



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE – IMS
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS - SBFIS**

LILIANY SOUZA DE BRITO AMARAL

**EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE A FUNÇÃO, ESTRUTURA E O
PERFIL INFLAMATÓRIO RENAL EM RATAS OVARIETOMIZADAS**

**Vitória da Conquista
2011**

LILIANY SOUZA DE BRITO AMARAL

**EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE A FUNÇÃO, ESTRUTURA E O
PERFIL INFLAMATÓRIO RENAL EM RATAS OVARIETOMIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas/ Sociedade Brasileira de Fisiologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Telma de Jesus Soares
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Terezila Machado Coimbra
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP

**Vitória da Conquista
2011**

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira - UFBA

Amaral, Lilianny Souza de Brito

Efeitos da dieta hiperlipídica sobre a função, estrutura e o perfil inflamatório renal em ratas ovariectomizadas / Lilianny Souza de Brito Amaral - 2011.

94 f. : il.

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Telma de Jesus Soares, Prof^{fa}. Co-orientadora: Dr^a. Terezila Machado Coimbra.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2011.

1. Rim – Inflamação. 2. Rim – Fisiopatologia. 3. Pós-Menopausa – Metabolismo. 4. Obesidade Abdominal – Inflamação. I. Universidade Federal da Bahia. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. II. Título.

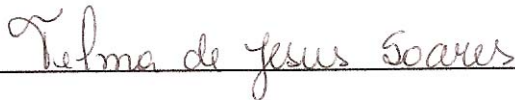
CDU – 616.61

LILIANY SOUZA DE BRITO AMARAL

**EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE A FUNÇÃO, ESTRUTURA E O
PERFIL INFLAMATÓRIO RENAL EM RATAS OVARIETOMIZADAS**

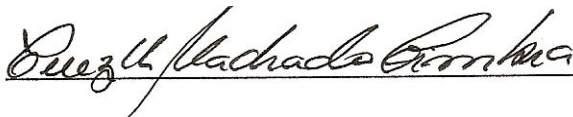
Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Fisiologia e aprovada em sua forma final pelo Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas – SBFIS da Universidade Federal da Bahia.

Vitória da Conquista – BA, 16 de fevereiro de 2011.



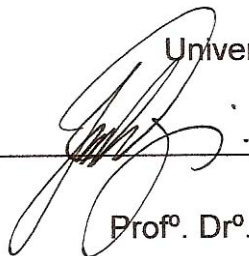
Prof^a. Dr^a. Telma de Jesus Soares

Universidade Federal da Bahia



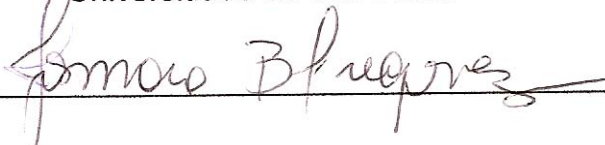
Prof^a. Dr^a. Terezila Machado Coimbra

Universidade de São Paulo



Prof^o. Dr^o. José Antunes Rodrigues

Universidade de São Paulo



Prof^a. Dr^a. Josmara Bartolomei Fregoneze

Universidade Federal da Bahia

À Deus, por Sua vida divina dada gratuitamente a nós.

Ao meu amado esposo, sempre amigo e companheiro, Marcelo, pelo amor, incentivo e muita compreensão.

Aos meus queridos filhos, Luiza e Lucas, por aquecer meu coração e fazer minha vida muito mais feliz todos os dias.

Aos meus queridos pais, pelo apoio, sabedoria, incentivo e grandes ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, por ter tornado possível meu ingresso no mestrado e pela força a mim concedida para superar os obstáculos e as saudades durante as longas viagens às Universidades Nucleadoras.

Ao meu querido esposo e aos meus pais pelo apoio, incentivo, compreensão e por terem tantas vezes assumido meus papéis quando precisei ausentar-me.

À prof^a Telma de Jesus Soares por ter partilhado seus conhecimentos com muita sabedoria, pela excelente orientação e incentivo constante na realização desse trabalho. Mas, também pela confiança, relacionamento saudável e terna amizade que cultivamos no decorrer desses dois anos. Muito obrigada, querida professora!

À prof^a Terezila Machado Coimbra pela preciosa contribuição na construção desse trabalho e pelo auxílio e acolhimento em seu laboratório para realização dos experimentos.

Ao prof^o José Rodrigues Antunes pela idealização do Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, possibilitando a propagação do conhecimento e da pesquisa na área de fisiologia.

À prof^a Amélia Cristina Mendes de Magalhães, por todo apoio, contribuições, sugestões, elaboração da composição da dieta hiperlipídica e pela amizade.

À prof^a Raquel de Souza Gestinari, pelo valioso treinamento e auxílio na padronização da biologia molecular. Também aos professores Mayse Amorim Mendonça e Lucas Miranda Marques pelo apoio e sugestões.

Às professoras Najara de Oliveira Belo e Regiane Yatsuda pelas contribuições na elaboração e correções do projeto e no desenvolvimento desse trabalho.

À prof^a Josmara Bartolomei Fregoneze pela colaboração no fornecimento dos ratos do Biotério Setorial do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia – ICS/UFBA.

À prof^a Cláudia Macedo e a Ana Paula Silva Pereira pela realização dos cortes histológicos e ao prof^o Robson Amaro pela colaboração e sugestões nos estudos histológicos.

Aos meus queridos colegas de laboratório Anna Carolina, Everaldo, Kelle, Samira, Daniela e Raimundo, pela amizade e convívio harmonioso.

Aos colegas de iniciação científica Jussara, Thiago Trindade, Welber, Fernanda, Jéssica, Luciano, Roberta, Grazielle, Gabriela, Gleisy, Thiago Henrique, Caroline e Clarisse pela valiosa ajuda nos experimentos.

À técnica do laboratório de Fisiologia Renal da FMRP/USP, Cleonice Giovanni Alves

da Silva, pelo auxílio na realização de alguns experimentos.

Ao técnico do Departamento de Fisiologia da FMRP-USP, Rubens Fernando de Melo, pelo apoio técnico.

À Heloísa e Éveling, alunas de pós-doutorado e doutorado respectivamente, do laboratório de Fisiologia Renal da FMRP/USP, pelo acolhimento e sugestões.

Aos professores e colegas das Universidades Nucleadoras da FMRP/USP, UFMG e UFRJ pela simpatia e acolhimento.

À Faculdade de Tecnologia e Ciências – FTC de Vitória da Conquista, por ter permitido meu afastamento temporário para a realização do mestrado.

À FAPESB, pela concessão de bolsa e à CAPES e CNPq pelo financiamento que possibilitaram a realização desse estudo.

*Não que, por nós mesmos, sejamos capazes de pensar
alguma coisa, como se partisse de nós; pelo contrário,
a nossa suficiência vem de Deus.
(2 Cor 3:5)*

AMARAL, Lilianny Souza de Brito. **Efeitos da Dieta Hiperlipídica sobre a Função, Estrutura e o Perfil Inflamatório Renal em Ratas Ovariectomizadas**. 94 f. il. 2011. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2011.

RESUMO

A obesidade é considerada um problema mundial de saúde pública, frequentemente associada à alterações metabólicas e cardiovasculares. No entanto, a sua relação com o desenvolvimento de lesões renais, principalmente no período da pós-menopausa, tem sido menos documentada e os mecanismos pouco elucidados. O objetivo desse estudo foi avaliar a função, estrutura e o perfil inflamatório renal em um modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica em ratas ovariectomizadas. Vinte e seis ratas Wistar foram utilizadas, com peso inicial de 150 a 200 g. As ratas foram submetidas à ovariectomia ou cirurgia sham com 10 semanas de idade e consumiram ração padronizada controle ou ração hiperlipídica (54,4% de gordura), por um período de 24 semanas. Os animais foram divididos em quatro grupos distintos: DCS – ratas submetidas à dieta controle e à cirurgia sham (n=6); DCO – ratas submetidas à dieta controle e ovariectomia (n=6); DLS – ratas submetidas à dieta hiperlipídica e à cirurgia sham (n=6); DLO – ratas submetidas à dieta hiperlipídica e ovariectomia (n=8). O peso e a pressão sanguínea foram determinados semanalmente e amostras de sangue e urina foram coletadas ao longo do período experimental para análise da função renal. Os animais foram sacrificados 24 semanas após o fornecimento das dietas, e os rins removidos para os estudos histológicos, morfométricos, de imunistoquímica e de biologia molecular. Os resultados demonstraram que as ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) apresentaram aumento do peso corporal médio, do tecido adiposo abdominal e da pressão arterial sistólica, quando comparados aos animais dos demais grupos experimentais. Esses animais apresentaram diminuição significativa da fração de excreção de sódio e aumento da excreção urinária de proteína e albumina. Não foram observadas alterações significativas da creatinina plasmática, da fração de excreção de potássio e do fluxo urinário entre os grupos experimentais. Foi observado um discreto aumento da taxa de filtração glomerular

nesses animais. Os estudos histológicos e morfométricos mostraram alterações no córtex renal das ratas DLO, caracterizadas por infiltrado de células inflamatórias, atrofia e dilatação tubular, fibrose intersticial, adesão dos capilares à cápsula de *Bowman*, glomeruloesclerose e aumento da área do tufo glomerular. A marcação túbulo-intersticial para vimentina foi mais pronunciada no córtex renal das ratas do grupo DLO quando comparada aos grupos DCS e DCO. Além disso, as ratas do grupo DLO apresentaram maior número de macrófagos, linfócitos, PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular), angiotensina II (AII), NF-kB (fator nuclear-kB) e aumento da expressão do RNAm de TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*) no tecido renal. Os resultados demonstraram que a dieta hiperlipídica em ratas ovariectomizadas promoveu alterações histológicas discretas e focais, acompanhadas de alterações na função renal e na pressão sanguínea, sugerindo que macrófagos, linfócitos, AII, NF-kB e TNF- α devem contribuir para esse processo.

Palavras-chaves: Rim. Inflamação. Fisiopatologia. Pós-Menopausa. Metabolismo. Obesidade Abdominal.

AMARAL, Lilianny Souza de Brito. **Effects of high-fat diet on the function, structure and profile renal inflammation in ovariectomized rats.** 94 pp. ill. 2011. Máster Dissertation – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2011.

ABSTRACT

Obesity is considered a global public health problem, often associated with increased metabolic and cardiovascular diseases. However, its relationship with the development of renal lesions, especially in decreased of ovarian hormones period, has been less documented. The mechanisms by which obesity promotes renal changes in the postmenopausal period are not fully elucidated. The aim of this study was to assess the renal function, structure and inflammatory profile in a model of high fat diet-induced obesity in ovariectomized rats. Twenty-six Wistar rats were used, initially weighing 150 to 200 g. The rats were submitted to ovariectomy or sham surgery at 10 weeks of age and fed with standard diet or high-fat diet (54.4% fat) for a period of 24 weeks. The animals were divided into four distinct groups: SSD- sham operated rats submitted to standard diet (n=6); OSD- ovariectomized rats submitted to standard diet (n=6); SHFD- sham-operated rats submitted to high-fat diet (n=6); OHFD- ovariectomized rats submitted to high-fat diet (n=8). Weight and blood pressure were measured weekly. In addition, blood samples and urine were collected during the experimental period for analysis of renal function. The animals were killed 24 weeks after the dietary treatment, at which time the kidneys were removed for histological, morphometric, immunohistochemical studies and molecular biology. The results showed that ovariectomized rats submitted to high-fat diet (OHFD) presented increases in body weight, as well as in visceral adipose tissue and systolic blood pressure when compared to the other groups. These animals showed decreased fractional excretion of sodium and increased urinary protein and albumin excretion. There were no significant changes in plasma creatinine, fractional excretion of potassium and urine flow between the experimental groups. It was observed slight increase in glomerular filtration rate in these animals. Histological and morphometric studies showed alterations in the renal cortex of OHFD rats, characterized by inflammatory cells infiltration, tubular dilatation and atrophy, interstitial fibrosis,

adhesion to Bowman's capsule and glomerulosclerosis and increased glomerular tuft area. Tubulointerstitial staining for vimentin was more pronounced in the renal cortex of OHFD group rats than in the SSD and OSD group rats. In addition, OHFD group rats presented greater numbers of macrophages, lymphocytes, PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), angiotensin II (AII) e NF- κ B (nuclear factor-kappa B) and increased TNF α mRNA expression in renal tissue. The results has demonstrated that high-fat diet in ovariectomized rats promoted slight and focal histologic alterations, followed by renal function alterations, suggesting that macrophages, lymphocytes, AII, NF- κ B and TNF- α should contribute to this process.

Keywords: Kidney. Inflammation. Pathophysiology. Postmenopausal. Metabolism. Obesity Abdominal.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|---|
| All | Angiotensina II |
| ANP | Peptídeo natriurético atrial |
| CTI | Compartimento túbulo-intersticial |
| DCO | Ratas submetidas à dieta controle e ovariectomia |
| DCS | Ratas submetidas à dieta controle e cirurgia sham |
| DLO | Ratas submetidas à dieta hiperlipídica e ovariectomia |
| DLS | Ratas submetidas à dieta hiperlipídica e cirurgia sham |
| dNTP | Desoxirribonucleotídeo trifosfatado |
| ECA | Enzima conversora da angiotensina |
| ERO | Espécies reativas de oxigênio |
| ER- α | receptor alfa do 17 β -estradiol |
| FENa ⁺ | Fração de excreção de sódio |
| FPR | Fluxo plasmático renal |
| GESF | Glomeruloesclerose segmentar focal |
| GESF-I | Glomeruloesclerose segmentar focal induzida idiopaticamente |
| GESF-O | Glomeruloesclerose segmentar focal induzida por obesidade |
| GH | Hormônio do crescimento |
| IGE | Índice Glomeruloesclerótico |
| I κ B | Subunidade inibitória |
| IL | Interleucina |
| iNOS | Óxido nítrico sintetase induzível |
| LDL | Lipoproteína de baixa densidade |
| LPL | Lipoproteína lípase |
| MCP-1 | Fator quimiotático para monócitos e macrófagos |
| NF κ -B | Fator de transcrição nuclear kappa B |
| NO | Óxido nítrico |
| NPr-C | Receptor do ANP do tipo C |
| PA | Pressão arterial |
| PAI-1 | Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 |
| PAS | Pressão arterial sistólica |

| | |
|---------------|--|
| PCNA | Antígeno nuclear de proliferação celular |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| RNAm | Ácido ribonucléico mensageiro |
| SHR | Ratos espontaneamente hipertensos |
| SNS | Sistema nervoso simpático |
| SRAA | Sistema renina angiotensina aldosterona |
| TFG | Taxa de filtração glomerular |
| TGF- β | <i>Transforming growth factor-β</i> |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral alfa |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Peso corporal médio de ratas submetidas à dieta controle e cirurgia sham (DCS), ratas submetidas à dieta controle e ovariectomia (DCO), ratas submetidas à dieta hiperlipídica e cirurgia sham (DLS) e de ratas submetidas à dieta hiperlipídica e ovariectomia (DLO), após 24 semanas de fornecimento das dietas. * $p < 0,05$ representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCO e DLS; *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo DCS..... 49
- Figura 2 – Tecido adiposo abdominal de uma rata submetida à dieta controle e cirurgia sham (DCS) (A e C) e de uma rata submetida à dieta hiperlipídica e ovariectomia (DLO) (B e D), após 24 semanas de fornecimento da dieta..... 50
- Figura 3 – Médias da pressão arterial sistólica (A), diastólica (B), média (C) e da frequência cardíaca (D) de ratas submetidas à dieta controle e cirurgia sham (DCS), ratas submetidas à dieta controle e ovariectomia (DCO), ratas submetidas à dieta hiperlipídica e cirurgia sham (DLS) e de ratas submetidas à dieta hiperlipídica e ovariectomia (DLO), após 24 semanas de fornecimento das dietas. * $p < 0,05$ representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCS e DLS; ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo DCS, DCO e DLS..... 51
- Figura 4 – Fração de excreção de sódio de ratas submetidas a dieta controle sham (DCS), ratas submetidas à dieta controle e ovariectomia (DCO), ratas submetidas a dieta hiperlipídica sham (DLS) e ratas submetidas a dieta hiperlipídica e ovariectomia (DLO). * $p < 0,05$ representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCS, DCO e DLS. 53
- Figura 5 – Escore para lesões túbulo-intersticiais de ratas submetidas a dieta controle sham (DCS), ratas submetidas à dieta controle ovariectomizadas (DCO), ratas submetidas a dieta hiperlipídica sham (DLS) e ratas submetidas a dieta hiperlipídica e ovariectomia (DLO). *** $p < 0,001$ representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCS, DCO e DLS. 54

- Figura 6 – Cortes histológicos renais corados com Tricômio de Masson de ratas DCS (A), DCO (B) e DLO (C e D). Notar em C e D a presença de infiltrado de células inflamatórias, atrofia e dilatação tubulares, fibrose e glomeruloesclerose (20 x).
..... 54
- Figura 7 – Índice glomeruloesclerótico analisado em 100 glomérulos de ratas submetidas a dieta controle sham (DCS), ratas submetidas à dieta controle ovariectomizadas (DCO), ratas submetidas a dieta hiperlipídica sham (DLS) e ratas submetidas a dieta hiperlipídica e ovariectomia (DLO). Dados são expressos como média±EPM. *** $p < 0,001$ representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCS, DCO e DLS. 55
- Figura 8 – Cortes histológicos de rins corados com Tricômio de Masson de ratas DCS (A), DCO (B), e DLO (C e D). Notar em C e D áreas de fibrose glomerular com redução da luz dos capilares glomerulares e adesão da cápsula de *Bowman* (40x). 55
- Figura 9 – Morfometria da área do tufo de glomérulos corticais (A) e corticomedulares (B) de ratas submetidas a dieta controle e cirurgia sham (DCS), ratas submetidas a dieta controle e ovariectomia (DCO), ratas submetidas à dieta hiperlipídica e cirurgia sham (DLS) e de ratas submetidas à dieta hiperlipídica e ovariectomia (DLO). Dados são expressos como média±EPM. * $p < 0,05$ representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCS e DCO. 56
- Figura 10 – Escore para vimentina no CTI do córtex renal de ratas submetidas à dieta controle sham (DCS), ratas submetidas à dieta controle ovariectomizadas (DCO), ratas submetidas à dieta hiperlipídica sham (DLS) e de ratas submetidas à dieta hiperlipídica ovariectomizadas (DLO). Dados são expressos como média±EPM. * $p < 0,05$ representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCS e DCO. 58
- Figura 11 – Imunolocalização para vimentina no córtex renal de ratas DCS (A), DCO (B) e DLO (C e D) (20 x). Notar que a reação é mais intensa em C e D e abrange marcação do CTI (seta), enquanto que em (A) e (B) a marcação de vimentina está confinada às células mesangiais, células musculares lisas e

