



Olavo de Carvalho Freitas

**Avaliação do Bloqueio Duplo do Sistema
Renina-Angiotensina e Remodelações
Cardíaca e Renal, em Ratos
Espontaneamente Hipertensos, Obesos e
não Obesos**

**Tese apresentada à Faculdade
de Medicina de São José do Rio
Preto para obtenção do Título de
Doutor no Curso de Pós-
Graduação em Ciências da
Saúde. Eixo Temático: Medicina
Interna.**

Orientador: Prof. Dr. José Paulo Cipullo

**São José do Rio Preto
2008**

Freitas, Olavo de Carvalho

**Avaliação do Bloqueio Duplo do Sistema Renina-Angiotensina e Remodelações Cardíaca e Renal, em Ratos Espontaneamente Hipertensos, Obesos e não Obesos/Olavo de Carvalho Freitas
São José do Rio Preto, 2008
89 p.**

**Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP
Eixo Temático: Medicina Interna**

Orientador: Prof. Dr. José Paulo Cipullo

**1. Renina-Angiotensina; 2. Hipertensão; 3. Obesidade; 4. Proteinúria;
5. Colágeno.**

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

OLAVO DE CARVALHO FREITAS

**AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO DUPLO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA
E REMODELAÇÕES CARDÍACA E RENAL EM RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS, OBESOS E NÃO OBESOS**

16 DE ABRIL DE 2008

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. JOSÉ PAULO CIPULLO (ORIENTADOR - FAMERP)

Prof. Dr. JOSÉ FRANCHINI RAMIRES (INCOR – USP)

Prof. Dr. DOMINGO MARCOLINO BRAILE (FAMERP)

Prof. Dr. ANTONIO CARLOS PALANDRI CHAGAS (INCOR – USP)

Prof. Dr. JOSÉ CARLOS AIDAR AYOUB (FAMERP)

SUMÁRIO:

Página

Agradecimentos	I
Epígrafe.....	III
Lista de Figuras.....	IV
Lista de Tabelas	IX
Lista de Abreviaturas.....	X
Resumo	XIII
Abstract	XV
Introdução.....	1
Objetivos.....	15
Material e Métodos.....	16
Resultados.....	26
Discussão	56
Conclusões.....	67

Referências bibliográficas	69
---	-----------

AGRADECIMENTOS:

- *Ao Professor Doutor José Paulo Cipullo da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, a quem conheço há mais de 30 anos. Aprendi a admirá-lo, ainda mais, quando juntos trabalhamos no Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Medicina de Catanduva, no final da década de 80 e inícios da década de 90. Pela sua competência e dedicação ao ensino e à pesquisa que desenvolve a frente do Departamento de Medicina Interna dessa Faculdade e pela grandiosa contribuição para que se pudesse integralizar, com êxito, a presente investigação científica.*

- *Ao Professor Doutor Reinaldo Azoubel, Coordenador do Eixo Temático de Medicina Interna do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. O professor Azoubel foi com quem primeiro trabalhei, então no Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP. Dessa cooperação resultou o primeiro trabalho e a primeira apresentação em congresso a nível nacional (Congresso da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência em 1965). Meu primeiro orientador em pesquisa e o grande incentivador da carreira de docência. Na pós-graduação sempre se mostrou preocupado com o sucesso do trabalho e contribuiu, com sua competência e experiência ímpares, para a forma final.*

HOMENAGENS ESPECIAIS

- *Aos médicos Eduardo Marques da Silva e Henrique Luiz Carrascossi, acadêmicos na época da elaboração do trabalho, que nos estimularam no avanço da pesquisa e montaram toda a infraestrutura necessária ao projeto.*
- *Biólogo José Ricardo de Sousa, pelas cuidadosas preparações dos materiais e dedicadas atenções aos animais.*
- *Sr. Camilo de Lelis Franco, técnico em informática, sem o qual seriam impossíveis as montagens gráficas e a impressão final do trabalho.*
- *Sras. Márcia Polimeno Caneglian, biomédica e Monise Gomes Fernandes, bioquímica, do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina de Catanduva, graças às quais pode-se realizar, com precisão, as dosagens bioquímicas.*
- *Sra. Tereza Cristina Tessina, biomédica do Instituto Rio Preto de Medicina Nuclear de São José do Rio Preto, que no plano piloto do trabalho, realizou com enorme dedicação e competência, exames de radioimunoensaio.*
- *Sr. Mairto Roberis Geromel, técnico em anatomia patológica da Faculdade de Medicina de Catanduva, que procedeu ao meticuloso preparo das peças, sempre atencioso e prestativo.*
- *Sras. Cristiane Stuchi Maria, Marisa Centurion Stuchi e Solange Dotti Rossi, bibliotecárias da Faculdade de Medicina de Catanduva, incansáveis nos levantamentos bibliográficos, sem as quais não se poderia terminar toda a ampla revisão.*

***“Não basta saber, é preferível saber aplicar.
Não é bastante querer, é preciso saber querer”
(Johann Goethe, filósofo alemão (1749-1832))***

LISTA DE FIGURAS:

	Página
Figura 1: Cronograma do estudo	17
Figura 2: Organograma dos grupos e subgrupos	17
Figura 3: Visão geral do sistema não invasivo “tail cuff” da Power Lab NIBP System, para aferição da pressão arterial.....	19
Figura 4: Rato em gaiola de contenção para aferição da pressão arterial.....	19
Figura 5: Valor da pressão arterial (sistólica) em rato espontaneamente hipertenso (SHR), pelo sistema não invasivo.	20
Figura 6: Rato em gaiola metabólica para dosagem da proteinúria.....	20
Figura 7: Seqüência da determinação da fração do colágeno, pela análise do “Image J”, em coração de rato espontaneamente hipertenso e obeso (SHR O), após bloqueio duplo (B) do sistema renina angiotensina (SRA).....	22
Figura 8: Seqüência da determinação da fração do colágeno, pela análise do “Image J”, em rim de rato obeso (O)	23
Figura 9: Seqüência da determinação da fração do colágeno, pela análise do “Image J”, em	

	rim de rato espontaneamente hipertenso e obeso (SHR O)	24
Figura 10:	Pesos dos animais normais (N), obesos (O), espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O) no início do estudo (I) e ao final de 4 semanas (F).....	28
Figura 11:	Pressão arterial (sistólica) em ratos normais (N), obesos (O), espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas	33
Figura 12:	Pressão arterial (sistólica) em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas	34
Figura 13:	Pressão arterial (sistólica) em ratos normais (N), obesos (O) e obesos e bloqueados (O B), após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas.....	35
Figura 14:	Índice peso coração/peso corporal em ratos normais (N), obesos (O), espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O) no início do estudo (I) e após	

	bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas.	38
Figura 15:	Índice peso coração/peso corporal em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas.	39
Figura 16:	Índice peso rim/peso corporal em ratos normais (N), obesos (O), espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas.	42
Figura 17:	Índice peso rim/peso corporal em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas	43
Figura 18:	Quantidade de colágeno cardíaco em ratos normais (N), obesos (O), espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-	

	angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas.....	45
Figura 19:	Quantidade de colágeno cardíaco em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas	46
Figura 20:	Quantidade de colágeno renal em ratos normais (N), obesos (O), espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas.....	48
Figura 21:	Quantidade de colágeno renal em ratos normais (N), obesos (O) e obesos e bloqueados (O B) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas	49
Figura 22:	Quantidade de colágeno renal em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas	50
Figura 23:	Proteinúria em ratos normais (N), obesos (O), espontaneamente	

LISTA DE TABELAS:

	Página
Tabela 1: Peso inicial	27
Tabela 2: Peso final	30
Tabela 3: Pressão arterial sistólica	32
Tabela 4: Índice peso coração/peso corporal	37
Tabela 5: Índice peso rim/peso corporal	41
Tabela 6: Proteinúria	52

	hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas	53
Figura 24:	Proteinúria em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas	54
Figura 25:	Proteinúria em ratos normais (N), obesos (O) e obesos e bloqueados (O B) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas	55

LISTA DE ABREVIATURAS (por ordem de aparecimento no texto)

Ang: angiotensina

SRA: sistema renina-angiotensina

RNAm: ácido ribonucléico mensageiro

ICAM-1: molécula-1 de adesão intercelular

VCAM-1: molécula-1 de adesão vascular celular

MCP-1: proteína-1 quimioatrativa do monócito

MMPs: metaloproteinases

bFGF: fator de crescimento básico do fibroblasto

PDGF: fator de crescimento derivado das plaquetas

VEGF: fator de crescimento vascular endotelial

TGF- β : fator de crescimento transformador beta

CTGF: fator de crescimento do tecido conjuntivo

NF- κ B: fator nuclear de transcrição kapa B

L-Name: éster de metil-nitro-L-arginina

NO: óxido nítrico

SHR: rato espontaneamente hipertenso

ECA: enzima conversora da angiotensina

NECP: “National Cholesterol Education Program”

ATP: “Adult Treatment Panel

NHANES: “National Healthy and Nutrition Examination Survey”

EGIR: “European Group for the Study of Insulin Resistance”

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

CALM: “Candesartan and Lisinopril Microalbuminuria”

VALIANT: “Valsartan in Acute Myocardial Infarction Trial”

CHARM: “Candesartan in Heart Failure-Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity”

O: rato obeso

SHR O: rato espontaneamente hipertenso e obeso

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

PA: pressão arterial

P: probabilidade

IC: intervalo de confiança

N: rato normal

O B: rato obeso e bloqueado

DP: desvio padrão

NS: não significativo

SHR B: rato espontaneamente hipertenso bloqueado

SHR O B: rato espontaneamente hipertenso e obeso, bloqueado

N I: peso inicial de rato normal

N F: peso final de rato normal

O I: peso inicial de rato obeso

O F: peso final de rato obeso

SHR I: peso inicial de rato espontaneamente hipertenso

SHR F: peso final de rato espontaneamente hipertenso

SHR O I: peso inicial de rato espontaneamente hipertenso e obeso

SHR O F: peso final de rato espontaneamente hipertenso e obeso

I: início

F: fim

B: bloqueio

ELITE: “Evaluation of Losartan in the Elderly”

“OPTIMAAL”: “the Optimal Trial in Myocardial Infarction with the Angiotensin II Antagonist Losartan”

LIFE: “Losartan Intervention for End Point Reduction in Hypertension”

RESUMO

Introdução: A ativação do sistema renina-angiotensina tem sido relacionada, cada vez mais, como importante interação com a obesidade, porque o acúmulo do tecido adiposo visceral é um risco maior para o desenvolvimento da hipertensão. A obesidade está associada com várias anormalidades, tais como, a retenção de sódio, a hiperfiltração renal, a hipertrofia ventricular esquerda e a microalbuminúria.

Objetivo: Avaliar o remodelamento do coração e rins, após duplo bloqueio farmacológico do sistema renina-angiotensina, em ratos espontaneamente hipertensos e em normotensos e espontaneamente hipertensos, induzidos à obesidade na vida adulta.

Material e Método: Ratos Wistar espontaneamente hipertensos em número de 40 foram subdivididos em 4 grupos de 10 animais, a saber: 10 ratos foram tratados com bloqueio farmacológico duplo do sistema renina-angiotensina e receberam enalapril e losartan por 4 semanas; 10 ratos não foram bloqueados; 10 ratos foram tornados obesos na vida adulta por meio de dieta hipercalórica e não foram bloqueados e 10 ratos hipertensos e obesos-induzidos, foram bloqueados. Os ratos normais (controles), normotensos, em número de 40, foram subdivididos em 4 grupos de 10 animais, a saber: 10 ratos normais; 10 normais e bloqueados; 10 induzidos à obesidade, sem bloqueio e 10 obesos-induzidos e bloqueados. A pressão arterial, os pesos de coração e rins (em relação ao peso corporal), os níveis de colágeno desses órgãos e a proteinúria foram avaliados em todos os animais.

Resultados: Aumento do peso do coração e dos rins em relação ao peso corporal, aumento dos níveis de colágeno nesses órgãos e da proteinúria, foram encontrados nos ratos hipertensos e nos hipertensos e obesos. O bloqueio farmacológico duplo do sistema renina-angiotensina trouxe reduções significativas (IC 95 %) do peso do coração (em relação ao peso corporal) nos ratos hipertensos e obesos, do colágeno renal e da proteinúria nos animais hipertensos e hipertensos e obesos. Os ratos normotensos e obesos apresentaram aumento do colágeno renal e da proteinúria. Tais alterações foram significativamente reduzidas (IC 95 %) com o bloqueio do sistema renina-angiotensina.

Conclusões: O duplo bloqueio farmacológico do sistema renina-angiotensina traz benefícios à remodelação, particularmente dos rins, com redução da proteinúria nos ratos hipertensos, nos hipertensos obesos-induzidos e nos normotensos e obesos.

ABSTRACT

Introduction: The renin-angiotensin system activation has been regarded as more and more important, namely interaction with obesity, by accumulation of visceral adipose tissue, a major risk for hypertension development. Obesity is associated with several abnormalities, such as sodium retention, renal hyperfiltration, left ventricular hypertrophy and microalbuminuria.

Objective: To evaluate kidney and heart remodeling, following pharmacological double blockade of the renin-angiotensin system, in spontaneously hypertensive rats, and in normotensive and spontaneously hypertensive obese-induced adult rats.

Material and Method: Forty spontaneously hypertensive Wistar rats were subdivided into 4 groups of 10, as follows: 10 animals were treated with pharmacological double blockade of the renin-angiotensin system, and received enalapril and losartan for 4 weeks; 10 non-blocked; 10 rats rendered obese in adult life by means of a hypercaloric diet without block, and 10 hypertensive obese-induced, blocked animals. Forty normotensive rats (controls) were subdivided into 4 groups of 10 animals, as follows: 10 normal rats; 10 normal and blocked; 10 obese-induced without block and 10 obese-induced, blocked. Blood pressure, heart and kidney weights (relatively to body weight), heart and kidney collagen levels, and proteinuria, were evaluated in all animals.

Results: Increased heart and kidney weight/body weight and tissue collagen and proteinuria levels were found in hypertensive and obese-

hypertensive rats. Pharmacological double blockade of the renin-angiotensin system brought significant reduction (CI 95 %) in heart weight/body weight in obese-hypertensive rats, and reduction of renal collagen levels and proteinuria in hypertensive and obese-hypertensive rats. The normotensive obese rats increased renal collagen levels and proteinuria. Such changes were significantly reduced (CI 95 %) by means of renin-angiotensin system blocked.

Conclusions: Pharmacological double blockade of the renin-angiotensin system brings benefits, particularly, to kidney remodeling, with reduction of the proteinuria in hypertensive, hypertensive-obese and normotensive-obese rats.

I - INTRODUÇÃO

Em 1898, Tigerstedt e Bergman⁽¹⁾, trabalhando no Instituto Karolinska de Estocolmo (Suécia), descobriram a presença de um composto pressor no tecido renal de coelho que, por sua origem, foi chamado de renina. Em St Petersburg mostrou-se que essa substância vasoativa induzia a contração dos vasos por ação direta, produzindo hipertensão⁽²⁾ e poderia explicar a hipertrofia cardíaca resultante.⁽³⁾ O primeiro modelo experimental de hipertensão arterial bem sucedido, porém, realizou-se somente em 1934, por Goldblatt e colaboradores⁽⁴⁾, passo inicial para a posterior descoberta de um polipetídeo ativo. Induziu-se hipertensão experimental ao se fazer constrição parcial da artéria renal do cão com um clipe de prata que desenvolvia isquemia renal. Dois grupos de pesquisadores, trabalhando independentemente, um na Universidade de Buenos Aires, e o outro nos Laboratórios da Eli Lilly Research, em Indianápolis, sob a orientação do Dr. Irvine H. Page, chegaram às mesmas conclusões. O grupo norte americano descobriu o efeito pressor de uma substância que denominou de angiotonina e o grupo sul americano de hipertensina.⁽³⁾ Kohlstaedt e colaboradores⁽³⁾ demonstraram que a renina não era um vasoconstritor, exceto na presença de uma outra proteína presente no sangue por eles identificada como “ativador da renina” porque, na sua ausência, a renina não era ativada. Em 1939, o grupo argentino descobriu que a renina poderia atuar como uma enzima semelhante à papaína (uma protease), agindo sobre uma proteína existente no plasma para liberar a hipertensina, produto

final da reação enzimática.⁽³⁾ Experimentos seguintes demonstraram que a renina era secretada pelos rins e a hipertensina formada no plasma⁽³⁾, a partir de um substrato protéico, que recebeu o nome de hipertensinogênio. Verificou-se que a hipertensina poderia ser inativada no sangue e nos rins pela ação de outras enzimas, que receberam o nome de hipertensinases.⁽³⁾ A origem hepática do substrato da renina foi sugerida por Page e colaboradores em 1941⁽³⁾, mas os experimentos conclusivos só foram apresentados por Leloir e colaboradores no ano seguinte.⁽³⁾ Page e colaboradores haviam proposto a existência de um componente sangüíneo necessário para a ação vasoativa da renina.⁽³⁾ O composto protéico do plasma recebeu o nome de “ativador da renina”. O produto final, uma substância pressora, formada pela interação da renina com seu ativador, recebeu o nome de angiotonina⁽³⁾, provavelmente, o efector da ação pressórica da renina. Page e colaboradores⁽³⁾ logo alteraram o nome para “substrato de renina”. A síntese do octapeptídeo foi realizada, simultaneamente, pelo grupo do Page em 1957 e pelo Dr. Schwyzer na Basileia, Suíça⁽³⁾, que batizaram o octapeptídeo com o nome de hipertensina⁴. Em 1958, os Drs. Braun-Menéndez e Page concordaram em utilizar uma nomenclatura única para os componentes do sistema.⁽⁵⁾ Assim, a hipertensina passou a ser chamada de angiotensina (Ang). O substrato de renina, de angiotensinogênio, e as enzimas metabolizadoras do peptídeo, de angiotensinases. A Ang I era o decapeptídeo (angiotensina 1-10) e a Ang II, o octapeptídeo (angiotensina 1-8).⁽³⁾

Nos últimos 50 anos importantes descobertas foram feitas no sistema renina-angiotensina (SRA). Análises de RNAm (ácido ribonucléico mensageiro), em vários tecidos, mostraram que o RNAm para a renina estava presente em vasos sanguíneos, miocárdio, adrenais, cérebro e órgãos do sistema reprodutor, além dos rins.^(6,7) Essas descobertas demonstraram as múltiplas atuações do SRA, tais como, autócrina, parácrina e endócrina. Outros peptídeos angiotensinérgicos foram acrescentados ao sistema: a Ang III ou Ang 2-8⁽⁸⁾, a Ang IV ou Ang 3-8^(9,10) e a Ang 1-7.^(8,11,12)

Todos os componentes do SRA foram encontrados no cérebro, no coração, nos vasos, no tecido adiposo, nas gônadas, no pâncreas, na placenta, nos rins, entre outros órgãos.⁽¹³⁾ Em alguns tecidos, apenas alguns componentes do sistema foram descobertos, especulando-se, assim, a existência de vias alternativas para a produção da Ang II.⁽¹³⁾

O papel do SRA intrarenal mostrou-se importante e verificou-se que os níveis de Ang II, no fluido tubular de camundongos hipertensos, não dependiam apenas da Ang II filtrada da circulação.^(13,14) Os efeitos diretos no transporte do sódio no néfron proximal e os indiretos no néfron distal, regulando a síntese de canais de sódio para a aldosterona, dependiam da Ang II ligada a receptores AT₁.⁽¹⁵⁾ Outros trabalhos mostraram que as fontes extra-hepáticas do angiotensinogênio pouco contribuíam para seu nível plasmático.⁽¹⁶⁾

Verificou-se, além disso, que o SRA estaria envolvido no processo inflamatório das paredes vasculares e demonstrou-se a presença dos

receptores AT₁ nas células musculares lisas dos vasos⁽¹⁷⁾, deduzindo-se que a inflamação seria mediada pela estimulação desses receptores, induzida pela Ang II.⁽¹⁸⁻²⁰⁾

Evidências sugeriram que os receptores AT₁ e AT₂ poderiam produzir efeitos antagônicos, mas os dados permanecem controversos. Lévy BI⁽²¹⁾ discutiu a necessidade de maior conhecimento dos receptores AT₂, pois quando se bloqueiam os AT₁, e os AT₂ passam a ser superestimulados, o efeito não seria tão benéfico. Possivelmente o bloqueio AT₁, com a conseqüente estimulação dos AT₂, a longo prazo, poderiam exercer atividade hipertrófica e antiangiogênica nos tecidos cardiovasculares.

A Ang II é ativador dos monócitos circulantes, regulando sua aderência, junto com os neutrófilos, às células endoteliais das artérias.^(22,23) Neste processo, a molécula-1 de adesão intercelular (ICAM-1) e a molécula-1 de adesão celular vascular (VCAM-1), membros das superfamílias das imunoglobulinas, seriam estimuladas pela Ang II.⁽¹⁷⁾ Essas moléculas de adesão, junto com a MCP-1 (proteína-1 quimoatrativa do monócito), sendo pró-inflamatórias, exerceriam papel crítico na iniciação e na progressão da aterosclerose.⁽²⁴⁻²⁶⁾ A Ang II ativa as metaloproteinases (MMPs), enzimas da matriz que ao permitirem a neovascularização⁽²⁷⁾, iniciam o processo aterosclerótico.

