aos padrões atuais de vida da população em geral que têm favorecido o consumo de alimentos de alto poder calórico e baixo valor nutritivo. (DE ROSE et al., 2009)

Acredita-se que alterações no balanço entre necessidades energéticas e ingestão alimentar durante a infância e a adolescência possam ter importante impacto no desenvolvimento de problemas de saúde, como a obesidade e o desenvolvimento de resistência à insulina, não apenas a curto prazo, mas com importante reflexo a longo prazo como a persistência da obesidade até a fase adulta, com conseqüente aumento nas taxas de morte decorrentes de cardiopatias, insuficiência renal, hipertensão e diabetes. (KRIKEN et al., 2009)

A utilização de modelos experimentais que associam alterações da dieta, como excesso de carboidratos e lipídios, tem sido amplamente utilizada na literatura a fim de se entender melhor essa complexa associação entre obesidade e morbidade e mortalidade associadas ao desenvolvimento de doenças renais crônicas (DAMJANOVI & BARTON, 2008; DUE et al., 2008). Camundongos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram importantes alterações renais, como aumento da síntese e acúmulo renal de triglicerídeos, expansão mesangial, lesão dos podócitos, acúmulo de matriz extracelular de proteínas glomerular e túbulo intersticial e proteinúria (DEJI et al., 2009; JIANG et al., 2005). Resultados preliminares de nosso laboratório, projeto

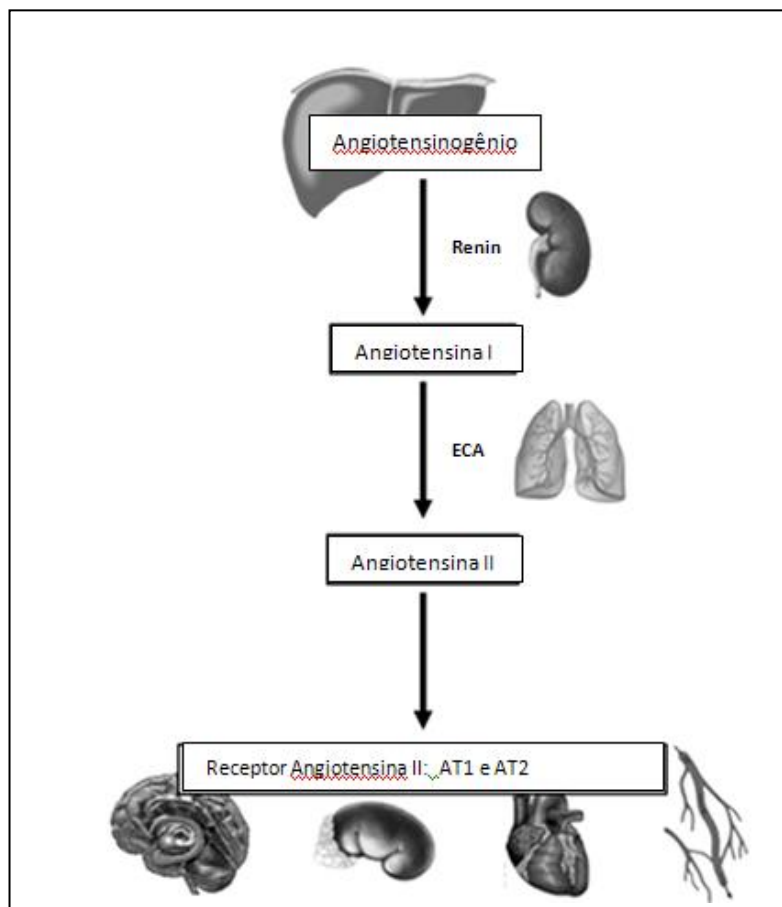
Mackpesquisa em andamento, mostraram importantes alterações na função renal, no sistema do rim isolado (*ex-vivo*), como aumento da resistência vascular renal, da pressão de perfusão e do fluxo plasmático renal, em ratos alimentados durante 8 semanas com ração hiperlipídica (30%), sugerindo uma correlação positiva entre dieta e nefropatia, nesse modelo experimental.

Os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da função renal associados à dieta hiperlipídica, são complexos e não completamente entendidas. Entretanto, estudos experimentais e clínicos têm revelado o potencial do tecido renal em produzir importantes peptídios, como os componentes do sistema renina angiotensina (SRA), que podem estar contribuindo para tais alterações renais a curto e/ou longo prazo. (KLOET et al., 2010)

O SRA corresponde a um complexo sistema hormonal, cujo papel fundamental está relacionado com o controle da pressão arterial e homeostasia hidroeletrólítica do organismo. Classicamente, o SRA é entendido como um sistema endócrino cuja substância ativa, angiotensina II (Ang II), é a responsável pela maioria dos efeitos fisiológicos observados. (MENARD, 1993)

O sistema renina angiotensina (SRA) é uma cascata coordenada de proteínas e hormônios peptídicos que desempenha papel fundamental na regulação da pressão arterial e no balanço de fluidos e eletrólitos em mamíferos (INAGAMI et al., 1994). Na visão clássica do SRA (figura 1) a renina, na corrente sangüínea, converte o angiotensinogênio circulante, proveniente do fígado, no decapeptídeo inativo angiotensina I, que dá origem à angiotensina II (AII) pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), proveniente especialmente dos pulmões (KRIKEN et al., 2009). A AII, além de exercer funções em órgãos-alvo distantes do local da produção (DZAU et al., 1986; FERRARIO CM., 1990), possui múltiplas ações renais diretas, incluindo vasoconstricção arterial, estimulação de reabsorção de sódio e inibição da natriurese de pressão, via receptor AT1. (CAREY & SIRAGY, 2003)

Com a utilização de métodos bioquímicos aliados a técnicas modernas de biologia molecular, tem sido possível comprovar a presença dos componentes individuais (angiotensinogênio, renina, ECA e receptores de Ang II) em diversos órgãos como glândulas adrenais, rins, coração, vasos e cérebro. (GRIENGLING et al., 1993)



**Figura 1:** Visão Clássica do Sistema Renina Angiotensina.

ECA: Enzima Conversora de Angiotensina I; figura adaptado de KLOET AD. The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. *Physiol Behav.* 100(5):525-34, 2010).

Diversos estudos têm destacado a importância no entendimento da contribuição sistêmica e local da ANGII em diferentes estados fisiopatológicos. Em particular, foi demonstrado que o conteúdo da ANG II em tecidos renais é muito mais elevado do que pode ser explicado (NAVAR, et al., 2000; NAVAR e NISHIYAMA, 2004) sugerindo uma regulação local seletiva para a ANG II, independentemente de suas concentrações circulantes. (NAVAR e NISHIYAMA, 2004)

A ANG II produzida no rim exerce uma importante influência na regulação da hemodinâmica renal e outras funções como um fator parácrino (NAVAR, et al., 2000; PAUL, et al., 2006). Estudos demonstraram que a diminuição da função renal e suas alterações estruturais estão associadas com a inadequada ativação da ANG II intrarenal, levando ao desenvolvimento de hipertensão arterial e lesão renal (NAVAR, 2005). A elevação da ANG II intrarenal induz proteinúria acompanhado por lesão progressiva da barreira de filtração glomerular (MILLER, et al., 1991, HOFFMANN, et al., 2004).

Estudos em ratos geneticamente obesos (Zucker) revelaram que o receptor para a AngII (AT1), responsável primariamente pela vasoconstrição pós-glomerular, está com sua expressão tecidual aumentada no córtex renal (XU et al., 2005). Tais resultados sugerem que o aumento do SRA intrarenal pode ser um fator relevante para o aumento da vasoconstrição da arteríola eferente, aumento da pressão glomerular, aumento da fração de filtração e, finalmente, aumento da pressão arterial sistêmica. (HUNLEY et al., 2008)

Alguns trabalhos com pacientes e modelos experimentais de obesidade apresentam resultados conflitantes, com aumento, diminuição ou não alteração do SRA (KLOET et al., 2010; BOMBACK & KLEMMER, 2008; KENNEFICK & ANDERSON, 1997). Estas discrepâncias podem ser explicadas devido à quantidade de fatores que influenciam o SRA, sendo dependente do tecido estudado, da idade do indivíduo e tempo de exposição a fatores como nível glicêmico estabelecido durante a doença, hiperglicemia, hiperinsulinemia e aumento da pressão arterial. (LEEHEY et al., 2008; BURNS, 2009)

Embora a associação da obesidade com distúrbios renais estejam descritos na literatura, assim como a participação do sistema renina angiotensina na regulação da função renal e cardiovascular, uma lacuna de conhecimento existe sobre a influência do SRA na função renal e cardiovascular na presença de obesidade induzida por dieta. Sabe-se menos ainda sobre as repercussões na fase adulta quando a dieta hiperlipídica é introduzida no início do ciclo vital, período caracterizado por altas taxas de crescimento e desenvolvimento.

Sendo assim, o objetivo do presente projeto foi avaliar a participação do sistema renina angiotensina na função renal e cardiovascular em ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica desde o desmame até a idade adulta.

Importante ressaltar que o presente projeto solicitado justifica-se pelo já exposto e também por representar a continuidade de um projeto Mackpesquisa em andamento. Assim, reiteramos que os resultados preliminares obtidos em nosso laboratório têm mostrado importantes associações entre o consumo excessivo de lipídios desde o início do ciclo vital, 21 dias de idade, nas características funcionais renais na fase adulta.

Tais alterações podem estar associadas a respostas intrarenais decorrentes da ativação do SRA, acompanhadas de alterações no metabolismo da glicose e no sistema cardiovascular, abrindo importantes perspectivas para a continuidade dos estudos no entendimento dos fatores envolvidos nestas alterações precoces da função renal.

## **2 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a participação do SRA na função renal e nas alterações cardiovasculares em ratos submetidos a uma dieta hiperlipídica desde o início do ciclo vital (21 dias de idade), período caracterizado por altas taxas de crescimento e desenvolvimento, até a fase adulta (77 dias de idade).

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Estudar em ratos adultos, submetidos a dieta controle e hiperlipídica desde o desmame:

1. O papel do SRA na função renal através da preparação de rim isolado, modelo de perfusão renal *extracorpórea*;
2. O papel do SRA na resposta de pressão arterial e frequência cardíaca;
3. A expressão dos componentes do SRA renal através da técnica de *Western Blotting*.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 AMOSTRA E MODELO EXPERIMENTAL**

Para a realização dos experimentos, foram utilizados ratos Wistar machos recém desmamados (tratados a partir do desmame, 21 dias de idade), pesando entre 50-60g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Durante o protocolo experimental, os animais foram mantidos no Biotério Central da Universidade Presbiteriana Mackenzie em ambiente com temperatura controlada (22°C e 25°C), ciclo claro-escuro (12 horas) e com livre acesso à água e alimentação. Os procedimentos experimentais adotados para o estudo obedecerão às normas estabelecidas pela comissão de Pesquisa e Ética da Universidade Presbiteriana Mackenzie (obtido após aprovação do projeto no Mackpesquisa e antes de iniciar o mesmo na UPM).

Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos experimentais de acordo com o teor lipídico da ração recebida, desta forma:

- 1) Grupo Dieta Padrão (GDP): Os ratos foram alimentados com ração industrial (padrão) para ratos e água *ad libitum* por um período 8 semanas
- 2) Grupo Dieta Hiperlipídica (GHL): Os ratos foram alimentados com ração com teor lipídico de 30%, e água *ad libitum*, durante 8 semanas

No projeto original oi previsto um n=8 para cada grupo experimental, entretanto, para cada protocolo experimental utilizado o numero de animais variou, de forma que o numero final utilizado esta apresentado na descrição dos resultados.



### 3.1.1 RAÇÃO HIPERLIPÍDICA

A ração hiperlipídica foi preparada no laboratório, levando-se em conta a porcentagem de extrato etéreo ou gorduras totais já existentes na ração comercializada e calculada a porcentagem de gordura restante a ser adicionada. A receita resume-se a 430g de ração comercializada (4%) para cada 200g de manteiga comercializada (82%) com adição de 150 ml de água.

A dieta hiperlipídica foi administrada ao longo do protocolo de 8 semanas, com início após o desmame, aos 21 dias de idade.



**Figura 2:** Foto representativa da ração hiperlipídica comparada com a ração padrão administrada aos grupos GHL e GDP, respectivamente.

## **3.2 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL**

### **3.2.1 AVALIAÇÃO DIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL**

Para registro direto da pressão arterial (PA), assim como administração de anestésico ou outras drogas utilizadas durante os protocolos, a artéria e veia femorais foram cateterizadas. Para isso, os ratos foram anestesiados com uma solução de cloridrato de Ketamina (50 mg/kg) e Xylazina (12 mg/kg) por via intraperitoneal.

Os registros de PA e da FC foram realizados com os ratos acordados e em livre movimentação durante 30 minutos. O registro terá início apenas após a estabilização de atividade exploratória do animal (15-20 minutos).

A medida direta da PA foi obtida do catéter na artéria femoral conectada a um transdutor de pressão (Hewlett-Packard 1280, EUA) acoplado a um amplificador (General Purpose Amplifier, Stemtech, Inc.; EUA). O sinal amplificado foi digitalizado através de uma placa de conversão analógico digital (CODAS), com frequência de amostragem de 2000 Hz, instalada em um computador PC586. Os dados digitalizados foram processados através do programa WinDaq (DataQ Instruments, Inc.; EUA) e posteriormente analisados (Excel, Microsoft Co.; EUA).

### **3.2.1.1 INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DO SRA**

Após o registro da PA basal foi realizado o bloqueio farmacológico do sistema SRA pela administração do antagonista específico de receptor AT-1, Losartan (10 mg/kg, iv, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) em volume não superior a 0,2 ml pela veia femoral do animal. A PA e a FC foram registradas continuamente durante 15 min., após a administração da droga.

### **3.2.2 AVALIAÇÃO INDIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL**

Para acompanhamento da evolução da pressão arterial durante a ingesta (8 semanas) utilizaremos o método de avaliação indireta da pressão arterial.

A pressão arterial sistólica de repouso foi mensurada na 4<sup>o</sup>, 6<sup>o</sup> e na 8<sup>o</sup> semanas de protocolo experimental através de pletismografia de cauda, usando o equipamento BP-2000 Blood Pressure Analysis System™ (Visitech Systems, Carolina do Norte, USA). Antes das mensurações propriamente ditas, os animais passaram por um período de adaptação de 3 dias. A temperatura da plataforma foi mantida em 37°C para todos os animais. Realizou-se 10 registros estáveis, sendo que o valor final foi obtido a partir da média dos registros.

### **3.3 RESPOSTAS RENAIS A INIBIÇÃO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA NO MODELO DE PERFUSÃO RENAL EXTRACORPÓREA.**

#### **3.3.1 PERFUSÃO RENAL EXTRACORPÓREA**

O sistema de perfusão renal extracorpórea, ou do rim isolado, consiste de um conjunto de equipamentos que possibilita o estudo da fisiologia renal, onde o órgão é mantido funcional (urinando metabólitos processados ou não, a partir do perfusato fornecido), em ambiente extracorpóreo, por algumas horas. O sistema de perfusão foi desenvolvido por Bowman & Maack (1974) e Ross (1978) e modificado por Fonteles et al. (1983).

Durante todo o protocolo de perfusão renal extracorpórea, o rim foi perfundido por solução de Krebs-Henseleit (VON KUGELGEN I et al., 1995) contendo: NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O e NaHCO<sub>3</sub>, acrescida de albumina bovina (fração V, 6g%, Sigma). Além disso, no dia do experimento, adiciona-se ao perfusato: creatinina e glicose (LIMA et al., 1992). Esta solução de perfusão, ou perfusato, foi então ajustado para pH 7,4 e colocado no sistema de perfusão, garantindo o fornecimento das condições e dos nutrientes necessários para manutenção do tecido renal.

Para o procedimento de retirada do rim, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol veterinário 30%; Fontoveter, Brasil) na dose de 45 mg/kg e.v. O rim direito foi cuidadosamente removido e introduzido ao sistema de perfusão onde, após 15 minutos para a adaptação do rim às novas condições experimentais, dar-se-á início a coleta das amostras de urina, obtida através da canulação do ureter, e do perfusato, coletado com seringa do próprio sistema.

### 3.3.1.1 PERÍODO BASAL

Após a estabilização do rim no sistema de perfusão, deu-se início ao período basal de 30 minutos. Nesta fase, as amostras coletadas de urina e de perfusato, foram obtidas para as análises de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, por fotometria de chama (Micronal, B462) e creatinina, através de Kit comercial (Enz color, Bio Diagnostica). Com estas análises bioquímicas, e as avaliações da pressão de perfusão (mmHg) e de fluxo urinário (ml/min), obtidas do próprio sistema de perfusão, durante o protocolo experimental, foi possível avaliar os parâmetros renais descritos abaixo:

1. Pressão de perfusão (PP, mmHg):  $PP =$  dado obtido do manômetro de mercúrio
2. Fluxo plasmático renal (FPR, mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>):  $FPR =$  fluxo registrado a cada 10 min/intervalo de tempo x peso do rim.
3. Fluxo Urinário (FU, mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>):  $FU =$  peso do volume urinário/peso do rim esquerdo x 10
4. Ritmo de filtração glomerular (RFG, mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>):  $RFG = (CrU/CrPxFU)PESO DO RIM$ , onde: CrU = creatinina na urina; CrP = creatinina no perfusato
5. Resistência Vascular Renal (RVR, mmHg.mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>):  $RVR = PP/FPR$
6. Percentual de sódio OU potássio transportado, onde X<sup>+</sup> será o Sódio ou Potássio, logo:  $(\%TX+, (Eq.g^{-1}.min^{-1}):\%TX+ = TX+ \times 100/FX+$ 
  - Sódio ou Potássio transportado (TX+, (Eq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>):  $TX+ = FX+ - EX+$
  - Sódio ou Potássio excretado (EX+, (Eq.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>)  $EX+ = FU \times UX+$ ; onde: UX+ = concentração de X<sup>+</sup> na urina
  - Sódio ou Potássio filtrado:  $F X+ = RFG \times P X+$ ;  $P X+ =$  concentração de X<sup>+</sup> no perfusato

### 3.3.1.2 APLICAÇÃO DO LOSARTAN

Após o período basal de 30 minutos de duração, o antagonista específico do receptor de AII, AT1, o LOSARTAN (LOS) , foi administrado (10 mg por 100ml) no recipiente onde esta o perfusato na concentração de. Novas amostras de perfusato e urina foram coletadas nos tempos de 30, 60 e 90 minutos de acordo com a figura abaixo (figura 3):

Rim colocado no sistema: período de adaptação de 15 minutos	Coleta de urina e perfusato durante os 30 minutos do período Basal.	Injeção única do LOSARTAN	Coleta da urina e perfusato, após a infusão do Losartan em 30, 60 e aos 90 min.
---	---	---------------------------	---

**Figura 3:** Etapas de coleta de urina e perfusato no sistema de perfusão renal.

### **3.4 ESTUDO DA EXPRESSÃO PROTEICA DA ECA.**

Amostras do rim (30 µg), obtidas do rim esquerdo contralateral ao rim utilizado na perfusão renal, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (7,5% acrilamida) na presença de sulfato dodecil de sódio (SDS-PAGE). As proteínas foram eletroforeticamente transferidas para uma membrana de nitrocelulose, a qual foi incubada com anticorpo anti ECA. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho biotilado (1:2000), as etapas subsequentes foram realizadas utilizando-se o sistema estreptavidina/fosfatase alcalina, segundo recomendações do fabricante (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia).

#### **3.4.1 DOSAGEM DE PROTEÍNA**

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

## **3.5 METABOLISMO DA GLICOSE**

### **3.5.1 TESTE DE TOLERÂNCIA A INSULINA**

Na sétima semana do protocolo experimental, após um período de jejum de 4 horas, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/Kg) e colocados em decúbito dorsal em cama aquecida à 37°C. A veia caudal foi localizada a fim de se administrar uma injeção endovenosa de insulina (0,75 U/Kg peso corporal). Foi coletado sangue da cauda do animal para análise da concentração de glicose sanguínea usando método de química seca (Accu-Check Advantage Blood Glucose Monitor, Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN) nos tempos 0, 4, 8, 12 e 16 min após a injeção de insulina. Os valores de glicemia dos min 4 e 16 foram utilizados para calcular a constante de queda da glicose plasmática (Kitt) de acordo com a descrição de Bonora (1989).

### **3.5.2 TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE (TTG)**

Na oitava semana do protocolo experimental, após um período de jejum de 4 horas, os animais foram submetidos ao TTG. O protocolo inicia com a aferição da glicemia basal em jejum, através da obtenção de uma gota de sangue a partir de um corte na ponta da cauda do animal. A análise da concentração de glicose sanguínea foi nrealizado usando método de química seca (Accu-Check Advantage Blood Glucose Monitor, Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN).



Após a realização deste procedimento, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de glicose (1,5g/Kg) e novas amostras de sangue foram coletadas nos tempos 15, 30, 60 e 90 minutos após a injeção de glicose.

### **3.5.3 CONCENTRAÇÃO DA INSULINA PLASMÁTICA**

A insulina foi avaliada através de Kit comercial de radioimunoensaio (Sensitive Rat Insulin RIA kit-Linco Research, Inc.). Após a completa anestesia via intraperitoneal com de 10mg/Kg de xilazina e 90mg/Kg de cloridrato quetamina, os animais foram submetidos a uma incisão através da parede abdominal para aceder à cavidade abdominal e permitir a coleta de sangue pela veia cava inferior.