- podócitos (seta). O padrão de marcação dos animais do grupo DLS foi semelhante ao dos animais do grupo DCO (foto não mostrada). 58
- Figura 12 – Número de células ED-1-positivas no CTI do córtex renal de ratas submetidas à dieta controle e sham (DCS), ratas submetidas à dieta controle e ovariectomia (DCO), ratas submetidas à dieta hiperlipídica e sham (DLS) e de ratas submetidas à dieta hiperlipídica e ovariectomia (DLO). Dados são expressos como média±EPM. ***p<0,001 representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCS, DCO e DLS. 59
- Figura 13 – Imunolocalização de células ED-1-positivas (macrofágos/monócitos) no CTI do córtex renal de ratas DCS (A), DCO (B) e DLO (C e D) (seta). Notar que o número de células ED-1 positivas é maior em C e D. (20 x). Os animais do grupo DLS apresentaram padrão normal semelhante ao encontrado no grupo DCO (foto não mostrada). 59
- Figura 14 – Número de linfócitos no CTI do córtex renal de ratas submetidas à dieta controle e sham (DCS), ratas submetidas à dieta controle e ovariectomia (DCO), ratas submetidas à dieta hiperlipídica e sham (DLS) e de ratas submetidas à dieta hiperlipídica e ovariectomia (DLO). Dados são expressos como média±EPM. **p<0,01 representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCS, DCO e DLS. 60
- Figura 15 – Imunolocalização de linfócitos no CTI do córtex renal de ratas DCS (A), DCO (B) e DLO (C) (seta). Notar que o número linfócitos é maior em C (20 x). Os animais do grupo DLS apresentaram padrão normal semelhante ao encontrado no grupo DCO (foto não mostrada). 60
- Figura 16 – Número de células PCNA positivas no CTI do córtex renal de ratas submetidas à dieta controle sham (DCS), ratas submetidas à dieta controle ovariectomizadas (DCO), ratas submetidas à dieta hiperlipídica sham (DLS) e de ratas submetidas a dieta hiperlipídica ovariectomizadas (DLO). Dados são expressos como média±EPM. **p<0,01 representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCS e DCO. 61

- Figura 17 – Imunolocalização de células PCNA positivas no CTI do córtex renal de ratas DCS (A), DCO (B) e DLO (C e D) (seta). Notar que o número de células PCNA positivas é maior em C e D (20x). Os animais do grupo DLS apresentaram padrão normal semelhante ao encontrado no grupo DCO (foto não mostrada). 61
- Figura 18 – Número de células NF-kB positivas no CTI do córtex renal de ratas submetidas à dieta controle sham (DCS), ratas submetidas à dieta controle ovariectomizadas (DCO), ratas submetidas à dieta hiperlipídica sham (DLS) e de ratas submetidas a dieta hiperlipídica ovariectomizadas (DLO). Dados são expressos como média±EPM. *p<0,05 representa diferença estatística significativa quando comparado ao grupo DLS; **p<0,01 quando comparado aos grupos DCS, DCO. 62
- Figura 19 - Imunolocalização de células NF-kB positivas no CTI do córtex renal de ratas DCS (A), DCO (B) e DLO (C) (20x) e (D) (40x) (seta). Notar que o número de células NF-kB positivas é maior em C e D. Os animais do grupo DLS apresentaram padrão normal semelhante ao encontrado no grupo DCO (foto não mostrada). 62
- Figura 20 – Número de células Angiotensina II positivas no CTI do córtex renal de ratas submetidas à dieta controle sham (DCS), ratas submetidas à dieta controle ovariectomizadas (DCO), ratas submetidas à dieta hiperlipídica sham (DLS) e de ratas submetidas a dieta hiperlipídica ovariectomizadas (DLO). Dados são expressos como média±EPM. **p<0,01 representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCS, DCO e DLS. 63
- Figura 21 - Imunolocalização de células All-positivas no CTI do córtex renal de ratas DCS (A), DCO (B) e DLO (C) (20x) e (D) (40x) (setas). Notar a marcação normal de All no aparelho justaglomerular em A e B e a marcação aumentada de células no CTI do córtex renal em C e D. Os animais do grupo DLS apresentaram padrão normal semelhante ao encontrado no grupo DCO (foto não mostrada). 63
- Figura 22 – Expressão gênica para TNF- α e controle interno β -actina no tecido renal de ratas submetidas a uma dieta controle e cirurgia sham (DCS) e de ratas

submetidas a dieta hiperlipídica e ovariectomia (DLO). Os dados são expressos como média±EPM. *p<0,05 representa diferença estatística significativa quando comparado ao grupo DCS..... 64

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Proporções dos ingredientes nas dietas experimentais controle (DC) e hiperlipídicas (DL)..... | 39 |
| Tabela 2 – Composição bromatológica das dietas experimentais controle (DC) e hiperlipídicas (DL)..... | 40 |
| Tabela 3 – Contribuição das frações de proteínas, carboidratos e gorduras no total da energia metabolizável nas dietas experimentais..... | 40 |
| Tabela 4 – Contribuição das frações de amido de milho, farelo de soja, sacarose e maltodextrina na composição dos carboidratos totais nas dietas experimentais. | 40 |
| Tabela 5 – Comparação do peso corporal (g), dos pesos dos tecidos adiposos abdominais (mg/pc), e ingestão calórica (Kcal/dia) entre os grupos DCS, DCO, DLS e DLO. | 50 |
| Tabela 6 – Pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média (mmHg) e frequência cardíaca (bpm) dos grupos DCS, DCO, DLS e DLO. | 52 |
| Tabela 7 – Parâmetros de função renal dos grupos experimentais DCS, DCO, DLS e DLO. | 52 |
| Tabela 8 – Parâmetros histológicos e morfométricos de ratas DCS, DCO, DLS e DLO. | 57 |
| Tabela 9 – Estudos imunoistoquímicos de ratas DCS, DCO, DLS E DLO..... | 57 |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 21 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 23 |
| 2.1 | OBESIDADE E RIM | 23 |
| 2.2 | MECANISMOS DE LESÃO RENAL ASSOCIADOS À OBESIDADE | 24 |
| 2.3 | OBESIDADE, RIM E ESTRÓGENOS | 31 |
| 3 | OBJETIVOS | 36 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL | 36 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 36 |
| 4 | HIPÓTESES | 37 |
| 5 | MATERIAL E MÉTODOS | 38 |
| 5.1 | ANIMAIS | 38 |
| 5.2 | PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS | 38 |
| 5.3 | DIETAS | 39 |
| 5.4 | PROCEDIMENTO CIRÚRGICO | 41 |
| 5.5 | DETERMINAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E DO PESO CORPORAL | 41 |
| 5.6 | ANÁLISE DA FUNÇÃO RENAL | 41 |
| 5.6.1 | Quantificação de creatinina nas amostras de sangue e de urina | 42 |
| 5.6.2 | Quantificação de Na ⁺ e K ⁺ nas amostras de sangue e de urina | 42 |
| 5.6.3 | Quantificação da proteína urinária | 43 |
| 5.6.4 | Quantificação da Albumina Urinária | 43 |
| 5.7 | ANÁLISE HISTOLÓGICA RENAL | 43 |
| 5.7.1 | Lesões Túbulo-intersticiais | 44 |
| 5.7.2 | Glomeruloesclerose | 44 |
| 5.8 | ANÁLISE MORFOMÉTRICA GLOMERULAR | 44 |

| | |
|--|-----------|
| 5.9 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA PARA AII, NF-kB, LINFÓCITOS, MACRÓFAGOS, VIMENTINA E PCNA | 44 |
| 5.10 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA RENAL DE TNF-A E IL-6..... | 45 |
| 5.10.1 Extração de RNAm | 45 |
| 5.10.2 Transcrição Reversa..... | 46 |
| 5.10.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) | 46 |
| 5.10.4 Eletroforese..... | 47 |
| 5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 48 |
| 6 RESULTADOS | 49 |
| 6.1 PESO CORPORAL E TECIDO ADIPOSEO VISCERAL | 49 |
| 6.2 PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA | 50 |
| 6.3 FUNÇÃO RENAL..... | 52 |
| 6.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO RIM..... | 53 |
| 6.5 EXPRESSÃO RENAL DE AII, NF-kB E MARCADORES DE MACRÓFAGOS, LINFÓCITOS, VIMENTINA E PCNA | 57 |
| 6.6 EXPRESSÃO GÊNICA DE TNF-A E IL-6 | 63 |
| 7 DISCUSSÃO..... | 65 |
| 7.1 LIMITAÇÕES | 79 |
| 8 CONCLUSÃO | 80 |
| REFERÊNCIAS..... | 81 |

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é definida como um índice de massa corpórea (IMC) igual ou superior a 30 e tem sido considerada uma doença altamente prevalente e de elevada morbidade e mortalidade, principalmente nos países industrializados ou em fase de industrialização (FLEGAL et al., 2010). Dentre os fatores que promovem a obesidade ressaltam-se as alterações hormonais, os fatores hereditários e as mudanças no estilo de vida e nos hábitos alimentares. As mudanças nos hábitos alimentares e a atividade física representam a combinação mais efetiva para o controle de peso, sendo que o consumo de uma dieta com alto teores de gorduras e o sedentarismo podem explicar o excesso de acúmulo da gordura corporal em grandes proporções na população mundial (SOWERS, 1998).

Existem evidências indicando que o padrão de acúmulo de tecido adiposo abdominal está mais correlacionado aos problemas de saúde do que o nível de adiposidade global, devido ao fato dos adipócitos omentais e mesentéricos serem metabolicamente mais ativos do que aqueles que compõem o tecido adiposo subcutâneo, secretando uma grande variedade de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio (ERO) (DUBEY; JACKSON, 2001). A maior parte das complicações atribuídas à obesidade está relacionada aos riscos cardiovasculares, particularmente presentes na obesidade. O padrão de distribuição da gordura corporal visceral está associado ao aumento de alterações metabólicas, hormonais, inflamatórias e hemodinâmicas, capazes de provocar maior acometimento sobre a microvasculatura e sobre os órgãos-alvo (SOWERS, 1998; SHI; CREGG, 2009; BROWN; CLEGG, 2010).

A obesidade é largamente reconhecida por iniciar uma série de alterações fisiopatológicas, incluindo intolerância à glicose, dislipidemia, hipertensão arterial e doenças cardiovasculares, contudo, os seus efeitos sobre os rins têm sido menos documentado (HALL et al., 2002; DO CARMO et al., 2009). Os mecanismos pelos quais a obesidade promove lesões renais não estão completamente elucidados. As alterações hemodinâmicas, metabólicas e inflamatórias presentes na obesidade parecem desempenhar função importante na indução e progressão de lesões renais (DO CARMO et al., 2009).

O aumento da pressão arterial relacionado à obesidade está associado ao impedimento da natriurese pressórica, o qual é principalmente causado pelo aumento da reabsorção tubular de sódio e aumento do líquido extracelular (HALL, 1997; HALL et al., 2003; DO CARMO et al., 2009). Vários mecanismos podem estar envolvidos contribuindo para a reabsorção aumentada de sódio na obesidade, dentre eles destacam-se: aumento da atividade do sistema nervoso simpático (SNS), ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), aumento do clearance do peptídeo natriurético atrial (ANP) pelos adipócitos e hiperinsulinemia (HALL, 1997; HENEGAR et al., 2001).

O período pós-menopausal está frequentemente associado a alterações do perfil hemodinâmico e da função endotelial, alterações renais, distúrbios no metabolismo energético, estresse oxidativo, obesidade e dislipidemias sendo estes sintomas indicativos de que a drástica redução na produção de estrógeno pode acelerar o desenvolvimento de processos degenerativos (WISE et al., 1999). Dentre essas alterações, destacam-se as doenças cardiovasculares e a obesidade por serem considerados fatores importantes para a mortalidade na população de mulheres no período pós-menopausa. O aumento do peso corporal no período da pós-menopausa é acompanhado por mudanças na distribuição dos depósitos de tecido adiposo, sendo que o padrão de acúmulo abdominal é prevalente nesse período (DUBEY; JACKSON, 2001).

As alterações renais induzidas pelo excesso de ganho de peso incluem hiperfiltração glomerular, espessamento da membrana basal glomerular, expansão da matriz glomerular, alargamento da cápsula de *Bowmann*, hipertrofia glomerular, albuminúria, glomeruloesclerose, lesão de podócitos e do compartimento túbulo-intersticial (COIMBRA et al., 2000; HENEGAR et al., 2001; HALL, 2003; RUTKOWSKI et al., 2006). Embora a associação entre obesidade e doença renal tenha sido estabelecida, os mecanismos envolvidos ainda não estão completamente elucidados, principalmente no período de diminuição dos hormônios ovarianos, característico da pós-menopausa. Portanto, dentre os objetivos desse estudo destacam-se o desenvolvimento de um modelo experimental de obesidade induzida por uma dieta hiperlipídica, que possa ser utilizado para o estudo dos efeitos de uma dieta rica em gordura sobre os parâmetros de função e estrutura renal e sobre o perfil inflamatório em ratas ovariectomizadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Obesidade e Rim

A prevalência da obesidade tem aumentado em índices alarmantes em todo o mundo, não somente em países industrializados, mas também em nações em fase de industrialização (FLEGAL et al., 2002). No Brasil, o percentual de pessoas com excesso de peso e obesas aumentou de maneira significativa em todas as regiões do país e em todas as faixas etárias. Dados do IBGE demonstraram que o excesso de peso em homens adultos passou de 18,5% para 50,1%, e nas mulheres de 28,7% para 48% nos anos 2008-2009. O sobrepeso atingiu mais de 30% das crianças entre 5 e 9 anos de idade. Entre os meninos e rapazes de 10 a 19 anos de idade, o excesso de peso passou de 3,7% (1974-1975) para 21,7% (2008-2009), já entre as meninas e moças entre 10 a 19 anos de idade, o aumento foi de 7,6% para 19,4% nos respectivos anos (BRASIL, 2011)

O excesso de gordura corporal está relacionado ao aparecimento de inúmeras disfunções metabólicas e funcionais, tornando-se um problema atual de saúde pública (SOWERS, 1998; ZIMMET et al., 1999). Dentre os fatores que promovem a obesidade ressaltam-se as alterações hormonais, os fatores hereditários e as mudanças no estilo de vida e nos hábitos alimentares, sendo que esses dois últimos fatores representam a combinação mais efetiva para o controle de peso, podendo explicar o excesso de acúmulo da gordura corporal em grandes proporções na população mundial (SOWERS, 1998).

A maior parte das complicações atribuídas à obesidade está relacionada aos riscos cardiovasculares, particularmente presentes nos indivíduos obesos com padrão de distribuição visceral da gordura corporal, o qual está associado ao aumento de alterações metabólicas, hormonais, inflamatórias e hemodinâmicas, capazes de provocar maior acometimento sobre a microvasculatura e sobre os órgãos-alvo (SOWERS, 1998; SHI; CREGG, 2009; BROWN; CLEGG, 2010). A obesidade constitui um importante indicador de risco, tanto metabólico quanto cardiovascular, e está frequentemente associada à síndrome metabólica (SOWERS, 2003). A síndrome metabólica é a associação de diversas doenças à obesidade, incluindo

alterações do metabolismo de glicose (resistência à insulina, intolerância à glicose), aumento da pressão arterial e dislipidemia (ZIMMET et al., 1999).

Embora a obesidade seja largamente reconhecida como um fator que contribui para essa série de alterações fisiopatológicas, seu papel na iniciação e progressão da doença renal é menos documentado (HALL et al., 2002; ABRASS, 2004; DO CARMO et al., 2009). O interesse em estudar a relação entre obesidade e alterações renais tem aumentado nos últimos anos devido à frequente associação da obesidade com o diabetes e a hipertensão, causas principais de insuficiência renal crônica (CHEN, et al., 2004; KRAMER, 2006). Contudo, existem evidências que a obesidade também pode ser um fator de risco independente para o desenvolvimento de lesões renais, mesmo na ausência de doença hipertensiva ou diabética (KAMBHAM et al., 2001; FOX et al., 2004), e o seu efeito na iniciação e progressão da doença renal tem sido recentemente reconhecido (SAXENA; CHOPRA, 2004; DO CARMO et al., 2009).

Os primeiros estudos demonstrando a relação direta entre obesidade e lesão renal foram realizados por Weisinger et al. (1974), os quais sugeriram que a obesidade foi a causa direta de lesão renal, caracterizadas por proteinúria, hipertrofia glomerular e glomeruloesclerose, em indivíduos com obesidade mórbida. Contudo, somente a partir dos estudos realizados por kambham et al., (2001) pôde-se considerar a obesidade como principal fator de indução de lesões renais. Esses autores publicaram uma extensa revisão de 6.618 biópsias renais realizadas entre 1986 e 2000. Os resultados demonstraram aumento de dez vezes na incidência de glomerulopatia associada à obesidade ao compararem as biópsias renais do ano de 1986 com as biópsias do ano de 2000. As principais alterações encontradas foram hipertrofia glomerular, glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) e aumento da celularidade da matriz mesangial. Essas alterações foram associadas à obesidade, independentemente de doença hipertensiva ou diabética (GUEDES et al., 2010). A relação entre obesidade e doença renal tem sido estabelecida, mas os mecanismos envolvidos ainda não estão completamente elucidados, principalmente no período de diminuição dos hormônios ovarianos.

2.2 Mecanismos de Lesão Renal Associados à Obesidade

A obesidade está frequentemente associada a algumas alterações da função e estrutura renal, as quais são semelhantes às aquelas verificadas na nefropatia diabética (DO CARMO et al., 2009). O excesso de ganho de peso pode promover hiperfiltração glomerular, aumento da reabsorção de sódio, espessamento da membrana basal glomerular, expansão da matriz glomerular, alargamento da cápsula de *Bowman*, albuminúria, glomeruloesclerose, lesão de podócitos e do compartimento túbulo-intersticial (CTI) (COIMBRA et al., 2000; HENEGAR et al., 2001; HALL, 2003; RUTKOWSKI et al., 2006; DO CARMO et al., 2009). Contudo, os mecanismos envolvidos na indução e progressão das lesões renais promovidas pela obesidade ainda não estão completamente elucidados. Vários fatores hemodinâmicos, metabólicos e inflamatórios podem estar envolvidos na nefropatia associada à obesidade. Alguns desses fatores incluem aumento da pressão arterial, resistência à insulina, hiperinsulenemia, hiperglicemia, hiperleptinemia, dislipidemia, estresse oxidativo, angiotensina II (AII) e inflamação (DUNN et al., 1986; DENGEL et al., 1996; FUJIWARA et al., 2000; NODA et al., 2001; ABRASS, 2006; DO CARMO et al., 2009).

Na obesidade ocorre aumento das necessidades metabólicas basais e acúmulo de produtos do metabolismo celular. Conseqüentemente, a obesidade é acompanhada de alterações hemodinâmicas caracterizadas por aumento do fluxo sanguíneo regional, do débito cardíaco e da pressão arterial sistêmica (HALL, 2003). Parte do aumento do débito cardíaco é destinada a órgãos não-adiposos como o coração e os rins. O aumento do débito cardíaco para os rins resulta em vasodilatação da arteríola aferente, aumento do fluxo sanguíneo renal e hiperfiltração glomerular (CHAGNAC et al., 2000; HALL et al., 2003). Como consequência, ocorre aumento da reabsorção tubular de sódio, evento que ativa o “*feedback* da mádula densa”. Segundo essa hipótese, a maior reabsorção de sódio nos segmentos proximais do néfron reduz a oferta de cloreto de sódio ao túbulo distal, o que causa a vasodilatação da arteríola aferente e aumento da atividade do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), promovendo o balanço positivo de sódio e o estresse glomerular (HALL et al., 2003).