Demonstrou-se que a infusão da Ang II em ratos também promovia a proliferação das células musculares lisas da artéria renal.⁽²⁸⁾ Esse crescimento é mediado por fatores de crescimento autócrinos e

parácrinos, como o fator de crescimento básico do fibroblasto (bFGF), o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de crescimento transformador β (TGF- β).⁽²⁹⁻³³⁾ Mostrou-se que a Ang II estimulava o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF).⁽³⁴⁾

Evidências indicam que a Ang II induz a proliferação celular, a hipertrofia e a fibrose, através de mecanismos dependentes da pressão arterial, mas também por outros mecanismos.⁽¹⁷⁾

Demonstrou-se, in vitro, a ativação do fator NF- κ B (fator nuclear de transcrição kapa B) em resposta à Ang II em vários tipos celulares, como em células musculares vasculares lisas, endoteliais, glomerulares, tubulares e mononucleares.^(35,36) In vivo, a expressão e a atividade aumentadas do NF- κ B, foram documentadas na vasculatura periférica, no coração e nos rins de ratos transgênicos.⁽³⁶⁾

Hisada e colaboradores⁽³⁷⁾ demonstraram que a Ang II estava envolvida na patogênese da nefrite experimental por complexo-imune, através da ativação do NF- κ B e de moléculas de adesão. Ambos os receptores AT₁ e AT₂ ativam a via da NF- κ B, mas há muitas dúvidas sobre os reais mecanismos envolvidos.^(38,39) Existem evidências de que, infiltrados de células imuno competentes, estariam presentes nos rins, especialmente nos interstícios, produzindo lesões renais em várias patologias que causam proteinúria.⁽⁴⁰⁾ Como a Ang II tem propriedades atrativas para células mononucleares, a ativação intrarenal do SRA poderia contribuir para aumentar o infiltrado intersticial.⁽⁴¹⁾ Trabalhos com

ratos, tornados hipertensos pela administração crônica do ester de metil-nitro-L-arginina (L-NAME) que suprime o óxido nítrico (NO), produziram hipertensão com aumento inflamatório intersticial.⁽⁴²⁾ Nesse modelo de hipertensão, verificou-se acúmulo intersticial de células produtoras de Ang II, principalmente linfócitos, além do estresse oxidativo.^(40,42,43) Isto sugere que células imunes produzem Ang II em locais de lesão renal e podem ter importante papel na hipertensão sensível ao sal.⁽⁴¹⁾ Outros trabalhos indicaram a contribuição dos infiltrados intersticiais na produção da Ang II em diferentes modelos de hipertensão.^(44,45) Da mesma maneira, células imunocompetentes recrutadas para dentro do interstício inflamado, pela síntese da Ang II e de várias citocinas, poderiam aumentar ainda mais a inflamação intersticial.⁽⁴¹⁾

Em ratos espontaneamente hipertensos (SRH) demonstrou-se que a ECA (enzima conversora da angiotensina) e a Ang II vascular estavam elevadas, independente da alteração da ECA no plasma ou em outros tecidos;⁽⁴⁶⁾ isto veio demonstrar a importância da conversão local da Ang I para a Ang II.

No modelo experimental de hipertensão em ratos com dois rins e um clip, modelo de hipertensão dependente do SRA, verificou-se que na fase aguda, a hipertensão é devida à produção maior de renina e de Ang II, mas a ECA vascular está baixa.⁽⁴⁷⁾ Entretanto, na fase crônica da hipertensão, a atividade da renina se normaliza, mas a responsividade aos inibidores da ECA mantém-se pela elevada atividade da ECA vascular.⁽⁴⁶⁾

Nos últimos anos, outro aspecto da participação do SRA passou a ser muito discutido, representando um fator de agravo para o sistema cardiovascular que foi a obesidade. O acúmulo do tecido adiposo visceral passou a ser considerado um risco maior para o desenvolvimento da hipertensão.⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾

A obesidade abdominal é o principal fator de risco para a resistência à insulina e o desenvolvimento do diabetes tipo 2.⁽⁵¹⁾ Cerca de 300.000 mortes por anos nos Estados Unidos são atribuídas ao sobrepeso e à obesidade.⁽⁵²⁾ Demonstrou-se que a obesidade abdominal estava associada a várias anormalidades como a retenção do sódio, o aumento do débito cardíaco, a hiperfiltração renal, a disfunção endotelial, a hipertrofia do ventrículo esquerdo, a microalbuminúria e marcadores de inflamação aumentados.^(53,54)

A hipertensão arterial em obesos, complicada pela dislipidemia, a hiperinsulinemia e a intolerância à glicose, compõem a chamada síndrome metabólica.⁽⁵⁵⁾ Nos últimos anos, os pesquisadores têm focalizado a atenção para a síndrome metabólica e sua relação com a doença cardiovascular. Em 1990, Ferrannini e colaboradores e Reaven, em 1988, já haviam sugerido que a causa desta síndrome fosse a resistência à insulina. Por isto, Ferrannini e colaboradores utilizaram o termo “síndrome de resistência à insulina”, enquanto Reaven chamou-a de “síndrome X”.⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾ O “National Cholesterol Education Program” (NCEP) e o “Adult Treatment Panel” III (ATP III) usaram o termo síndrome metabólica para descrevê-la, em 2001.⁽⁵⁷⁾ Naquele ano identificaram a

síndrome como alvo secundário (após a redução do LDL colesterol) para a redução do risco de doença coronária.⁽⁵⁹⁾

Usando dados do National Health and Nutrition Examination Survey III (NHANES III) estima-se que 25 % da população adulta americana preenche os critérios para a síndrome metabólica.⁽⁶⁰⁻⁻⁶²⁾ Esta porcentagem se eleva para 44%, se somente os americanos maiores de 50 anos forem considerados.⁽⁵⁷⁾ Aproximadamente 25 % dos indivíduos adultos nos países ocidentais sofrem da síndrome. No recente estudo europeu EGIR (European Group for the Study of Insulin Resistance),⁽⁶³⁾ a prevalência da resistência à insulina, que é uma causa subjacente e um achado característico da síndrome, foi de aproximadamente 16 % na população Caucasiana da Europa.

Há evidências da ativação do sistema nervoso simpático no desenvolvimento da hipertensão relacionada com a obesidade.⁽⁵⁰⁾ Estudos experimentais e humanos mostraram que o excesso de peso está associado ao aumento da atividade simpática, com conseqüente retenção de sódio.^(64,65) Esta reabsorção tubular aumentada de sódio, associada à vasoconstrição, poderia explicar a hipertensão arterial dependente da atividade simpática em obesos.⁽⁵²⁾ Estudos em animais de experimentação demonstraram a elevada atividade simpática renal associada à obesidade.⁽⁶⁶⁾

A ativação simpática ligada à obesidade está associada, pelo menos parcialmente, à leptina.^(67,68) A leptina, hormônio descoberto em

1994, tem sua maior secreção pelo adipócito do tecido adiposo visceral.^(69,70)

Em ratos Sprague-Dawley, níveis elevados de leptina aumentaram o “turnover” da norepinefrina e, portanto, a atividade simpática para o tecido adiposo marrom.⁽⁵⁰⁾ A leptina, ao estimular a atividade do sistema nervoso simpático, faz com que este promova a reabsorção de sódio tubular.⁽⁷¹⁾ Além de sua ação sobre o metabolismo e o apetite, a leptina também atua no hipotálamo aumentando a pressão arterial através da ativação do sistema nervoso simpático.⁽⁵²⁾ Os níveis de leptina declinam rapidamente com a restrição calórica e a perda de peso.⁽⁷²⁾ Este declínio está associado com respostas adaptativas à inanição, tais como o apetite aumentado e o gasto energético diminuído. Estas mesmas respostas são observadas em camundongos com deficiência de leptina e no homem, apesar da maciça obesidade.⁽⁷²⁾

No ser humano, a leptina se eleva proporcionalmente ao grau de adiposidade.⁽⁷³⁾ Nos obesos, verificou-se hiperleptinemia (um estado de resistência à leptina). Demonstrou-se que o aumento desta adipocina está associado ao aumento da frequência cardíaca, da hiperinsulinemia, da atividade da renina plasmática, dos níveis de aldosterona e do angiotensinogênio circulante.⁽⁷⁴⁻⁷⁷⁾ Altos níveis circulantes de leptina foram observados em obesos humanos e poderiam explicar seu tonus simpático renal aumentado.⁽⁷⁸⁾

Segundo Unger⁽⁷⁹⁾, o papel principal da leptina seria proteger o acúmulo de lípidos em vários tecidos, como coração, fígado e músculo

esquelético. A perda da ação da leptina associada à obesidade e a conseqüente hiperleptinemia, poderia causar lipotoxicidade de tecidos não adiposos com conseqüências cardiovasculares adversas.⁽⁵²⁾

Além disso, na hipertensão associada à obesidade, a Ang II parece ativar neurônios centrais, sugerindo um provável sinergismo entre a Ang II e a atividade simpática.⁽⁸⁰⁾ O tecido adiposo também é importante produtor de angiotensinogênio.⁽⁵⁰⁾ A renina, a Ang I e II, os receptores para a Ang II, tipos AT₁ e AT₂, a enzima conversora da angiotensina e outras proteases, como a quimase, as catepsinas D e G e a tonina, são também produzidos no tecido adiposo.⁽⁸¹⁾

Em camundongos, o angiotensinogênio produzido nos adipócitos, além de atuar localmente, afetando o crescimento e a diferenciação dos adipócitos, pode também ganhar a circulação contribuindo para o angiotensinogênio circulante.⁽⁵²⁾

O angiotensinogênio, a atividade da renina e da enzima conversora plasmáticas e a expressão do angiotensinogênio tecidual, correlacionam-se positivamente, com a adiposidade em humanos.⁽⁸¹⁾ O angiotensinogênio e a Ang II foram induzidos durante a adipogênese.⁽⁸¹⁾ Essa alteração foi acompanhada por elevações paralelas da pressão arterial. A inibição do SRA, por bloqueio da enzima conversora, ou por antagonismo do receptor AT₁, produziu redução do peso e melhorou a sensibilidade à insulina em roedores.⁽⁸¹⁾

Camundongos com amplificação transgênica de glicocorticóides devido à superexpressão da 11 β -hidroxiesteróide dehydrogenase tipo 1

no tecido adiposo, desenvolveram hipertensão associada com a ativação do SRA, verificando-se aumentos plasmáticos do angiotensinogênio, da Ang II e da aldosterona.⁽⁷²⁾ Ou seja, a Ang II poderia ter importância no controle da síntese e estoque dos lipídeos nos adipócitos e, por conseguinte, na adiposidade.⁽⁵⁰⁾ Por outro lado, a ativação do SRA está relacionada ao desenvolvimento de hipertensão em modelos experimentais de obesidade visceral.⁽⁵²⁾

Elevados níveis circulantes de ácidos graxos em obesos parecem ter importância na ativação do sistema nervoso simpático. Desta forma, a lipólise visceral aumentada, com liberação de ácidos graxos em nível portal, poderia explicar a forte associação entre a obesidade visceral, o aumento da atividade simpática e a elevação da pressão arterial.⁽⁸²⁾

A aldosterona também pode elevar a pressão arterial na obesidade, pela ação de receptores mineralocorticóides localizados em diferentes tecidos, como os rins, os vasos e o cérebro.⁽⁵²⁾

A atividade da renina, o receptor AT₁ e os genes da ECA estão estimulados no tecido adiposo de hipertensos obesos.⁽⁸³⁾ Todos os componentes do SRA são encontrados nos adipócitos.⁽⁸⁴⁾ Verificou-se, também, correlação positiva entre a citocina TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) sintetizada pelos adipócitos⁽⁷¹⁾ e a resistência à insulina.⁽⁷²⁾

Demonstrou-se que pacientes obesos têm aumento do fluxo plasmático renal e da taxa de filtração glomerular, mas com a evolução da obesidade passa a haver decréscimo da taxa de filtração, com aumento

na excreção da albumina renal.⁽⁵⁰⁾ Supõe-se que tais alterações possam ser secundárias à ativação do SRA intrarenal em obesos.⁽⁸⁵⁻⁸⁸⁾

Sugeriu-se que a ativação da Ang II intrarenal poderia contribuir para o desenvolvimento da nefropatia em vários modelos de experimentação animal.⁽⁸⁹⁾ Em ratos SHR e obesos e em outros modelos experimentais, verificou-se microalbuminúria, hipertensão, expansão da matriz mesangial nos rins, precedendo a glomerulosclerose focal.^(50,89) Demonstrou-se a presença de receptores para a leptina nas células tubulares renais.⁽⁹⁰⁾ Estes receptores modulam efeitos como o aumento da diurese e da natriurese, na ausência de alterações da pressão arterial ou da excreção do potássio.⁽⁹¹⁾ Nos SHR, parece existir uma resistência tubular à ação da leptina, desaparecendo assim, seu efeito natriurético.⁽⁹²⁾ No glomérulo, a leptina estimulou a proliferação endocapilar e a deposição do colágeno no mesângio.⁽⁹³⁾ A leptina aumentou a expressão do colágeno IV e a produção do tipo I, este nas células mesangiais de ratos.⁽⁹⁴⁾

Enfim, a leptina poderia influenciar a pressão arterial por vários mecanismos como a ativação do sistema nervoso simpático e do eixo pituitário-adrenal; o balanço hidro-eletrolítico; a modulação da função endotelial e a influência sobre a remodelação vascular.⁽⁷¹⁾

Nos obesos existem afirmações de que o excesso de tecido adiposo ao penetrar nos seios medulares dos rins, produziria compressão, aumentando as pressões intrarenais.⁽⁶⁶⁾ Esta pressão aumentada no interstício elevaria a matriz extracelular, possivelmente

contribuindo para a reabsorção de sódio e a expansão da volemia na obesidade.⁽⁵⁰⁾

Assim, fica muito claro, que o SRA tem importante e crucial participação em várias alterações metabólicas do organismo, como a ativação de processos inflamatórios em vários tecidos (vasos, rins, coração, tecido adiposo); nos processos imunológicos; na resistência à insulina; na ativação do sistema nervoso central e do simpático periférico. Essas modificações nos vários sistemas envolvidos contribuem para o desenvolvimento de várias doenças, como a hipertensão, o diabetes tipo 2, as dislipidemias e as nefropatias. Nos últimos anos, a obesidade e a síndrome metabólica passaram a constituir um problema epidêmico mundial e sua principal complicação, as doenças cardiovasculares, têm sido responsáveis pela mortalidade de 2/3 da população nos países desenvolvidos.

O duplo bloqueio sobre o SRA tem sido objeto de análise em vários trabalhos. O estudo “CALM I” (“Candesartan and Lisinopril Microalbuminuria”)⁽⁹⁵⁾ usou bloqueio do receptor AT₁ com candesartan e da ECA com lisinopril, em pacientes hipertensos e diabéticos com microalbuminúria. Em um braço do estudo “VALIANT” (“Valiant in Acute Myocardial Infarction Trial”)⁽⁹⁶⁾, o bloqueador AT₁ foi o valsartan e o da enzima conversora, o captopril, em pacientes com infarto agudo complicado. No estudo “COOPERATE”⁽⁹⁷⁾, o bloqueio do receptor AT₁ foi realizado com o losartan e o da enzima conversora com o trandolapril, em pacientes com nefropatia não diabética. Um braço do estudo “CHARM”

“Candesartan in Heart Failure-Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity”⁽⁹⁸⁾ utilizou o candesartan como bloqueador AT₁ e enalapril, lisinopril, captopril ou ramipril, como inibidores da enzima conversora, em pacientes com insuficiência cardíaca. O estudo (“CALM” II)⁽⁹⁹⁾ analisou pacientes hipertensos e diabéticos, tipos 1 e 2, com terapia combinada de lisinopril e candesartan. Agarwal R⁽¹⁰⁰⁾ acompanhou nefropatas com proteinúria moderada e avançada insuficiência renal crônica com duplo bloqueio (AT₁ com losartan e ECA com lisinopril). Wolf G e Ritz E⁽¹⁰¹⁾, em revisão recente, consideram o bloqueio combinado como mais potente na redução da proteinúria em nefropatas crônicos de diversas etiologias, inclusive na diabética, em relação à monoterapia. Segundo os autores, essa melhora da função renal não dependeria apenas da queda na pressão arterial que se segue ao bloqueio combinado.

Frente aos benefícios promissores demonstrados pelo bloqueio farmacológico duplo do SRA escolhe-se esse modelo no presente estudo.

Procurando-se avaliar o efeito do duplo bloqueio do SRA e sua repercussão em tecidos-alvo como coração e rins, utilizam-se ratos Wistar SHR e normotensos, não obesos ou tornados obesos, quando adultos.

É a simulação do que o mundo assiste hoje nos seres humanos com obesidade crescente, atrelada à hipertensão arterial sistêmica, na morbidade que é a síndrome metabólica.

Ia – OBJETIVO GERAL:

- **Avaliar o comportamento do duplo bloqueio farmacológico do sistema renina-angiotensina (SRA) em ratos normotensos e obesos (O), espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O).**

Ib – OBJETIVO ESPECÍFICO:

- **Avaliar remodelações e alterações estruturais em coração e rins e a proteinúria, após duplo bloqueio farmacológico do sistema renina-angiotensina (SRA), nesses animais.**

II - MATERIAL E MÉTODOS

Desenho do estudo

Joram utilizados 80 ratos machos da raça Wistar de 90 a 100 dias de idade, pesando entre 270 e 318 g, sendo 40 ratos normais e 40 SHR, estes provenientes da linhagem “Okamoto-Aoki”.⁽¹⁰²⁾ Todos os animais (hipertensos e normais), procederam do biotério da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) e nunca antes foram utilizados para fins experimentais. Permaneceram acondicionados em gaiolas individuais, sendo respeitado o biociclo de 12 horas de luz, com alimentação e água fornecidas *ad libitum*. O estudo seguiu as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA)⁽¹⁰³⁾ e o “NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”⁽¹⁰⁴⁾ e só foi iniciado após a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina de Catanduva, sob registro nº 18/04.

Os animais, após 7 dias de adaptação ao ambiente do laboratório (Figura 1), foram divididos em dois grupos de 40 ratos: grupo controle (animais normais) e grupo SHR. Cada um destes grupos foi subdividido em subgrupos “não-bloqueados” e “bloqueados” (Figura 2). Os subgrupos “não bloqueados” e “bloqueados” compunham-se de 40 animais cada. Os animais deste último subgrupo foram assim chamados, porque sofreram duplo bloqueio farmacológico do SRA. A ECA foi inibida com enalapril (20 mg/kg/dia) e os receptores AT₁ com losartan (30

mg/kg/dia), administrados simultaneamente e por via oral, durante 4 semanas.⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾ (figura 1).

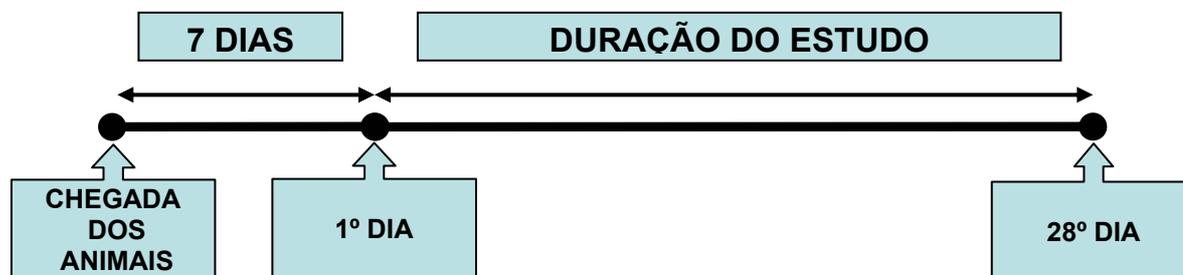


Figura 1: Cronograma do estudo.

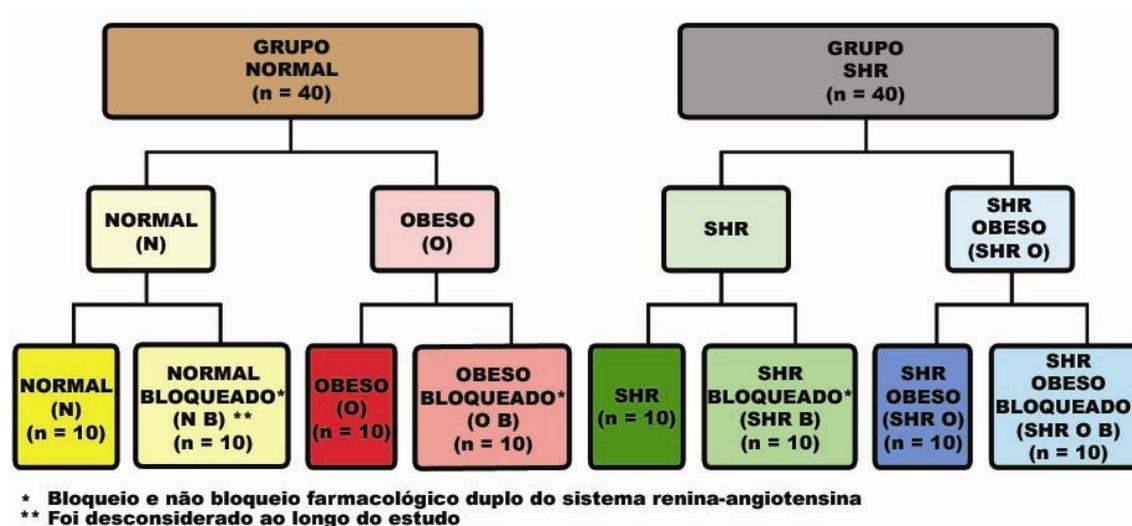


Figura 2: Organograma dos grupos e subgrupos.