Os experimentos foram realizados no Instituto do Coração (InCor) em colaboração com a Profa. Dra. Fabiana de Sant'Anna Evangelista.

## **4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram analisados e apresentados como média  $\pm$  EPM. Consideraremos significativamente diferente somente quando  $p < 0,05$ , após análise de variância de um ou dois fatores (ANOVA), conforme a necessidade. Em caso de diferença significativa entre os grupos experimentais, foi utilizado o pós-teste de Tukey.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 CONSUMO DE RAÇÃO HIPERLIPÍDICA

A dieta hiperlipídica foi administrada ao longo do protocolo de 8 semanas, com início após o desmame, aos 21 dias de idade.

Na tabela 1 estão apresentados os valores nutricionais das rações utilizadas no projeto, após análise da ração no Laboratório de Bromatologia da Universidade Presbiteriana Mackenzie, aos cuidados do Prof. Ms. Eder de Carvalho Pincinato.

Ao final da tabela, apresentamos o total de calorias (Kcal/100g) da ração industrial e da ração manipulada, acrescida de manteiga, para obtenção de teor lipídico de 30%.

**Tabela 1:** Avaliação da composição nutricional da Ração Comercial e da Ração Hiperlipídica administradas aos Grupos experimentais.

	<b>Ração Comercial:</b> ração industrial para ratos ( <i>Nuvilab</i> )	<b>Ração Hiperlipídica:</b> ração manipulada para 30% de lipídeos
<b>Carboidratos (%)</b>	36	23
<b>Proteínas (%)</b>	20	19
<b>Lipídeos (%)</b>	3,5	30
<b>Umidade (%)</b>	9,5	0,5
<b>Fibras (%)</b>	20	23
<b>Calorias totais da ração (Kcal/100g)</b>	<b>257</b>	<b>381</b>

Composição nutricional da ração industrial e hiperlipídica. Foram realizadas 6 amostras em duplicatas para cada dieta.

Na tabela 2 estão apresentados os resultados referentes ao consumo médio em 24 horas de ração na sétima semana de protocolo, nos animais adultos dos grupos GDP e GHL. Com base neste consumo, calculamos o consumo calórico médio dos grupos experimentais.

Pode-se observar na tabela 2 que o consumo médio de ração é maior no grupo GDP, entretanto, com igual consumo calórico em relação ao GHL, sugerindo que de alguma forma, o GHL ajustou seu consumo calórico médio similar aos obtidos nos animais do grupo GDP.

Além disso, apesar do cálculo do consumo calórico médio ter sido similar, deve-se lembrar de que a ingestão total de lipídios no GHL (30%) é sempre maior em relação ao GDP (3,5%).

**TABELA 2:** Valores médios do consumo de ração no GDP (grupo dieta controle) e GHL (grupo dieta hiperlipídica) na sétima semana de protocolo experimental.

<b>GRUPO</b>	<b>Calorias totais ração (Kcal/g)</b>	<b>Consumo Médio em 24 horas (g/24hrs)</b>	<b>Consumo calórico médio (Kcal/g/24hrs)</b>
<b>GDP (n=14)</b>	2,98	26 ± 0,34	79±1,0
<b>GHL (n=20)</b>	3,81	21 ± 0,71 *	79±2,7

Os resultados estão representados como média±erro padrão da média. n= número de animais. GDP (grupo dieta padrão), GHL (grupo dieta hiperlipídica). \* p<0,05 vs GDP.

## 5.2 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL

Na tabela 3 estão os valores absolutos do peso corporal do início do protocolo (peso inicial, Pi) e ao final das 8 semanas de experimento (peso final, Pf), após a administração das respectivas rações.

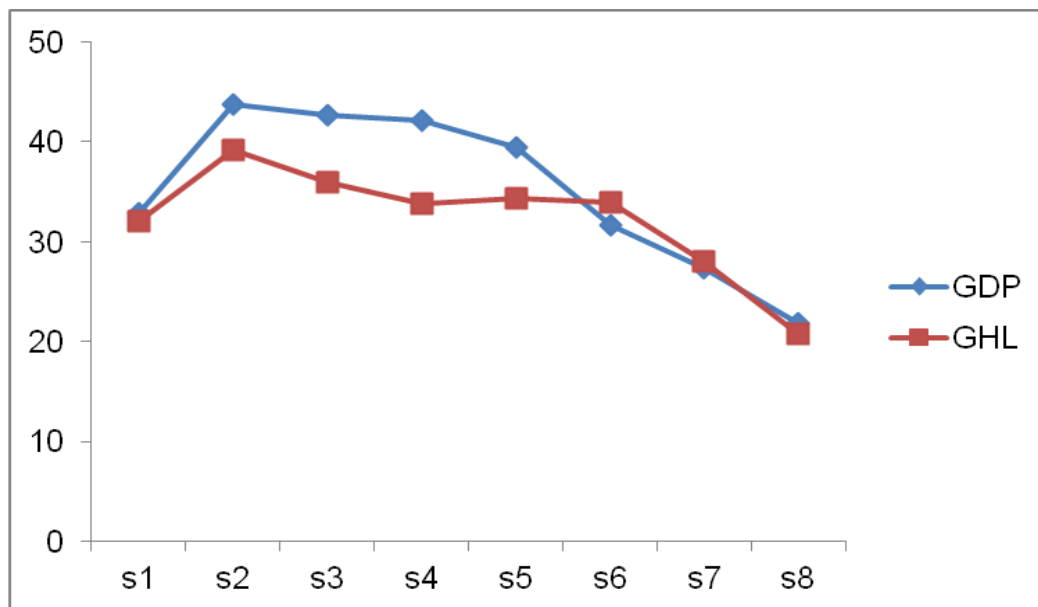
Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados, tanto no início como ao final dos experimentos, na 8ª semana (Pf) (tabela 3).

**Tabela 3:** Média do peso corporal no início do protocolo experimental (Pi) e ao final da 8ª semana (Pf) de ratos alimentados com dieta padrão (GDP) e hiperlipídica (GHL).

	Pi (g)	Pf (g)	
<b>GDP (n=14)</b>	47,27 ± 1,08	312,6 ± 7,1	
<b>GHL (n=20)</b>	49,30 ± 1,04	295,3 ± 6,4	

Os resultados estão representados como média±erro padrão da média. n= número de animais. GDP (grupo dieta padrão), GHL (grupo dieta hiperlipídica). Pi, peso inicial dos animais e início da administração das respectivas dietas; Pf, peso ao final do protocolo experimental

Na figura 4 está representado o ganho de peso corporal médio durante as 8 semanas de protocolo (S1 a S8). Observa-se que os animais, independentemente da ração ingerida, hiperlipídica ou não, apresentaram ganho de peso corporal semelhante.



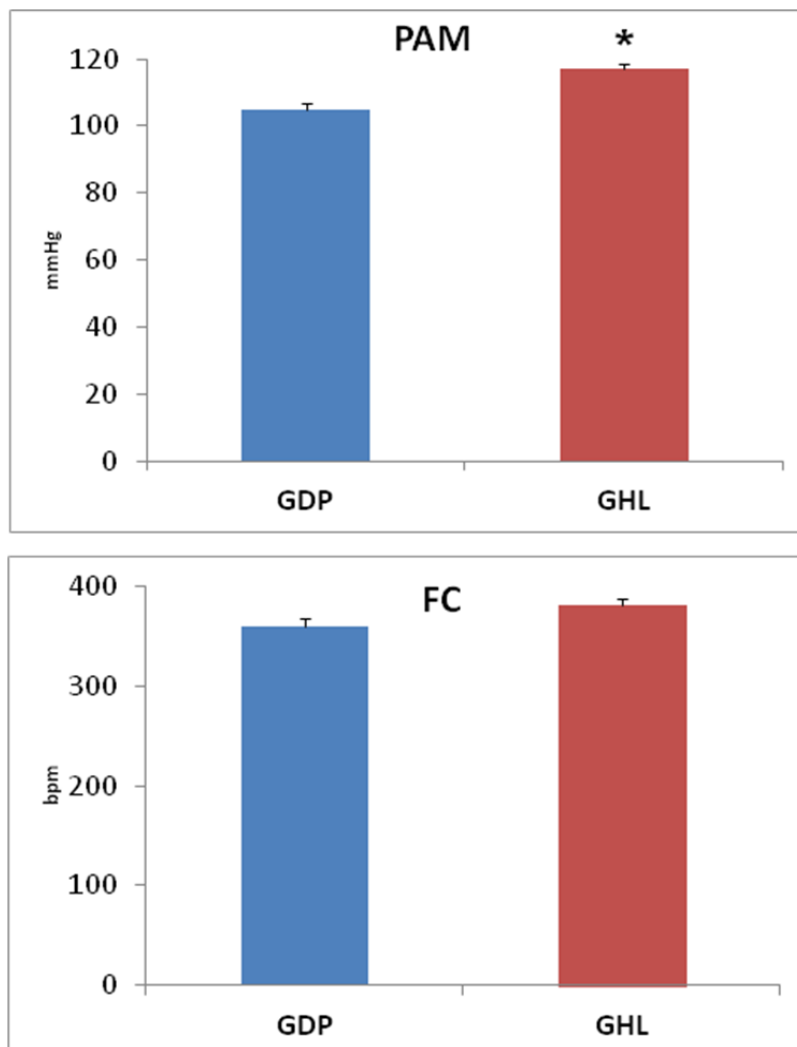
**Figura 4:** Média do ganho de peso corporal durante as 8 semanas (S1 até S8) de protocolo experimental nos grupos GDP (grupo dieta padrão) e GHL (grupo dieta hiperlipídica).

A avaliação do consumo de ração e do peso corporal semanais tem sido utilizada como padrão de qualidade de nossos experimentos, pois servem como orientação aos novos protocolos experimentais sobre o que é esperado destes parâmetros durante as 8 semanas que dura nosso protocolo, em nosso biotério central.