O rim é um órgão fundamental para o controle da pressão arterial, contudo os mecanismos envolvidos na hipertensão associada à obesidade não estão completamente elucidados. O aumento da pressão sanguínea associada à

obesidade é acompanhado pelo impedimento da natriurese pressórica (HALL et al., 2003). Embora os mecanismos envolvidos nas alterações da natriurese pressórica observadas na hipertensão ainda não estejam totalmente esclarecidos, evidências sugerem que a obesidade e o sobrepeso podem ter maior importância nesse processo (ROCCHINI, 1990; HALL, 2003). Nos indivíduos obesos, essa alteração na natriurese pressórica se deve inicialmente ao aumento da reabsorção de sódio, a qual pode ser explicada, em parte, pelo aumento da taxa de filtração glomerular (TFG) superior ao aumento do fluxo plasmático renal (FPR), resultando em maior fração de filtração (FF) (CHAGNAC et al., 2008). Essa hiperfiltração, quando acompanhada por aumento da FF, resulta em aumento da concentração de proteínas na circulação pós-glomerular em relação a circulação sistêmica e, conseqüentemente, elevação da pressão oncótica nos capilares peritubulares. Dessa forma, como a pressão hidrostática cai ao longo da arteríola eferente, a elevação da pressão oncótica nos capilares peritubulares gera um gradiente de pressão transcapilar favorável para a reabsorção de sódio e água do lúmen tubular proximal para o espaço intercelular e deste para os capilares peritubulares, culminando, dessa forma, em retenção de sódio e aumento do líquido extracelular (CHAGNAC et al., 2008). Além disso, na obesidade prolongada, a vasodilatação renal e a ativação neurohumoral, juntamente com outras alterações metabólicas, podem provocar glomeruloesclerose e perda de néfrons funcionantes, reforçando o distúrbio da natriurese pressórica, culminando na forma mais severa de hipertensão arterial (HALL, 1997; KURUKULASURIYA et al., 2008).

A retenção de sódio e o líquido extracelular estão aumentados na obesidade induzida pela dieta em animais experimentais (HALL et al., 1997) e em humanos obesos (MESSERLI et al., 1981). Estudos têm demonstrado que uma dieta rica em gordura consistentemente resulta em aumento da reabsorção de sódio em indivíduos obesos, e que a perda de peso promove excreção urinária de sódio, sugerindo associação direta entre obesidade e retenção de sódio (KASSAB et al., 1995; HALL; BRANDS; HENEGAR, 1999; STERN et al., 2001). No entanto, as causas do aumento da reabsorção tubular de sódio associado à obesidade não estão completamente elucidadas, mas podem ser devido a: 1) ativação SRAA; 2) ativação do sistema nervoso simpático (SNS); 3) alterações plasmáticas do peptídeo natriurético atrial (ANP); 4) compressão física dos rins causada pelo aumento do

tecido adiposo; e 5) hiperinsulinemia (HALL, 2003; SARAFIDIS; RUILOPE, 2006; SARZANI et al., 2008; KOTSIS et al., 2010; HALL et al., 2010). Todos esses fatores podem contribuir para o aumento da reabsorção de sódio e do líquido extracelular, contribuindo, desta maneira, para a hipertensão associada à obesidade.

Embora o excesso de peso corporal esteja associado à retenção de sódio e a expansão do líquido extracelular, indivíduos obesos frequentemente apresentam aumento da atividade do SRAA. Esse sistema influencia o balanço de sódio, o volume do líquido extracelular e a resistência vascular e sistêmica (SCHORR et al., 1998; ENGELI; SHARMA, 2001). Os estudos realizados em cães alimentados com dieta rica em gordura demonstraram que o tratamento com antagonista da AII ou inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) promoveu diminuição da retenção de sódio e da expansão do volume, e conseqüentemente redução da pressão arterial nesses animais (ROBLES et al., 1993; HALL et al., 1997). A ativação desse sistema pode contribuir para a lesão glomerular e perda de néfrons associada à obesidade devido ao aumento da constrição das arteríolas eferentes pela AII (HALL, 2003). O aumento dos níveis plasmáticos de aldosterona tem sido também relatado na obesidade (SCHORR et al., 1998; ENGELI; SHARMA, 2001). Rogerio et al., (2004) demonstraram que o uso do antagonista da aldosterona atenuou significativamente a hiperfiltração glomerular, a retenção de sódio e a hipertensão associada a obesidade induzida por dieta hipercalórica.

Existem evidências, tanto em animais experimentais quanto em humanos, que o ganho de peso corporal está associado com o aumento da atividade simpática, principalmente nos rins (KASSAB et al., 1995; WOFFORD et al., 1998; HALL et al., 1993; HALL, 2003). A atividade simpática aumentada parece elevar a pressão sanguínea principalmente através dos nervos simpáticos renais, uma vez que a desnervação diminui a retenção de sódio e atenua o aumento na pressão sanguínea associada à obesidade induzida pela dieta rica em gordura em cães (KASSAB et al., 1995). Outros estudos demonstraram que o bloqueio combinado das vias alfa e beta adrenérgicas atenua marcadamente o aumento na pressão sanguínea durante o desenvolvimento da obesidade em cães induzida pela dieta (HALL et al., 1993), e em humanos essa redução na pressão foi mais evidenciada em indivíduos hipertensos obesos quando comparados aos não obesos (WOFFORD et al., 1998).

Têm sido demonstrado também a participação do sistema de peptídeos natriuréticos na gênese desta patologia (DESSI-FULGHERI et al., 1998; WANG et al., 2004). A obesidade está associada aos baixos níveis de peptídeos natriuréticos que apresentam funções importantes na homeostase de sódio e água e na regulação do tônus vascular (WANG, et al., 2004). Os receptores do tipo C, responsáveis pelo *clearance* dos peptídeos natriuréticos, são abundantes nos tecidos adiposos, sugerindo que os adipócitos participem da remoção desses peptídeos da circulação, contribuindo dessa forma para a retenção de sódio e aumento da pressão sanguínea (DESSI-FULGHERI, 1998).

Outro fator que pode contribuir para o aumento da pressão arterial induzido pela obesidade é a compressão renal, provocada pelas alterações histológicas da medula renal e pelo acúmulo de tecido adiposo (HALL, 2003). O aumento de células intersticiais, o acúmulo de matriz extracelular entre os túbulos na medula renal, a infiltração de gordura subcapsular renal, o aumento da gordura que circunda os rins e a elevação da pressão abdominal podem aumentar a pressão intersticial e alterar as forças físicas intrarrenais, reduzindo o fluxo sanguíneo dos vasos retos adjacentes ao *loop* da alça de Henle. A redução do fluxo sanguíneo medular pode contribuir para maior reabsorção de sódio, culminando em aumento do líquido extracelular e, conseqüentemente, aumento da pressão sanguínea (HALL, 2003; KOTSIS et al., 2010).

Além dos mecanismos hemodinâmicos, as próprias alterações metabólicas características da obesidade parecem promover um impacto negativo sobre os rins. As principais alterações metabólicas associadas à lesão renal, em indivíduos obesos ou em animais experimentais, incluem a resistência à insulina, hiperinsulinemia, aumento da atividade glicocorticóide, ativação exacerbada da AII e a hiperleptinemia (HENEGAR et al., 2001; PAPAFRAGKAKI; TOLIS, 2005; FUJITA, 2008).

A hiperinsulinemia pode causar dano renal por aumentar a atividade simpática, o estresse oxidativo, potencializar a resposta vascular à AII e reduzir a atividade do ANP. A insulina pode também atuar diretamente nos rins promovendo aumento da reabsorção de sódio (SARAFIDIS; RUILOPE, 2006; FUJITA, 2008). Em um modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos, foi demonstrado que os animais obesos apresentaram correlação positiva entre alterações metabólicas,

tais como hiperinsulinemia, hiperglicemia e hipertrigliceridemia, e alterações da estrutura e função renal caracterizadas por infiltração túbulo-intersticial de macrófagos, expansão mesangial, expressão aumentada de colágeno tipo IV nos glomérulos, albuminúria e retenção de sódio (DEJI et al., 2009). Outro estudo recente, utilizando ratos espontaneamente hipertensos (SHR) com obesidade induzida por dieta rica em gordura, demonstrou que apesar dos níveis pressóricos, animais com hiperglicemia, hiperleptinemia e hiperinsulinemia apresentaram maior grau de alterações histológicas renais quando comparados aos seus respectivos controles (OHTOMO et al., 2010). Chen et al., (2010) demonstraram correlação positiva entre os níveis de colesterol total e os de insulina com o aumento da excreção urinária de proteínas. Todas essas evidências reforçam a hipótese de que o perfil metabólico pode contribuir para o desenvolvimento das alterações na estrutura e função renal características da obesidade tanto em humanos quanto em animais experimentais.

Outros fatores podem também contribuir para as alterações renais induzidas pela obesidade, tais como estresse oxidativo, produção de citocinas pró-inflamatórias, infiltrado de células inflamatórias, fatores de crescimento celular e All, os quais, juntamente com outros mecanismos, podem promover tanto o dano vascular sistêmico quanto as lesões do parênquima renal, participando da patogênese da lesão renal induzida pela obesidade (HENEGAR et al., 2001; WAHBA; MAK, 2007; PÉREZ-TORRES et al., 2009; DEJI et al., 2009).

A obesidade e hipertensão são caracterizadas pela presença de infiltrado intersticial de macrófagos e monócitos e produção anormal de citocinas pró-inflamatórias no tecido renal (OHTOMO et al., 2010; RODRÍGUEZ-ITURBE et al., 2004). Os macrófagos são células potencialmente capazes de produzir vários produtos citotóxicos, incluindo espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio, quimiocinas, citocinas e All, os quais podem promover e intensificar a lesão tecidual (RODRÍGUEZ-ITURBE et al., 2004; NAVA et al., 2002). As citocinas, por sua vez, podem atuar induzindo proliferação celular e modificação de seus fenótipos, contribuindo para as alterações da estrutura e função renal (OHTOMO et al., 2010). Além disso, a própria lesão das células tubulares pode resultar em liberação de quimiocinas e citocinas, recrutamento de macrófagos e consequente estimulação dos fibroblastos, os quais estão diretamente envolvidos no processo de fibrose

intersticial (RIYUZO; SOARES, 2002).

A presença de linfócitos parece estar relacionada também com a modulação da resposta inflamatória e pode atuar intensificando a lesão tecidual. Os linfócitos T são capazes de sintetizar TGF- β (*transforming growth factor- β*), citocina classicamente conhecida por estimular a produção de colágeno pelos fibroblastos e inibir a produção de enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular (PETERS et al., 2004; STRUTZ; NEILSON, 1994). Foi também demonstrado que a infiltração túbulo-intersticial de linfócitos e macrófagos está associada com a geração de ERO e All em alguns modelos experimentais de lesão renal (RANGAN et al., 1999; NAVA et al., 2003; SOARES et al., 2006). A utilização de agentes anti-inflamatórios e antioxidantes reduz o infiltrado inflamatório e promove a melhora ou prevenção da hipertensão (MULLER et al., 2000; TIAN et al., 2005).

Estudos com modelos experimentais evidenciam que a inflamação renal participa da patogênese da hipertensão devido à retenção de sódio causada pelo acúmulo de células produtoras de All no tecido renal (RODRÍGUEZ-ITURBE et al., 2002b). Tanto a enzima conversora da angiotensina, quanto a própria All, são expressas por linfócitos T e macrófagos nos tecidos renais em modelos experimentais de hipertensão, e o acúmulo dessas células parece ser a razão primária para a retenção de sódio (COSTEROUSSE et al., 1993; RODRÍGUEZ-ITURBE et al., 2002a). O aumento da produção de All renal promove diminuição da TFG, com consequente redução da carga de filtração de sódio; aumento da reabsorção tubular de sódio; impedimento da natriurese pressórica; sinalização em cascata de fatores de transcrição inflamatórios e produção de superóxido mediada pela estimulação da NAD(P)H oxidase (RODRÍGUEZ-ITURBE et al., 2004).

Todos esses fatores em conjunto podem contribuir potencialmente para a retenção de sódio e consequente aumento da pressão sanguínea e para perda progressiva da função renal. Portanto, o processo de lesão renal pode ser resultante de uma complexa relação entre o infiltrado de células imunes, lesão de células tubulares e estresse oxidativo, resultando na produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento celular, os quais podem estar envolvidos na patogênese da lesão renal induzida pela obesidade.

Existem evidências que mostram a participação do NF- κ B (fator nuclear kapa B) na patogênese de várias doenças renais. (BARNES; KARIN, 1997; CHEN et al., 1999; RANGAN et al., 1999; GUIJARRO; EGIDO, 2001). O NF- κ B controla a transcrição de muitos genes celulares que regulam a resposta inflamatória, a sobrevivência e a proliferação celular. Esse fator está localizado no citosol como um dímero de componentes protéicos (p50/p65) ligado a uma subunidade inibitória (I κ B) que o mantém inativo no citoplasma (MASSY et al., 1999; GUIJARRO; EGIDO, 2001; BIRBACH et al., 2002).

O NF- κ B pode ser ativado por diferentes fatores, incluindo AII, endotelina, mitógenos, interleucinas (IL-1, IL-2), TNF α , vírus, estresse mecânico e oxidativo (HILL; TREISMAN, 1995; CHEN et al., 1999; GÓMEZ-GARRE et al., 2001; VAN DEN BERG et al., 2001). O NF- κ B ativado aumenta a expressão de vários genes envolvidos na inflamação, como citocinas, moléculas de adesão vascular e intracelular, fatores quimiotáticos para monócitos e macrófagos (MCP-1), IL-1, IL-6, IL-8, enzimas relacionadas com inflamação iNOS (óxido nítrico sintetase induzível) e fosfolipases (HILL; TREISMAN, 1995; GUIJARRO; EGIDO, 2001; VAN DEN BERG et al., 2001). Existem também evidências demonstrando o envolvimento do NF- κ B na obesidade (PERCY et al., 2009; PHILIP et al., 2009). A dieta hiperlipídica em ratos Zucker obesos promove maior expressão do RNAm para NF- κ B e TNF- α no córtex renal (PHILIP et al., 2009) desses animais. Dessa forma, os distúrbios hemodinâmicos, metabólicos e inflamatórios característicos da obesidade podem promover um impacto desfavorável sobre a função e estrutura renal e contribuir para iniciação e evolução de lesões renais. A perpetuação desses processos pode causar a perda progressiva de néfrons funcionantes, resultando na forma mais severa de hipertensão arterial.

2.3 Obesidade, Rim e Estrógenos

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a menopausa é definida como a cessação permanente dos ciclos menstruais, resultante da perda da função folicular ovariana ou da remoção cirúrgica dos ovários (WHO, 1996), cujas alterações hormonais resultantes, sobretudo a redução dos níveis plasmáticos dos estrógenos, estão frequentemente associadas à obesidade, bem como à maior incidência de

doenças cardiovasculares.

A menor incidência de doenças cardiovasculares em mulheres antes da menopausa tem levantado à hipótese de que o estrógeno seja responsável por proteção cardiovascular (MENDELSON; KARAS, 1999; MEERSMAN et al., 1998; KHALIL, 2005). Estudos com mulheres na pós-menopausa vêm demonstrando efeitos benéficos da terapia de reposição hormonal no sistema cardiovascular. Mendelsohn e Karas (1999) demonstraram que a terapia com estrógeno reduz em 35 a 50% o risco primário de doenças cardiovasculares em mulheres na pós-menopausa previamente saudáveis.

Vários mecanismos têm sido propostos na tentativa de elucidar os efeitos benéficos do estrógeno no sistema cardiovascular, como por exemplo, redução da pressão arterial (CAGNACCI et al., 1999; WEST et al., 2001), alterações no metabolismo lipídico (HIGASHI et al., 2001) e efeitos antioxidantes (RUIZ-LARREA et al., 2000). A redução da pressão arterial já foi relatada em ratas espontaneamente hipertensas (SHR) (HOEG et al., 1977; WILLIAMS et al., 1988) e em mulheres na pós-menopausa em uso de terapia de reposição hormonal (CAGNACCI et al., 1999; WEST et al., 2001). Este efeito hipotensor pode ser resultado de efeitos diretos do estrógeno na atividade dos canais iônicos, como também por alterações na síntese e/ou atividade de substâncias vasodilatadoras como óxido nítrico (DUBEY; JACKSON, 2001).

As mulheres no período da pós-menopausa tendem a acumular mais gordura nos seus depósitos intra-abdominais do que mulheres na pré-menopausa, resultando em maior risco de desenvolver complicações associadas à obesidade (LOBO, 2008; BROWN; CLEGG, 2010). Os estrógenos promovem acúmulo de gordura subcutânea e a sua deficiência está associada com aumento da gordura abdominal. Estes hormônios atenuam os efeitos do receptor α 2A-adrenérgico no tecido adiposo subcutâneo, reduzindo a lipólise (PEDERSEN et al., 2004; SHI; CLEGG, 2009), podendo parcialmente explicar a maior deposição subcutânea de gordura em mulheres na pré-menopausa quando comparadas aos homens. Assim, no período da pré-menopausa, o estradiol promove deposição subcutânea do tecido adiposo, enquanto que o padrão de deposição, tanto em homens quanto em mulheres na pós-menopausa, é predominantemente visceral (DUBEY; JACKSON, 2001). Essas

observações sugerem que a redução dos níveis plasmáticos de estradiol no período da pós-menopausa pode contribuir, pelo menos em parte, para o aumento da adiposidade visceral, o qual pode estar correlacionado com maior risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão e outras desordens verificadas durante esse período.

Além dos efeitos centrais dos estrógenos regulando o consumo e o gasto energético, o estradiol também possui efeitos diretos sobre o tecido adiposo, tais como: 1) inibição da lipogênese, via redução da atividade da lipoproteína lipase (LPL), enzima que regula a captação de lipídios pelos adipócitos (HOMMA et al., 2000); 2) aumento da lipólise, via aumento da atividade da enzima lípase hormônio-sensível (PALIN et al., 2003), bem como aumentando o efeito lipolítico da epinefrina (ACKERMAN et al., 1981); e 3) aumento da beta-oxidação (MISSO et al., 2003), colaborando para a redução dos estoques de tecido adiposo. Os mecanismos moleculares pelos quais o estradiol exerce esses efeitos não são totalmente esclarecidos, entretanto há fortes evidências que a sinalização do 17 β -estradiol via receptor alfa (ER- α) seja a principal via responsável pela modulação desse hormônio sobre o tecido adiposo (HEINE et al., 2000; JONES et al., 2000).