Nos subgrupos não obesos, num total de 40 animais, foi administrada a ração Purina Rodent Chow No. 5001[®], *ad libitum*. Os demais 40 animais dos subgrupos obesos receberam uma alimentação especial, modificada de Levin⁽¹⁰⁸⁾ e Archer⁽¹⁰⁹⁾, para indução de obesidade,

contendo 4,5 kcal/g e composta de 31% gorduras, 48% de carboidratos e 21% de proteínas.

Pressão arterial (PA)

A PA foi aferida de maneira não invasiva pelo sistema “tail-cuff” da Power Lab NIBP System (figuras 3 e 4). Os animais, sem qualquer tipo de sedação, foram colocados em gaiolas adequadas aos seus tamanhos, com aquecimento da cauda por cerca de 5 minutos para melhor visualização da oscilação pressórica. O valor da PA correspondeu à pressão arterial sistólica (figura 5). Todos os animais (grupos normal e SHR) tiveram suas PAs aferidas (médias de 4 a 5 medidas) no 1º. dia do protocolo (figura 1).

Proteinúria

A urina de 24h foi coletada por meio de gaiola metabólica (figura 6) e a proteinúria dosada por espectrofotometria com ácido sulfosalicílico a 3%.⁽¹¹⁰⁾



Figura 3: Visão geral do sistema não invasivo “tail-cuff” da Power Lab NIBP System, para aferição da pressão arterial.

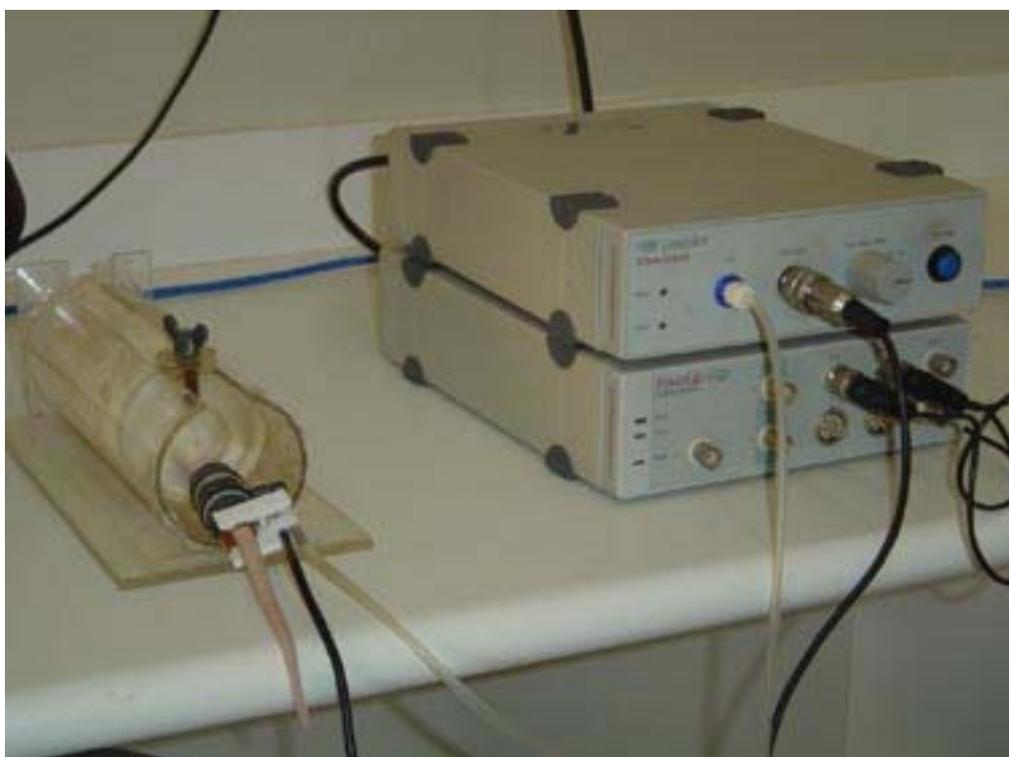


Figura 4: Rato em gaiola de contenção para aferição da pressão arterial.

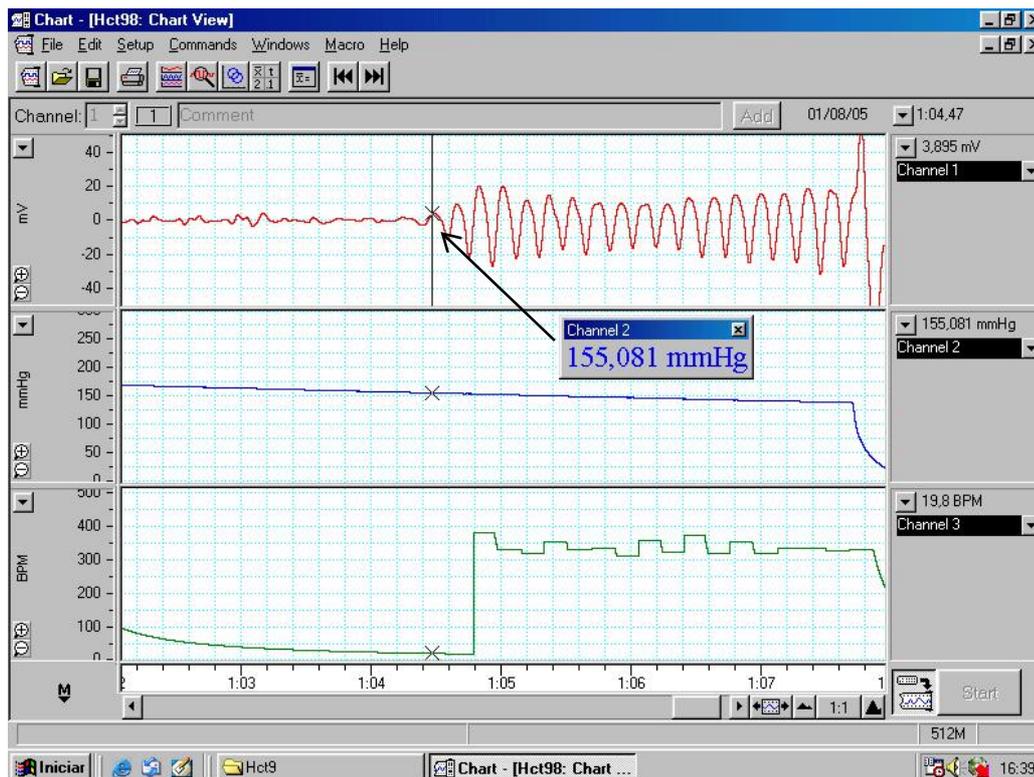


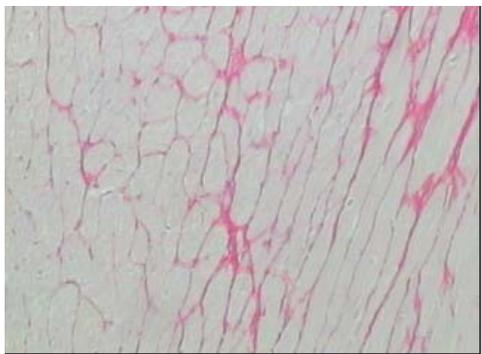
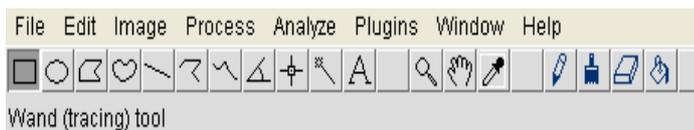
Figura 5: Valor da pressão arterial (sistólica) em rato espontaneamente hipertenso (SHR), pelo sistema não invasivo.



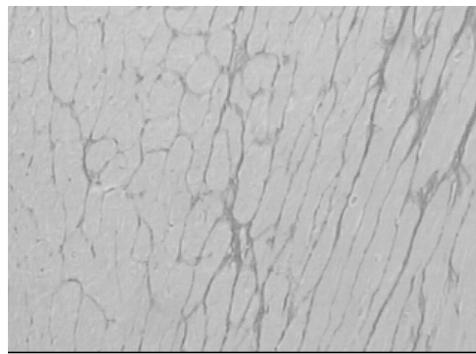
Figura 6: Rato em gaiola metabólica para dosagem da proteinúria.

Morfometria

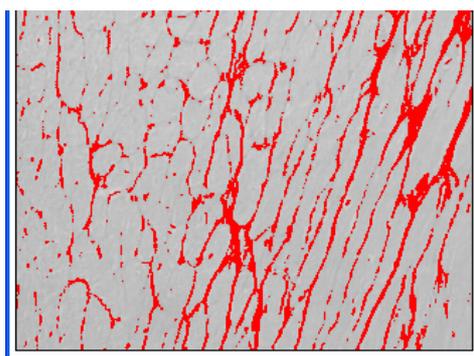
Depois de transcorridas quatro semanas, todos os animais foram anestesiados com 30 mg/kg de pentobarbital via intraperitoneal e seu coração e o rim direito foram extirpados e pesados. Os pesos do coração e rins foram normatizados pelo índice “peso do órgão/peso do animal”.⁽¹¹¹⁾ Coração e rins foram fixados em solução de Bouin, processados de acordo com técnicas histológicas convencionais e o colágeno corado por picrossirius. As frações do colágeno cardíaco e do renal foram determinadas por porcentagem da área colorida, que foi marcada pelo programa de computação, em campo de 100 aumentos, em relação à área total. Essa análise foi feita com o “NIH software” (“Image J” 1.36b[®])⁽¹¹²⁾, (figuras 7, 8 e 9). Campos contendo vasos, artefatos, cicatrizes ou tecido incompleto puderam ser descartados ou “apagados” pelo programa. Foram analisados 5 campos no coração (2 septais e 3 no ventrículo esquerdo, sendo 2 endocárdicos e 1 epicárdico). Nos rins, foram analisados 3 campos, 1 abrangendo a região medular e 2 a cortical. Tanto para o coração, como para os rins, foram considerados os valores médios de 3 a 4 lâminas para cada campo.



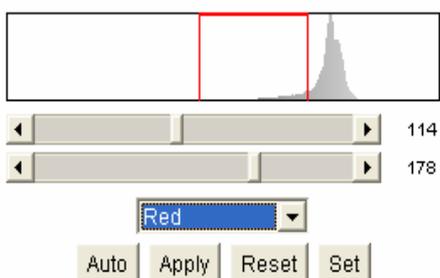
a) Corte histológico do miocárdio de rato SHR obeso, após bloqueio duplo do SRA. Coloração por picrosirius. Aumento de 400x.



b) Ajuste para 8 bit 75K pelo "Image J".



c) Lâmina pronta para a leitura.

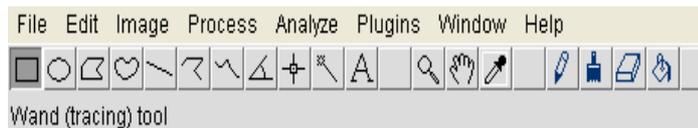


d) Aplicado o "threshold".

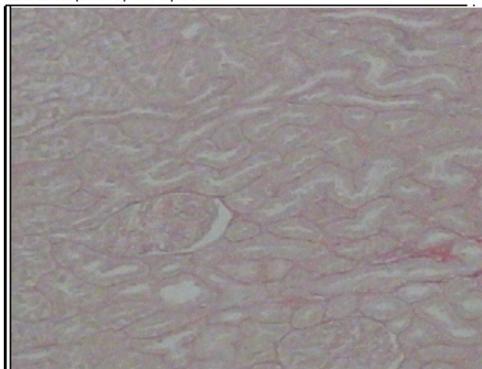
	Area	Mean	Min	Max
1	76800	188.824	114	218

e) Valor da área da lâmina e do colágeno (%).

Figura 7: Seqüência da determinação da fração do colágeno, pela análise do "Image J", em coração de rato espontaneamente hipertensivo e obeso (SHR O), após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA).

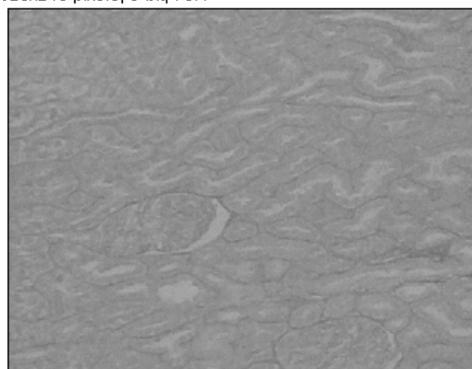


320x240 pixels; RGB; 300K



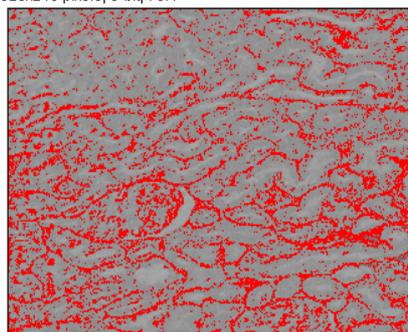
a) Corte histológico de rim de rato obeso. Coloração por picrosirius. Aumento de 400x.

320x240 pixels; 8-bit; 75K



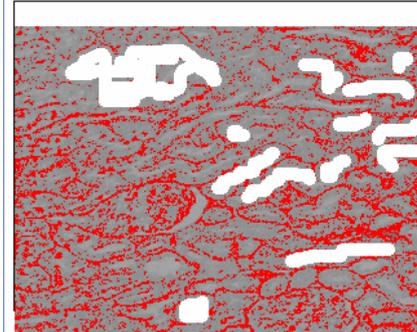
b) Ajuste para 8 bit 75K pelo "Image J".

COBI-80L008.JPG
320x240 pixels; 8-bit; 75K

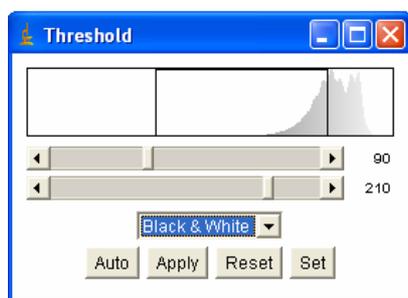


c) Lâmina pronta para a leitura.

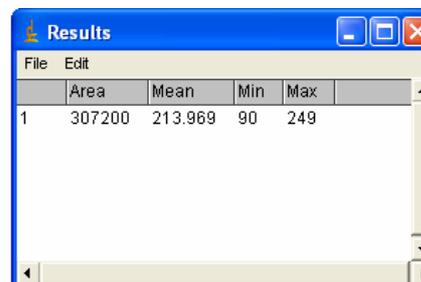
COBI-80L008.JPG
320x240 pixels; 8-bit; 75K



d) "Apagando" os artefatos ou imagens "não colágenas" pelo programa.

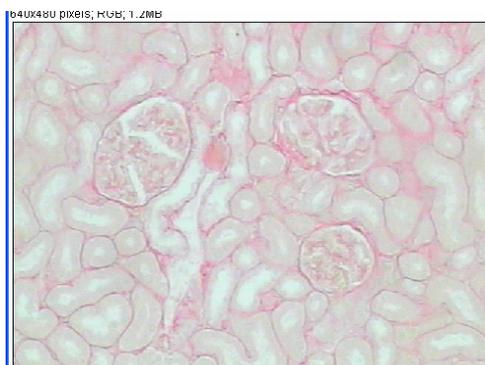
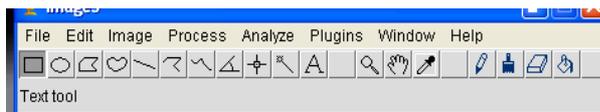


e) Aplicado o "threshold".

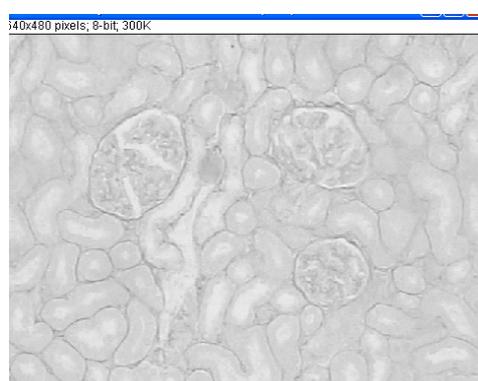


f) Valor da área da lâmina e do colágeno (%).

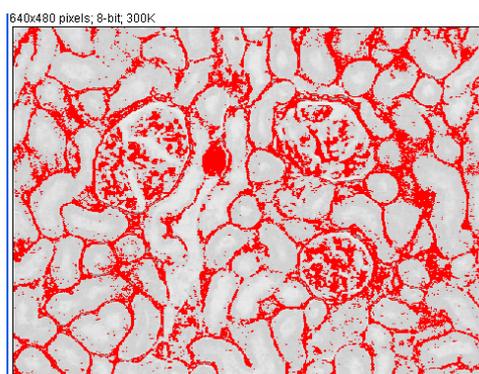
Figura 8: Seqüência da determinação da fração do colágeno, pela análise do "Image J", em rim de rato obeso (O).



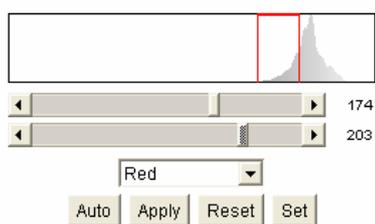
a) Corte histológico de rim de rato SHR obeso. Coloração por picrosirius. Aumento de 400x.



b) Ajuste para 8 bit 75K pelo "Image J".



c) Lâmina pronta para a leitura.



d) Aplicando o "threshold".

File	Edit	Area	Mean	Min	Max
1		307200	209.334	124	250

e) Valor da área da lâmina e do colágeno (%).

Figura 9: Seqüência da determinação da fração do colágeno, pela análise do "Image J", em rim de rato espontaneamente hipertenso e obeso (SHR O).

Análise estatística

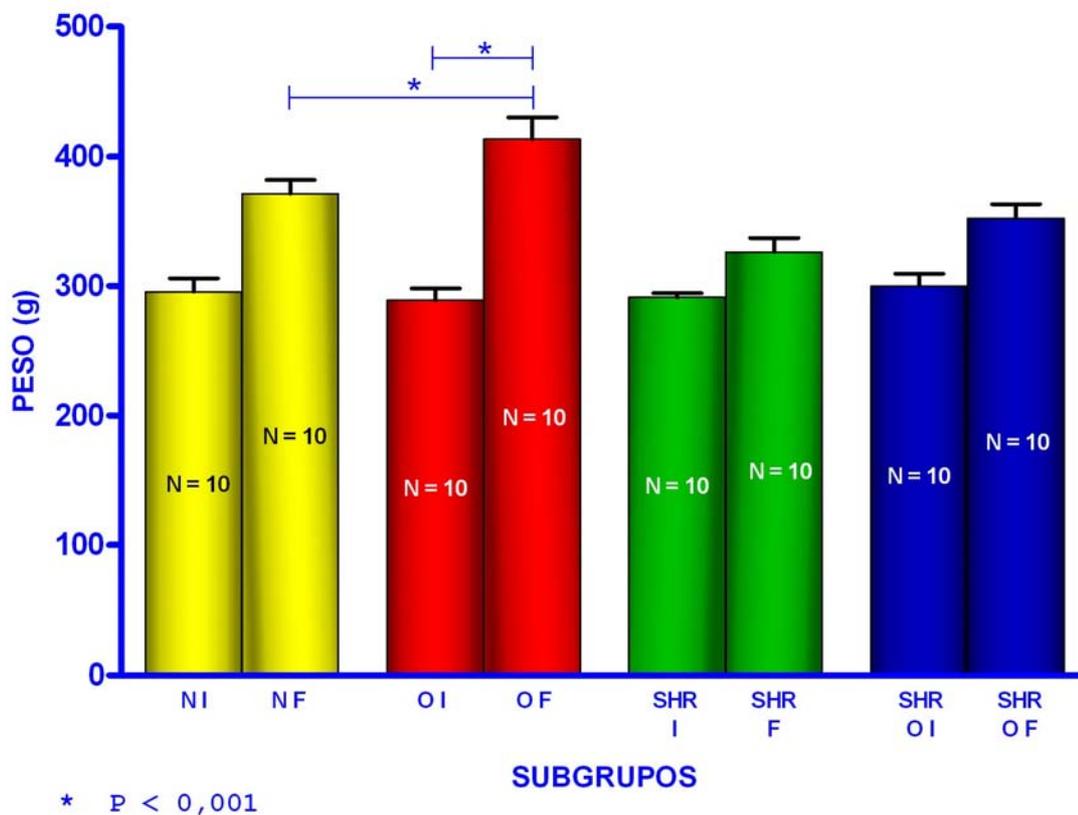
Foram realizadas comparações utilizando-se como significância estatística a probabilidade $P \leq 0,05$ para um intervalo de confiança (IC) de 95% no peso corporal, na pressão arterial, nas dimensões renais e cardíacas, nas alterações histopatológicas (colágeno) em coração e rim e na dosagem da proteinúria, entre todos os subgrupos. Foi utilizada a tabela “Anova” com teste de comparação múltipla “Newman-Keuls”.