## 3.2 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL

### 3.2.1 AVALIAÇÃO DIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL

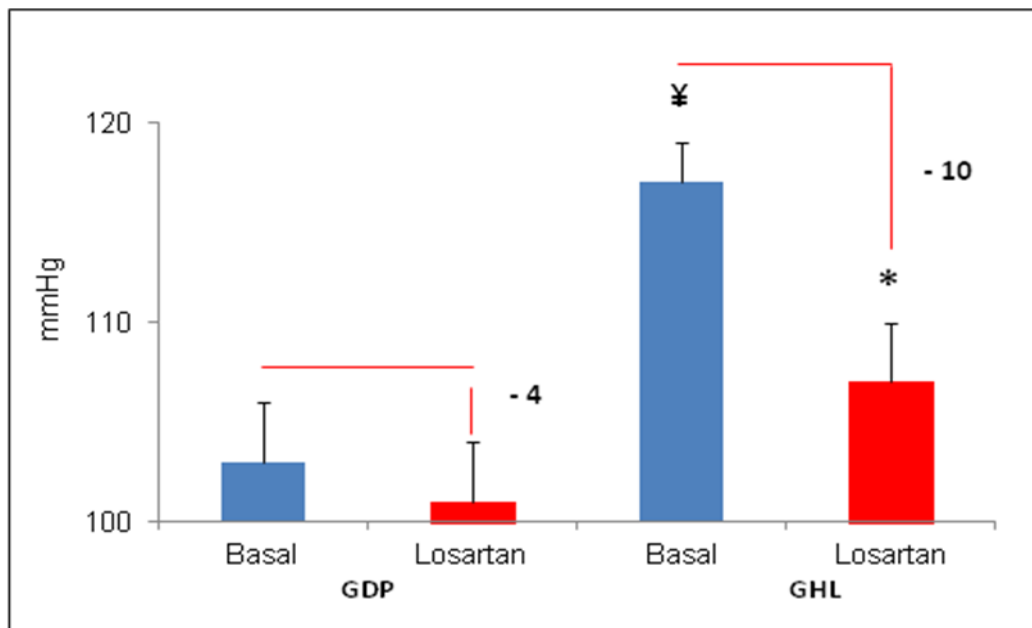
A figura 5 mostra a média dos valores da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) obtido dos animais dos grupos GDP (n=13) e GHL (n=10) ao final das 8 semanas de experimento. Podemos verificar que os animais pertencentes ao grupo GHL apresentaram aumento significativo da PAM (17%), sem alteração da FC, quando comparado ao GDP.



**Figura 5:** Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) ao final das 8 semanas de protocolo experimental nos grupos GDP (grupo dieta padrão) e GHL (grupo dieta hiperlipídica). \*  $p < 0,05$  vs GDP.

### 3.2.1.1 INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DO SRA

Após o registro da pressão arterial (PA) basal foi realizado o bloqueio farmacológico do sistema SRA pela administração do antagonista específico de receptor AT-1, Losartan (LOS, 10 mg/kg, iv, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (Figura 6).



**Figura 6:** Valores da Pressão Arterial Média (PAM) no período basal e após administração do Losartan (10mg/Kg), nos grupos GDP (grupo dieta padrão, n=6) e GHL (grupo dieta hiperlipídica, n=12). \* p<0,05 vs PAM após Losartan; ¥ p<0,05 vs PAM basal GDP

A figura mostra, o efeito agudo do LOS em reduzir a PA em ambos os grupos experimentais estudados. Entretanto, a resposta de queda da PA no grupo GHL (-10 mmHg) foi significativamente maior que no GDP (-4 mmHg), sugerindo a participação deste sistema no aumento da PA observado no GHL.

### 3.2.2 AVALIAÇÃO INDIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL

A avaliação indireta da PA permitiu acompanhar a evolução da PA durante as 8 semanas de protocolo. A PA sistólica (PAS) foi estimada na 4<sup>o</sup>, 6<sup>o</sup> e na 8<sup>o</sup> semanas de protocolo experimental através de pletismografia de cauda (tabela 4)

**Tabela 4:** Média do peso corporal no início do protocolo experimental (Pi) e ao final da 8<sup>o</sup> semana (Pf) obtida dos animais submetidos a gaiola metabólica, de ratos alimentados com dieta padrão (GDP) e hiperlipídica (GHL) obtidas na de protocolo experimental

	PAS (mmHg)		
	GDP (n=4)	GHL (n=4)	Valores de <i>p</i>
<b>4° SEMANA</b>	130 ± 6	145 ± 4	0,08
<b>6° SEMANA</b>	116 ± 14	143 ± 5	0,11
<b>8° SEMANA</b>	126 ± 8	143 ± 3	0,09

Os resultados estão representados como média±erro padrão da média. n= número de animais. GDP (grupo dieta padrão), GHL (grupo dieta hiperlipídica). PAS: pressão arterial sistólica.

Não observamos diferenças significativas entre os grupos estudados, bem como nas semanas avaliadas, entretanto, se analisarmos os valores de *p* apresentados na tabela 4, mesmo com o número insuficiente de animais, sugerimos uma tendência (valores de *p*) ao aumento da PAS no GHL nos três momentos estudados, sugerindo que o aumento da PAS é progressivo e está associada ao consumo da dieta hiperlipídica.



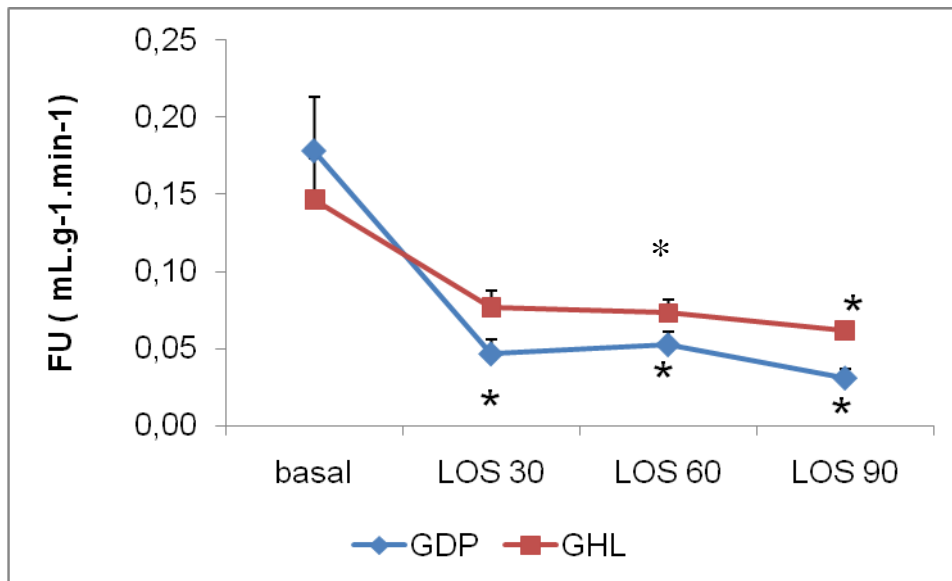
### **3.3 RESPOSTAS RENAIS A INIBIÇÃO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA (SRA) NO MODELO DE PERFUSÃO RENAL EXTRACORPÓREA.**

#### **3.3.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL DO RIM ISOLADO (EXTRACORPORAL).**

O estudo da participação do SRA na função renal de ratos alimentados com ração hiperlipídica foi avaliado através do método de perfusão renal extracorporal. O Losartan (LOS) foi adicionado ao reservatório do perfusato na concentração de 10mg/100ml. Os resultados foram expressos como média±EPM e obtidos como delta de variação do efeito do LOS nos tempos de 30 (LOS30), 60 (LOS60) e 90 (LOS90) minutos comparados com o período basal (pré-Losartan).

O Fluxo Urinário (FU, mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>.) obtido durante o período basal da perfusão extracorpórea nos animais controle (GDP) e alimentados com dieta hiperlipídica durante 8 semanas (GHL) foi similar (p<0,560) entre os grupos estudados (figura 7).

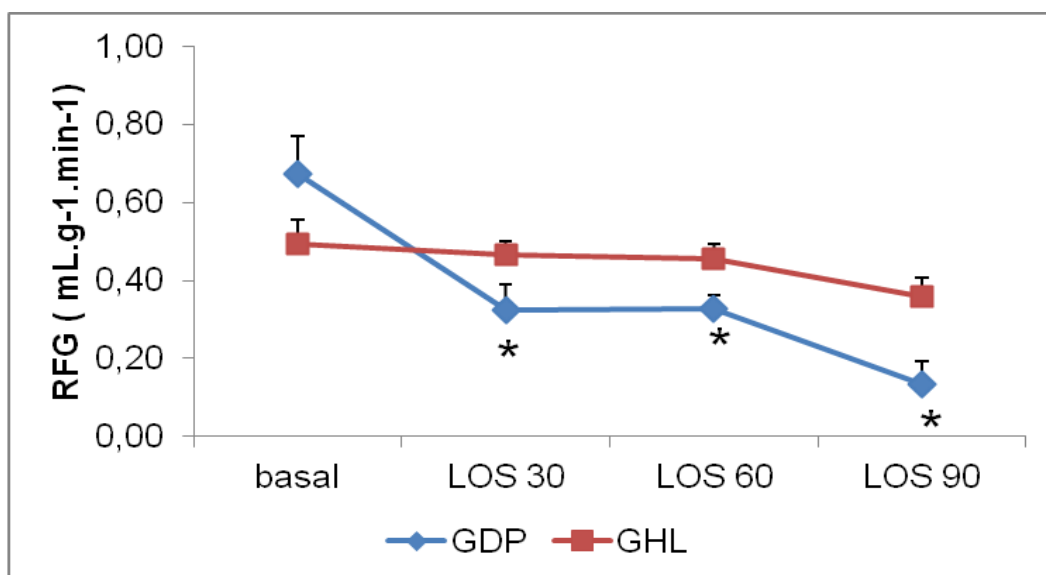
Após a infusão com LOS o FU reduziu de forma significativa no GDP em LOS30 (p<0,01), mantendo-se reduzida em LOS60 e LOS90. No GHL o FU não reduziu de forma significativa em LOS30 (p<0,0512), reduzindo de forma significativa no LOS60 (p<0,03) e LOS90 (p<0,02).



**Figura 7:** Fluxo urinário avaliada na perfusão renal extracorporeal, antes (basal) e após o Losartan. Os resultados estão expressos como média±EPM obtidos como delta de variação do efeito do losartan nos tempos de 30 (LOS30), 60 (LOS60) e 90 (LOS90) minutos comparados com os 30 minutos do período basal, pré-Losartan. Nos grupos GDP (dieta padrão, n=6) e GHL (dieta hiperlipídica, n=6) \*p < 0,05 comparado com o período basal; #p < 0,05 comparado com GDP.

O Ritmo de Filtração Glomerular (RFG, mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) obtida durante o período basal de perfusão extracorpórea nos animais GDP (0,67 ± 0,09, mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) e GHL (0,49 ± 0,06, mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) não apresentou diferença significativa (figura 8).