Estudos demonstraram que mulheres na pré-menopausa são protegidas da progressão da doença renal quando comparadas aos homens de mesma idade, contudo após o período da pós-menopausa a deterioração progressiva dos rins torna-se semelhante em ambos os sexos (SILBIGER; NEUGARTEN, 1995; MARIC et al., 2004). Reckelhoff; Fortepiani, (2004) demonstraram que a redução dos níveis plasmáticos de estradiol pode ter contribuído para o aumento da pressão arterial média, bem como para a redução da TFG em ratas SHR ovariectomizadas. Outro estudo demonstrou que a ovariectomia contribuiu para o aumento da excreção urinária de proteínas, enquanto que a terapia com reposição de estradiol reverteu essa alteração em ratas com síndrome metabólica induzida por dieta (PERÉZ-TORRES et al., 2009). Além disso, um estudo com ratos Wistar demonstrou que a hemodinâmica e resposta renal à AII são diferentes entre os sexos (MUNGER; BAYLIS, 1988; RECKELLOFF, 2001). Nesses animais, a TFG e o FPR são mais elevados, enquanto que a resistência da arteríola aferente é mais baixa em ratos machos quando comparados a fêmeas intactas. Contudo, parece que a ovariectomia banuiu as diferenças desses parâmetros entre machos e fêmeas, sugerindo que o

estradiol pode ser responsável, pelo menos em parte, pela proteção renal em fêmeas. Um outro estudo em humanos demonstrou que a infusão de All provocou um declínio do FPR tanto em homens quanto em mulheres em idade fértil, no entanto, a TFG nos homens mostrou-se inalterada, resultando em um aumento da fração de filtração. Já em mulheres, tanto o FPR quanto a TFG sofreram um declínio em resposta à infusão de All, sugerindo que mulheres respondem diferentemente à All, com menor aumento da fração de filtração (FF) e possivelmente com um menor aumento da pressão intraglomerular, quando comparadas aos homens (MILLER; ANACTA; CATTRAN, 1999). A redução na resistência pré-glomerular, observadas tanto em homens quanto em animais experimentais, está associada ao aumento da lesão glomerular, se particularmente existir aumento concomitante da pressão sanguínea (MUNGER; BAYLIS, 1988).

Estudos experimentais têm confirmado o envolvimento do estradiol na proteção da função e estrutura renal em modelos de síndrome metabólica induzida por dieta. Esses estudos demonstraram que a ovariectomia em animais experimentais resulta em aumento do tecido adiposo visceral, associado às alterações do perfil lipídico e metabólico, proteinúria, aumento da pressão arterial e alterações da função e estrutura renal (PÉREZ-TORRES, et al., 2009; PARK et al., 2010; COHEN et al., 2010), fornecendo fortes evidências que os hormônios ovarianos podem, pelo menos em parte, ser responsáveis pela proteção cardiovascular e renal nesses animais.

Vários mecanismos têm sido propostos a fim de explicar a função do estradiol como um fator renoprotetor. Considerando que o acúmulo de proteínas da matriz extracelular é um dos eventos iniciais no desenvolvimento da glomeruloesclerose, o estradiol pode limitar o remodelamento glomerular suprimindo a síntese de colágenos pelas células mesangiais, via redução da atividade da ECA e consequente redução dos níveis plasmáticos e renais de All (JI et al., 2008), bem como via inibição do TGF- β (SILBIGER et al., 1998; DIXON; MARIC, 2007), fator envolvido no aumento da matriz glomerular, que intermedeia os efeitos mitogênicos da All e da endotelina I sobre as células mesangiais. O estradiol também reduz a inflamação e a síntese de homocisteína (BRUSCHI et al., 2004; KARIM et al., 2010), um aminoácido sulfurado endógeno capaz de causar lesão de podócitos e glomeruloesclerose (ZHANG et al., 2010), bem como atenua o estresse oxidativo,

reduzindo a produção de superóxido e peroxidação lipídica (JI et al., 2007; SULLIVAN et al., 2009).

Os mecanismos pelos quais a obesidade promove seus efeitos sobre os rins ainda são pouco compreendidos. Além disso, existem poucos estudos demonstrando a relação entre obesidade e as alterações iniciais de função e estrutura renal, associado ao perfil inflamatório, principalmente no período de diminuição dos hormônios ovarianos. Portanto, dentre os objetivos do nosso estudo destacam-se o desenvolvimento de um modelo experimental de obesidade induzida por dieta hiperlipídica que possa ser utilizado para estudar os efeitos da dieta rica em gordura sobre os parâmetros renais e o perfil inflamatório em ratas ovariectomizadas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os parâmetros de função e estrutura renal e o perfil inflamatório em um modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica em ratas ovariectomizadas.

3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a função renal de ratas ovariectomizadas e sham submetidas à dieta controle ou hiperlipídica;
2. Avaliar a estrutura renal de ratas ovariectomizadas e sham submetidas às dietas hiperlipídica ou controle;
3. Avaliar o grau de lesão tubular no córtex renal de ratas ovariectomizadas e sham submetidas às dietas hiperlipídica ou controle;
4. Analisar a proliferação celular no córtex renal de ratas ovariectomizadas e sham submetidas às dietas hiperlipídica ou controle
5. Determinar o número de macrófagos/monócitos, linfócitos e NF- κ B) no córtex renal de ratas ovariectomizadas e sham submetidas às dietas hiperlipídica ou controle;
6. Analisar a expressão de Angiotensina II (All) no córtex renal de ratas ovariectomizadas e sham submetidas às dietas hiperlipídica ou controle;
7. Analisar a expressão gênica de TNF- α e IL-6 no tecido renal de ratas ovariectomizadas e sham submetidas às dietas hiperlipídica ou controle;

4 HIPÓTESES

1. O fornecimento da dieta hiperlipídica por um período de 24 semanas contribui para o desenvolvimento de lesão renal, com alterações estruturais e funcionais em animais experimentais;
2. A redução de hormônios ovarianos acentua o grau de lesão renal em ratas submetidas a dieta hiperlipídica.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizadas 26 ratas Wistar de 10 semanas de idade, cujo peso corporal inicial variava em torno de 150 a 200 gramas, provenientes do Biotério Setorial do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia – ICS/UFBA. Os animais foram mantidos no biotério do Instituto Multidisciplinar em Saúde - Campus Anísio Teixeira/IMS/UFBA em ambiente com controle de luz (12 horas luz, das 7 às 19h) e temperatura ($23\pm 3^{\circ}\text{C}$) e livre acesso à água e ração. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animal Experimental da Universidade Estadual de Feira de Santana (Protocolo número 028/08).

5.2 Procedimentos Experimentais

Os animais consumiram ração padronizada controle (Pragsoluções Biociências, SP) durante uma semana para aclimatação. Após a aclimatação, os animais receberam os seguintes tratamentos dietéticos, por um período de 24 semanas: 1) *Dieta Hiperlipídica* (dieta contendo 54,4% do total de calorias oriundas de gordura); ou 2) *Dieta Controle* (ração padronizada AIN 93 M – Pragsoluções Biociências, SP). Para simular o quadro de pós-menopausa, as ratas foram ovariectomizadas com 10 semanas de idade, ou submetidas ao estresse cirúrgico através de uma cirurgia fictícia com a preservação de seus ovários (cirurgia sham). Os animais foram randomizados e divididos em 4 grupos distintos: DCS - Ratas submetidas à dieta controle e cirurgia sham (n=6); DCO – Ratas submetidas à dieta controle e ovariectomia (n=6); DLS – Ratas submetidas à dieta lipídica e cirurgia sham (n=6); DLO – Ratas submetidas à dieta lipídica e ovariectomia (n=8). O peso e a pressão arterial (PA) foram determinados semanalmente, e amostras de sangue e urina foram coletadas ao longo do período experimental para a análise dos parâmetros de função renal. Ao término das 24 semanas, os animais foram sacrificados por decapitação e os rins removidos. O rim esquerdo foi fixado para os estudos histológicos, morfométricos e imunoistoquímicos, enquanto que o rim direito foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e mantidos a -20°C para análise de

expressão gênica de TNF- α e IL-6. Os depósitos de tecido adiposo mesentérico (TAM), parametrial (TAP) e retroperitoneal (TAR) de cada animal também foram removidos e pesados individualmente. Por fim, o sangue do tronco foi coletado em tubos heparinizados e submetido à centrifugação para separação do plasma, o qual foi armazenado sob refrigeração a - 20°C para análise da função renal.

5.3 Dietas

As dietas experimentais foram calculadas com base na recomendação para dietas de roedores de laboratórios, elaborada pelo *American Institute of Nutrition* e reportada por Reeves et al. (1993). As proporções dos ingredientes das dietas experimentais, expressas na matéria seca, encontram-se descritas na **Tabela 1**, enquanto que a composição bromatológica, calculada com base nos valores das análises laboratoriais dos alimentos e da proporção dos ingredientes, encontra-se descrita na **Tabela 2**. As contribuições das frações de proteínas, carboidratos e gorduras no total de energia metabolizável das dietas experimentais encontram-se descritas na **Tabela 3**.

Tabela 1 – Proporções dos ingredientes nas dietas experimentais controle (DC) e hiperlipídicas (DL).

| Ingredientes | DC | DL |
|--|----------------|-------|
| | -----% MS----- | |
| Amido de milho | 37,38 | 13,88 |
| Farelo de soja | 30,50 | 30,50 |
| Sacarose | 6,50 | 6,00 |
| Sebo bovino | 0,0 | 24,00 |
| Maltodextrina | 10,00 | 10,00 |
| Gordura Protegida de soja | 7,5 | 7,50 |
| Celulose Microcristalizada | 3,17 | 3,17 |
| L-cistina | 0,30 | 0,30 |
| Cloreto de colina | 0,15 | 0,15 |
| Mistura mineral (AIN-93M-MX)¹ | 3,50 | 3,50 |
| Mistura Vitamínica (AIN-93-VX)²² | 1,00 | 1,00 |

¹ Mistura mineral AIN-93G-MX: 35,7% de carbonato de cálcio; 25% de fosfato monobásico de potássio; 7,4% de cloreto de sódio; 4,66% de sulfato de potássio; 2,8% de citrato de potássio; 2,4% de óxido de magnésio; 0,606% de citrato férrico; 0,165% de carbonato de zinco; 0,063% carbonato de manganês; 0,03% de carbonato de cobre; 0,001% de iodato de potássio; 0,001% de selenito de sódio; 0,0008% de paramobdato de amônia; 0,145% de metasilicato de sódio; 0,0275% de sulfato de potássio e cromo; 0,0082% de ácido bórico; 0,00635% de fluoreto de sódio; 0,00318% de carbonato de níquel; 0,00174% de cloreto de lítio; 0,00066% vanadato de amônio; 20,98% de sacarose em pó.

| Ingredientes | DC | DL |
|-------------------------------|----------------|---------------|
| | -----% MS----- | |
| Tert-butil-hidroquinona (BHT) | 0,001 | 0,003 |
| Total | 100,00 | 100,00 |

Tabela 2 – Composição bromatológica das dietas experimentais controle (DC) e hiperlipídicas (DL).

| Item | Dietas Experimentais | |
|---|----------------------|-------|
| | DC | DL |
| Matéria seca (g.kg⁻¹) | 82,93 | 85,25 |
| Cinzas (g.kg⁻¹) | 2,78 | 2,74 |
| Proteína Bruta (g.kg⁻¹) | 15,1 | 15,0 |
| Extrato etéreo (g.kg⁻¹) | 6,97 | 30,85 |
| Carboidratos totais (g.kg⁻¹) | 66,76 | 42,97 |
| Valores estimados de energia metabolizável | | |
| Energia Metabolizável (Mcal.kg⁻¹) | 3,99 | 5,19 |

Tabela 3 – Contribuição das frações de proteínas, carboidratos e gorduras no total da energia metabolizável nas dietas experimentais.

| Item | Dietas experimentais | |
|--|----------------------|-------|
| | DC | DL |
| Energia Metabolizável (Mcal/kg⁻¹) | 3,99 | 5,19 |
| % de contribuição das frações dietéticas na Energia Metabolizável | | |
| Proteína | 32,36 | 24,89 |
| Carboidratos | 54,25 | 23,24 |
| Gorduras | 12,39 | 51,1 |
| Vitaminas | 1,00 | 0,77 |

Tabela 4 – Contribuição das frações de amido de milho, farelo de soja, sacarose e maltodextrina na composição dos carboidratos totais nas dietas experimentais.

| Item | Dietas experimentais | |
|--|----------------------|-------|
| | DC | DL |
| Carboidratos totais (g.kg⁻¹) | 66,76 | 42,97 |

² Mistura vitamínica AIN-93-VX- Composição de vitaminas por kg de dieta: 30mg de ácido nicotínico; 15mg de ácido pantotênico; 6mg de piridoxina; 5mg de tiamina; 6mg de riboflavina; 2mg de ácido fólico; 750µg de vitamina K; 200µg de D-biotina; 25µg de vitamina B-12; 4000UI de vitamina A; 1000UI de vitamina D3; 75UI vitamina E.

| Contribuição das fontes de carboidratos na dieta (g.kg ⁻¹) | | |
|--|-------|-------|
| Amido de milho | 37,06 | 13,76 |
| Farelo de soja | 13,42 | 13,42 |
| Sacarose | 6,49 | 5,99 |
| Maltodextrina | 9,8 | 9,8 |

5.4 Procedimento cirúrgico

Para a realização da ovariectomia ou cirurgia sham, os animais foram anestesiados com Xilazina® (2mg/ml) e Ketamina® (50mg/ml), em uma dose de 4mg/Kg e 40mg/Kg, respectivamente. Foram feitas incisões bilaterais de aproximadamente 1 cm nos flancos dos animais, até a cavidade abdominal, os ovários foram removidos e o músculo e a pele, suturados. Como medida profilática de infecção pós-operatória, os animais receberam a dose de 5mg/Kg de antibiótico enrofloxacino (Flotril® 2,5%). Com a finalidade de confirmar a ovariectomia foi realizado o ciclo estral dos animais por meio de esfregaço do lavado vaginal e após o sacrifício dos animais foi verificada se houve atrofia uterina.

5.5 Determinação da Pressão Arterial e do Peso Corporal

As determinações de peso, pressão arterial sistólica, diastólica e média e frequência cardíaca foram realizadas semanalmente, com as ratas acordadas, em ambiente livre de ruídos para evitar estresse do animal e conseqüente interferências nos resultados. Os animais foram aquecidos a 35°C por 5 minutos para determinação da pressão pelo método de pletismografia de cauda (*LE 5001 Electro-Sphygmomanometer* - Panlab, Spain).

5.6 Análise da Função Renal

Para avaliação da função renal, amostras de urinas de 24 horas foram coletadas ao longo do período experimental. Para tanto, a cada 60 dias, os animais foram introduzidos em gaiolas metabólicas por um período de 72 horas, sendo as primeiras 24 horas destinadas à adaptação, nas quais não foram coletadas amostras de urina. O fluxo urinário foi então determinado a partir do volume urinário coletado no período

de 24 horas. Amostras de sangue foram obtidas nos mesmos períodos através de incisão na ponta da cauda dos animais, previamente aquecidos em caixa térmica. O sangue foi coletado em tubos heparinizados e imediatamente centrifugado para separação do plasma, o qual foi armazenado a -20°C para posteriores análises da função renal.

5.6.1 Quantificação de creatinina nas amostras de sangue e de urina

A análise de creatinina nas amostras de sangue e urina foi realizada pelo método colorimétrico utilizando ácido pícrico (Labtest®) (HAYGEN, 1953). O princípio dessa técnica se fundamenta no fato da creatinina e outros cromógenos do plasma reagirem com o ácido pícrico em meio alcalino formando o picrato de creatinina e os cromógenos-picrato, respectivamente, dando à solução uma coloração amarelada. A coloração foi medida em espectrofotômetro e absorção máxima de 510nm. O plasma foi acidificado para quantificar a creatinina verdadeira contida no plasma. A análise da creatinina urinária foi feita seguindo o mesmo princípio descrito acima, excluindo a etapa de acidificação. A taxa de filtração glomerular (TFG³) foi determinada pelo *Clearance* de Creatinina.

5.6.2 Quantificação de Na⁺ e K⁺ nas amostras de sangue e de urina

A dosagem de sódio e potássio foi realizada por fotometria de chama (Mod. 910, *Analyser*, São Paulo, Brazil). Essa técnica baseia-se na espectroscopia atômica, na qual a aspiração da amostra diluída contendo cátions é nebulizada e levada a uma chama. A radiação emitida possui diferentes comprimentos de onda, que são característicos para cada elemento químico contido na amostra. O fotômetro permite a separação das radiações com comprimentos de onda distintos, de modo que o comprimento de onda emitido por um determinado íon é proporcional à sua concentração na solução (OKUMURA; CAVALHEIRO, 2004). Após as determinações das concentrações plasmáticas e urinárias dos íons Na⁺ e K⁺ foram

³ $TFG = \frac{\text{Concentração de Creatinina Urinária} \times \text{Volume Urinário}}{\text{Concentração de Creatinina Plasmática}}$

calculadas as cargas e as frações de excreção (FE)⁴ desses íons.

5.6.3 Quantificação da proteína urinária

A quantificação da proteína urinária foi realizada pelo método colorimétrico, utilizando o kit comercial *Sensiprot* (Labtest®, MG, Brasil). Esse teste baseia-se na formação de um complexo resultante da reação entre o vermelho de pirogalol e o molibdato de sódio. Tal complexo, quando combinado com a proteína existente na urina (meio ácido), desenvolve um cromóforo azul. A intensidade da coloração formada é então quantificada em absorvância de 600 nm, sendo proporcional à concentração de proteína presente na amostra.

5.6.4 Quantificação da Albumina Urinária

A excreção urinária de albumina foi avaliada pelo método do eletroimunoensaio (LAURELL, 1972; COIMBRA et al., 1983) em amostras de 24 horas coletadas. Foram utilizados nesse processo anticorpo anti-albumina de rato, soluções padrões de albumina de rato (0,04, 0,06 e 0,10 mg/ml), agarose tipo II (Sigma) e tampão tris-acetato, pH 8,6. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose contendo anti-albumina de rato e as placas com o gel foram processadas e os picos corados. As alturas dos picos foram utilizadas para calcular as concentrações de albumina urinária, de modo que a altura desses picos no gel é proporcional à concentração de albumina urinária.

5.7 Análise Histológica Renal

Após o sacrifício, os animais tiveram seus rins removidos e fixados em solução de *methacarn* (metanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%) durante um período de 24 horas e, após esse período, o fixador foi substituído por álcool etílico hidratado 70° INPM. O tecido renal foi então parafinizado, cortado em fatias de 4 µm de espessura e corado com tricrômio de Masson para avaliação do comprometimento glomerular e túbulo-intersticial do córtex renal dos animais.

⁴ $FENa = \frac{\text{Concentração de Na}^+ \text{ Urinário} \times \text{Concentração de Creatinina Plasmática}}{\text{Concentração de Na}^+ \text{ Plasmático} \times \text{Concentração de Creatinina Urinária}} \times 100$

5.7.1 Lesões Túbulo-intersticiais

As lesões túbulo-intersticiais (LTI), caracterizadas por dilatação ou atrofia tubular, fibrose intersticial e infiltrado de células inflamatórias foram avaliadas em 30 campos seguidos e graduadas segundo o escore semiquantitativo preconizado por Shih et al. (1988): escore 0: nenhuma lesão; escore 0,5: pequenas áreas de lesões discretas e focais; escore 1: lesão atingindo uma área < 10% do córtex; escore 2: lesão atingindo uma área de 10-25%; escore 3: lesão atingindo uma área de 25-75% e escore 4: lesão extensa e difusa atingindo uma área > que 75%.