O sistema de computação do “windows XP[®]”, com planilha excel e o “software GraphPad Prism 4[®]”, serviram de base para os cálculos.

I - RESULTADOS

N o início do estudo, o peso corporal médio do grupo de ratos normais (N) (utilizados como subgrupo controle) e dos subgrupos para serem induzidos à obesidade, bloqueados ou não (O e O B), foi: média +/- DP = 291,5 +/- 15,42 g, sem diferença estatística (NS) entre eles (tabela 1 e figura 10). O peso médio dos subgrupos SHR para ser bloqueado (SHR B) e SHR para ser induzido à obesidade (SHR O) e depois bloqueado (SHR O B), foi: média +/- DP = 294,6 +/- 5,74, também sem diferença estatística significativa entre eles (tabela 1 e figura 10).

TABELA 1								
PESO INICIAL (g)								
SUBGRUPOS								
		Normal (N)	Obeso (O)	Obeso e bloqueado (O B)	SHR	SHR bloqueado (SHR B)	SHR obeso (SHR O)	SHR obeso e bloqueado (SHR O B)
RATOS	1	297	279	278	292	296	316	291
	2	275	275	270	291	293	308	296
	3	318	280	272	287	291	286	295
	4	289	282	275	283	295	308	293
	5	299	294	318	300	293	283	292
	6	318	280	318	297	295	275	295
	7	299	299	294	292	296	299	296
	8	295	295	311	291	291	299	292
	9	284	287	288	288	292	315	294
	10	283	318	276	290	298	307	293
	MÉDIA	295,70	288,90	290,00	291,10	294,00	299,60	293,70
	DP	14,10	12,97	19,20	4,82	2,36	14,02	1,77
		286,96	280,86	278,10	288,11	292,54	290,91	292,60
	IC 95%	a	a	a	a	a	a	a
		304,44	296,94	301,90	294,09	295,46	308,29	294,80



LEGENDA:

- NI: ratos normais - peso inicial
- NF: ratos normais - peso final
- OI: ratos obesos - peso inicial
- OF: ratos obesos - peso final
- SHR I: ratos espontaneamente hipertensos - peso inicial
- SHR F: ratos espontaneamente hipertensos - peso final
- SHR OI: ratos espontaneamente hipertensos e obesos - peso inicial
- SHR OF: ratos espontaneamente hipertensos e obesos - peso final

Figura 10: Pesos dos animais normais (N), obesos (O), espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O), no início do estudo (I) e ao final de 4 semanas (F). Médias + IC 95%.

Os animais pertencentes ao subgrupo O apresentaram peso médio final (413,20 g) significativamente maior ($P < 0,001$) que os animais do grupo N (371,15), ao fim das 4 semanas do estudo (tabela 2 e figura 10). Os animais do subgrupo SHR O (351,90 g) não aumentaram o peso em relação ao grupo N (371,15) ao final do estudo, porque esses animais hipertensos desenvolvem-se menos em função da patologia hipertensiva (tabela 2 e figura 10).

Todos os subgrupos com bloqueio combinado do SRA apresentaram menores pesos, em relação aos seus controles, ao final das 4 semanas do estudo. Assim, o subgrupo O apresentou peso médio final maior (413,20 g) e significativo ($P < 0,001$), em relação ao do subgrupo O B (296,85 g). O subgrupo SHR apresentou peso médio final maior (326,20 g) e significativo ($P < 0,001$), em relação ao do subgrupo SHR B (206,20 g). O subgrupo SHR O apresentou peso médio final superior (351,90 g), mas não significativo, em relação ao do subgrupo SHR O B (321,00 g), tabela 2.

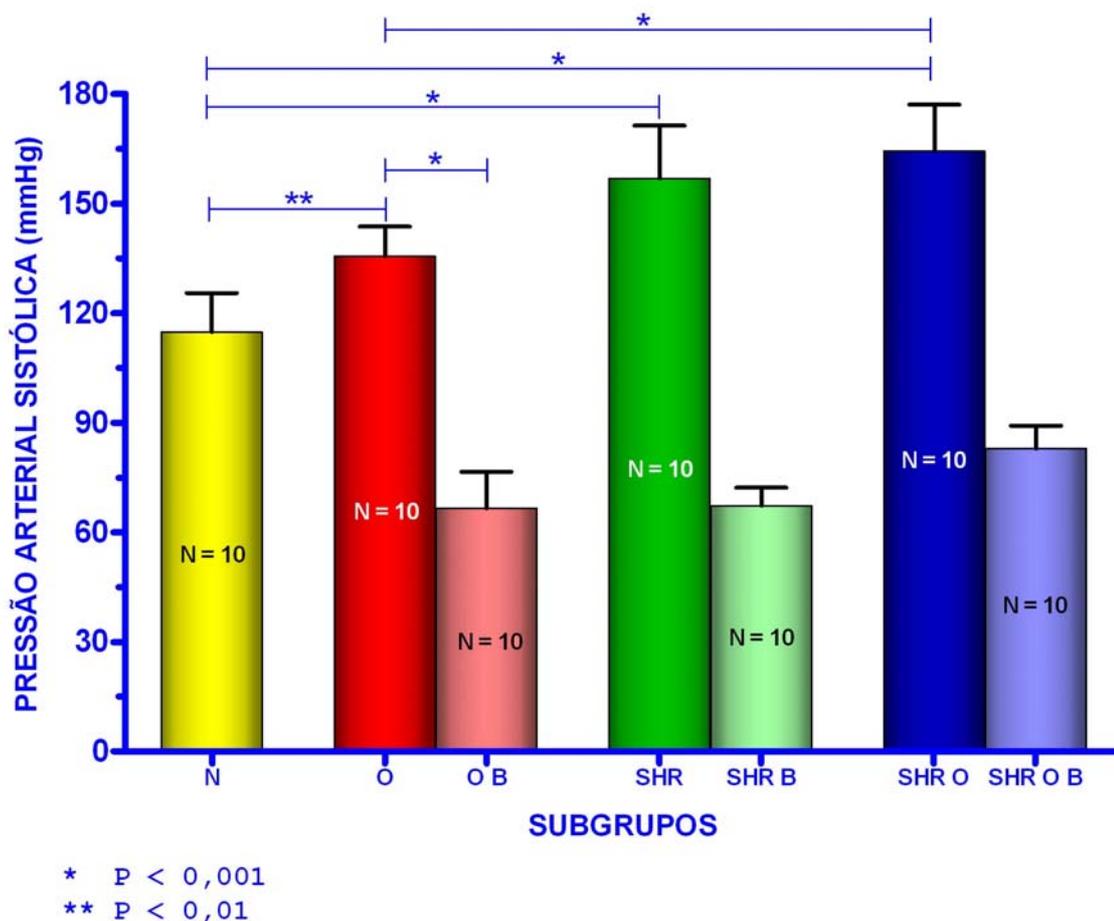
O subgrupo SHR B apresentou o menor peso final (206,20 g) e significativo ($P < 0,001$), em relação aos demais subgrupos (tabela 2).

TABELA 2								
PESO FINAL (g)								
SUBGRUPOS								
		Normal (N)	Obeso (O)	Obeso e bloqueado (O B)	SHR	SHR bloqueado (SHR B)	SHR obeso (SHR O)	SHR obeso e bloqueado (SHR O B)
RATOS	1	383	401	300	315	207	392	360
	2	344	403	333	298	185	336	350
	3	380	402	273	351	207	350	400
	4	388	407	280	347	229	349	280
	5	351	417	297	329	208	340	300
	6	375	407	296	318	204	348	250
	7	381	417	299	325	207	352	270
	8	371	463	296	326	204	360	280
	9	379	375	295	327	206	352	360
	10	360	440	300	326	205	340	360
MÉDIA		371,15	413,20	296,85	326,20	206,20	351,90	321,00
DP		14,77	23,90	15,60	15,08	10,46	15,77	50,65
		361,99	398,39	287,18	316,86	199,71	342,13	289,61
IC 95%		a	a	a	a	a	a	a
		380,31	428,01	306,52	335,54	212,69	361,67	352,39

A PA, ao final do estudo, foi significativamente maior nos subgrupos O ($P < 0,01$), SHR ($P < 0,001$) e SHR O ($P < 0,001$) em relação ao grupo N (tabela 3 e figuras 11, 12 e 13). As elevações da PA foram, respectivamente, de 17,8 %, 36,5 % e 43,0 %. Introduzido o bloqueio duplo do SRA as quedas pressóricas foram significativas ($P < 0,001$), em todos esses subgrupos, em relação aos seus controles (O, SHR e SHR O), tabela 3 e figuras 11, 12 e 13. Essas quedas foram, respectivamente, de 50,8 %, 57,0 % e 49,5 %. No subgrupo SHR O, a PA também foi significativamente mais elevada ($P < 0,001$) em relação ao subgrupo O (figura 11). Esse aumento foi de 21,3 %. A queda da PA, nos subgrupos O e SHR submetidos ao bloqueio combinado (O B e SHR B), foi semelhante ($P = NS$), figura 11. O subgrupo SHR O B foi o que apresentou a menor queda da PA, em valor absoluto, em comparação aos subgrupos O B e SHR B (figura 11).

TABELA 3
PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (mmHg)

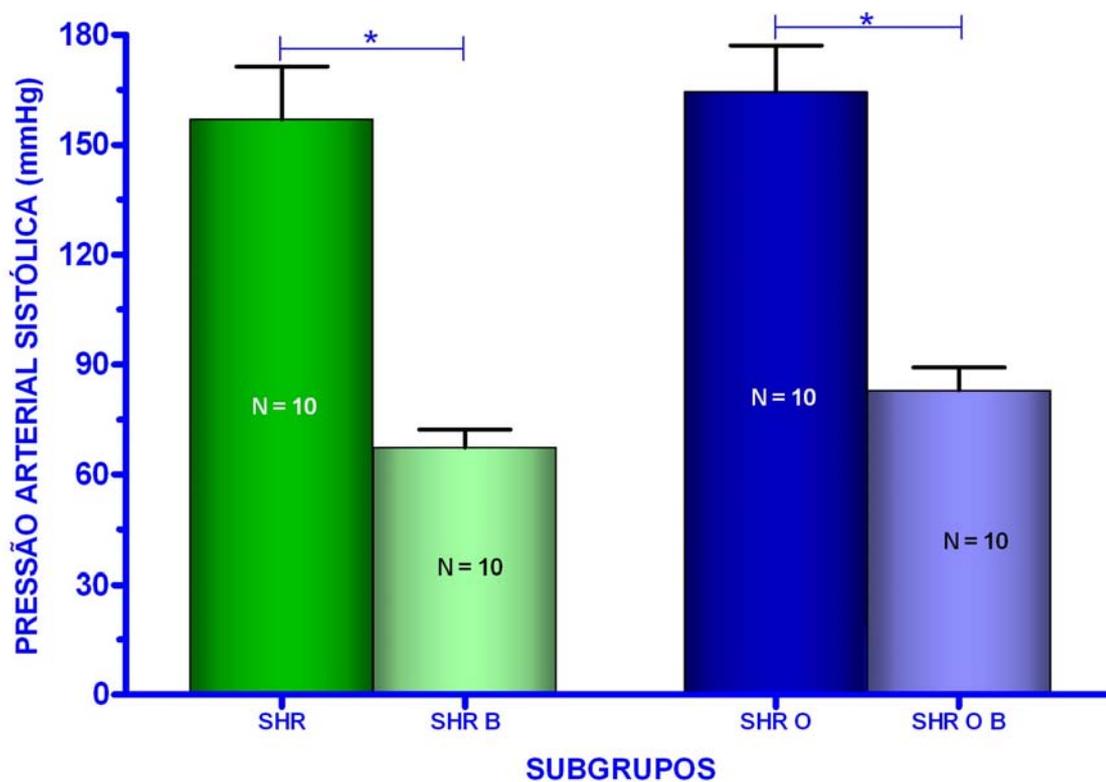
SUBGRUPOS										
		Normal (N)	Obeso (O)	Obeso e bloqueado (O B)	SHR	SHR bloqueado (SHR B)	SHR obeso (SHR O)	SHR obeso e bloqueado (SHR O B)	COMPARAÇÕES ENTRE OS SUBGRUPOS	P
RATOS	1	118	157	62	194	68	178	89	N vs O N vs SHR N vs SHR O O vs O B O vs SHR O SHR vs SHR B SHR O vs SHR O B	< 0,01 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,001
	2	129	131	67	171	53	181	84		
	3	130	122	64	170	67	168	82		
	4	109	127	66	123	82	120	83		
	5	83	143	64	136	67	182	87		
	6	134	150	59	143	68	158	74		
	7	118	126	54	156	66	164	84		
	8	114	138	78	155	65	164	99		
	9	108	129	100	166	68	165	81		
	10	105	132	52	155	69	164	66		
MÉDIA		114,80	135,50	66,60	156,90	67,30	164,40	82,90		
DP		14,94	11,33	13,79	20,05	6,93	17,63	8,72		
IC 95%		105,54	128,48	58,06	144,48	63,01	153,47	77,49		
		a	a	a	a	a	a	a		
		124,06	142,52	75,14	169,32	71,59	175,33	88,31		



LEGENDA:

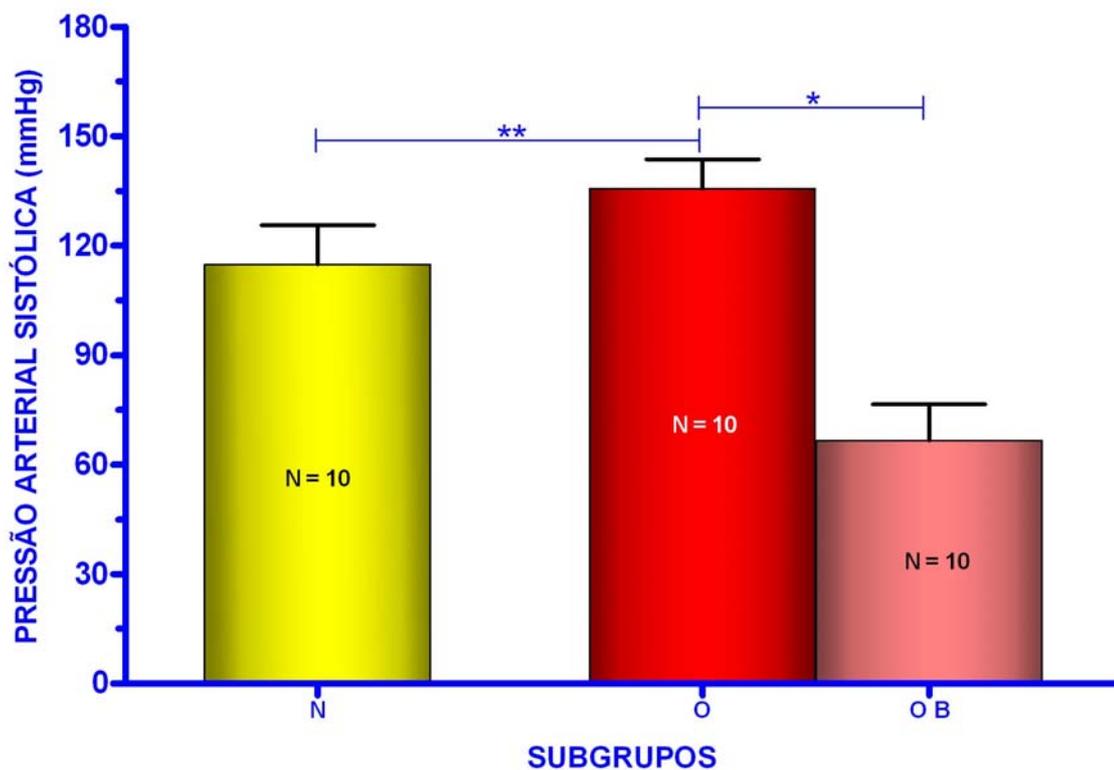
- N: ratos normais
- O: ratos obesos
- O B: ratos obesos e bloqueados
- SHR: ratos espontaneamente hipertensos
- SHR B: ratos espontaneamente hipertensos, bloqueados
- SHR O: ratos espontaneamente hipertensos e obesos
- SHR O B: ratos espontaneamente hipertensos e obesos, bloqueados

Figura 11: Pressão arterial (sistólica) em ratos normais (N), obesos (O), espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas. Médias + IC 95%.

**LEGENDA:**

- SHR: ratos espontaneamente hipertensos
- SHR B: ratos espontaneamente hipertensos, bloqueados
- SHR O: ratos espontaneamente hipertensos e obesos
- SHR O B: ratos espontaneamente hipertensos e obesos, bloqueados

Figura 12: Pressão arterial (sistólica) em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas. Médias + IC 95%.



* $P < 0,001$

** $P < 0,01$

LEGENDA:

■ N: ratos normais

■ O: ratos obesos

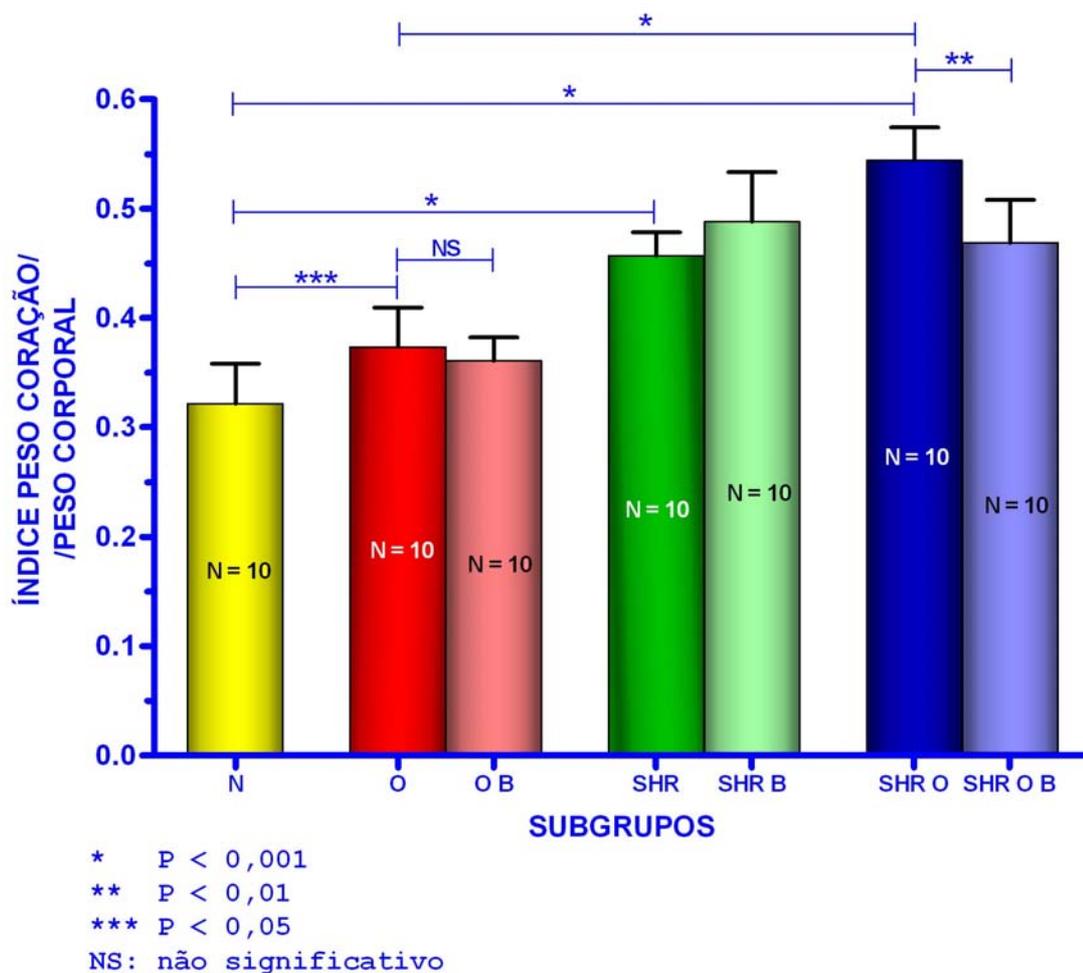
■ O B: ratos obesos e bloqueados

Figura 13: Pressão arterial (sistólica) em ratos normais (N), obesos (O) e obesos e bloqueados (O B), após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas. Médias + IC 95%.

Ao final das 4 semanas do estudo, os subgrupos O, SHR e SHR O apresentaram maior relação peso coração/peso corporal em relação ao grupo N (respectivamente, $P < 0,05$, $P < 0,001$ e $P < 0,001$), (tabela 4 e figura 14). Esses aumentos foram, respectivamente, de 15,6 %, 43,8 % e 68,8 %.

Submetidos esses subgrupos ao bloqueio combinado do SRA, apenas o subgrupo SHR O B apresentou queda significativa ($P < 0,01$) do índice peso coração/peso corporal em relação ao seu controle SHR O. Essa queda foi de 13,8 % (tabela 4 e figuras 14 e 15).