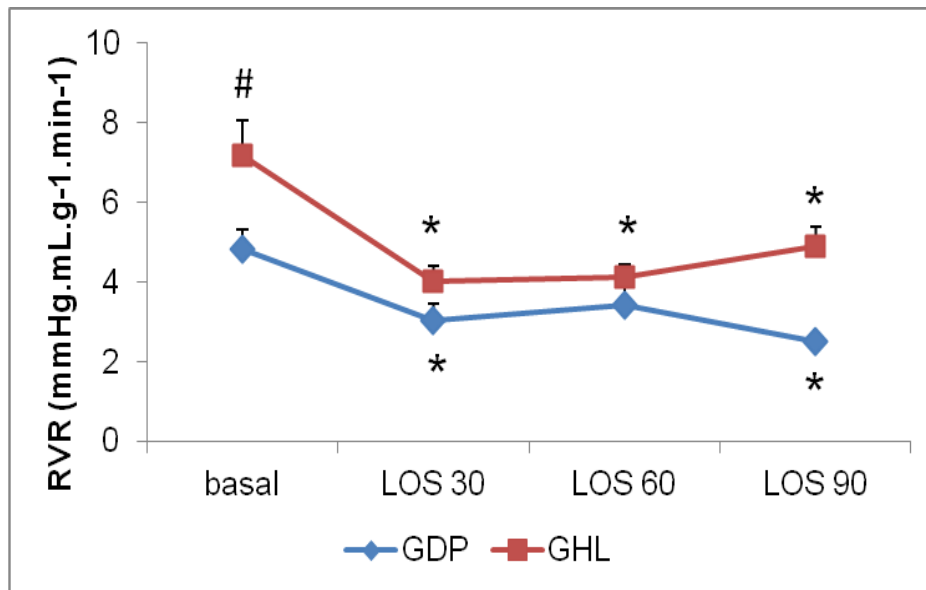
Na figura 8 observamos que a infusão com LOS reduziu de forma significativa o RFG no GDP em LOS30 (0,32 ± 0,07, mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), mantendo reduzida em LOS60 (0,33 ± 0,03, mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) e LOS90 (0,13 ± 0,06, mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), quando comparada com seu período basal. No GHL o LOS não modificou o RFG.



**Figura 8:** Ritmo de Filtração Glomerular (RFG) avaliada na perfusão renal extracorporeal, antes (basal) e após o Losartan. Os resultados estão expressos como média±EPM obtidos como delta de variação do efeito do losartan nos tempos de 30 (LOS30), 60 (LOS60) e 90 (LOS90) minutos comparados com os 30 minutos do período basal, pré-Losartan. Nos grupos GDP (dieta padrão, n=6) e GHL (dieta hiperlipídica, n=6) \*p < 0,05 comparado com o período basal.

A Resistência Vascular Renal (RVR, mmHg.mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) durante o período basal de perfusão extracorpórea estava aumentada no GHL (7,2 ± 0,85, mmHg.mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) em relação ao GDP (4,83 ± 0,49, mmHg.mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) (figura 9).

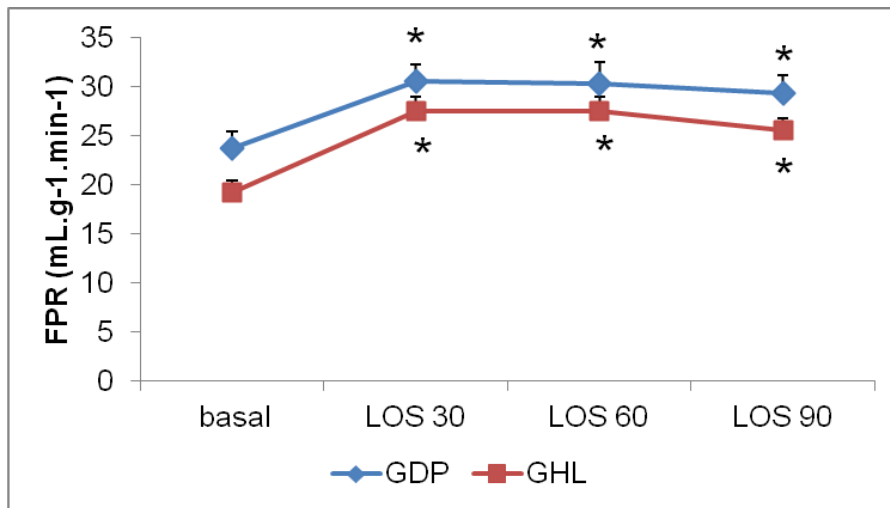
Na figura 9 observamos que a infusão com Losartan reduziu de forma significativa o RFG no GDP no LOS30 (3,04 ± 0,4, mmHg.mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), mantendo-se em LOS60 e reduzindo ainda mais em LOS90 (2,52 ± 0,15, mmHg.mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), quando comparada com seu período basal. No GHL o Losartan reduziu significativamente em 43% a RVR em LOS30, que permaneceu reduzida em LOS60 e em LOS90.



**Figura 9:** A Resistência Vascular Renal (RVR) avaliada na perfusão renal extracorporeal, antes (basal) e após o Losartan. Os resultados estão expressos como média±EPM obtidos como delta de variação do efeito do losartan nos tempos de 30 (LOS30), 60 (LOS60) e 90 (LOS90) minutos comparados com os 30 minutos do período basal, pré-Losartan. Nos grupos GDP (dieta padrao, n=6) e GHL (dieta hiperlipidica, n=6) \*p < 0,05 comparado com o período basal; <sup>#</sup>p < 0,05 comparado com GDP.

O Fluxo Plasmático Renal (FPR, mL.g<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) durante o período basal de perfusão extracorpórea não foi significativamente diferente (p<0,066) entre os grupos GHL e GDP (figura 10).

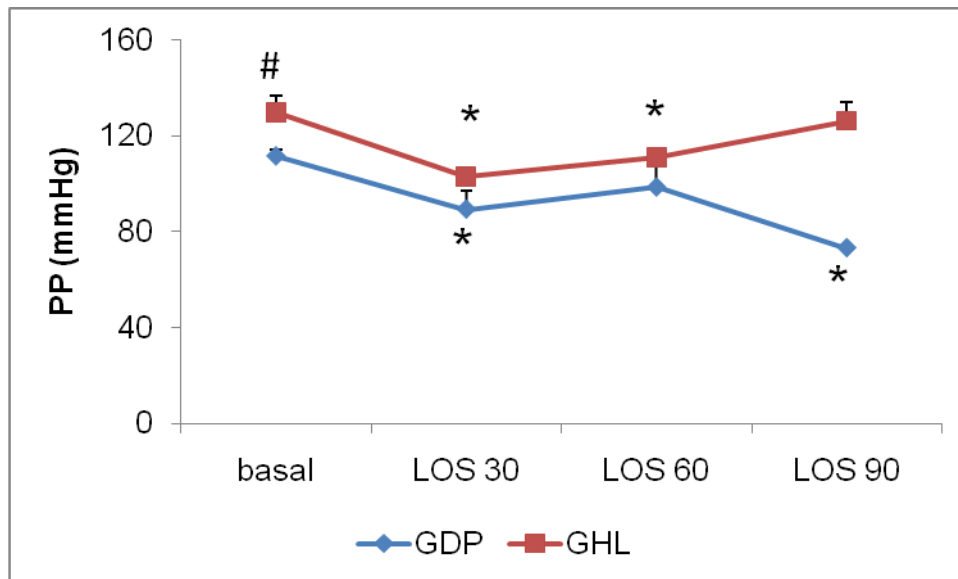
Na figura 10 observamos que após 30 minutos da infusão com Losartan, o FPR aumentou significativamente em 29% no GDP e em 43,5% no GHL. Mantendo-se elevado, em ambos os grupos, até o final do protocolo experimental de perfusão renal.



**Figura10:** O Fluxo Plasmático Renal (FPR) avaliada na perfusão renal extracorporeal, antes (basal) e após o Losartan. Os resultados estão expressos como média±EPM obtidos como delta de variação do efeito do losartan nos tempos de 30 (LOS30), 60 (LOS60) e 90 (LOS90) minutos comparados com os 30 minutos do período basal, pré-Losartan. Nos grupos GDP (dieta padrao, n=6) e GHL (dieta hiperlipidica, n=6) \*p < 0,05 comparado com o período basal.

A Pressão de Perfusão (PP, mmHg) durante o período basal de perfusão extracorpórea foi significativamente maior ( $p < 0,0301$ ) no grupo GHL quando comparado ao GDP (figura 11).

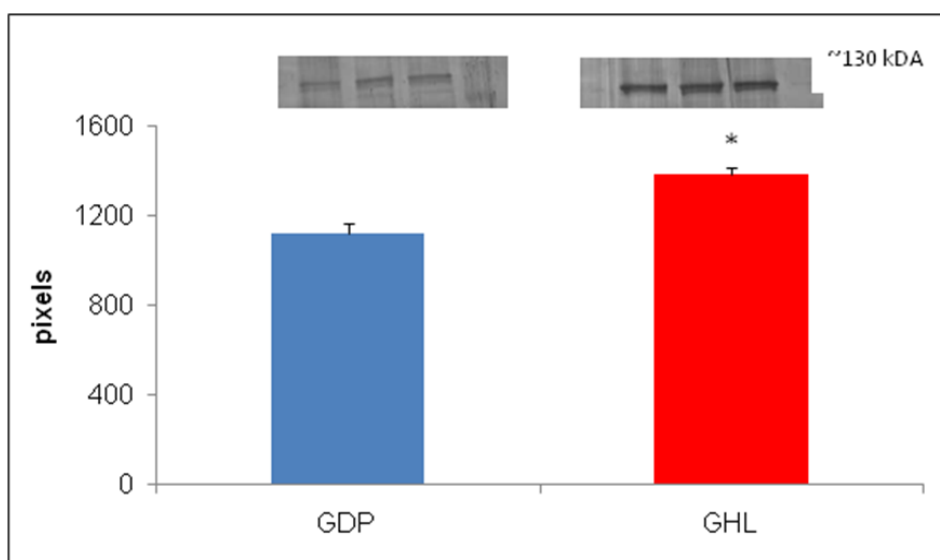
Na figura 11 observamos que após 30 minutos da infusão com Losartan, a PP diminuiu significativamente e de forma similar, 20%, nos grupos GDP e GHL.



**Figura11:** Pressão de Perfusão (PP) avaliada na perfusão renal extracorporeal, antes (basal) e após o Losartan. Os resultados estão expressos como média±EPM obtidos como delta de variação do efeito do losartan nos tempos de 30 (LOS30), 60 (LOS60) e 90 (LOS90) minutos comparados com os 30 minutos do período basal, pré-Losartan. Nos grupos GDP (dieta padrao, n=6) e GHL (dieta hiperlipidica, n=6) \*p < 0,05 comparado com o período basal ; #p < 0,05 comparado com GDP.

### 3.4 ESTUDO DA EXPRESSÃO PROTEICA RENAL DA ECA.

Os resultados (figura 11) mostram que a ECA de 130 kDa aumentou significativamente ( $p < 0,0009$ ) no GHL quando comparada com o GDP. .