5.7.2 Glomeruloesclerose

A glomeruloesclerose foi avaliada em 100 glomérulos de cada animal, cuja extensão foi graduada segundo o escore semiquantitativo: escore 0, glomérulo normal; escore 1, área esclerótica até 25% (esclerose mínima); escore 2, área esclerótica de 25 a 50% (esclerose moderada); escore 3, área esclerótica de 50 a 75% (esclerose moderada a severa); escore 4, área esclerótica de 75% a 100% (esclerose severa). O índice glomeruloesclerótico (IGE) foi calculado segundo a fórmula: $IGE = (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4) / n_T$, onde n_1 representa o número de glomérulos com escore 1, n_2 representa o número de glomérulos com escore 2, n_3 representa o número de glomérulos com escore 3 e n_4 representa o número de glomérulos com escore 4 e n_T representa o número total de glomérulos avaliados (SAITO et al., 1987).

5.8 Análise Morfométrica Glomerular

A análise morfométrica dos glomérulos foi feita pela medida da área do tufo de 30 glomérulos da região cortical e 15 da região corticomedular de cada animal dos diferentes grupos experimentais. As imagens obtidas pela microscopia de luz foram captadas por meio de vídeo-câmera conectada a um analisador de imagens (*Kontron Electronic KS-300*, Eching, Germany). A área do tufo glomerular foi delimitada manualmente e determinada por morfometria computadorizada.

5.9 Análise Imunoistoquímica para AII, NF-kB, Linfócitos, Macrófagos, Vimentina e PCNA

Além dos estudos histológicos, o tecido renal foi submetido à análise imunoistoquímica (FLANDERS et al., 1989; KLIEM et al., 1996; SOARES et al., 2007). Para tanto, as secções de 4 µm de tecido renal foram desparafinizadas e incubadas com anticorpos anti-Angiotensina II (1/200), policlonal (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz®, CA, USA), anti-linfócitos (1/200), monoclonal (Harlan Sera-Lab®), anti-NF-kB p65 (1/200), policlonal (Abcam®) durante a noite a 4°C, e com anticorpos anti-ED-1 (macrófagos/monócitos - 1/1000), monoclonal (AbD serotec®), anti-vimentina, marcador de lesão tubular, (1/500), monoclonal (Dako®), anti-antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA - 1/1000), monoclonal (Sigma®) durante 60 minutos em temperatura ambiente. O produto da reação foi detectado pelo complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame®, CA, USA) e a cor desenvolvida com 3,3-diaminobenzidina (Easypath®). A contracoloração foi feita com hematoxilina de *Harris* ou *Metil green*.

A avaliação dos resultados da imunorreação para vimentina foi feita através de escores que refletem a extensão da área do córtex renal marcada, graduado da seguinte forma: escore 0, representa 0 a 5% do campo marcado; escore 1, representa 5 a 25% do campo marcado; escore 2 representa 25 a 50% do campo marcado; escore 3 representa 50 a 75% do campo marcado e 4 representa 75 a 100% do campo marcado. Foram analisados 30 campos seguidos e determinado um escore médio para cada rato (LEWERS et al., 1970). As análises das imunorreações para monócitos/macrófagos, angiotensina II, linfócitos, PCNA e NF-kB foram realizadas através da contagem do número de células ED-1, angiotensina II, linfócitos, PCNA e NF-kB positivas, respectivamente, em 30 campos (0,245 mm²) do compartimento túbulo intersticial do córtex renal, e determinado o número médio de células por campo para cada animal. Foi realizado um controle negativo para cada reação de imunoistoquímica, o qual foi submetido às mesmas condições da reação correspondente, omitindo-se o anticorpo primário.

5.10 Análise da Expressão Gênica Renal de TNF-α e IL-6

5.10.1 Extração de RNAm

Após o sacrifício, o rim direito foi removido, rapidamente congelado em nitrogênio

líquido e congelados até o dia da extração do RNAm pelo método de tiocionato-fenol-clorofórmio (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987). Os tecidos foram triturados em tubos estéreis contendo solução de fenol e isotiocianato de guanidina (BRAZOL®), 1ml/100mg de tecido. Em seguida foi adicionado clorofórmio à solução (0,2 ml/100mg de tecido) e posteriormente centrifugado (10.000 g, 4°C, 15 min). O sobrenadante contendo o RNA total foi transferido para um novo tubo contendo isopropanol (0,5ml), o qual foi submetido a nova centrifugação (12000 g, 4°C, 20 minutos). O precipitado de RNA foi lavado com etanol a 75%, seguido de nova centrifugação (9500 g, 4°C, 5 minutos), e após secagem, ressuspenso em 50 µl de água livre de RNase e DNase. Após a desnaturação da cadeia em banho Maria por 10 minutos a 50°C, foi feita a quantificação do RNA em espectrofotômetro SP-2000UV-VIS® (*Spectrum*, Shanghai) com comprimento de onda 260/280nm.

5.10.2 Transcrição Reversa

A transcrição reversa a partir do RNAm foi feita utilizando-se oligonucleotídeos complementares à cauda poli-A do RNAm. Um volume correspondente à 1µg de RNA foi adicionado a 1µl de oligo DT e água ultra-pura tratada com dietilpirocarbonato (DEPEC) (LGC Biotecnologia) suficiente para completar um volume de 5µl, seguido de aquecimento à 70°C e rápido resfriamento para interromper a reação. Em 5 µl dessa solução, adicionou-se 4µl de tampão 10x (ImProm), 1 µl de desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dNTP), 1,6 µl de MgCl₂, 6,4 µl de *nuclease free water*, 1µl de inibidor e 1µl de enzima transcriptase reversa (Moloney Murine Leukemia Vírus). Essa solução foi aquecida a 40°C por 60 minutos para síntese de cDNA, em seguida a 25°C por 5 minutos e por fim a 42°C por 60 minutos.

5.10.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a amplificação do cDNA do gene do TNF-α foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se uma combinação de dois oligonucleotídeos com as seguintes sequências: Senso 5' TTG CTT CTT CCC TGT TCC 3' e Anti-senso 5' CTG GGC AGC GTT TAT TCT 3'. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25µL e as condições estabelecidas para amplificação incluíram: 0,2 µL de cada oligonucleotídeo concentrados a 10 pmol, 1 µL de cDNA, 25 µl do kit

comercial para PCR (2x PCR Mix® - LGC Biotecnologia) e 23,6 µL de água DEPEC. As reações de PCR foram conduzidas em um termociclador (Longene) e as condições de ciclagem incluíram uma desnaturação inicial de 94°C por 6 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, finalizando com uma etapa de extensão de 72°C por 7 minutos.

Já para a amplificação do cDNA do gene da IL-6 foi realizada a PCR utilizando-se a seguinte combinação de nucleotídeos: Senso 5' CTA GGA AGA ACT GGC AAT ATG 3' e Anti-senso 5' AAA CCA TCT GGC TAG GTA 3'. As reações da PCR foram realizadas com os mesmos reagentes e volumes descritos para a amplificação do cDNA do gene TNF- α . As reações de PCR foram conduzidas com as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial de 95°C por 1 minutos, seguida de 25 ciclos de 95°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, finalizando com uma etapa de extensão de 72°C por 7 minutos.

Por fim, para a amplificação do cDNA do gene β -actina utilizou-se os seguintes nucleotídeos: Senso 5' ACG CAC GAT TTC CCT CTC 3' e Anti-senso 5' GAC CTT CAA CAC CCC AGC 3'. As reações da PCR foram realizadas com os mesmos reagentes e volumes descritos acima. As reações de PCR foram conduzidas com as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial de 95°C por 1 minutos, seguida de 25 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, finalizando com uma etapa de extensão de 72°C por 7 minutos.

5.10.4 Eletroforese

As amostras amplificadas pela PCR foram submetidas à corrida eletroforética em gel de agarose 1% em TAE 1X corado com brometo de etídeo (1 µg/ml). As amostras aplicadas em gel foram preparadas utilizando-se 02 µL de corante de corrida (0,25% de azul de bromofenol e 40% de glicerol) e 15 µL do produto amplificado. Os géis foram visualizados por meio do transiluminador de luz ultravioleta. Os fragmentos amplificados foram comparados ao marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder a fim de confirmar se os tamanhos de amplificação obtidos correspondiam aos esperados. As imagens foram digitalizadas com a ajuda de um software *LPix Image*® (Loccus Biotecnologia) e as análises densitométricas foram realizadas por meio do software ImageQuant 5®. A β -actina foi utilizada como um controle interno.

5.11 Análise Estatística

Para a análise dos dados foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis*, não paramétrico, com comparações múltiplas pelo teste de *Dunn* para análise dos resultados de fluxo urinário, proteinúria e microalbuminúria, enquanto os demais dados foram submetidos à análise de variância com comparações múltiplas realizadas pelo teste de *Newman-Keuls*. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$ como probabilidade mínima aceitável para a diferença estatística entre as médias.

6 RESULTADOS

6.1 Peso Corporal e Tecido Adiposo Visceral

Os nossos resultados demonstraram aumento significativo do peso corporal das ratas submetidas à dieta hiperlipídica e ovariectomizadas (DLO) quando comparado ao peso das ratas submetidas à dieta controle e com cirurgia sham (DCS) ($p < 0,001$), das ratas submetidas à dieta controle e ovariectomizadas (DCO) ($p < 0,05$) e das ratas submetidas à dieta hiperlipídica e sham (DLS) ($p < 0,05$), após 24 semanas de tratamento dietético (Figura 1). Semelhantemente, os pesos dos depósitos de tecido adiposo visceral foram maiores no grupo DLO quando comparados aos demais grupos experimentais, conforme demonstrado na Tabela 5 e ilustrado na Figura 2.

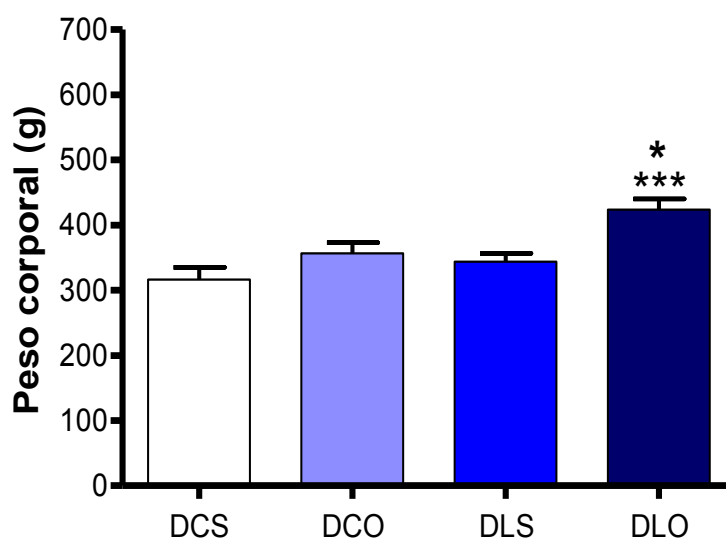


Figura 1 – Peso corporal médio de ratas submetidas à dieta controle e cirurgia sham (DCS), ratas submetidas à dieta controle e ovariectomia (DCO), ratas submetidas à dieta hiperlipídica e cirurgia sham (DLS) e de ratas submetidas à dieta hiperlipídica e ovariectomia (DLO), após 24 semanas de fornecimento das dietas. * $p < 0,05$ representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCO e DLS; *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo DCS.

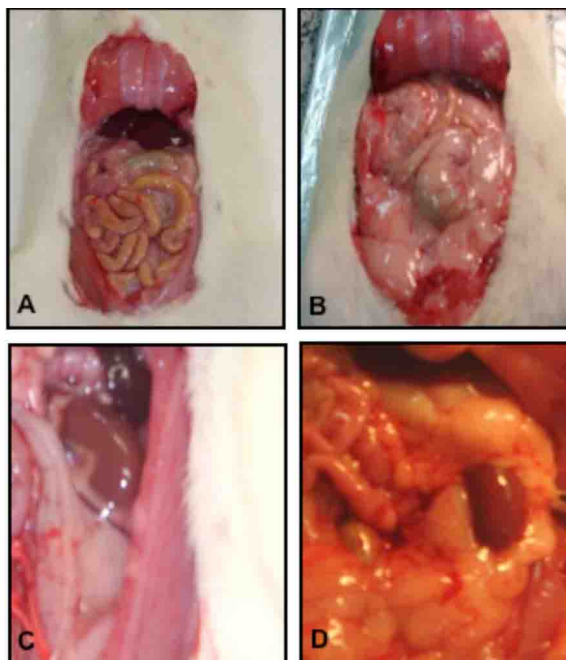


Figura 2 – Tecido adiposo abdominal de uma rata submetida à dieta controle e cirurgia sham (DCS) (A e C) e de uma rata submetida à dieta hiperlipídica e ovariectomia (DLO) (B e D), após 24 semanas de fornecimento da dieta.

Tabela 5 – Comparação do peso corporal (g), dos pesos dos tecidos adiposos abdominais (mg/pc), e ingestão calórica (Kcal/dia) entre os grupos DCS, DCO, DLS e DLO.

| Tecidos | DCS (mg/pc) | DCO (mg/pc) | DLS (mg/pc) | DLO (mg/pc) |
|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Peso Corporal | 316,3±19,1 | 356,6±16,7 | 343,8±12,9 | 423,9±16,4* |
| TAM | 0,73±0,11 | 0,91±0,14 | 1,28±0,22* | 1,39±0,1** |
| TAP | 1,53±0,37 | 2,09±0,32 | 2,61±0,25 | 2,92±0,39* |
| TAR | 1,61±0,31 | 1,32±0,25 | 2,18±0,27 | 2,82±0,39# |
| Gordura Visceral Total | 3,87± 0,73 | 4,32±0,63 | 6,08±0,58 | 7,13±0,77# |
| Ingestão calórica | 60.48±4.69 | 62.86±3.10 | 81.35±3.65# | 79.13±3.13# |

TAM, tecido adiposo mesentérico; TAP, tecido adiposo parametrial; TAR, tecido adiposo retroperitoneal; mg/pc, miligramas por peso corporal. Dados são expressos como média±EPM. ** p<0,01 representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCS; *p<0,05 quando comparado ao grupo DCS; #p<0,05 comparado ao grupo DCS e DCO.

6.2 Pressão Arterial e Frequência Cardíaca

Os resultados de pressão arterial (mmHg) demonstraram aumento da pressão arterial sistólica no grupo DLO, quando comparado ao grupo DCS, DCO e DLS, medida 24 semanas após o fornecimento das dietas (p<0,01) (Figura 3A). Os dados

de pressão arterial média também revelaram níveis mais elevados no grupo DLO ($p < 0,05$) quando comparado aos animais do grupo DCS e DLS, mas não foi observada diferença quando comparado ao grupo DCO (Figura 3C). Não foram observadas alterações significativas da pressão arterial diastólica (Figura 3B) ou frequência cardíaca (Figura 3D) entre os grupos experimentais (Tabela 6).

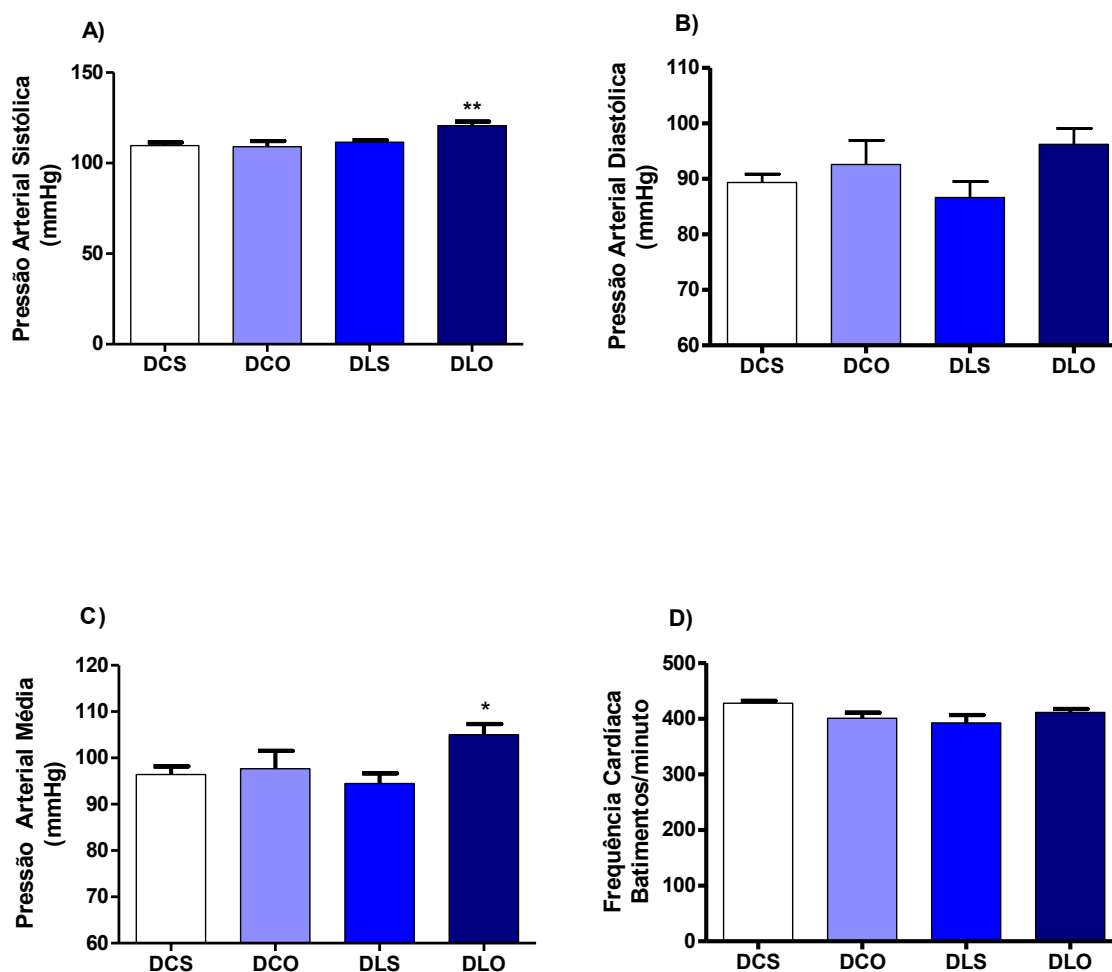


Figura 3 – Médias da pressão arterial sistólica (A), diastólica (B), média (C) e da frequência cardíaca (D) de ratas submetidas à dieta controle e cirurgia sham (DCS), ratas submetidas à dieta controle e ovariectomia (DCO), ratas submetidas à dieta hiperlipídica e cirurgia sham (DLS) e de ratas submetidas à dieta hiperlipídica e ovariectomia (DLO), após 24 semanas de fornecimento das dietas. * $p < 0,05$ representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCS e DLS; ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo DCS, DCO e DLS.