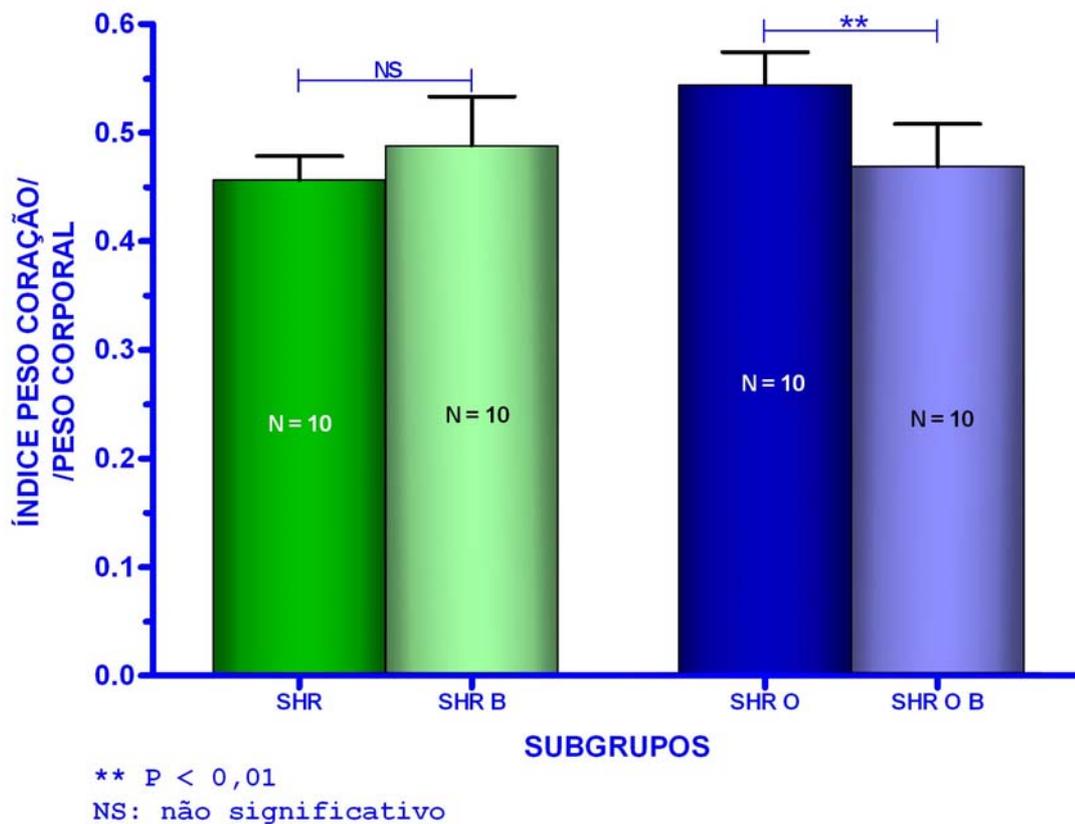
TABELA 4										
ÍNDICE PESO CORAÇÃO / PESO CORPORAL										
SUBGRUPOS										
		Normal (N)	Obeso (O)	Obeso e bloqueado (O B)	SHR	SHR bloqueado (SHR B)	SHR obeso (SHR O)	SHR obeso e bloqueado (SHR O B)	COMPARAÇÕES ENTRE OS SUBGRUPOS	P
RATOS	1	0,31	0,41	0,38	0,45	0,48	0,56	0,45	N vs O	< 0,05
	2	0,31	0,37	0,35	0,48	0,54	0,63	0,46	N vs SHR	< 0,001
	3	0,35	0,40	0,41	0,45	0,49	0,57	0,49	N vs SHR O	< 0,001
	4	0,28	0,40	0,36	0,44	0,44	0,57	0,41	O vs O B	NS
	5	0,29	0,29	0,36	0,43	0,50	0,50	0,44	O vs SHR O	< 0,001
	6	0,29	0,29	0,31	0,45	0,49	0,49	0,49	SHR vs SHR B	NS
	7	0,29	0,44	0,34	0,44	0,39	0,53	0,44	SHR O vs SHR O B	< 0,01
	8	0,32	0,38	0,36	0,53	0,58	0,52	0,61		
	9	0,45	0,41	0,40	0,47	0,57	0,54	0,47		
	10	0,33	0,35	0,33	0,43	0,41	0,52	0,44		
	MÉDIA	0,32	0,37	0,36	0,46	0,49	0,54	0,47		
	DP	0,05	0,05	0,03	0,03	0,06	0,04	0,05		
	IC 95%	0,29	0,34	0,34	0,44	0,45	0,52	0,43		
		a	a	a	a	a	a	a		
		0,35	0,40	0,38	0,48	0,53	0,57	0,50		



LEGENDA:

- N: ratos normais
- O: ratos obesos
- O B: ratos obesos bloqueados
- SHR: ratos espontaneamente hipertensos
- SHR B: ratos espontaneamente hipertensos bloqueados
- SHR O: ratos espontaneamente hipertensos e obesos
- SHR O B: ratos espontaneamente hipertensos e obesos, bloqueados

Figura 14: Índice peso coração/peso corporal em ratos normais (N), obesos (O), espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas. Médias + IC 95%.



LEGENDA:

- SHR: ratos espontaneamente hipertensos
- SHR B: ratos espontaneamente hipertensos bloqueados
- SHR O: ratos espontaneamente hipertensos e obesos
- SHR O B: ratos espontaneamente hipertensos e obesos, bloqueados

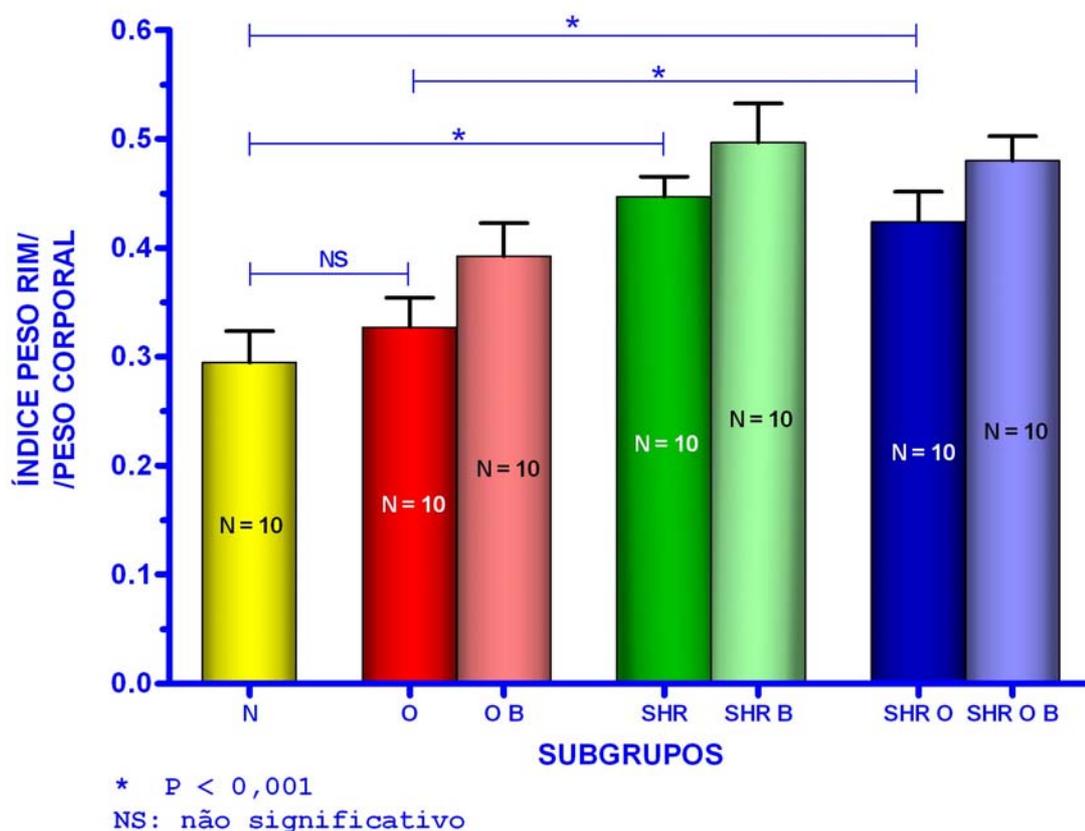
Figura 15: Índice peso coração/peso corporal em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas. Médias + IC 95%.

O índice peso rim/peso corporal foi significativamente maior ($P < 0,001$) nos subgrupos SHR e SHR O, em relação ao grupo N (tabela 5 e figura 16). Os aumentos foram, respectivamente, de 51,8 % e 43,9 %. O subgrupo O não apresentou aumento significativo dessa relação ($P = NS$), comparado ao grupo N (figura 16).

O bloqueio combinado do SRA não produziu queda da relação peso rim/peso corporal em nenhum dos subgrupos (O B, SHR B e SHR O B), figuras 16 e 17. Ao contrário, ocorreu aumento significativo desse índice (respectivamente, $P < 0,01$, $P < 0,05$ e $P < 0,05$), em relação aos seus subgrupos (O, SHR e SHR O), figuras 16 e 17.

TABELA 5
ÍNDICE PESO RIM / PESO CORPORAL

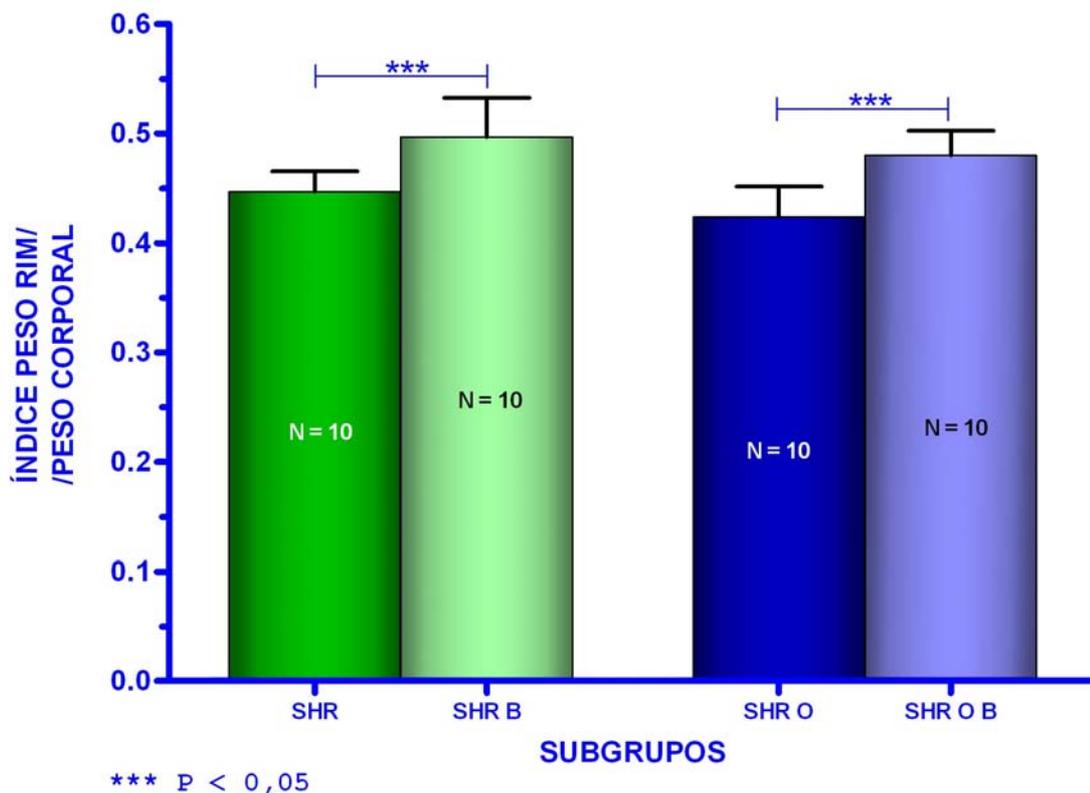
SUBGRUPOS										
		Normal (N)	Obeso (O)	Obeso e bloqueado (O B)	SHR	SHR bloqueado (SHR B)	SHR obeso (SHR O)	SHR obeso e bloqueado (SHR O B)	COMPARAÇÕES ENTRE OS SUBGRUPOS	P
RATOS	1	0,24	0,35	0,44	0,38	0,53	0,45	0,49	N vs O N vs SHR N vs SHR O O vs SHR O SHR vs SHR B SHR O vs SHR O B	NS < 0,001 < 0,001 < 0,001 < 0,05 < 0,05
	2	0,33	0,37	0,40	0,46	0,59	0,47	0,47		
	3	0,30	0,34	0,45	0,49	0,50	0,35	0,43		
	4	0,27	0,35	0,40	0,45	0,49	0,39	0,50		
	5	0,28	0,29	0,39	0,44	0,39	0,47	0,47		
	6	0,28	0,24	0,30	0,46	0,50	0,39	0,54		
	7	0,24	0,33	0,35	0,45	0,50	0,42	0,51		
	8	0,29	0,33	0,40	0,44	0,49	0,42	0,48		
	9	0,34	0,36	0,37	0,44	0,48	0,44	0,45		
	10	0,36	0,31	0,41	0,46	0,51	0,43	0,47		
MÉDIA		0,29	0,33	0,39	0,45	0,50	0,42	0,48		
DP		0,04	0,04	0,04	0,03	0,05	0,04	0,03		
IC 95%		0,27	0,30	0,37	0,43	0,47	0,40	0,46		
		a	a	a	a	a	a	a		
		0,32	0,35	0,42	0,46	0,53	0,45	0,50		



LEGENDA:

- N: ratos normais
- O: ratos obesos
- O B: ratos obesos bloqueados
- SHR: ratos espontaneamente hipertensos
- SHR B: ratos espontaneamente hipertensos bloqueados
- SHR O: ratos espontaneamente hipertensos e obesos
- SHR O B: ratos espontaneamente hipertensos e obesos, bloqueados

Figura 16: Índice peso rim/peso corporal em ratos normais (N), obesos (O), espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas. Médias + IC 95%.

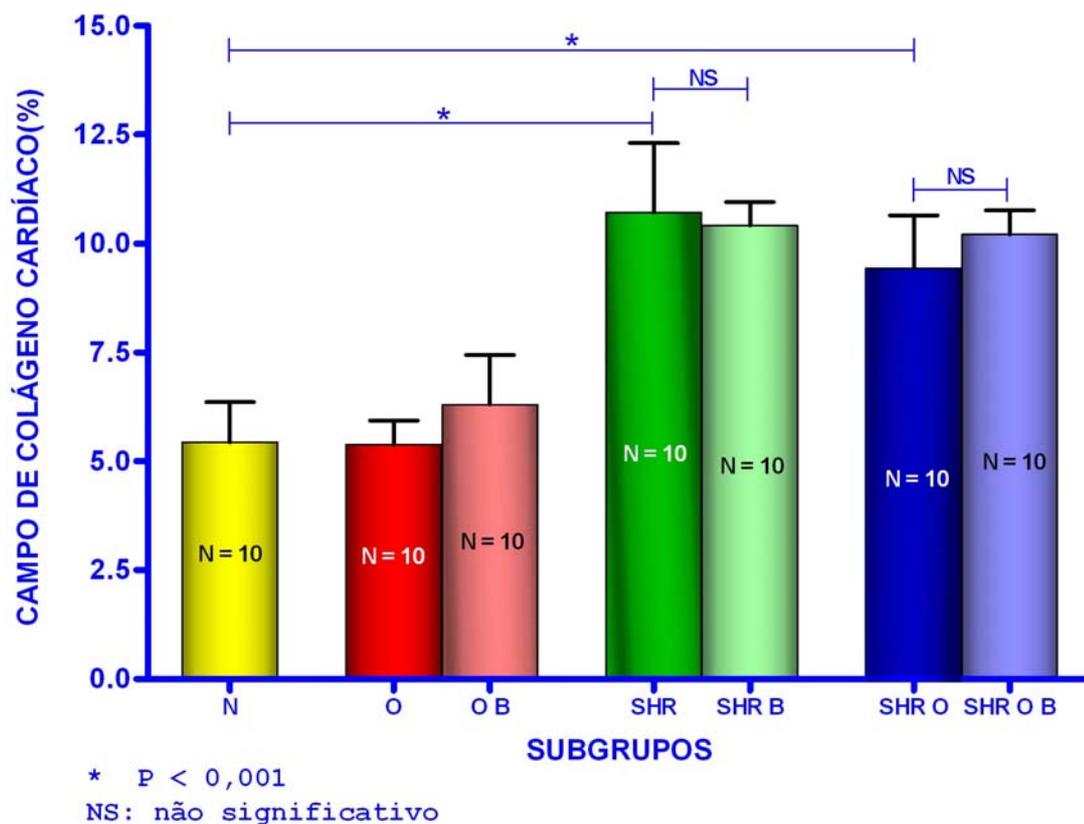


LEGENDA:

- SHR: ratos espontaneamente hipertensos
- SHR B: ratos espontaneamente hipertensos bloqueados
- SHR O: ratos espontaneamente hipertensos e obesos
- SHR O B: ratos espontaneamente hipertensos e obesos, bloqueados

Figura 17: Índice peso rim/peso corporal em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas. Médias + IC 95%.

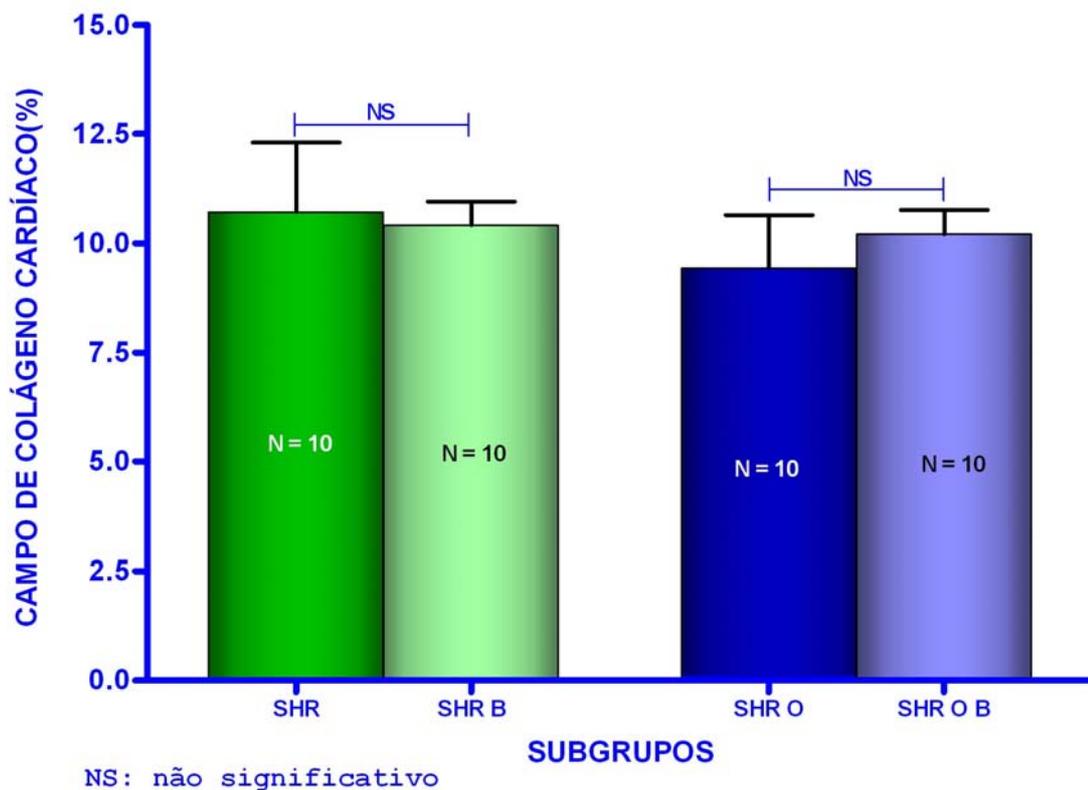
Os subgrupos SHR e SHR O apresentaram aumento significativo da quantidade de colágeno cardíaco ($P < 0,001$), comparados ao grupo N (figura 18). Esses aumentos foram, respectivamente, de 97,3 % e 73,5 %. No subgrupo O, não houve aumento significativo ($P = NS$). Submetidos ao bloqueio combinado do SRA, os subgrupos SHR B e SHR O B, não apresentaram queda significativa do colágeno ($P = NS$), em relação aos seus subgrupos SHR e SHR O, (figuras 18 e 19).