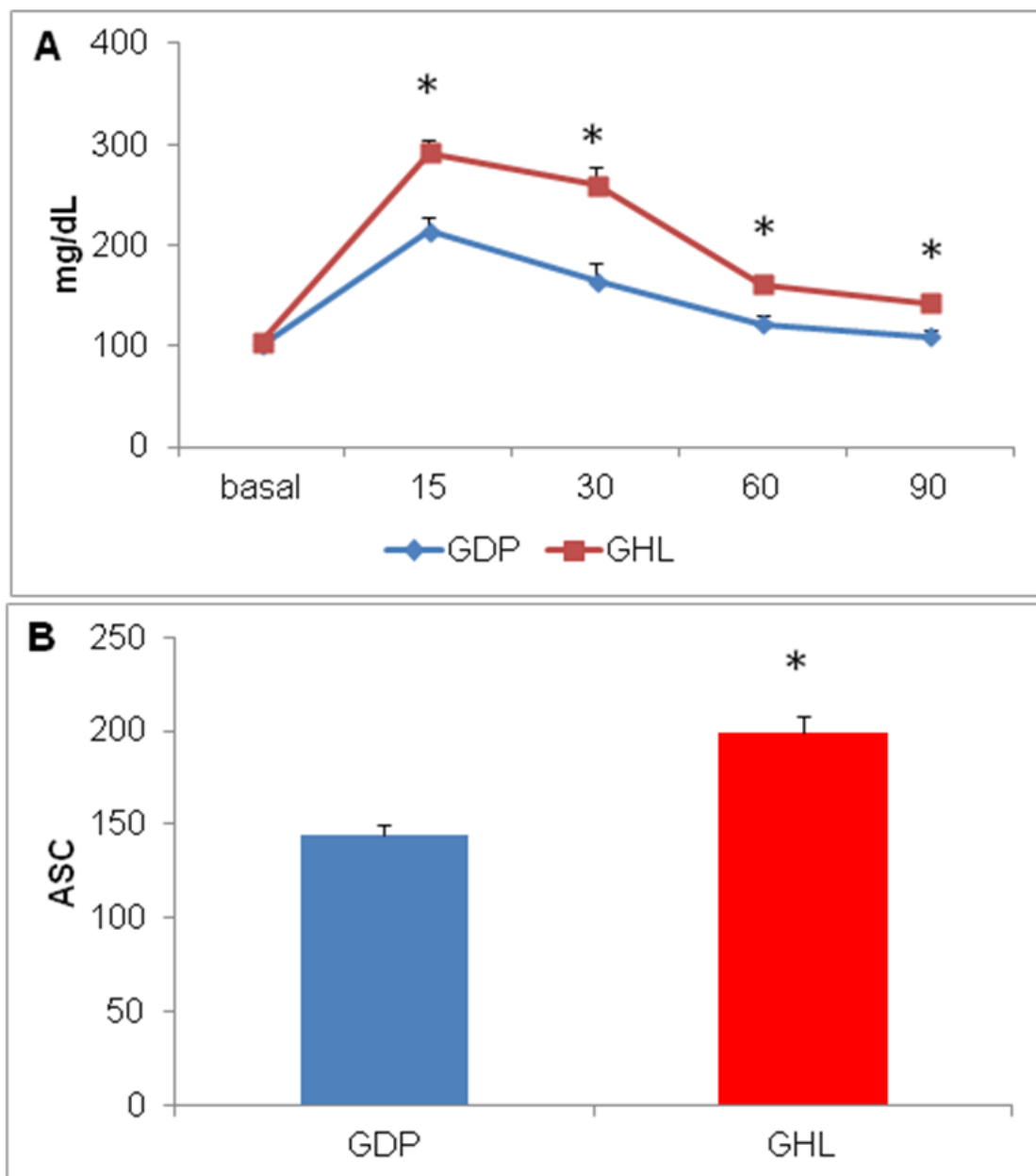
**Figura11:** Expressão proteica da ECA renal (130 kDa)

### **3.5 METABOLISMO DA GLICOSE**

#### **3.5.1 DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA BASAL E TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE**

Na figura 12A esta representada o comportamento da curva glicêmica durante o TTG. Obsevamos que os grupos GDP e GHL não apresentam diferença significativa com relação a glicemia basal. Após a injeção de glicose, observa-se umk aumento significativo da glicemia no grupo GHL, que permaneceu elevado ate o final do teste.

Na figura 12B os resultados mostram aumento significativo no calculo da área sob a curva no GHL, o que é associado com redução na velocidade d de captação sistêmica da glicose e portanto, sugerindo intolerância a glicose nestes animais.



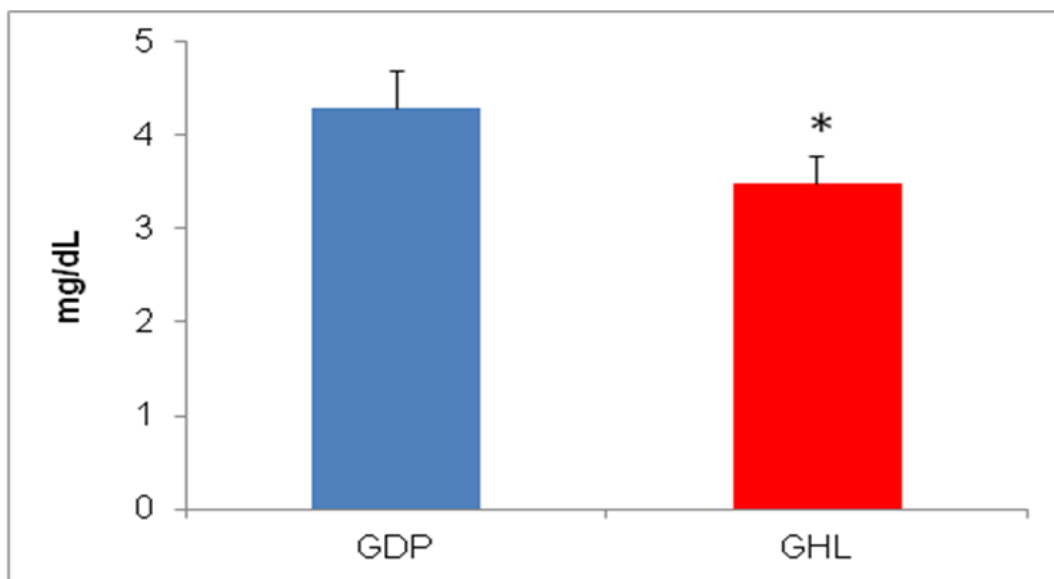
**Figura 12:** Teste de Tolerancia a Glicose. Em (A) a curva glicêmica e em (B) o resultado do calculo da area sobre a curva (ASC). Nos grupos GDP (dieta padrao, n=6) e GHL (dieta hiperlipidica, n=9).



### 3.5.2 TESTE DE TOLERÂNCIA A INSULINA

Na sétima semana do protocolo experimental, após um período de jejum de 4 horas, os animais foram submetidos ao teste de tolerância a insulina (TTI). Os valores de glicemia dos min 4 e 16 foram utilizados para calcular a constante de queda da glicose plasmática (Kitt, mg/dL) de acordo com a descrição de Bonora (1989), para estimar a sensibilidade a insulina.

No GHL a curva de decaimento da glicose foi significativamente ( $p < 0,028$ ) mais lenta que no GDP sugerindo uma resposta de resistência a insulina.

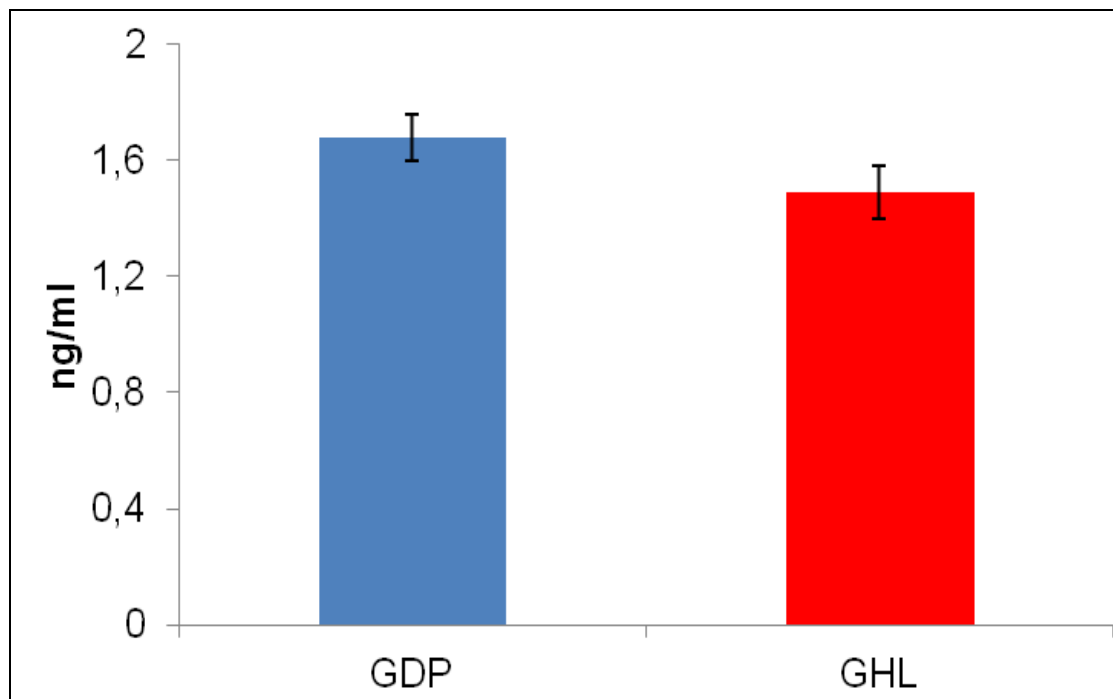


**Figura 13:** Teste de Tolerancia a Insulina. Média dos resultados obtidos após calculo do coeficiente de decaimento da glicose após infusao de insulina (Kitt), nos grupos GDP (dieta padrao, n=6) e GHL (dieta hiperlipidica, n=9).

### 3.5.3 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA INSULINA PLASMÁTICA

A insulina foi avaliada através de Kit comercial de radioimunoensaio, após coleta de sangue ao final do protocolo experimental na oitava semana.

Conforme os resultados apresentados na figura 14, não foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,274$ ) quanto a insulina sanguínea dos grupos estudados.



**Figura 14:** Dosagem (ng/ml) da Insulina plasmática nos grupos GDP (dieta padrão, n=6) e GHL (dieta hiperlipídica, n=15).