Tabela 6 – Pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, pressão arterial média (mmHg) e frequência cardíaca (bpm) dos grupos DCS, DCO, DLS e DLO.

| Parâmetros Analisados | DCS | DCO | DLS | DLO |
|-----------------------------|------------|-------------|-------------|---------------|
| Pressão arterial sistólica | 109,7±1,70 | 109,1±3,12 | 111,6±1,05 | 120,6 ± 2,25* |
| Pressão arterial diastólica | 89,36±1,49 | 92,60±4,32 | 86,65±2,86 | 96,21±2,90 |
| Pressão arterial média | 96,45±1,73 | 97,70±3,82 | 94,48±2,19 | 105,0±2,35# |
| Frequência cardíaca | 428,1±4,26 | 400,9±10,00 | 392,7±14,30 | 411,3±6,46 |

Dados são expressos como média±EPM. *p<0,05 representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCS, DCO e DLS; #p<0,05 quando comparado ao grupo DCS e DLS.

6.3 Função Renal

Quanto aos parâmetros de função renal, os resultados revelaram redução significativa da fração de excreção de sódio (FENa⁺) no grupo DLO quando comparado ao grupo DCS, DCO e DLS (p<0,05) (Figura 4). Os resultados demonstraram também maior excreção urinária de proteínas e de albumina nos animais do grupo DLO quando comparados aos animais dos demais grupos experimentais. Não foram encontradas alterações significativas nos níveis plasmáticos de creatinina, taxa de filtração glomerular e do fluxo urinário entre os grupos experimentais (Tabela 7).

Tabela 7 – Parâmetros de função renal dos grupos experimentais DCS, DCO, DLS e DLO.

| Parâmetros Analisados | DCS | DCO | DLS | DLO |
|-----------------------|----------------|-----------------|---------------|------------------------------|
| Creatinina Plasma | 0,54±0,11 | 0,74±0,04 | 0,65±0,09 | 0,60±0,10 |
| TFG | 0,46±0,12 | 0,35±0,08 | 0,32±0,03 | 0,39±0,06 |
| FENa ⁺ | 0,38±0,07 | 0,42±0,05 | 0,40±0,07 | 0,18±0,02* |
| FEK ⁺ | 70,14±14,3 | 49,24±17,6 | 50,19±7,21 | 48,82±11,6 |
| Fluxo Urinário | 3,4(2,1; 18,9) | 5,7(2,5; 6,9) | 3,3(2,4; 6,9) | 6,0(4,5; 6,9) |
| Proteinúria | 5,6(2,6; 9,3) | 3,3(2,3; 3,4) | 4,9(2,9; 7,3) | 12,9(5,4; 24,3) ⁺ |
| Microalbuminúria | 0,2(0,1; 0,7) | 0,02(0,0; 0,04) | 0,4(0,1; 0,6) | 0,6(0,2; 1,0)** |

Creatinina plasmática (mg/dL); TFG = taxa de filtração glomerular (ml/min/100g); FENa⁺= fração de excreção de sódio (%); FEK⁺= fração de excreção de potássio (%); Fluxo urinário (µl/min); Proteinúria (mg/24h). Dados são expressos como média±EPM, com exceção dos dados de fluxo urinário e proteinúria que são expressos como mediana e percentil 25 e 75. *p<0,05 representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCS, DCO e DLS; +p<0,05 comparado ao grupo DCO; **p<0,01 comparado ao grupo DCO.

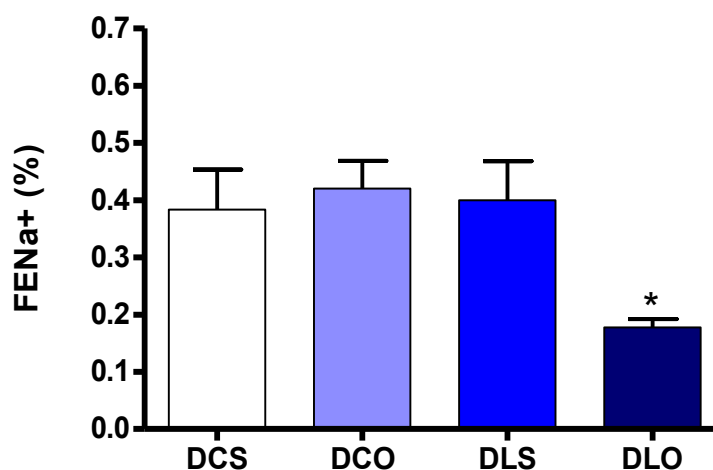


Figura 4 – Fração de excreção de sódio de ratas submetidas a dieta controle sham (DCS), ratas submetidas à dieta controle e ovariectomia (DCO), ratas submetidas a dieta hiperlipídica sham (DLS) e ratas submetidas a dieta hiperlipídica e ovariectomia (DLO). * $p < 0,05$ representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCS, DCO e DLS.

6.4 Análise Histológica e Morfométrica do Rim

Os estudos histológicos evidenciaram a presença de discretas áreas de lesões, porém significativas, com padrão focal de distribuição no compartimento túbulo-intersticial do córtex renal (CTI) das ratas DLO quando comparada as ratas DCS, DCO e DLS. Essas lesões túbulo-intersticiais foram caracterizadas por infiltrado inflamatório, atrofia e dilatação tubular e fibrose intersticial (Tabela 8, Figura 5 e Figura 6). Semelhantemente, o índice glomerulosclerótico (IGE) dos animais do grupo DLO foi significativamente maior quando comparado ao IGE dos animais dos grupos DCS, DCO e DLS (Figura 7 e Figura 8). Os estudos morfométricos demonstraram aumento da área do tufo glomerular dos glomérulos corticais das ratas do grupo DLO quando comparadas às ratas do grupo DCS e DCO ($p < 0,05$), bem como dos animais do grupo DLS quando comparados aos animais dos grupos DCS e DCO (Tabela 8, Figura 9A). Não houve diferenças estatísticas na área do tufo glomerular dos glomérulos córtico-medulares entre os grupos experimentais (Figura 9B).

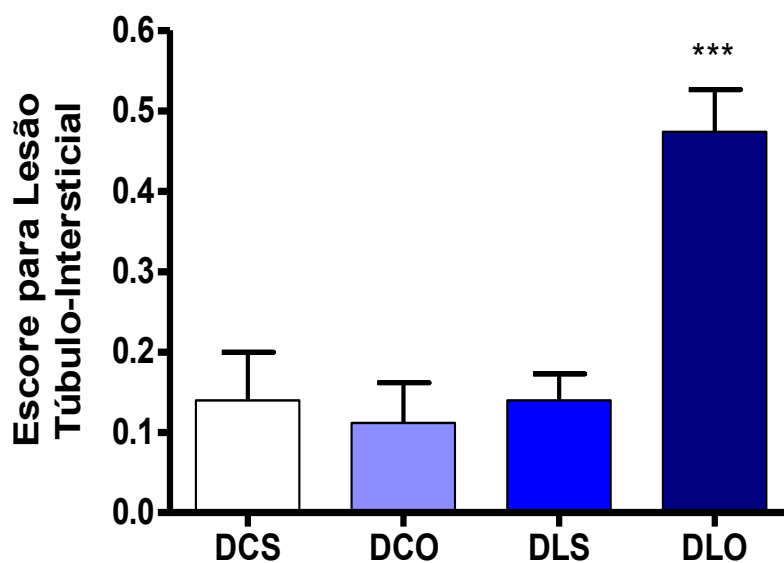


Figura 5 – Escore para lesões túbulo-intersticiais de ratas submetidas a dieta controle sham (DCS), ratas submetidas à dieta controle ovariectomizadas (DCO), ratas submetidas a dieta hiperlipídica sham (DLS) e ratas submetidas a dieta hiperlipídica e ovariectomia (DLO). *** $p < 0,001$ representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCS, DCO e DLS.

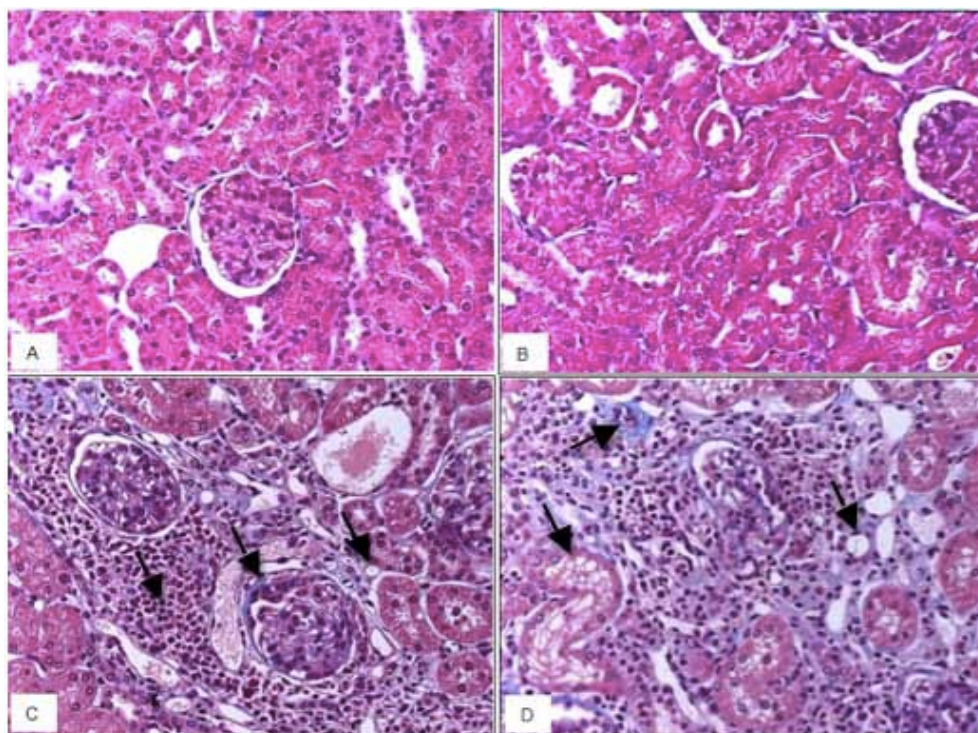


Figura 6 – Cortes histológicas renais corados com Tricômio de Masson de ratas DCS (A), DCO (B) e DLO (C e D). Notar em C e D a presença de infiltrado de células inflamatórias, atrofia e dilatação tubulares, fibrose e glomeruloesclerose (20 x).

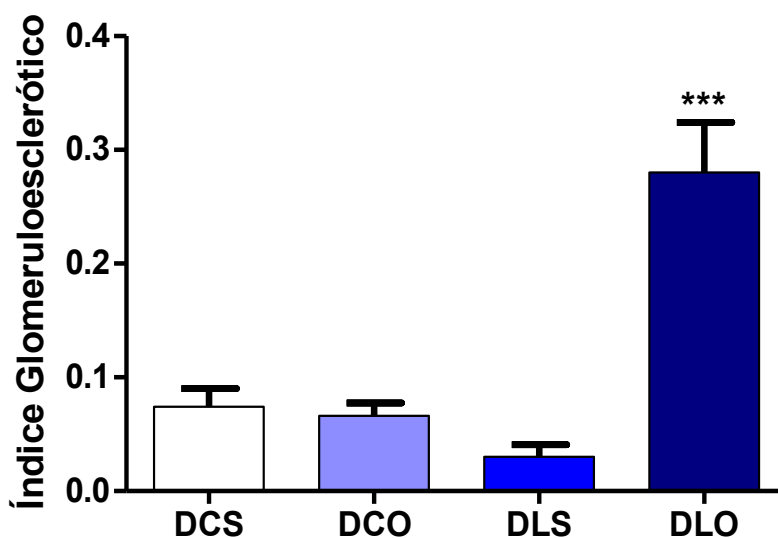


Figura 7 – Índice glomeruloesclerótico analisado em 100 glomérulos de ratas submetidas a dieta controle sham (DCS), ratas submetidas à dieta controle ovariectomizadas (DCO), ratas submetidas a dieta hiperlipídica sham (DLS) e ratas submetidas a dieta hiperlipídica e ovariectomia (DLO). Dados são expressos como média±EPM. *** $p < 0,001$ representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCS, DCO e DLS.

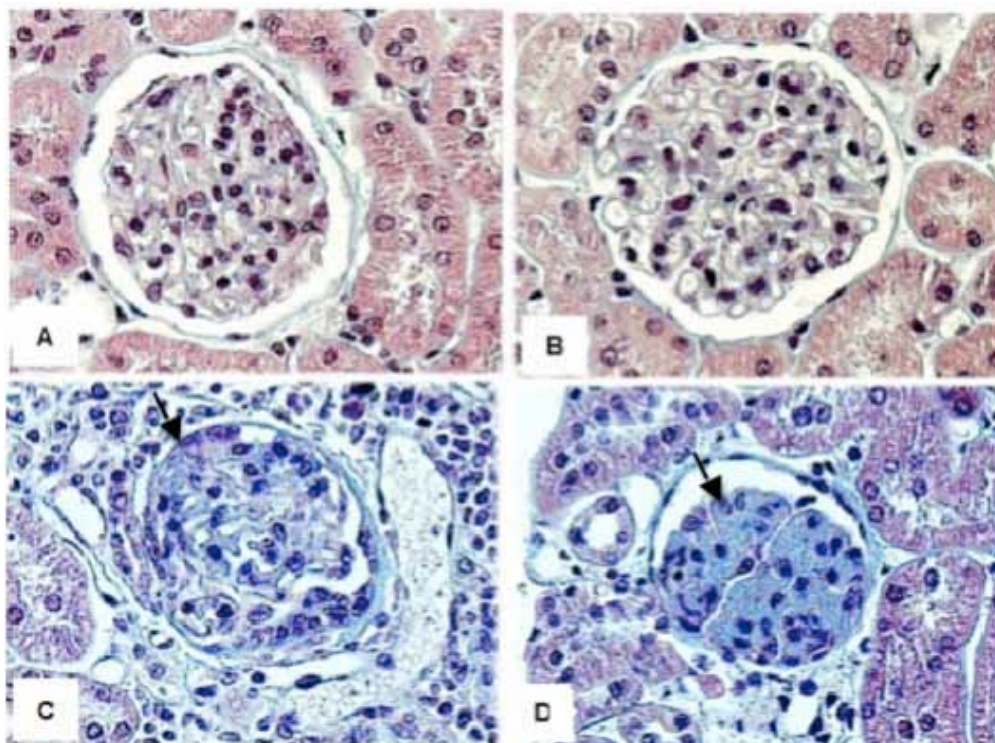


Figura 8 – Cortes histológicos de rins corados com Tricômio de Masson de ratas DCS (A), DCO (B), e DLO (C e D). Notar em C e D áreas de fibrose glomerular com redução da luz dos capilares glomerulares e adesão da cápsula de *Bowman* (40x).

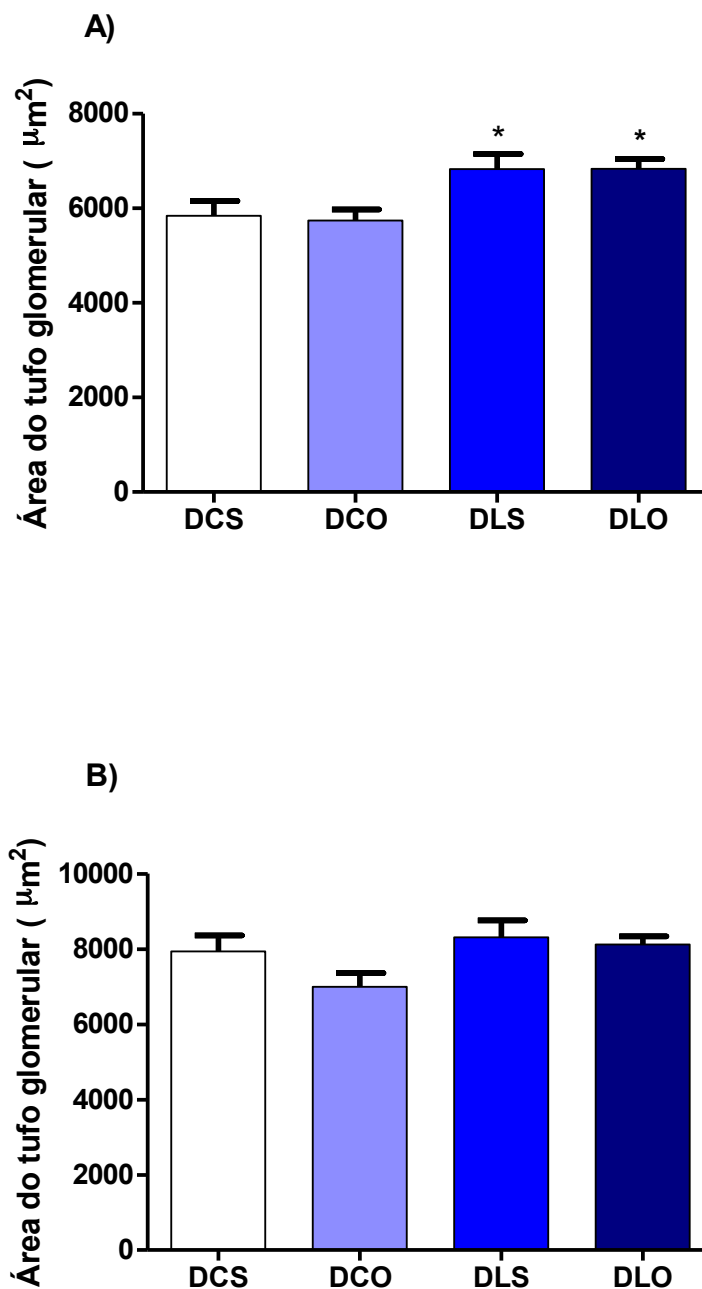


Figura 9 – Morfometria da área do tufo de glomérulos corticais (A) e corticomedulares (B) de ratas submetidas a dieta controle e cirurgia sham (DCS), ratas submetidas a dieta controle e ovariectomia (DCO), ratas submetidas à dieta hiperlipídica e cirurgia sham (DLS) e de ratas submetidas à dieta hiperlipídica e ovariectomia (DLO). Dados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCS e DCO.

Tabela 8 – Parâmetros histológicos e morfométricos de ratas DCS, DCO, DLS e DLO.

| Parâmetros analisados | DCS | DCO | DLS | DLO |
|--|-------------|-------------|-------------|----------------|
| Lesão Túbulointersticial | 0,14±0,06 | 0,11±0,05 | 0,14±0,03 | 0,50±0,05*** |
| Índice Glomeruloesclerótico | 0,07± 0,016 | 0,07± 0,012 | 0,03± 0,011 | 0,28± 0,044*** |
| Área glomerular, μm^2 dos GC | 5843±311,5 | 5744±232,4 | 6830±317,8* | 6835±208,6* |
| Área glomerular, μm^2 dos GCM | 7938±421,5 | 6998±366,5 | 8312±449,6 | 8124±213,0 |

GC= glomérulos corticais; GCM= glomérulos corticomedulares. Dados são expressos como média±EPM, *p<0,05 representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCS e DCO; ***p<0,001 quando comparado aos grupos DCS, DCO, DLS.