LEGENDA:

- N: ratos normais
- O: ratos obesos
- O B: ratos obesos bloqueados
- SHR: ratos espontaneamente hipertensos
- SHR B: ratos espontaneamente hipertensos bloqueados
- SHR O: ratos espontaneamente hipertensos e obesos
- SHR O B: ratos espontaneamente hipertensos e obesos, bloqueados

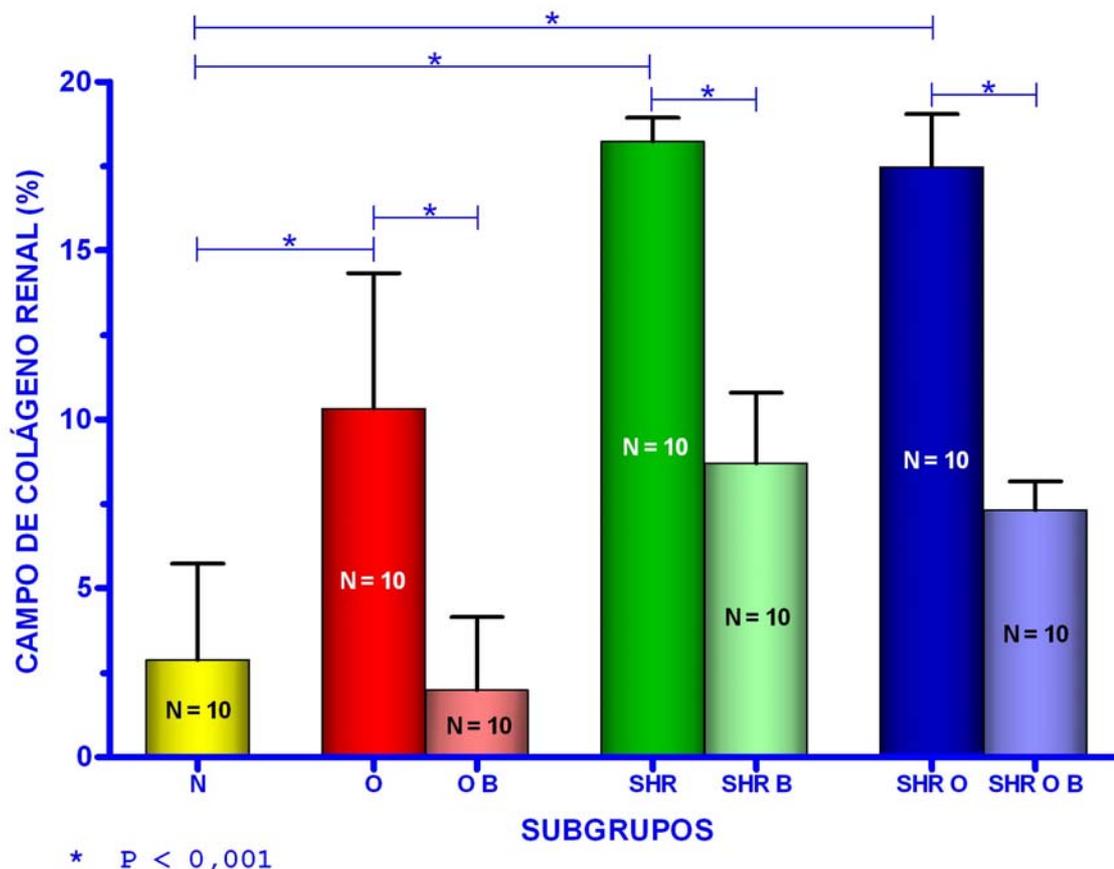
Figura 18: Quantidade de colágeno cardíaco em ratos normais (N), obesos (O), espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas. Médias + IC 95%.

**LEGENDA:**

- SHR: ratos espontaneamente hipertensos
- SHR B: ratos espontaneamente hipertensos bloqueados
- SHR O: ratos espontaneamente hipertensos e obesos
- SHR O B: ratos espontaneamente hipertensos e obesos, bloqueados

Figura 19: Quantidade de colágeno cardíaco em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas. Médias + IC 95%.

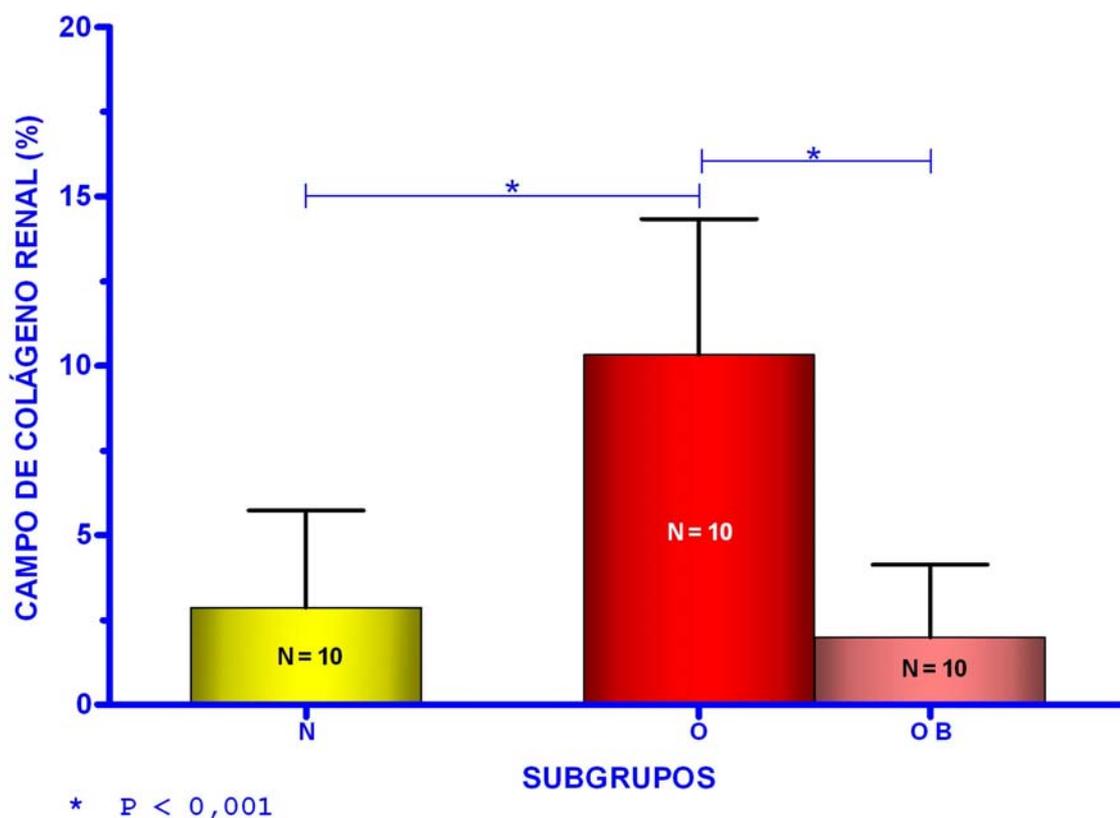
Os subgrupos O, SHR e SHR O apresentaram aumento significativo do colágeno renal ($P < 0,001$) em relação ao grupo N. Os aumentos foram, respectivamente, de 259,6 %, 535,1 % e 508,9 % (figura 20). Quando se realizou o bloqueio combinado do SRA, a queda do colágeno foi significativa ($P < 0,001$) para todos os subgrupos (O B, SHR B e SHR O B). Essas reduções foram, respectivamente, de 416,0 %, 109,6 % e 139,0 % (figuras 20, 21 e 22).



LEGENDA:

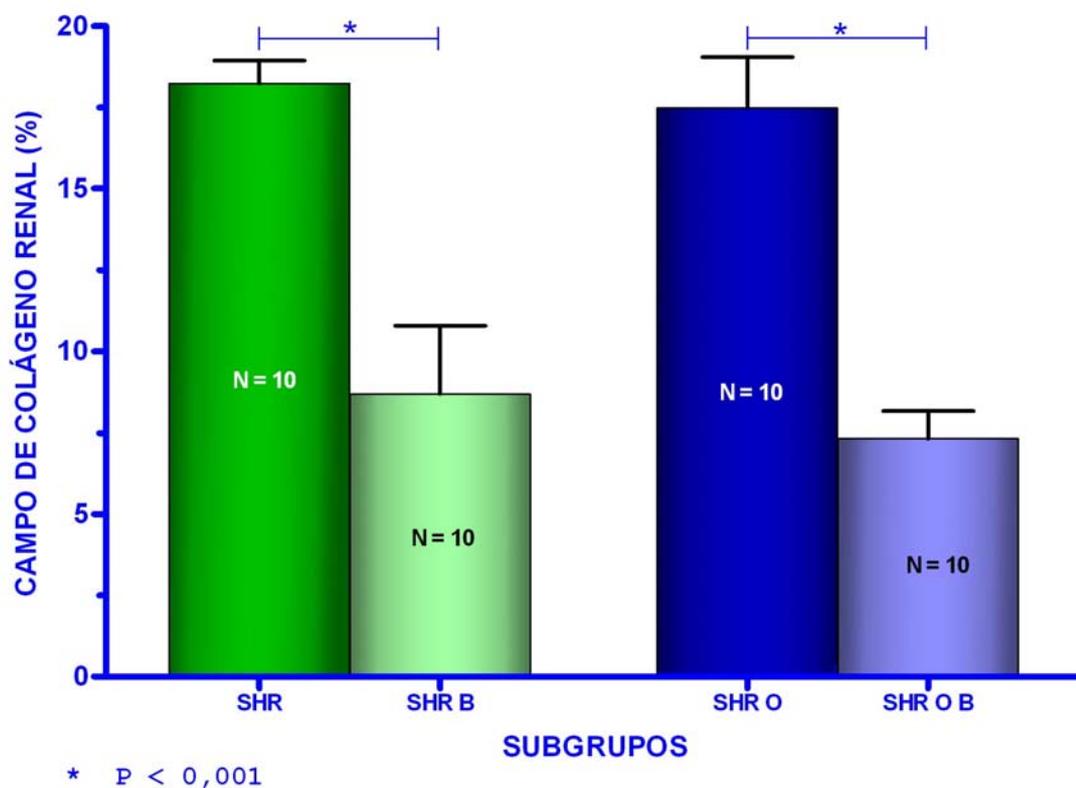
- N: ratos normais
- O: ratos obesos
- O B: ratos obesos bloqueados
- SHR: ratos espontaneamente hipertensos
- SHR B: ratos espontaneamente hipertensos bloqueados
- SHR O: ratos espontaneamente hipertensos e obesos
- SHR O B: ratos espontaneamente hipertensos e obesos, bloqueados

Figura 20: Quantidade de colágeno renal em ratos normais (N), obesos (O), espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas. Médias + IC 95%.

**LEGENDA:**

- N: ratos normais
- O: ratos obesos
- O B: ratos obesos bloqueados

Figura 21: Quantidade de colágeno renal em ratos normais (N), obesos (O) e obesos e bloqueados (O B) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas. Médias + IC 95%.

**LEGENDA:**

- SHR: ratos espontaneamente hipertensos
- SHR B: ratos espontaneamente hipertensos bloqueados
- SHR O: ratos espontaneamente hipertensos e obesos
- SHR O B: ratos espontaneamente hipertensos e obesos, bloqueados

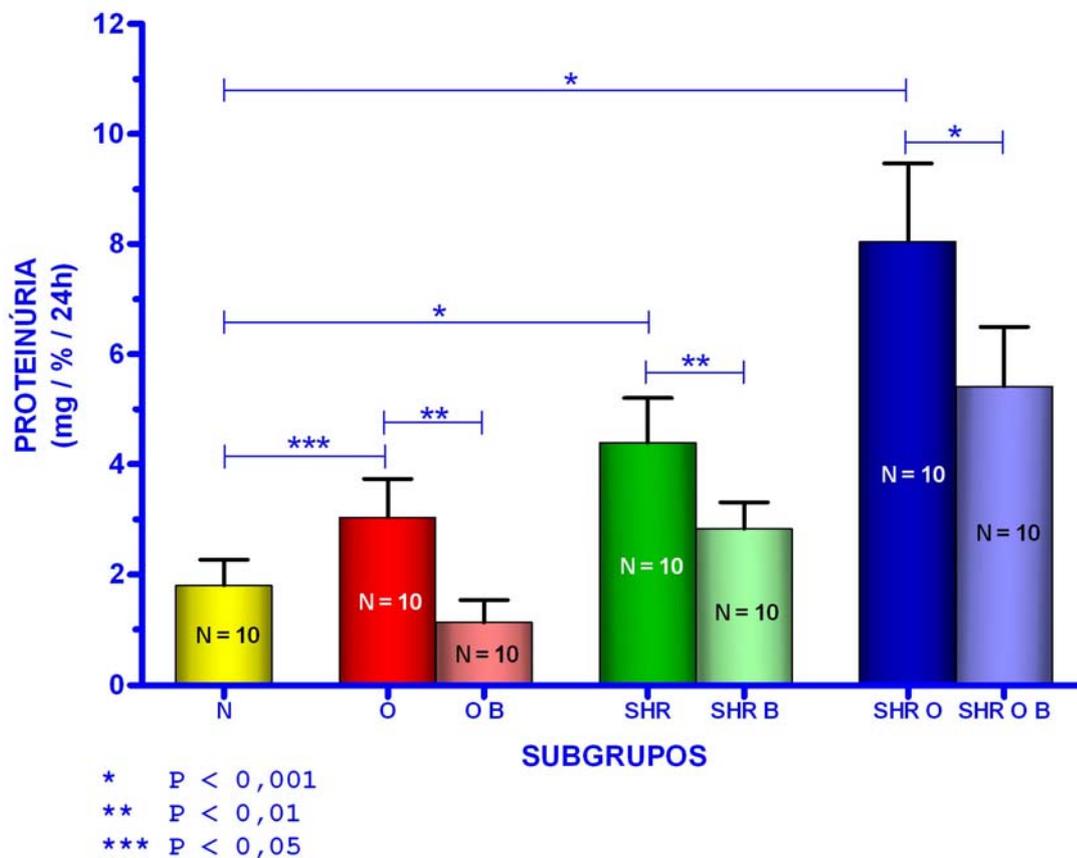
Figura 22: Quantidade de colágeno renal em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas. Médias + IC 95%.

Com relação à proteinúria os subgrupos O, SHR e SHR O apresentaram aumento significativo em relação ao grupo N (respectivamente, $P < 0,05$, $P < 0,001$ e $P < 0,001$), (tabela 6 e figura 23). Esses acréscimos foram, respectivamente, de 67,9 %, 144,2 % e 345,0 %. De relevância, foi o grande aumento da proteinúria nos animais SHR O.

Com o bloqueio do SRA, ocorreu queda significativa da proteinúria nos subgrupos O B, SHR B e SHR O B (respectivamente, $P < 0,01$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$), em relação aos subgrupos O, SHR e SHR O, (tabela 6 e figuras 23, 24 e 25). Essas reduções foram, respectivamente, de 62,8 %, 34,8 % e 32,8 %.

TABELA 6
PROTEINÚRIA (mg/%/24 h)

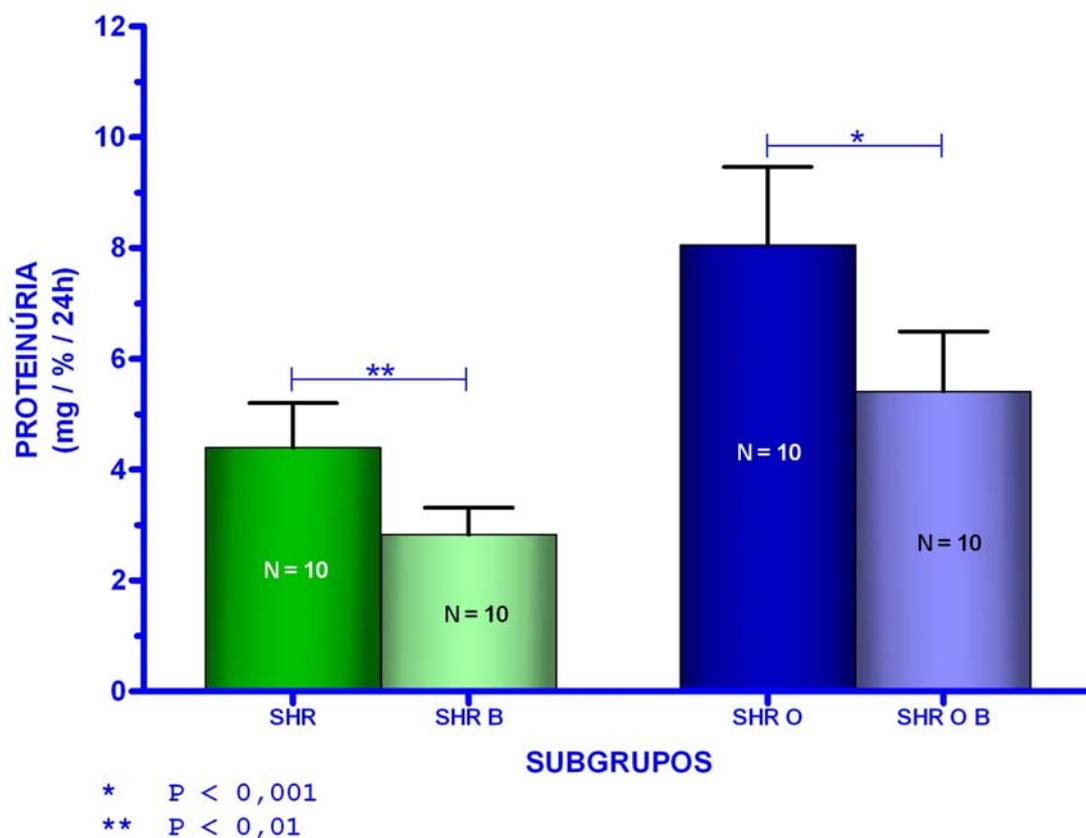
SUBGRUPOS										
		Normal (N)	Obeso (O)	Obeso e bloqueado (O B)	SHR	SHR bloqueado (SHR B)	SHR obeso (SHR O)	SHR obeso e bloqueado (SHR O B)	COMPARAÇÕES ENTRE OS SUBGRUPOS	P
RATOS	1	1,30	4,54	2,27	3,80	2,30	5,13	5,31	N vs O N vs SHR N vs SHR O O vs O B SHR vs SHR B SHR O vs SHR O B	< 0,05 < 0,001 < 0,001 < 0,01 < 0,01 < 0,001
	2	1,31	4,99	0,85	3,82	2,40	5,11	4,58		
	3	1,99	2,32	0,58	7,18	2,49	10,47	5,46		
	4	1,17	2,73	0,80	3,92	2,88	7,73	8,88		
	5	3,37	3,06	1,13	3,82	2,85	8,13	2,61		
	6	1,40	3,14	1,14	4,37	4,58	11,57	5,46		
	7	2,15	2,52	1,64	4,87	2,66	8,08	5,45		
	8	1,69	2,15	0,27	5,39	3,40	8,07	5,44		
	9	1,93	2,15	1,15	3,50	2,87	8,10	5,46		
	10	1,76	2,75	1,46	3,50	2,39	8,07	5,45		
MÉDIA		1,81	3,04	1,13	4,42	2,88	8,05	5,41		
DP		0,64	0,98	0,57	1,14	0,68	1,98	1,51		
IC 95%		1,41	2,43	0,78	3,71	2,46	6,82	4,47		
		a	a	a	a	a	a	a		
		2,21	3,64	1,48	5,13	3,30	9,28	6,35		



LEGENDA:

- N: ratos normais
- O: ratos obesos
- O B: ratos obesos bloqueados
- SHR: ratos espontaneamente hipertensos
- SHR B: ratos espontaneamente hipertensos bloqueados
- SHR O: ratos espontaneamente hipertensos e obesos
- SHR O B: ratos espontaneamente hipertensos e obesos, bloqueados

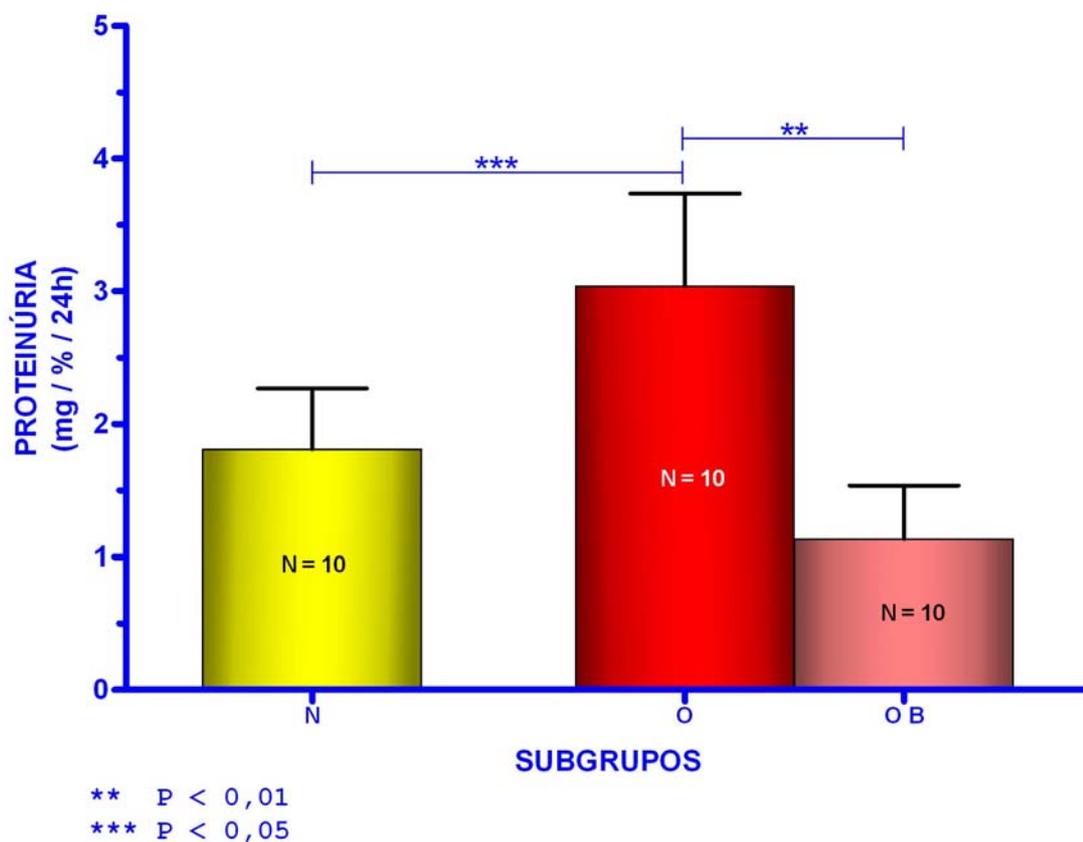
Figura 23: Proteinúria em ratos normais (N), obesos (O), espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas. Médias + IC 95%.