## **6. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES FINAIS**

O modelo experimental de ingestão de uma dieta rica em lipídios (30%), com composição exclusivamente de gordura saturada, foi desenvolvido em nosso laboratório e apresentado no primeiro projeto Mackpesquisa (2010). Neste primeiro projeto mostramos que a dieta levou a importantes alterações metabólicas, tais como hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e aumento da adiposidade corporal. Além destas alterações metabólicas, também descrevemos alterações anatômicas e funcionais renais e cardíacas, acompanhadas de aumento da pressão arterial média.

Em conjunto, estes resultados sugeriram os resultados associando dieta e alterações metabólicas, cardíacas e renais, parece um quadro clínico esperad em se tratando de um modelo de obesidade. Entretanto, o diferencial experimental de nosso estudo, foi mostrar que muitas alterações que acompanham a obesidade, principalmente se tratando de indivíduos jovens, podem levar a importantes transformações na fase adulta, aumentando a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças renais e cardiovasculares, muitas delas sem potencial de regressão.

### ***Avaliações Gerais:***

O peso corporal dos ratos ao final das 8 semanas de protocolo experimental não foi modificado pelo consumo das diferentes dietas, quando comparamos o GDP e o GHL. Entretanto o GHL apresenta aumento dos depósitos de gordura visceral (Mackpesquisa 2010). Sabe-se que, em roedores, o aumento de peso como marcador de obesidade é muito controversa. De qualquer forma, em humanos e animais sabe-se que o aumento da adiposidade *per se* é um importante fator de risco isolado para doenças metabólicas degenerativas e para aumento de risco para lesão de órgão alvo.

Embora as dietas que apresentam alto teor de gordura estejam associadas a hiperfagia (KIM et al., 1988), o consumo de ração dos ratos do grupo GHL foi significativamente menor que no GDP. Provavelmente esta redução no consumo de ração no GHL esteja associada ao maior teor calórico da ração hiperlipídica (381 Kcal/100g) em relação a ração padrão (257 Kcal/100g).

As dosagens glicêmicas realizadas mostraram que o GHL durante o TTG apresentou glicemia em jejum normal, mas com resposta glicêmica alterada/aumentada após a sobrecarga de glicose, quadro característico de intolerância a glicose. De forma similar, no GHL, o TTI, mostrou decaimento lento da glicose após a infusão de insulina, perfil de reposta associado a resistência a insulina. Por outro lado, a dosagem plasmática da insulina, mostrou-se similar entre o GHL e o GDP, não apresentando alteração da insulina plasmática em jejum.

A resposta do tempo de captação da glicose no TTI sugere que a problemática estaria relacionada a célula alvo, ou seja, modificação nas vias intracelulares em resposta da ligação da insulina com seu receptor. Mesmo que o GHL não apresente aumento do peso corporal, sabe-se que o padrão de distribuição da gordura corporal (adiposidade central ou visceral) é indicador clínicos importante para a presença de resistência à insulina.

Por outro lado, o comportamento da glicemia durante o TTG nos fez pensar em outras possibilidades. Randle (1994) mostrou que a exposição aguda à glicose e aos ácidos graxos livres (AGL) promove a secreção de insulina pelas células B pancreáticas. No entanto, exposição crônica a altas concentrações de AGL ou de glicose pode levar à inibição da secreção de insulina. Experimentos *in vitro* mostraram aumento da secreção de insulina quando as ilhotas foram expostas às altas concentrações de AGL por 3-4h, e diminuição quando expostos de 24-48h (73,74), sugerindo que o efeito de altas concentrações dos AGL sobre a secreção de insulina é tempo dependente.

O efeito dos ácidos graxos varia muito, elevando a secreção de insulina com o aumento do comprimento da cadeia e diminuindo com o grau de insaturação (STEIN et al., 1997), por exemplo, dietas ricas em ácidos graxos saturados (como a manteiga) reduzem a responsividade das ilhotas à glicose. A literatura fornece importantes evidências (HABER et al., 2001) da modulação da via de sinalização da insulina em células B pancreáticas pelos ácidos graxos, entretanto, as consequências da exposição das ilhotas pancreáticas aos ácidos graxos a curto e a longo prazo nas primeiras etapas da sinalização insulínica, são ainda desconhecidas.

Em conjunto, estes resultados sugerem que os animais com ingestão de uma dieta rica em lipídios, desde a infância, apresentam manutenção da glicemia basal mas, através dos testes TTG e TTI, foi possível detectar precocemente a presença de distúrbios nas etapas iniciais da sinalização de insulina, possivelmente encaminhando para um quadro de hiperinsulinemia e/ou diabetes tipo 2.

***O papel do SRA na função renal através da preparação de rim isolado, modelo de perfusão renal extracorpórea:***

No presente estudo, foi utilizado o sistema de perfusão renal fechado baseado nos estudos desenvolvidos por Bowman and Maack (1974); Ross (1978); Pegg (1971); Hamilton et al. (1974) e modificado por Fonteles et al (1983); Lima et al (1992).

Os experimentos com perfusão renal extracorpórea permitem uma abordagem experimental para estudar a função renal sem a interferência dos fatores neurais e endócrinos sistêmicos, permitindo trabalhar apenas com as características moduladoras do próprio rim, seus próprios fatores ativos intrarenais e de seus fatores de adaptação miogênicos.

Neste projeto foi a primeira vez que se utilizou o método de rim isolado para estudar a função renal em um modelo de obesidade após bloqueio dos receptores AT1 renais.

Durante o período basal de 30 minutos, observou-se que o GHL apresentou manutenção do fluxo urinário (FU), do ritmo de filtração glomerular (RFG) e do fluxo plasmático renal (FPR), com aumento da resistência vascular renal (RVR), quando comparado ao GDP.

A medida do ritmo de filtração glomerular (RFG) permite avaliação precisa da função renal, sendo o melhor marcador de função renal em indivíduos saudáveis ou doentes. No GHL observou-se manutenção do RFG apesar do aumento da RVR e do aumento da PP.

A infusão de losartan (LOS) no sistema de perfusão foi capaz de modificar significativamente quase todos os parâmetros funcionais renais avaliados, tanto no GDP quanto no GHL. De forma surpreendente, o RFG no GHL não foi modificado de forma significativa pelo LOS, quando comparado com o GDP, que apresentou uma redução de aproximadamente 45%.

A obesidade está associada a muitas alterações hormonais, como o aumento da atividade de diferentes componentes do SRA. Em nosso modelo experimental, a AngII parece contribuir no aumento da RVR, observado tanto pela redução da RVR após LOS como pelo aumento da ECA tecidual.

O sistema de perfusão renal extracorpórea possibilitou visualizar os efeitos da inibição da AngII, através do bloqueio do AT1, de produção local (CAREY & SIRAGY, 2003), ou seja, independente dos componentes sistêmicos (FERRARIO, 1990).

A AngII tem efeitos importantes nas artérias intrarenais, além de exercer profunda influencia sobre a hemodinâmica glomerular e as funções tubulares, sendo um fator importante na auto-regulação do fluxo plasmático renal e, conseqüentemente, do RFG, diante de variações de perfusão renal.

A AngII aumenta a RVR, o que levaria a diminuição do FPR o que levaria a redução do RFG. Entretanto, o aumento da PP observada no GHL pode ser um fator importante contrabalançando o efeito da redução do FPR.

Entretanto, o sistema de perfusão renal não esclarece como o LOS aumentou o FPR, reduziu a RVR e a PP, sem alterar o RFG. Quais ajustes intrarenais estão envolvidos nesta condição?

### ***O papel do SRA na resposta de pressão arterial e frequência cardíaca.***

Os resultados da pressão arterial obtida pelo método indireto sugeriu aumento progressivo da PAS durante as 8 semanas de ingestão de uma dieta hiperlipídica no GHL, que terminou com aumento significativo em 17% na PAM ao término do protocolo experimental de 8 semanas.

O sistema renina-angiotensina (SRA) tem sido considerado como um sistema humoral clássico, cujo produto final, a angiotensina (Ang) II formada na circulação, tem um papel fundamental na regulação da homeostase cardiovascular; atuando tanto sobre a regulação do volume sanguíneo como da resistência vascular (INAGAMI et al., 1994). Entretanto, em algumas circunstâncias metabólicas, como na obesidade, novas interações podem ser estabelecidas alterando a secreção do SRA com conseqüências danosas a manutenção da homeostasia corporal, como a hipertensão arterial.



Os mecanismos envolvidos na gênese da hipertensão na obesidade são vários e não totalmente elucidados (DAVY & HALL, 2004). No entanto, é ponto comum que os mecanismos pressóricos exacerbam-se com o aumento de peso (LANDSBERG et al., 1992; BROWN, et al., 2000; DAMJANOVIC & BARTON, 2008 ) e particularmente com a deposição visceral de gordura (KLOET et al., 2010).

O bloqueio farmacológico do SRA pela administração do antagonista específico de receptor AT-1 o Losartan, levou a redução da PAM no GDP (4mmHg) e de maior magnitude no GHL (10mmHg), sugerindo ativação e participação do SRA no aumento da PAM neste modelo.

Alguns autores tem proposto a participação mais ativa do tecido adiposo na gênese da hipertensão, pois este tecido é expressa e apresenta regulação independente de todos os componentes do SRA, estabelecendo-se, assim, um possível elo entre obesidade e hipertensão, talvez mais relacionada à obesidade visceral.

Engeli (1999) mostraram o aumento da expressão de RNA mensageiro do angiotensinogênio na gordura visceral, levando ao aumento da produção local de angiotensina II. Hall (2003) sugere que um fator importante que associa hipertensão, obesidade e ativação do SRA esta relacionado com aumento na retenção de sódio pelos rins. Entretanto, não observamos alteração na relação do sódio absorvido/excretado (Mackpesquisa 2010), bem como no RFG, nos ratos do grupo GHL, quando comparados ao GDP.

Entretanto, outros tecidos também contribuem para a hipertensão em obesos com aumentos locais da expressão de ECA nos vasos e rins,

especialmente naqueles com aumento na distribuição visceral (Barton et al., 2000).

Finalmente, o aumento da gordura visceral pode ser um fator de ativação de mecanismos neuro-hormonais, determinando aumento da susceptibilidade a acometimento de lesão de órgãos-alvo, com menor ou maior participação da hemodinâmica-pressórica.

Desta forma, esta abordagem experimental de utilizar Losartan em infusão sistêmica e no sistema de perfusão renal, sugere a participação do SRA nas alterações observadas de aumento da PAM e na função renal.