6.5 Expressão Renal de All, NF-kB e Marcadores de Macrófagos, Linfócitos, Vimentina e PCNA

Os estudos imunoistoquímicos demonstraram aumento significativo do número de células ED-1 (macrófagos/monócitos) (Figura 12 e Figura 13), linfócitos (Figura 14 e Figura 15), PCNA (Figura 17 e Figura 16), NF-kB (Figura 18 e Figura 19) e Angiotensina II (All) (Figura 20 e Figura 21) positivas, com padrão focal de distribuição no CTI do córtex renal das ratas DLO, localizados predominantemente nas áreas lesadas, evidenciando a atividade das lesões (Tabela 9). Os resultados também revelaram uma maior imunomarcagem para vimentina, também com padrão focal de distribuição no CTI do córtex renal das ratas do grupo DLO quando comparadas às ratas do grupo DCO (p<0,05) (Figura 10 e Figura 11).

Tabela 9 – Estudos imunoistoquímicos de ratas DCS, DCO, DLS E DLO.

| Grupos | DCS | DCO | DLS | DLO |
|------------|-----------|-----------|-----------|--------------|
| Vimentina | 0,27±0,04 | 0,16±0,02 | 0,39±0,05 | 0,69±0,15* |
| ED-1 | 5,2±0,8 | 5,3±0,6 | 6,4±0,2 | 21,4±3,2*** |
| Linfócitos | 2,5±0,9 | 4,3±0,4 | 4,3±0,5 | 11,4±1,9** |
| PCNA | 3,1±0,4 | 2,5±0,5 | 3,9±0,5 | 8,3±1,2** |
| NF-KB | 1,96±0,42 | 1,57±0,37 | 2,20±0,27 | 6,74±1,48**# |
| All | 1,38±0,32 | 2,49±0,62 | 1,70±0,48 | 5,52±0,82### |

Dados são expressos como média±EPM. *p<0,05 representa diferença estatística significativa quando comparado ao grupo DCO; **p<0,01 quando comparado aos grupos DCS e DCO; ***p<0,001 comparado aos grupos DCS, DCO e DLS; #p<0,05 comparado ao grupo DLS; ###p<0,01 comparado aos grupos DCS, DCO e DLS.

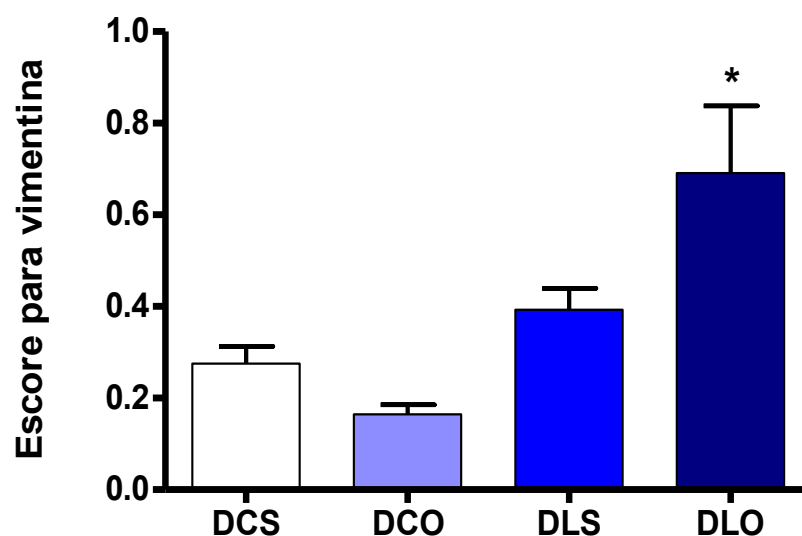


Figura 10 – Escore para vimentina no CTI do córtex renal de ratas submetidas à dieta controle sham (DCS), ratas submetidas à dieta controle ovariectomizadas (DCO), ratas submetidas à dieta hiperlipídica sham (DLS) e de ratas submetidas à dieta hiperlipídica ovariectomizadas (DLO). Dados são expressos como média±EPM. * $p < 0,05$ representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCS e DCO.

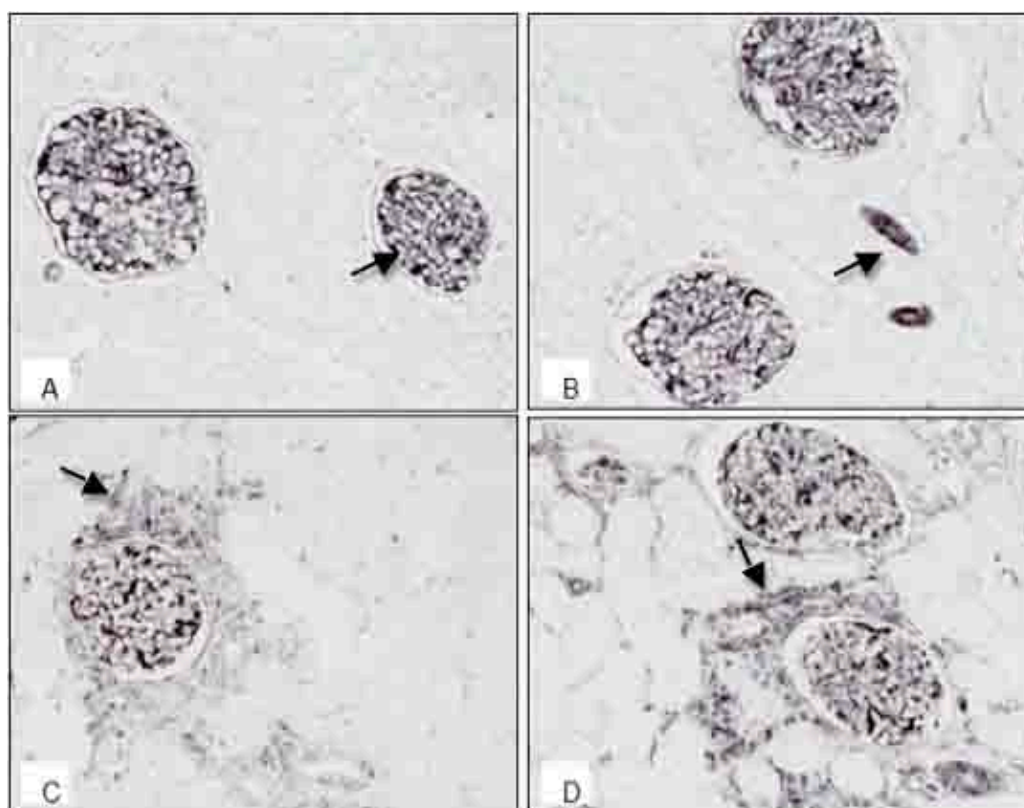


Figura 11 – Imunolocalização para vimentina no córtex renal de ratas DCS (A), DCO (B) e DLO (C e D) (20 x). Notar que a reação é mais intensa em C e D e abrange marcação do CTI (seta), enquanto que em (A) e (B) a marcação de vimentina está confinada às células mesangiais, células musculares lisas e podócitos (seta). O padrão de marcação dos animais do grupo DLS foi semelhante ao dos animais do grupo DCO (foto não mostrada).

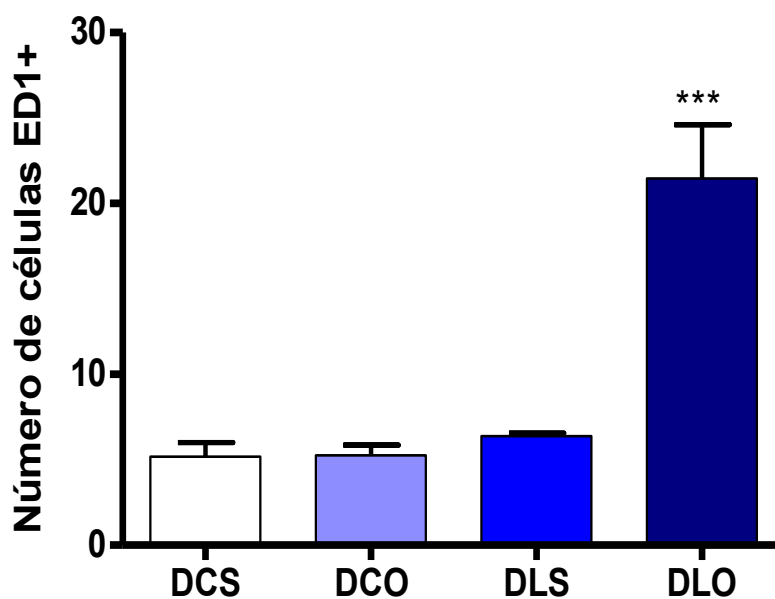


Figura 12 – Número de células ED-1-positivas no CTI do córtex renal de ratas submetidas à dieta controle e sham (DCS), ratas submetidas à dieta controle e ovariectomia (DCO), ratas submetidas à dieta hiperlipídica e sham (DLS) e de ratas submetidas à dieta hiperlipídica e ovariectomia (DLO). Dados são expressos como média±EPM. *** $p < 0,001$ representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCS, DCO e DLS.

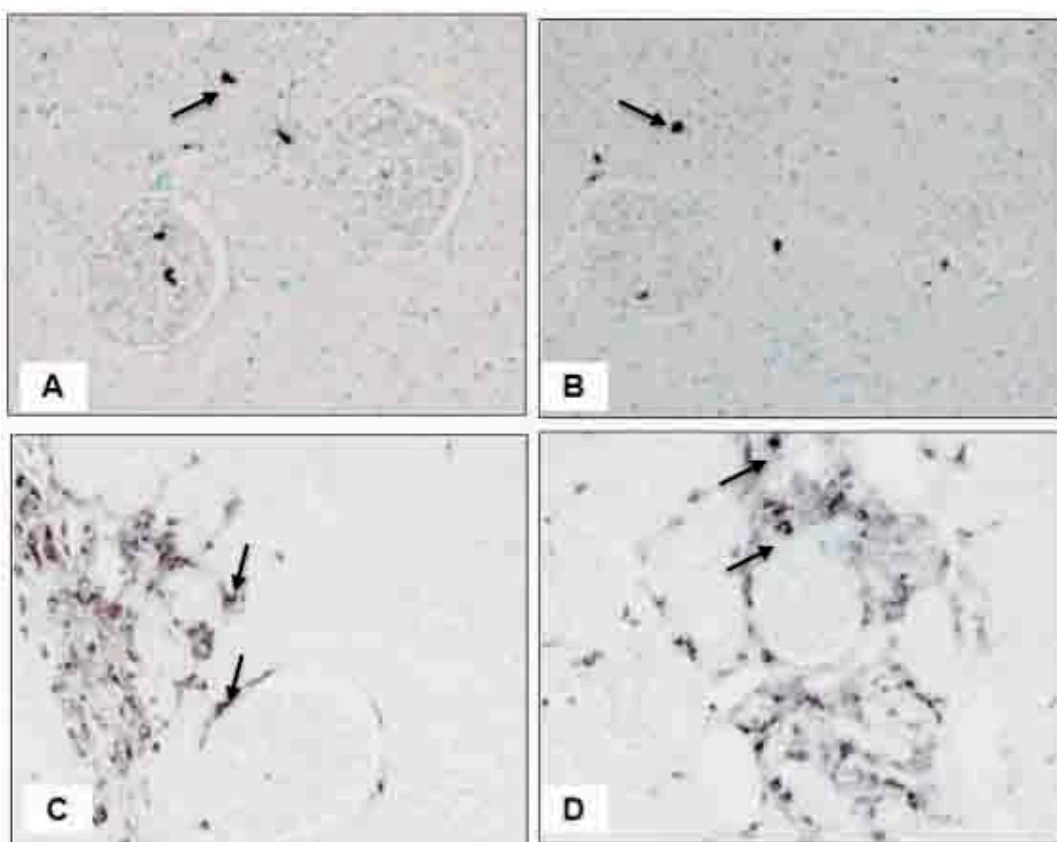


Figura 13 – Imunolocalização de células ED-1-positivas (macrofágos/monócitos) no CTI do córtex renal de ratas DCS (A), DCO (B) e DLO (C e D) (seta). Notar que o número de células ED-1 positivas é maior em C e D. (20 x). Os animais do grupo DLS apresentaram padrão normal semelhante ao encontrado no grupo DCO (foto não mostrada).

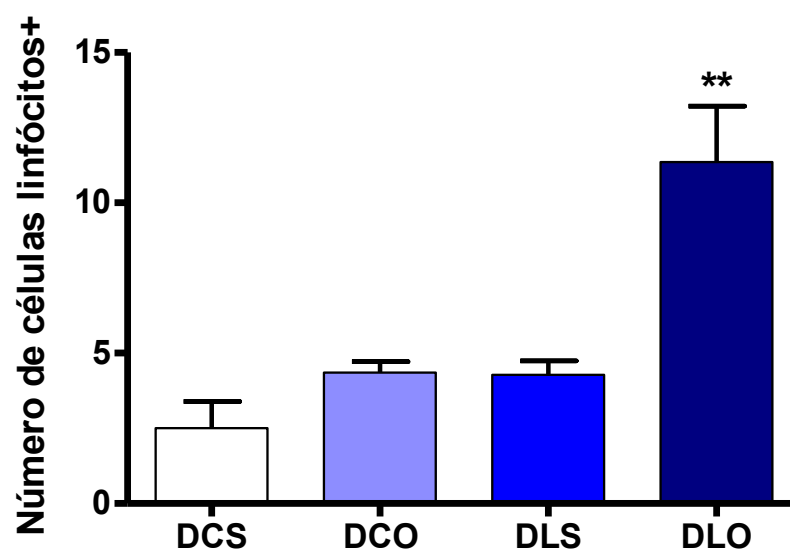


Figura 14 – Número de linfócitos no CTI do córtex renal de ratas submetidas à dieta controle e sham (DCS), ratas submetidas à dieta controle e ovariectomia (DCO), ratas submetidas à dieta hiperlipídica e sham (DLS) e de ratas submetidas à dieta hiperlipídica e ovariectomia (DLO). Dados são expressos como média±EPM. ** $p < 0,01$ representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCS, DCO e DLS.

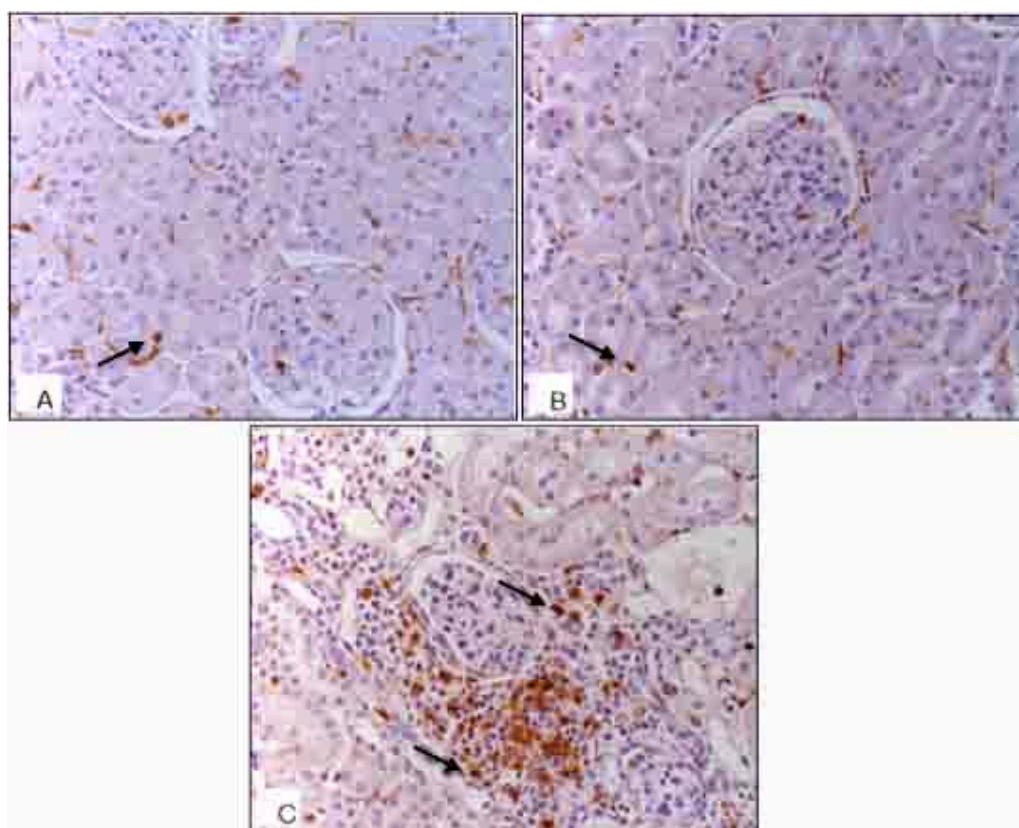


Figura 15 – Imunolocalização de linfócitos no CTI do córtex renal de ratas DCS (A), DCO (B) e DLO (C) (seta). Notar que o número linfócitos é maior em C (20 x). Os animais do grupo DLS apresentaram padrão normal semelhante ao encontrado no grupo DCO (foto não mostrada).

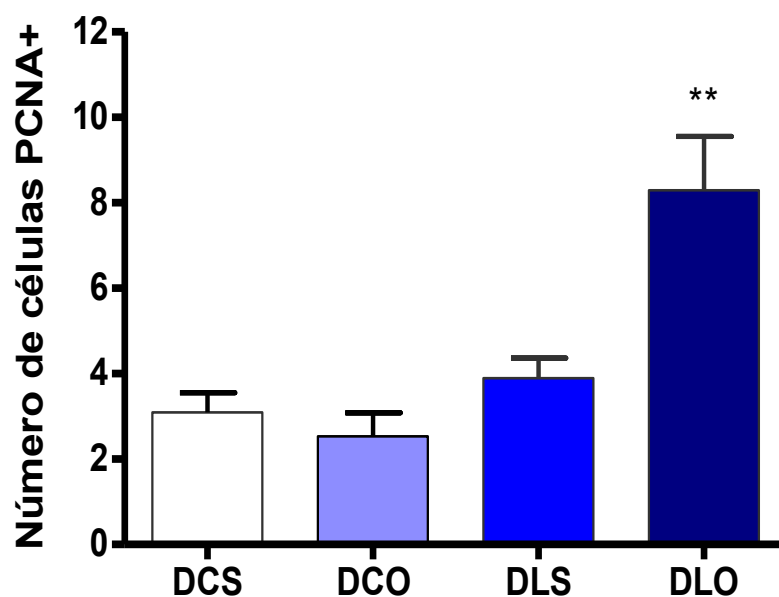


Figura 16 – Número de células PCNA positivas no CTI do córtex renal de ratas submetidas à dieta controle sham (DCS), ratas submetidas à dieta controle ovariectomizadas (DCO), ratas submetidas à dieta hiperlipídica sham (DLS) e de ratas submetidas a dieta hiperlipídica ovariectomizadas (DLO). Dados são expressos como média±EPM. ** $p < 0,01$ representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCS e DCO.