LEGENDA:

- SHR: ratos espontaneamente hipertensos
- SHR B: ratos espontaneamente hipertensos bloqueados
- SHR O: ratos espontaneamente hipertensos e obesos
- SHR O B: ratos espontaneamente hipertensos e obesos, bloqueados

Figura 24: Proteinúria em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e espontaneamente hipertensos e obesos (SHR O) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas. Médias + IC 95%.

**LEGENDA:**

- N: ratos normais
- O: ratos obesos
- O B: ratos obesos bloqueados

Figura 25: Proteinúria em ratos normais (N), obesos (O) e obesos e bloqueados (O B) no início do estudo (I) e após bloqueio duplo (B) do sistema renina-angiotensina (SRA), ao final de 4 semanas. Médias + IC 95%.

IV - DISCUSSÃO

Ao final das 4 semanas do estudo, observa-se aumento significativo no peso dos animais que recebem alimentação para indução da obesidade^(108,109), em relação aos que recebem apenas a ração convencional. Demonstra-se, assim, que o tipo de alimentação com alta taxa calórica é adequado para a obtenção do objetivo de tornar os animais obesos.

Verifica-se que no tempo de 4 semanas, o bloqueio farmacológico duplo do SRA é suficiente para produzir diminuição da PA e regressão dos colágenos cardíaco e renal, além da redução da proteinúria. Vários estudos têm analisado a redução da hipertensão e do remodelamento em órgãos-alvo, nesse período de tempo. Yao K e colaboradores⁽¹¹³⁾ obtiveram diminuição da PA, da albuminúria e da esclerose glomerular, utilizando bloqueio de AT₁ com candesartan e bloqueio dos canais de cálcio com benidipina ou amlodipina, em associação ou isoladamente, em ratos hipertensos Dahl, sal-sensíveis, por 2 a 6 semanas. Mougnot N e colaboradores⁽¹¹⁴⁾, trabalhando com ratos SHR, mostraram redução da PA, da hipertrofia ventricular esquerda e da renina, com o betabloqueador bisoprolol e o diurético hidroclorotiazida, associados ou não, em tratamento por 3 semanas. Nagai M e colaboradores⁽¹¹⁵⁾ analisaram o bloqueio duplo do SRA com perindopril e candesartan em ratos wistar hipertensos renovasculares (Goldblatt) por 4 semanas e mostraram redução da PA, da hipertrofia e da fibrose cardíacas. Okada T e colaboradores⁽¹¹⁶⁾ utilizaram valsartan como bloqueador AT₁ e

espironolactona, como bloqueador da aldosterona, em ratos hipertensos renovasculares durante 5 semanas com reduções da PA, da relação peso coração/peso corporal e da fibrose perivascular. Pollock DM e colaboradores⁽¹¹⁷⁾ estudaram ratos Sprague-Dawley com hipertensão maligna, modelo DOCA sal dependente, durante 3 semanas. Foi utilizado candesartan, como bloqueador AT₁, além de bloqueador para a endotelina-A, com redução da PA e melhora do perfil hemodinâmico.

O uso do bloqueio farmacológico duplo do SRA tem sido discutido na literatura. O estudo “CALM” I)⁽⁹⁵⁾ analisou 199 pacientes hipertensos e diabéticos, com microalbuminúria, durante 24 semanas, utilizando a combinação de lisinopril e candesartan, com significativa redução da PA e da microalbuminúria. O estudo “CALM” II)⁽⁹⁹⁾ analisou 75 pacientes hipertensos e diabéticos, tipos 1 e 2, com terapia combinada de lisinopril e candesartan, durante 12 meses. Não houve diferença significativa entre esse tratamento e o uso isolado do lisinopril. Em um braço do estudo “VALIANT”⁽⁹⁶⁾, o bloqueador AT₁ foi o valsartan, e o da enzima conversora o captopril, em pacientes com infarto agudo complicado por insuficiência cardíaca e/ou disfunção ventricular esquerda. O uso combinado, porém, não aumentou a sobrevida. No estudo “COOPERATE”⁽⁹⁷⁾, foram estudados 263 pacientes com nefropatia não diabética, dos quais 88 receberam terapêutica combinada com losartan e trandolapril durante 36 meses. Houve retardo da progressão da nefropatia com a terapêutica combinada. Um braço do estudo “CHARM”⁽⁹⁸⁾ analisou 483 pacientes em insuficiência cardíaca (classe funcional II-IV da New York Heart

Association) que receberam candesartan, associado a inibidores da enzima de conversão, como enalapril, lisinopril, captopril ou ramipril, durante 41 meses. Houve redução dos eventos cardiovasculares e melhora funcional cardíaca. Agawal R⁽¹⁰⁰⁾ acompanhou 16 nefropatas com proteinúria moderada e avançada insuficiência renal crônica com o duplo bloqueio, utilizando o losartan como bloqueador AT₁ e lisinopril como bloqueador da enzima conversora. Não houve melhora da proteinúria com 1 mês de seguimento, mas os autores deixaram clara a necessidade de estudos mais amplos e randomizados.

O bloqueio duplo do SRA teria a vantagem de oferecer maiores benefícios por promover bloqueio mais completo do sistema, uma vez que o bloqueio apenas da ECA, permitiria que a Ang II continuasse a ser produzida por vias alternativas. Não está claro, porém, se realmente é benéfico produzir-se bloqueio prolongado do receptor AT₁, com a conseqüente superestimulação do AT₂. Trabalhos mostraram que a ativação dos AT₂ pode mediar resposta promotora de crescimento em tecidos cardiovasculares e que esses efeitos podem correr paralelos, mais do que serem antagônicos, aos produzidos pela estimulação do AT₁. Bloqueio de AT₁ com losartan produziu queda da pressão arterial, mas levou à hiperplasia e hipertrofia da musculatura lisa vascular em ratos normotensos⁽²¹⁾ Ratos, em que se infundiu Ang II para produzir hipertensão, mas se bloqueou o receptor AT₁ com valsartan, apresentaram queda da pressão arterial, mas as alterações vasculares foram atenuadas quando se bloqueou especificamente o AT₂.⁽¹¹⁸⁾

No estudo “ELITE” II (“Evaluation of Losartan In The Elderly”)⁽¹¹⁹⁾, o bloqueio do receptor AT₁ foi realizado com losartan e não foi superior ao bloqueio da ECA com captopril na redução da morbidade e da mortalidade em pacientes com insuficiência cardíaca. No estudo “OPTIMAAL” (“the Optimal Trial in Myocardial Infarction with the Angiotensin II Antagonist Losartan”)⁽¹²⁰⁾, não houve benefício no uso do bloqueador AT₁ (losartan) sobre o inibidor da ECA (captopril). Acredita-se que o benefício do bloqueio da ECA em relação ao do AT₁ possa depender do aumento da bradicinina, que além de importante vasodilatador, tem efeitos vasculares protetores.⁽¹²¹⁾

Há, porém, grande quantidade de trabalhos experimentais que reforçam o papel vasodilatador do AT₂ e suas ações benéficas, opostas aos efeitos vasoconstritores mediados pelo receptor AT₁ sob ação da Ang II.⁽¹²²⁻¹²⁶⁾ No estudo de Nakao e colaboradores (COOPERATE)⁽⁹⁷⁾, a terapia combinada (trandolapril e losartan) em nefropatas não diabéticos, produziu melhora da sobrevida e redução da proteinúria, em relação a qualquer uma das substâncias isoladamente. O estudo CALM I⁽⁹⁵⁾, confirmou a redução da microalbuminúria com a terapia combinada. Os trabalhos de Wolf G e Ritz E⁽¹⁰¹⁾ também mostraram que o duplo bloqueio foi melhor que a monoterapia, na redução da proteinúria em nefropatas, inclusive diabéticos.

No estudo “LIFE” (“Losartan Intervention For End Point Reduction in Hypertension”)⁽¹²⁷⁾, em que doses mais elevadas do losartan foram utilizadas, houve superioridade em relação ao beta bloqueador atenolol

na redução de morbidade cardiovascular e, em particular, no acidente encefálico. Embora não tendo havido comparação entre drogas bloqueadoras de receptores, o trabalho mostrou benefícios do bloqueio do AT₁ em relação a uma terapia tradicional e bem estabelecida no controle da hipertensão.

No presente estudo, os resultados mostram que o bloqueio farmacológico combinado, produz queda na média da PA nos animais O, nos SHR e nos SHR O, em relação aos respectivos subgrupos controles, conforme já descrito na literatura.⁽¹¹³⁻¹¹⁷⁾

Nos animais O, observa-se que a PA aumenta, significativamente, em relação ao grupo N. Um dos fatores responsáveis pela elevação pressórica poderia ser a leptina, através da estimulação de receptores hipotalâmicos específicos e do sistema nervoso simpático.^(52,67,68) A leptina aumenta a atividade simpática para o tecido adiposo marrom, rins e membros inferiores.^(50,128) Essa aumentada atividade simpática com a conseqüente estimulação do SRA promove aumento da reabsorção tubular do sódio.^(52,71) Frente às alterações endoteliais impostas pela obesidade, há redução da produção do NO, predominando, assim, a vasoconstrição e favorecendo a hipertensão.⁽⁸²⁾ Acrescente-se, ainda, que a atividade simpática aumentada produz maior lipólise, com conseqüente liberação de ácidos graxos livres, que vão diminuir a disponibilidade de NO em nível endotelial, alimentando sua disfunção e facilitando a vasoconstrição.⁽⁸²⁾ Os ácidos graxos elevados, por sua vez, vão diminuir o “clearance” hepático da insulina, favorecendo a glicogenólise.

Estabelece-se um hiperinsulismo com maior reabsorção de sódio tubular e a hipertensão se agrava.^(82,129) A leptina ainda aumenta a atividade da renina plasmática, os níveis da aldosterona e do angiotensinogênio circulante.⁽⁷⁴⁻⁷⁷⁾ A própria angiotensina II, nos hipertensos e obesos, pode ativar neurônios centrais, aumentando o sinergismo entre ela e a atividade simpática.⁽⁸⁰⁾

O bloqueio combinado do SRA em animais O provoca queda da PA, em relação aos seus controles, não bloqueados. Este fato reforça que o SRA esteja ativado na obesidade⁽⁸⁰⁾, uma vez que todos os componentes do sistema se encontram nos adipócitos.^(81,84)

O índice peso coração/peso corporal é maior nos subgrupos SHR e SHR O, em relação aos subgrupos N e O, mostrando assim, a importância do fator hipertensão no aumento do peso do coração.

O bloqueio combinado do SRA reduz, significativamente, o peso do órgão em relação ao peso corporal no subgrupo SHR O, o que não foi verificado nos subgrupos SHR e O, em relação aos seus controles. Apesar da relação aumentada peso coração/peso corporal, não se observa redução do colágeno cardíaco nesses subgrupos.

Essa não diminuição do colágeno poderia sugerir que a obesidade induzida constitui fator importante para o aumento e manutenção dessa relação, mesmo sob bloqueio. Os possíveis fatores responsáveis poderiam ser o tempo de intervenção, talvez pequeno para determinar a diminuição do colágeno ou insuficiente para reverter as alterações produzidas pela obesidade. Sabe-se haver ação impeditiva da leptina

sobre os efeitos miocárdicos, em virtude dos baixos níveis do NO, pelo menos em ratos tornados hipertensos por bloqueio desse agente.⁽¹³⁰⁾

De qualquer forma, a relação aumentada peso coração/peso corporal, nos animais SHR e nos SHR O em relação ao grupo N, sugere que a remodelação cardíaca pode ser devida a outros fatores, como o aumento dos miócitos e a angiogênese e não somente o colágeno. A Ang II, elevada em tais situações, pode ativar as metaloproteinases, enzimas que permitem que as células migrem ou cresçam, exercendo papel fundamental na remodelação vascular e miocárdica. Desta forma, essa ativação enzimática permitiria a neovascularização.⁽²⁷⁾ Além do mais, a ativação do NF- κ B pela angiotensina II, pode produzir ativação de vários tipos celulares, incluindo células musculares lisas e endoteliais.^(35,36) Ratos tornados hipertensos por bloqueio do NO mostraram aumento do TNF- α , com remodelação miocárdica e maior deposição do colágeno tipo I⁽¹³¹⁾, além da hipertrofia de miócitos.⁽¹³²⁾

Na análise da relação peso rim/peso corporal, os subgrupos SHR e SHR O apresentam valores maiores e significativos em relação ao grupo N. Tais alterações, em termos de remodelação renal, estão de acordo com dados previamente publicados^(36,40-45,133), evidenciando a ativação do SRA nessa situação.

Sabe-se que este índice correlaciona-se de maneira direta com a quantidade de colágeno, mas também com elementos “não colágeno”, como células integrantes e não integrantes do néfron, estando todos aumentados nesses subgrupos, que apresentam seu SRA ativado.⁽¹³⁴⁾

Nos subgrupos SHR e SHR O, verificam-se, em relação à fração do colágeno renal, aumentos significativos deste componente, em relação ao grupo N. Estes dados concordam com a literatura⁽¹³⁵⁾ em relação ao efeito da ativação do SRA sobre o colágeno renal em ratos hipertensos. Além disso, a leptina, via aumentos do TGF- β e do seu receptor, produz maior deposição intersticial de colágeno (principalmente do tipo III), de material proteináceo e também do conteúdo celular do tecido não integrante do néfron.⁽¹³⁶⁾

Quando se produz o bloqueio duplo do SRA nos subgrupos SHR e SHR O, verifica-se diminuição significativa do colágeno, mas sem queda da relação peso rim/peso corporal, o que contribui para confirmar que nesses subgrupos as alterações não são devidas apenas ao componente colágeno, mas também às alterações “não colágenas” e que podem necessitar de mais tempo de bloqueio para serem revertidas.

No subgrupo O não ocorre aumento significativo da relação peso rim/peso corporal, mas demonstra-se importante aumento do colágeno, que se reduz, significativamente, com o bloqueio duplo do SRA. Nesse subgrupo, não hipertenso, pode ter havido predomínio do elemento “colágeno”, com menor ativação do SRA, comparado aos subgrupos SHR e SHR O.

Observa-se que, nos subgrupos O, SHR e SHR O, a proteinúria é significativamente maior comparada ao grupo N. Vários trabalhos na literatura relacionaram a proteinúria com a nefropatia experimental.⁽³⁷⁻⁴¹⁾ Estudos em ratos hipertensos por administração crônica de inibidor do

NO⁽¹³³⁾, produziu hipertensão com grande infiltrado inflamatório intersticial.⁽⁴²⁾

Os subgrupos O, SHR e SHR O, com bloqueio duplo do SRA, apresentam queda significativa da proteinúria, em relação aos seus subgrupos, não bloqueados. Esses dados demonstram que os animais O, SHR e SHR O, obtêm benefícios com o bloqueio do SRA, pelo menos no que se refere à queda da proteinúria, que é um marcador de nefropatia⁽³⁷⁻⁴¹⁾, colocando em destaque o importante papel da Ang II. Ressalte-se, porém, a observação de Gallego e colaboradores⁽¹³⁷⁾ de que a presença de lesão estrutural renal não pode ser diretamente correlacionada com a proteinúria.

A leptina, que é proporcional ao aumento da adiposidade⁽⁷³⁾, elevou a atividade da renina plasmática e o nível do angiotensinogênio circulante⁽⁷⁴⁻⁷⁷⁾, além de aumentar a atividade simpática, como provado em ratos Sprague-Dawley.⁽⁵⁰⁾ Além do mais, o SRA está ativado na obesidade isolada.^(72,81) Ratos espontaneamente hipertensos, que funcionaram como modelo da hipertensão primária humana, quando obesos, desenvolveram nefropatia com intensa proteinúria, em relação aos controles.⁽⁵⁰⁾

No subgrupo O, a proteinúria poderia ser explicada por diversos mecanismos, entre eles, a ativação do SRA produzindo hipertensão intraglomerular, maior pressão de filtração e microalbuminúria, que pode evoluir para a proteinúria.^(50,85-88) A proteinúria no grupo SHR, pode se basear no fato de que a Ang II aumentada, produz ativação do NF-κB,

além de aumentar a produção da MCP-1 e das moléculas de adesão, responsáveis pela nefrite experimental.⁽³⁷⁾ A Ang II também promoveu a proliferação de células endoteliais de vasos e de fatores de crescimento do tecido conjuntivo e do fibroblasto, entre outros.⁽²⁸⁻³⁴⁾

Com relação à proteinúria no subgrupo O, é importante analisar o aspecto da sua redução em relação ao grupo N, com o bloqueio farmacológico duplo do SRA. Mais uma vez, demonstra-se a influência da obesidade na proteinúria, porque esse subgrupo não é de animais hipertensos. Este fato reveste-se de enorme significado, uma vez que o bloqueio, pelo menos combinado do SRA, produz redução da proteinúria, conhecida como marcadora de nefropatia em ratos O, o que não foi relatado na literatura pesquisada.

Outro aspecto importante é a redução significativa do colágeno renal nos subgrupos SHR e SHR O, sob bloqueio duplo do SRA.

Essas reduções na fração do colágeno vêm ao encontro das observações de que há proteção renal, com o uso de inibidor da enzima conversora da angiotensina II e/ou do bloqueio dos seus receptores AT_1 .^(37-41,95,97,101,113)

A queda da fração do colágeno no subgrupo O, após bloqueio duplo do SRA, se reveste também de grande valor, dado que esse subgrupo não se constitui de animais hipertensos. Paralela a esta observação comprova-se aumento da proteinúria, e posteriormente sua redução, com o bloqueio duplo do SRA.

Essas observações não foram relatadas na literatura pesquisada e vêm a se constituir em dado indicativo da importância do uso dessas drogas, não só como proteção cardiovascular, mas também renal, inclusive nos indivíduos obesos, hipertensos ou não.

V - CONCLUSÕES

a) O QUE JÁ ERA CONHECIDO

- 1) O grupo de ratos Wistar espontaneamente hipertenso (SHR) e o subgrupo espontaneamente hipertenso obeso-induzido (SHR O), apresentam aumento dos pesos cardíaco e renal em relação ao peso corporal, relacionado ao aumento do colágeno. No rim, em particular, possivelmente elementos teciduais “não colágenos”, poderiam ter contribuído para o maior peso do órgão. O subgrupo normotenso obeso-induzido (O) também apresenta aumento do colágeno renal.
- 2) Os subgrupos normotenso obeso-induzido (O), espontaneamente hipertenso (SHR) e espontaneamente hipertenso obeso-induzido (SHR O) apresentam aumento da proteinúria, como marcador de lesão renal.
- 3) O bloqueio farmacológico duplo do sistema renina angiotensina (SRA) produz reduções do peso cardíaco, em relação ao peso corporal, no subgrupo espontaneamente hipertenso obeso-induzido (SHR O) e do colágeno renal e da proteinúria no grupo espontaneamente hipertenso (SHR) e no subgrupo espontaneamente hipertenso obeso-induzido (SHR O).

b) O QUE O ESTUDO ACRESCENTOU

- 1) Ratos Wistar normotensos e obesos (O) apresentam reduções da proteinúria e do colágeno renal, após bloqueio farmacológico duplo do SRA.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. Marks LS, Maxwell MH. Tigerstedt and the discovery of renin. An historical note. Hypertension 1979;1;384-388**
- 2. Persson PB. Renin: origin, secretion and synthesis. J Physiol 2003;552;667-671.**
- 3. Basso N, Terragno NA. History about the discovery of the renin-angiotensin system. Hypertension 2001;38:1246-1249.**
- 4. Renovascular hypertension due to ischemia renal [editorial]. Circulation 1965;32:1-4.**
- 5. Braun-Menéndez E, Page IH. Suggested revision of nomenclature – angiotensin. Science 1957;127:242.**
- 6. Deschepper CF, Bouhnik J, Ganong WF. Colocalization of angiotensin and glial fibrillary acidic protein in astrocytes in rat brain. Brain Res 1986;355:195-02.**
- 7. Okhubo H, Nakayama K, Tanaka T, Nakanishi S. Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of its heterogeneity. J Biol Chem 1986;261:319-323.**
- 8. Brosnihan BK, Santos RAS, Block CH, Schiavone MT, Welches MT, Welches, WR, et al. Biotransformation of angiotensins in the central nervous system. Therapeutic Res 1988; 9:184-195.**

9. **Braszko JJ, Wlasienko J, Koziolkiewicz W, Janecka A, Wisniewski K. The 3-7 fragment of angiotensin II is probably responsible for its psychoactive properties. Brain Res 1991;554:49-54.**
10. **Harding JW, Cook VI, Miller-Wing AV, Honesevorth JM, Sardinia MF, Holl KL, et al. Identification of and All-(3-8) (AIV) binding site in guinea pig hippocampus. Brain Res 1992; 583:340-343.**
11. **Santos RAS, Brosnihan KB, Chappell MC, Pesquero J, Chernicky CL, Greene LJ, et al. Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. Hypertension 1988, 11:1-153-I-157.**
12. **Santos RAS, Simões e Silva AC. Controle humoral da pressão arterial. In: Amodeo C, Lima EG, Vazquez EC, editores. Hipertensão arterial. 1ª. ed. São Paulo. Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda; 1997, p. 51-59.**
13. **Lavoie J, Sigmund CD. Minireview: overview of the renin-angiotensin system - an endocrine and paracrine system. Endocrinology 2003; 144:2179-2183.**
14. **Kobori H, Harrison-Bernard LM, Navar LG. Urinary excretion of angiotensinogen reflects intrarenal angiotensinogen production. Kidney Int 2002;61:579-585.**
15. **Cogan MG. Angiotensin II: a powerful controller of sodium transport in the early proximal tubule. Hypertension 1990;15:451-458.**

16. Stec DE, Davisson RL, Haskell RE, Davidson BL, Sigmund CD. Efficient liver-specific deletion of a floxed human angiotensinogen transgene by adenoviral delivery of cre-recombinase in vivo. *J Biol Chem* 1999;274:21285-21290.
17. Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E. Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit* 2005;11:RA194-RA205.
18. Mervaala EM, Muller DN, Park JK. Monocyte infiltration and adhesion molecules in a rat model of high human renin hypertension. *Hypertension* 1999;33:389-395.
19. Romero JC, Reckelhoff JF, Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension* 1999;34:943-949.
20. Griending KK, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2175-2183.
21. Lévy BI. Can angiotensin II type 2 receptors have deleterious effects in cardiovascular disease? *Circulation* 2004;109:8-13.
22. Kim JA, Berliner JA, Nadler JL. Angiotensin II increases monocyte binding to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;256:862-868.