## **7. PERSPECTIVAS DO PROJETO:**

A partir do financiamento Mackpesquisa 2010-2012, outros experimentos estão sendo finalizados a fim de dar prosseguimento aos estudos em nosso modelo experimental. Abaixo estão listados alguns dos experimentos realizados:

- 1- Dosagem da leptina e da adiponectina séricas;
- 2- Histologia hepática, cardíaca e renal para marcação de glicogênio e conteúdo tecidual lipídico;
- 3- Estudo da expressão proteica da SGLT2, transportador de glicose de túbulo proximal renal;
- 4- Método ecocardiográfico transtorácico para avaliação da anatomia-funcional cardíaca;
- 5- Estudo da modulação autonômica cardíaca e vascular através de bloqueios farmacológicos e da análise espectral;
- 6- Avaliação in vivo da função renal em diferentes períodos experimentais (4-6-8 semanas);

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALABAN, G.; SILVA, G.A.P. Prevalência de sobrepeso em crianças e adolescentes de uma escola da rede privada de Recife. **J Pediatr**, 77:96-100, 2001.

BARTON M, CARMONA R, MORAWIETZ H, D'USCIO LV, GOETTSCHE W, HILLEN H, et al. Obesity is associated with tissue specific activation of renal angiotensin-converting enzyme in vivo: evidence for a regulatory role of endothelin. **Hypertension**;35:329-36, 2000.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal Biochem**, 72:248-54, 1976.

BOMBACK AS, KLEMMER PJ. Renal injury in extreme obesity: the important role of aldosterone. **Kidney Int**, 74:1216; author reply 1216–1217, 2008.

BONORA E, MOGHETTI P, ZANCANARO C, CIGOLINI M, QUERENA M, CACCIATORI V, CORGNATI A, MUGGEO M. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J Clin Endocrinol Metab**, 68(2):374-8, 1989.

BOWMAN RH. & MAACK T. Effect of albumin concentration and ADH on H<sub>2</sub>O and electrolyte in perfused rat kidney. **Am J Physiol**. 226(2): 426-430, 1974.

BROWN CD, HIGGINS M, DONATO KA, et al. Body mass index and the prevalence of hypertension and dyslipidemia. **Obes Res**. 8(9):605–619, 2000.

BURNS KD, Li N. Characterization of renin-angiotensin system enzyme activities in cultured mouse podocytes. **Am J Physiol Renal Physiol**, Mar;296(3):F666, 2009.

CAREY, R. M. & SIRAGY, H. M. The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy. **Trends Endocrinol Metab**, 14, 274-81, 2003.

COSTA, R.; CINTRA, I.P.; FISBERG, M. Prevalência de Sobrepeso e Obesidade em Escolares da Cidade de Santos, SP. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 50/1:60-67, 2006.

DAMJANOVIC, M.; BARTON, M. Fat intake and cardiovascular response. **Curr Hypertens Rep**, Feb;10(1):25-31, 2008.

DAVY KP, HALL JE. Obesity and hypertension: two epidemics or one? **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 286(5):R803-13, 2004.

DE ROSE JR., D.; RÉ, A.H.N. **Esporte e atividade física na infância e na adolescência: uma abordagem multidisciplinar**. 2ª ed. Ed. Artmed. Porto Alegre, 2009.

DUE, A.; LARSEN, T.M.; MU, H.; HERMANSEN, K.; STENDER, S.; ASTRUP, A. Comparison of 3 ad libitum diets for weight-loss maintenance, risk of cardiovascular disease, and diabetes: a 6-mo randomized, controlled trial. **Am J Clin Nutr**, Nov;88(5):1232-41; Denmark, 2008.

DEJI, N.; KUME, S.; ARAKI, S.; SOUMURA, M.; SUGIMOTO, T.; ISSHIKI, K.; CHIN-KANASAKI, M.; SAKAGUCHI, M.; KOYA, D.; HANEDA, M.; KASHIWAGI, A.; UZU, T. Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet induced obese mice. **Am J Physiol Renal Physiol**, Jan; 296(1):F118-26, 2009.

DZAU, V.J.; INGELFINGER, J.R.; PRATT, R.E. Regulation of tissue renin and angiotensin gene expressions. **J Cardiovasc Pharmacol**, 8 Suppl 10:S11-6, 1986.

ENGELI S, GORZELNIAK K, KREUTZ R, RUNKEL N, DISTLER A, SHARMA AM. Co-expression of renin-angiotensin system genes in human adipose tissue. **J Hypertens**,17(4):555-60, 1999.

FERRARIO, C.M. Importance of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAS) in the physiology and pathology of hypertension. An overview. **Drugs**, 39 Suppl 2:1-8, 1990.

FONTELES MC, COHEN JJ, BLACK AJ, WERTHEIM SJ. Support of kidney function by long-chain fatty acids derived from renal tissue. **Am. J. Physiol.**, 244: F235-246, 1983.

GRIENGLING, KK, LASSEGUE B, ALEXANDER RW. The vascular angiotensin (AT1) receptor. **Thromb. Haemost**, 70:188-192, 1993.

HABER, EP; CURI, R, CARVALHO, CRO, CARPINELLI, AR. Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 45:219-227, 2001.

HALL JE. The kidney, hypertension, and obesity. **Hypertension**. 41(3 Pt 2):625-33. 2003.

HOFFMANN, S., PODLICH, D., HAHNEL, B., KRIZ, W., GRETZ, N.: Angiotensin II type 1 receptor overexpression in podocytes induces glomerulosclerosis in transgenic rats. **J Am Soc Nephrol**,15:1475–1487, 2004.

HUNLEY TE, MA LJ, KON V. Scope and mechanisms of obesity-related renal disease. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, May;19(3):227-34, 2010.

INAGAMI, T., GUO, D. F. & KITAMI, Y. Molecular biology of angiotensin II receptors: an overview. **J Hypertens Suppl**, 12, S83-94, 1994.

JIANG, T.; WANG, Z.; PROCTOR, G.; MOSKOWITZ, S.; LIEBMAN, S.E.; ROGERS, T.; LUCIA, M.S.; LI, J.; LEVI, M.: Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway. **J Biol Chem**, 280:32317-32325, 2005.

KENNEFICK TM, ANDERSON S. Role of angiotensin II in diabetic nephropathy. **Semin Nephrol**, Sep;17(5):441-7, 1997.

KIM EM, WELCH CC, GRACE MK, BILLINGTON CJ, LEVINE AS. Effects of palatability-induced hyperphagia and food restriction on mRNA levels of neuropeptide Y in the arcuate nucleus. **Brain Res**, 806(1):117-21, 1998.

KLOET AD, KRAUSE EG, WOODS SC. The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. **Physiol Behav**. Jul 14;100(5):525-34, 2010.

KRIKKEN, J.A.; BAKKER, S.J.L. and NAVIS, G.J. Editorial Comment: Role of renal haemodynamics in the renal risks of overweight. **Nephrol Dial Transplant**, Jun;24(6):1708-1711, 2009.

LANDSBERG L. Hyperinsulinemia: possible role in obesity induced hypertension. **Hypertension**,19(suppl 1):l61-6, 1992.

LEEHEY DJ, SINGH AK, BAST JP, SETHUPATHI P, SINGH R. Glomerular renin angiotensin system in streptozotocin diabetic and Zucker diabetic fatty rats. **Transl Res**, Apr;151(4):208-16, 2008.

LIMA AA, MONTEIRO HS, FONTELES MC. The effects of Escherichia coli heat-stable enterotoxin in renal sodium tubular transport. *Pharmacol Toxicol*. 70(3):163-7, 1992.

MENARD, J. Anthology of the renin-angiotensin system: a one hundred reference approach to angiotensin II antagonists. **J. Hypertens. Suppl**, 11:S3-11, 1993.

MILLER, P.L., RENNKE, H.G., MEYER, T.W.: Glomerular hypertrophy accelerates hypertensive glomerular injury in rats. **Am J Physiol**, 261:F459–F465, 1991.

NAVAR, L.G. The kidney in blood pressure regulation and development of hypertension. **Med Clin North Am**, 81:1165–1198, 1997.

NAVAR, L.G., HARRISON-BERNARD, L.M., WANG, C.T., CERVENKA, L., MITCHELL, K.D. Concentrations and actions of intraluminal angiotensin II. **J Am Soc Nephrol**, 10 Suppl 11:S189–S195, 1999.

NAVAR, L.G.; HARRISON-BERNARD, L.M.; IMIG, J.D.; CERVENKA, L.; MITCHELL, K.D. Renal responses to AT1 receptor blockade. **Am J Hypertens**, 13:45S–54S, 2000.

NAVAR, L.G.; KOBORI, H.; PRIETO-CARRASQUERO, M.C. Intrarenal angiotensin II and hypertension. **Curr Hypertens Rep**, 5:135–143, 2003.

NAVAR, L.G.; NISHIYAMA, A. Why are angiotensin concentrations so high in the kidney. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, 13:107–115, 2004.

NAVAR, L.G. The role of the kidneys in hypertension. **J Clin Hypertens**, 7:542–549; Greenwich, 2005.

PAUL, M.; MEHR, A.P.; KREUTZ, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiol Rev**, 86:747–803, 2006.

RANDLE PJ. Mechanism modifying glucose oxidation in diabetes mellitus. **Diabetologia**. 37:S155-S161, 1994.

ROSS BD. The isolated perfused rat. **Kidney.Clin Sci Mol Med**.55:13-21, 1978.

SIRIWARDHANA N, KALUPAHANA NS, FLETCHER S, et al. n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids differentially regulate adipose angiotensinogen and other inflammatory adipokines in part via NF- $\kappa$ B-dependent mechanisms. **J Nutr Biochem**., 2012, [Epub ahead of print].

SOUZA LEÃO, S.C.; ARAÚJO, L.M.B.; MORAES, L.T.L.P.; ASSIS, A.M. Prevalência de obesidade em escolares de Salvador, Bahia. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 47/2:151-7, 2003.

SPEISER, P.W.; RUDOLF, M.C.; ANHALT, H.; CAMACHO-HUBNER, C.; CHIARELLI, F.; ELIAKIM, A. Childhood obesity. **J Clin Endocrinol Metab**, 90(3):1871-87, 2005.

STEIN DT, STEVENSON BE, CHESTER MW, BASIT M, DANIELS MB, TURLEY SD, et al. The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. **J Clin Invest**, 100:398-403, 1997.

US RDS: USRDS 2009 Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States. In: National Institutes of Health NIDDK. Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases 2009.

VON KUGELGEN I, KRUMME B, SCHAIBLE U, SCHOLLMAYER PJ, RUMP LC. Vasoconstrictor responses to the P2x-purinoceptor agonist beta, gamma-methylene-L-ATP in human cutaneous and renal blood vessels. **Br J Pharmacol**., Sep;116(2):1932-6, 1995.

XU, Z.G.; LANTING, L.; VAZIRI, N.D.; et al. Upregulation of angiotensin II type 1 receptor, inflammatory mediators, and enzymes of arachidonate metabolism in obese Zucker rat kidney: reversal by angiotensin II type 1 receptor blockade. **Circulation**, 111:1962-1969, 2005.