23. Krejcy K, Eichler HG, Jilma B. Influence of angiotensin II on circulating adhesion molecules and blood leukocyte count in vivo. *Can J Physiol Pharmacol* 1996;74:9-14.
24. Pueyo ME. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:645-651.
25. Usui M. Important role of local angiotensin II activity mediated via type 1 receptor in the pathogenesis of cardiovascular inflammatory changes induced by chronic blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Circulation* 2000;101:305-310.
26. Luft FC. Hypertension-induced end-organ damage: a new transgenic approach to an old problem. *Hypertension* 1999;33:212-218.
27. Muramatsu M, Katada J, Hayashi I, Majima M. Chymase as a proangiogenic factor. A possible involvement of chymase-angiotensin-dependent pathway in the hamster sponge angiogenesis model. *J Biol Chem* 2000;275:5545-5552.
28. Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A. Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 1992;19:464-474.
29. Wolf G, Wenzel UO. Angiotensin II and cell cycle regulation. *Hypertension* 2004;43:693-698.

30. Cottone S, Vadala A, Vella MC. Changes of plasma endothelin and growth factor levels and left ventricular mass, after chronic ATP-1receptor blockade in human hypertension. *Am J Hypertens* 1998;11:548-553.
31. Wong J, Rauhoft C, Dilley RJ. Angiotensin-converting enzyme inhibition abolishes medial smooth muscle PDGF-AB biosynthesis and attenuates cell proliferation in injured carotid arteries: relationships to neointima formation. *Circulation* 1997;96:1631-1640.
32. Su EJ, Lombardi DM, Wiener J. Mitogenic effect of angiotensin II on rat carotid arteries and type II or III mesenteric microvessels but not type I mesenteric microvessels is mediated by endogenous basic fibroblast growth factor. *Circ Res* 1998;82:321-327.
33. Otani A, Takagi H, Suzuma K, Honda Y. Angiotensin II potentiates vascular endothelial growth factor-induced angiogenic activity in retinal microcapillary endothelial cells. *Circ Res* 1998;82:619-628.
34. Finckenberg P, Inkinen K, Ahonen J. Angiotensin II induces connective tissue growth factor gene expression via calcineurin-dependent pathways. *Am J Pathol* 2003;163:355-366.
35. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. *Hypertension* 2001;38:1382-1387.

36. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M. Systemic infusion of angiotensin II into normal rats activates nuclear factor-kappaB and AP-1 in the kidney: role of AT(1) and AT(2) receptors. *Am J Pathol* 2001;158:1743-1756.
37. Hisada Y, Sugaya T, Yamanouchi M, Uchida H, Fujimura H, Sakurai H, et al. Angiotensin II plays a pathogenic role in immune-mediated renal injury in mice. *J Clin Invest* 1999;103:627-635.
38. Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:881-900.
39. Luft FC. Angiotensin II, the AT2 receptor, and nuclear factor- κ B activation. *Kidney Int* 2002;61:2272-2273.
40. Rodriguez-Iturbe B, Pons H, Herrera-Acosta J, Johnson RJ. Role of immunocompetent cells in nonimmune renal diseases. *Kidney Int* 2001;59:1626-1640.
41. Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Guerrero CG, Tomino Y, Egido J. Angiotensin II, the immune system and renal diseases: another road for RAS? *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:1423-1426.
42. Quiroz Y, Pons H, Gordon KL. Mycophenolate mofetil prevents salt-sensitive hypertension resulting from nitric oxide synthesis inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;281:F38-F47.

43. Rodriguez-Iturbe B, Pons H, Quiroz Y. Mycophenolate mofetil prevents salt-sensitive hypertension resulting from angiotensin II exposure. *Kidney Int* 2001;59:2222-2232.
44. Rodriguez-Iturbe B, Quiroz Y, Nava M. Reduction of renal immune cell infiltration results in blood pressure control in genetically hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;282:F191-F201.
45. Muller DN, Shagdarsuren E, Park JK. Immunosuppressive treatment protects against angiotensin II-induced renal damage. *Am J Pathol* 2002;161:1679-1693.
46. Miyasaki M, Takai S. Tissue angiotensin II generating system by angiotensin-converting enzyme and chymase. *J Pharmacol Sci* 2006;100:391-397.
47. Miyasaki M, Okunishi H, Okamura T, Toda N. Elevated vascular angiotensin converting enzyme in chronic two-kidney, one clip hypertension in the dog. *J Hypertens* 1987;5:155-160.
48. Freedman DS, Khan LK, Serdula MK, Galuska DA, Dietz WH. Trends and correlates of class 3 obesity in the United States from 1990 through 2000. *JAMA* 2002;288:1758-1761.
49. Thompson D, Edelsberg J, Colditz GA, Bird AP, Oster G. Lifetime health and economic consequences of obesity. *Arch Intern Med* 1999;159:2177-2183.

50. Sharma AM. Is there a rationale for angiotensin blockade in the management of obesity hypertension? *Hypertension* 2004;44:12-19.
51. Meigs JB. Epidemiology of the insulin resistance syndrome. *Curr Diab Rep* 2003;3:73-79.
52. Rahmouni K, Correia MLG, Haynes WG, Mark AL. Obesity-associated hypertension: new insights into mechanisms. *Hypertension* 2005;45:9-14.
53. McVeigh GE, Cohn JN. Endothelial dysfunction and the metabolic syndrome. *Curr Diab Rep* 2003;3:87-92.
54. Rowley K, O'Dea K, Best JD. Association of albuminuria and the metabolic syndrome. *Curr Diab Rep* 2003;3:80-86.
55. Haffner S, Taegtmeier H. Epidemic obesity and the metabolic syndrome. *Circulation* 2003;108:1541-1545.
56. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2001;24:683-689.
57. Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM. NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. *Diabetes* 2003;52:1210-1214.

58. Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, for the conference participants. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on Scientific issues related to definition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:E-13-E-18.
59. Vitarius JA. The metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Mount Sinai J Med* 2005;72:257-262.
60. Wilson PW, Grundy SM. The metabolic syndrome: practical guide to origins and treatment: Part I. *Circulation* 2003;108:1422-1424.
61. Wilson PW. Estimating cardiovascular disease risk and the metabolic syndrome: a Framingham view. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2004;33:467-481.
62. Reilly MP, Rader DJ. The metabolic syndrome: more than the sum of its parts? *Circulation* 2003;108:1546-1551.
63. Hauner H. Insulin resistance and the metabolic syndrome – a challenge of the new millennium. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:S-25-S29.
64. Kassab S, Kato T, Wilkins FC, Chen R, Hall JE, Granger JP. Renal denervation attenuates the sodium retention and hypertension associated with obesity. *Hypertension* 1995;25:893-897.

65. Carlson SH, Shelton J, White CR, Wyss JM. Elevated sympathetic activity contributes to hypertension and salt sensitivity in diabetic obese Zucker rats. *Hypertension* 2000;35:403-408.
66. Hall JE. The kidney, hypertension, and obesity. *Hypertension* 2003;41:625-633.
67. Hall JE, Hildebrandt DA, Kuo J. Obesity hypertension.: role of leptin and sympathetic nervous system. *Am J Hypertens* 2001;14:103S-115S.
68. Mark AL, Correia M, Morgan DA, Shaffer RA, Haynes WG. State-of-the-art-lecture: obesity-induced hypertension: new concepts from the emerging biology of obesity. *Hypertension* 1999;33:537-541.
69. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 2004;145:2273-2282.
70. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000;21:697-738.
71. Wiecek A, Kokot F, Chudek J, Adamczak M. The adipose tissue –a novel endocrine organ of interest to the nephrologist. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:191-195.

72. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endoc Metab* 2004;89:2548-2556.
73. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996;334:292-295.
74. Hirose H, Saito I, Tsujioka M, Mori M, Kawabe H, Saruta T. The obese gene product, leptin: possible role in obesity-related hypertension in adolescents. *J Hypertens* 1998;16:2007-2012.
75. Schorr U, Blaschke K, Turan S, Distler A, Sharma AM. Relationship between angiotensinogen, leptin and blood pressure levels in young normotensive men. *J Hypertens* 1998;16:1475-1480.
76. Kazumi T, Kawaguchi A, Kato J, Iwahashi M, Yoshino G. Fasting insulin and leptin serum levels are associated with systolic blood pressure independent of percentage body fat and body mass index. *J Hypertens* 1999;17:1451-1455.
77. Segal KR, Landt M, Klein S. Relationship between insulin sensitivity and plasma leptin concentration in lean and obese men. *Diabetes* 1996;45:988-991.
78. Eikelis N, Schlaich M, Aggarwal A, Kaye D, Esler M. Interactions between leptin and the human sympathetic nervous system. *Hypertension* 2003;41:1072-1079.

79. Unger RH. The physiology of cellular liporegulation. *Annu Rev Physiol* 2003;65:333-347.
80. DiBona GF. The sympathetic nervous system and hypertension: recent developments. *Hypertension* 2004;43:147-150.
81. Goossens GH, Blaak EE, Van Baak MA. Possible involvement of the adipose tissue renin-angiotensin system in the pathophysiology of obesity and obesity-related disorders. *Obes Rev* 2003;4:43-55.
82. Montani J-P, Antic V, Yang Z, Dulloo A. Pathways from obesity to hypertension: from the perspective of a vicious triangle. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26(supp 2):S28-38.
83. Gorzelniak K, Engeli S, Janke J, Luft FC, Sharma AM. Hormonal regulation of human adipose-tissue renin-angiotensin system: relationship to obesity and hypertension. *J Hypertens* 2002;20:965-973.
84. Karlsson C. Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3925-3929.
85. Price DA, Lansang MC, Osei SY, Fisher ND, Laffel LM, Hollenberg NK. Type 2 diabetes, obesity, and the renal response to blocking the renin system with irbesartan. *Diabet Med* 2002;19:858-861.

86. Ribstein J, du Cailar G, Mimran A. Combined renal effects of overweight and hypertension. *Hypertension* 1995;26:610-615.
87. Zhang R, Reisin E. Obesity-hypertension: the effects on cardiovascular and renal system. *Am J Hypertens* 2000;13:1308-1314.
88. Kambham N, Markowitz GS, Valeri AM, Lin J, D'Agati VD. Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic. *Kidney Int* 2001;59:1498-1509.
89. Kasiske BL, O'Donnell MP, Keane WF. The Zucker rat model of obesity, insulin resistance, hyperlipidemia, and renal injury. *Hypertension* 1992;19:1110-1115.
90. Martinez-Anso E, Lostao MP, Martinez JA. Immuno-histochemical localization of leptin in rat kidney. *Kidney Int* 1999;55:1129-1130.
91. Jackson EK, Li P. Human leptin has natriuretic activity in the rat. *Am J Physiol* 1997;272:F333-F338.
92. Jackson EK, Herzer WA. A comparison of the natriuretic/diuretic effects of rat vs human leptin in the rat. *Am J Physiol* 1999;277:F761-F765.
93. Han DC, Isono M, Chen S. Leptin stimulates type I collagen production in db/db mesangial cells. Glucose uptake and TGF- β type II receptor expression. *Kidney Int* 2001;59:1315-1323.

94. Wolf G, Hamann A, Han DC. Leptin stimulates proliferation and TGF-beta expression in renal glomerular endothelial cells: potential role in glomerulosclerosis. *Kidney Int* 1999;56:860-872.
95. Mogensen CE, Neldam S, Tikkanen I, Oren S, Viskoper R, Watts RW, et al. Randomised controlled trial of dual blockade of renin-angiotensin system in patients with hypertension, microalbuminuria, and non-insulin dependent diabetes: the candesartan and lisinopril microalbuminuria (CALM) study. *BMJ* 2000;321:1440-1444.
96. Pfeffer M, McMurray J, Leizorovicz A, Maggioni AP, Rouleau J-L, Van de Werf F, for the VALIANT Investigators. Valsartan in Acute Myocardial Infarction Trial (VALIANT): rationale and design. *Am Heart J* 2000;140:727-34.
97. Nakao N, Yoshimura A, Morita H, Takada M, Kayano T, Ideura T, et al. Combination treatment of angiotensin-II receptor blocker and angiotensin-converting-enzyme inhibitor in non-diabetic renal disease (COOPERATE): a randomised controlled trial. *Lancet* 2003;361:117-124.
98. McMurray JJV, Östergren J, Swedberg K, Granger CB, Held P, Michelson EL, et al, for the CHARM Investigators and Committees. *Lancet* 2003;362:767-771.

99. Andersen NH, Poulsen PL, Knudsen ST, Poulsen SH, Eiskjaer H, Hansen KW, et al. Long-term dual blockade with candesartan and lisinopril in hypertensive patients with diabetes. The CALM II study. *Diabetes Care* 2005;28:273-277.
100. Agarwal R. Add-on angiotensin receptor blockade with maximized ACE inhibition. *Kidney Int* 2001;59:2282-2290.
101. Wolf G, Ritz E. Combination therapy with ACE inhibitors and angiotensin II receptor blockers to halt progression of chronic renal disease: pathophysiology and indications. *Kidney Int* 2005;67:799-812.
102. Badyal DK, Lata H, Dadhich AP. Animal models of hypertension and effect of drugs. *Indian J Pharmacol* 2003;35:349-362.
103. Cardoso CVP. Leis referentes à experimentação animal no Brasil. Colégio Brasileiro de Experimentação em Animais (COBEA). Available in: <http://www.cobea.org.br>. Acessado em 03 de julho de 2004.
104. NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. a) DHEW Publication No. (NIH) 78-23, Revised 1978 and b) NIH Publication No. 85-23, Revised 1985: U.S. Department of Health, Education and Welfare.

105. Nunez E, Hosoya K, Susic D, Frohlich ED. Enalapril and losartan reduced cardiac mass and improved coronary hemodynamics in SHR. *Hypertension*. 1997;29:519-524.
106. Pazoki-Toroudi HR. The preventive effect of captopril or enalapril on reperfusion injury of the kidney of rats is independent of angiotensin II AT1 receptors. *Fundam Clin Pharmacol*. 2003;17:595-598.
107. West DB, York B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. *Am J Clin Nutr* 1998;67(suppl):505S–512S.
108. Levin BE, Hogan S, Sullivan AC. Initiation and perpetuation of obesity and obesity resistance in rats. *Am J Physiol* 1989;256,RR66-RR71.
109. Archer ZA, Rayner DV, Rozman J, Klingenspor M, Mercer JG. Normal distribution of body weight gain in male Sprague-Dawley rats fed a high-energy diet. *Obes. Res*. 2003;11:1376-1383.
110. Wang Y, Tong J, Tang R, Dong H, XU J. Inhibitory effects of ligustrazine, a modulator of thromboxane-prostacycline-nitric oxide balance, on renal injury in rats with passive Heyman nephritis. *Nephron Physiol* 2004;98:80-88.

111. Wallen WJ, Cserti C, Belanger MP, Wittnich C. Gender-differences in myocardial adaptation to afterload in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 2000;36:774-779.
112. Image processing and analysis in Java. Available in <http://www.rsb.info.nih.gov/ij>. Acessado em 11 de outubro de 2006.
113. Yao K, Sato H, Sonoda R, Ina Y, Suzuki K, Ohno T. Effects of benidipine and candesartan on kidney and vascular function in hypertensive Dahl rats. *Hypertens Res* 2003;26:569-576.
114. Mougnot N, Médiani O, Lechat P. Bisoprolol and hydrochlorothiazide effects on cardiovascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Res.* 2005;51:359-365.
115. Nagai M, Horikoshi K, Izumi T, Seki S, Taniguchi M, Taniguchi I, et al. Cardioprotective action of perindopril versus candesartan in renovascular hypertensive rats. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2004;18:353-362.
116. Okada T, Nagai M, Taniguchi I, Kuno M, Imamoto S, Seki S, et al. Combined treatment with valsartan and spironolactone prevents cardiovascular remodeling in renovascular hypertensive rats. *Int Heart J.* 2006;47:783-793.
117. Pollock DM, Derebail VK, Yamamoto T, Pollock JS. Combined effects of AT(1) and ET(A) receptor antagonists, candesartan, and A-

- 127722 in DOCA-salt hypertensive rats. *Gen Pharmacol.* 2000;34:337-342.
118. Cao Z, Dean R, Wu L. Role of angiotensin receptor subtypes in mesenteric vascular proliferation and hipertrophy. *Hypertension.* 1999;34:408-414.
119. Pitt B, Poole-Wilson PA, Segal R. Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial – the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *Lancet.* 2000;355:1582-1587.
120. Dickstein K, Kjekshus J and the OPTIMAAL Steering Committee. Effects of losartan and captopril on mortality and morbidity in high-risk patients after acute myocardial infarction: the OPTIMAAL randomised trial. *Lancet.* 2002;360:752-760.
121. Emanuelli C, Salis MB, Stacca T. Targeting kinin B1 receptor for therapeutic neovascularization. *Circulation* 2002;105:360-366.
122. Henrion D, Kubis N, Lévy B. Physiological and pathophysiological functions of the AT2 subtype receptor of angiotensin II: from large arteries to the microcirculation. *Hypertension.* 2001;38:1150-1157.
123. Munzenmaier DH, Greene AS. Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension.* 1996;27:760-765.

124. Hein L, Barsh GS, Pratt RE. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature* 1995;377:744-747.
125. Ichiki T, Labosky PA, Shiota C. Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature*. 1995;377:748-750.
126. Akishita M, Yamada H, Dzau VJ. Increased vasoconstrictor response of the mouse lacking angiotensin II type 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;261:345-349.
127. Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* 2002;359:995-1003.
128. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MIC, Lima FB. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006;50:216-229.
129. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005;365:1415-1428.
130. Beltowski J, Wojcicka G, Jamroz-Wisniewska A. Role of nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in the regulation of blood pressure by leptin in lean and obese rats. *Life Sci* 2006;79:63-71.

131. Francois H, Placier S, Flamant M, Tharaux PL, Chansel D, Dussaule JC, et al. Prevention of renal vascular and glomerular fibrosis by epidermal growth factor receptor inhibition. *FASEB J.* 2004;18:926-928.
132. Girardot D, Jover B, Moles JP, Deblois D, Moreau P. Chronic nitric oxide synthase inhibition prevents new coronary capillary generation. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;44:322-328.
133. Pereira LM, Almeida JR, Mandarim-de-Lacerda CA. Kidney adaptation in nitric oxide-deficient Wistar and spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 2004;74:1375-1386.
134. Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Lombardi D, Pritzl P, Floege J, et al. Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 1992;19:464-474.
135. Rizzoni D, Rodella L, Porteri E, Rezzani R, Sleiman I, Paiardi S, et al. Effects of losartan and enalapril at different doses on cardiac and renal interstitial matrix in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 2003;25:427-441.
136. Wolf G, Chen S, Han DC, Ziyadeh FN. Leptin and renal disease. *Am J Kidney Dis* 2002;39:1-11.
137. Gallego B, Arevalo, Flores O, Lopez-Novoa JM, Perez-Barriocanal F. Effect of chronic and progressive aortic constriction on renal

function and structure in rats. *Can J Physiol Pharmacol*
2001;79:601-607.