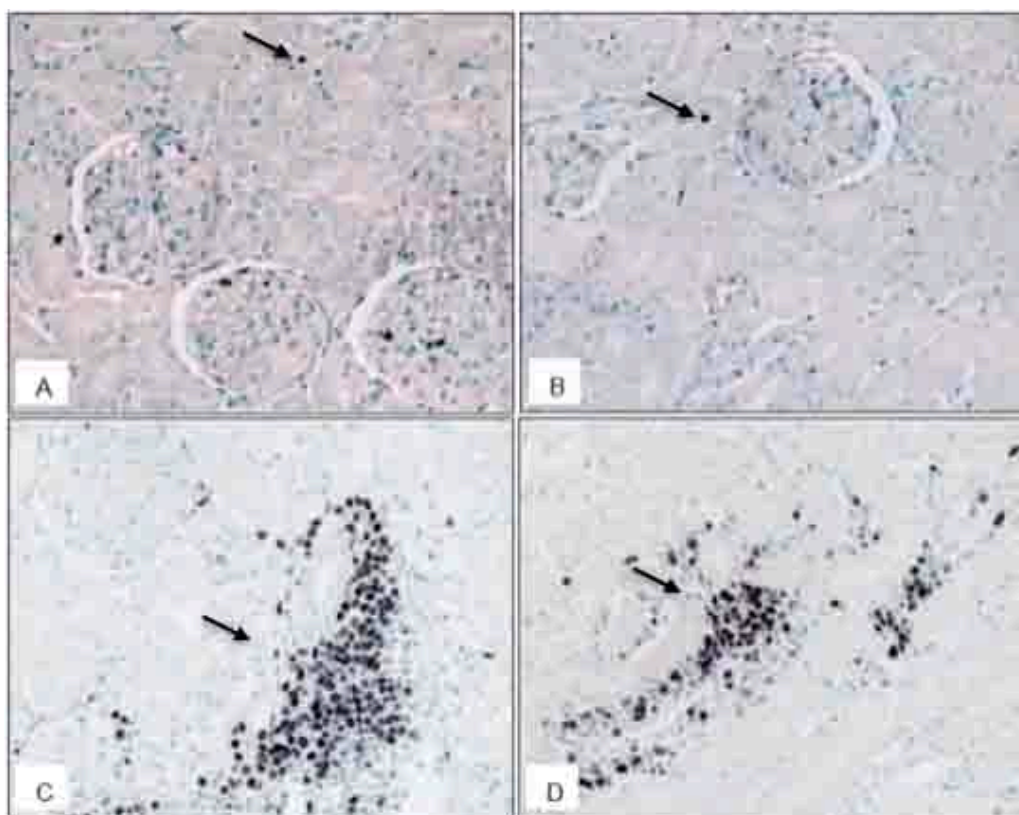


Figura 17 – Imunolocalização de células PCNA positivas no CTI do córtex renal de ratas DCS (A), DCO (B) e DLO (C e D) (seta). Notar que o número de células PCNA positivas é maior em C e D (20x). Os animais do grupo DLS apresentaram padrão normal semelhante ao encontrado no grupo DCO (foto não mostrada).

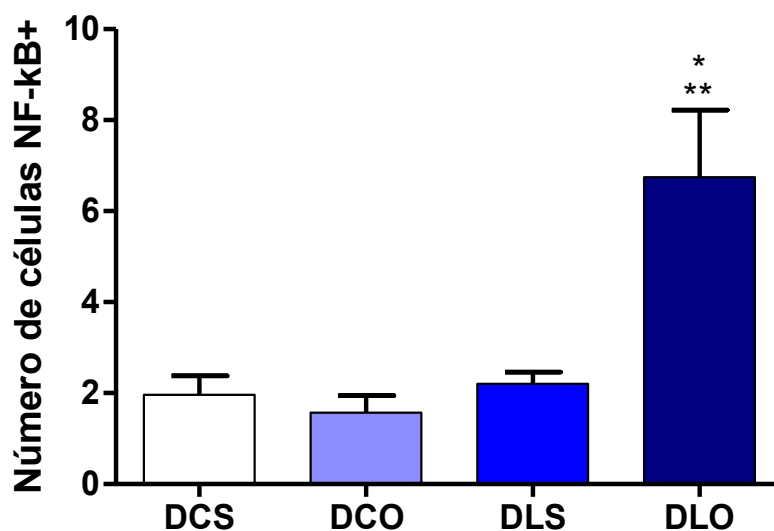


Figura 18 – Número de células NF-kB positivas no CTI do córtex renal de ratas submetidas à dieta controle sham (DCS), ratas submetidas à dieta controle ovariectomizadas (DCO), ratas submetidas à dieta hiperlipídica sham (DLS) e de ratas submetidas a dieta hiperlipídica ovariectomizadas (DLO). Dados são expressos como média±EPM. * $p < 0,05$ representa diferença estatística significativa quando comparado ao grupo DLS; ** $p < 0,01$ quando comparado aos grupos DCS, DCO.

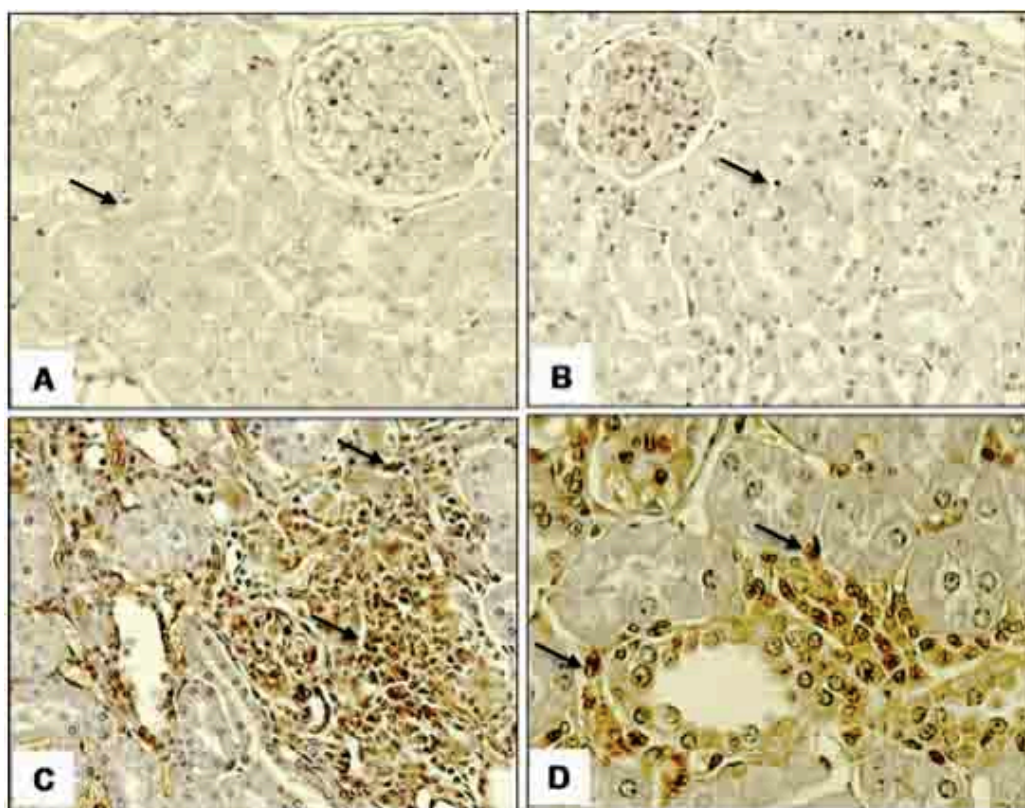


Figura 19 - Imunolocalização de células NF-kB positivas no CTI do córtex renal de ratas DCS (A), DCO (B) e DLO (C) (20x) e (D) (40x) (seta). Notar que o número de células NF-kB positivas é maior em C e D. Os animais do grupo DLS apresentaram padrão normal semelhante ao encontrado no grupo DCO (foto não mostrada).

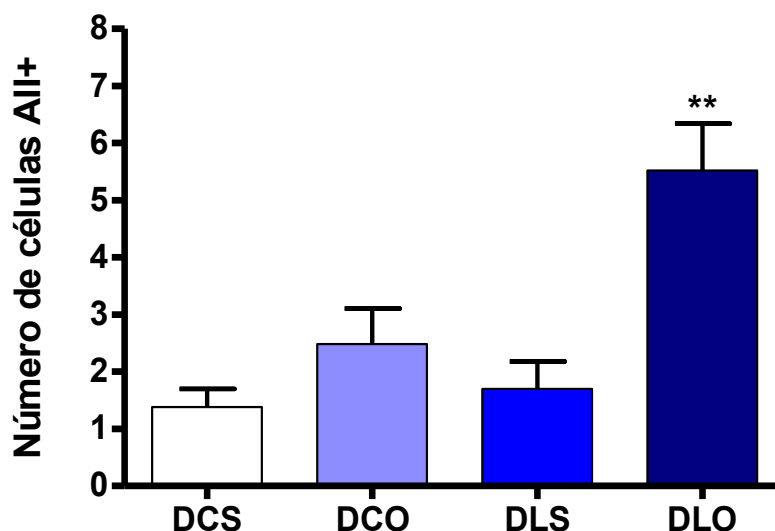


Figura 20 – Número de células Angiotensina II positivas no CTI do córtex renal de ratas submetidas à dieta controle sham (DCS), ratas submetidas à dieta controle ovariectomizadas (DCO), ratas submetidas à dieta hiperlipídica sham (DLS) e de ratas submetidas a dieta hiperlipídica ovariectomizadas (DLO). Dados são expressos como média±EPM. ** $p < 0,01$ representa diferença estatística significativa quando comparado aos grupos DCS, DCO e DLS.

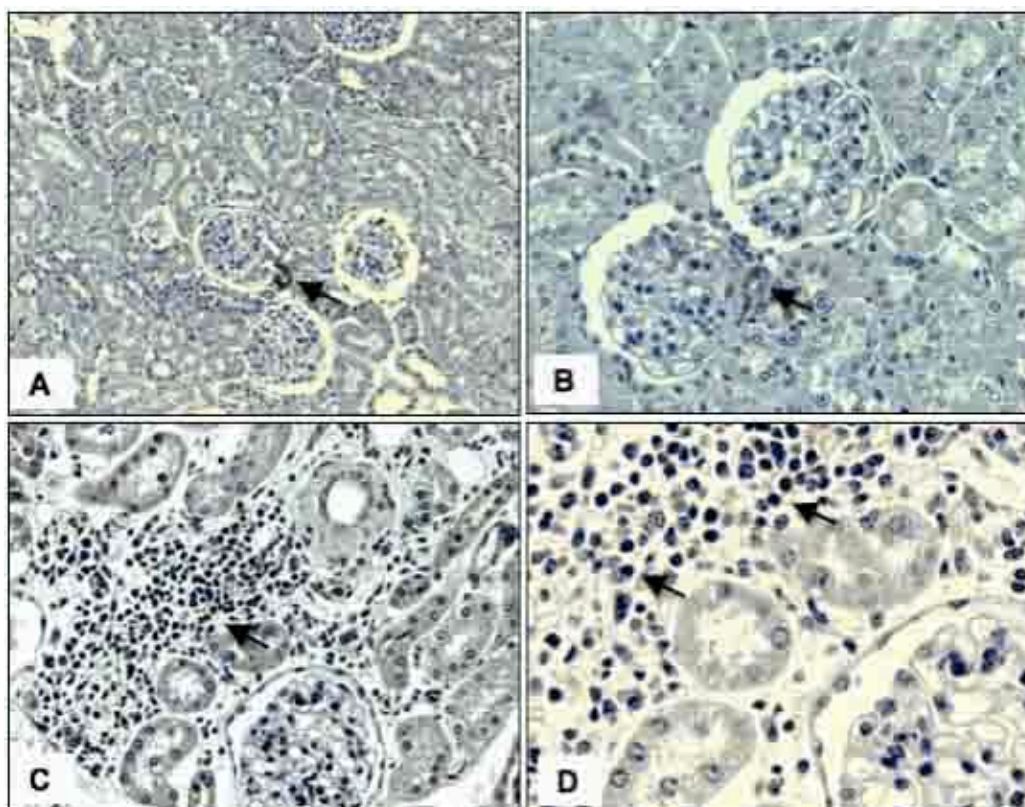


Figura 21 - Imunolocalização de células All-positivas no CTI do córtex renal de ratas DCS (A), DCO (B) e DLO (C) (20x) e (D) (40x) (setas). Notar a marcação normal de All no aparelho justaglomerular em A e B e a marcação aumentada de células no CTI do córtex renal em C e D. Os animais do grupo DLS apresentaram padrão normal semelhante ao encontrado no grupo DCO (foto não mostrada).

6.6 Expressão Gênica de TNF- α e IL-6

Os resultados demonstraram maior expressão gênica para TNF- α no grupo DLO (0,5404 \pm 0,003) quando comparado ao grupo DCS (0,4809 \pm 0,015) (p <0,05) (Figura 12). Quanto aos resultados referentes à IL-6, não foi observada expressão gênica desta citocina no tecido renal.

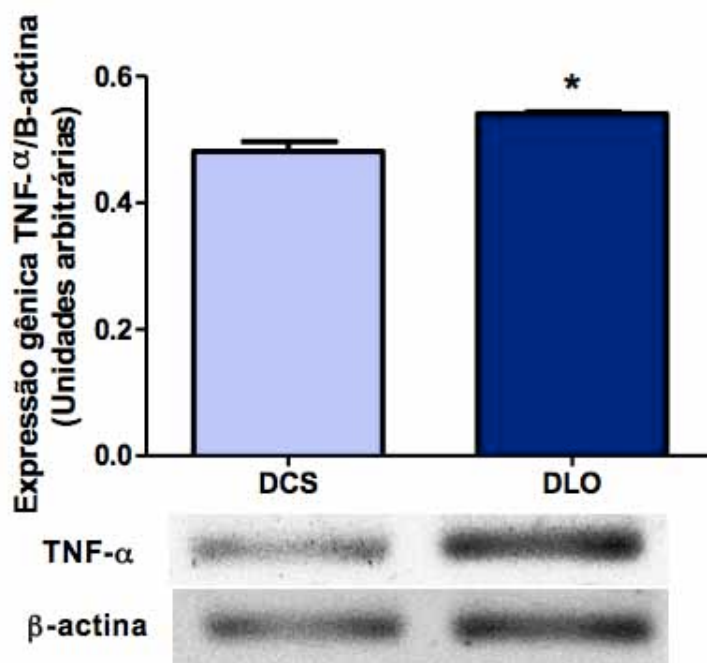


Figura 22 – Expressão gênica para TNF- α e controle interno β -actina no tecido renal de ratas submetidas a uma dieta controle e cirurgia sham (DCS) e de ratas submetidas a dieta hiperlipídica e ovariectomia (DLO). Os dados são expressos como média \pm EPM. * p <0,05 representa diferença estatística significativa quando comparado ao grupo DCS.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra que ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica, durante o período de vinte e quatro semanas, apresentaram aumentos significativos do peso corporal e do tecido adiposo visceral, associados à elevação da pressão arterial sistólica e às alterações dos parâmetros de função e estrutura renal e do perfil inflamatório renal. As alterações da função renal foram caracterizadas pela diminuição da fração de excreção de sódio e aumento da excreção urinária de proteína e albumina. Quanto à análise histológica, foram verificadas discretas alterações focais nos glomérulos e no compartimento túbulo-intersticial (CTI) do córtex renal das ratas submetidas à dieta hiperlipídica e ovariectomia (DLO), indicativas de lesão renal. Além disso, os estudos imunoistoquímicos evidenciaram aumento da expressão de vimentina e do número de células positivas para angiotensina II (AII), macrófagos, linfócitos, NF-kB e antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), no CTI do córtex renal dos animais do grupo DLO quando comparados aos demais grupos.

A compreensão dos mecanismos responsáveis pela obesidade, hipertensão e a sua relação com as alterações renais ainda está totalmente esclarecida. Vários modelos experimentais, principalmente de síndrome metabólica, têm sido utilizados para investigar as alterações renais associadas à obesidade, dentre os quais destaca-se o uso de animais geneticamente modificados. No entanto, as mutações gênicas podem não mimetizar as alterações observadas em humanos, além de dificultar a investigação dos mecanismos iniciais da doença renal relacionada à obesidade (DEJI et al., 2009). Por outro lado, o consumo de uma dieta hiperlipídica por animais experimentais pode representar as condições mais próximas daquelas encontradas em humanos, cuja prevalência da obesidade tem crescido grandemente em várias populações mundiais, graças ao aumento do consumo de carboidratos e do teor de gorduras na dieta (FLEGAL et al., 2010). Somando-se a isso, existe também a falta de um modelo animal que represente essas alterações em fêmeas, principalmente no período da pós-menopausa. Alguns estudos demonstraram que a dieta hiperlipídica promove hipertensão e obesidade em ratos machos (DOBRIAN et al., 2000; TAMAYA-MORI et al., 2002; UEMARA et al., 2006). Contudo, os estudos utilizando fêmeas falharam por mostrar hipertensão e obesidade induzida por dieta

hiperlipídica, provavelmente devido ao efeito protetor do estrógeno no sistema cardiovascular (UEMARA et al., 2006; AUBIN et al., 2008).

Com a padronização do modelo experimental de dieta hiperlipídica em ratas ovariectomizadas, foi possível observar que a dieta e a ovariectomia, quando analisadas isoladamente, não promoveram aumentos significativos do peso corporal nos animais submetidos à dieta controle e ovariectomia (DCO) e dos animais submetidos à dieta hiperlipídica e cirurgia sham (DLS), quando comparados aos animais submetidos à dieta controle e cirurgia sham (DCS). Contudo, a associação da dieta hiperlipídica com a ovariectomia resultou em aumento significativo do peso corporal, bem como dos depósitos de tecido adiposo visceral das ratas DLO, quando comparadas às ratas dos demais grupos experimentais. Reckelhoff; Fortepiani, (2004) demonstraram em um modelo pós-menopausal de ratas espontaneamente hipertensas que a redução dos níveis plasmáticos de estradiol parece contribuir para o aumento do peso corporal em ratas ovariectomizadas, quando comparadas aos seus controles intactos. Semelhantemente, o período da pós-menopausa em mulheres e a ovariectomia estão relacionados ao aumento dos depósitos de tecido adiposo visceral (WADE; GRAY; BARTNESS, 1985). Essas observações sugerem que a redução dos níveis plasmáticos de estradiol no período da pós-menopausa pode contribuir, pelo menos em parte, para o aumento da adiposidade visceral e obesidade, frequentemente observado nessas mulheres.

Os estrógenos possuem efeitos no sistema nervoso central que repercutem sobre o tecido adiposo, incluindo a regulação do consumo e do gasto de energia, e efeitos periféricos diretos sobre os adipócitos, inibindo a lipogênese. Evidências sugerem que as variações no consumo alimentar e no gasto energético, durante as diferentes fases do ciclo menstrual, pode ser, em parte, devido às variações das concentrações plasmáticas de estradiol (SHI; CLEGG, 2009). Os animais do grupo DLO demonstraram aumento do consumo alimentar quando comparados aos demais grupos experimentais. A leptina, hormônio produzido pelos adipócitos, cuja secreção é proporcional ao acúmulo de adiposidade, atua no hipotálamo, reduzindo a ingestão de alimentos e aumentando o gasto energético. Contudo, MELI et al. (2004) demonstraram que o receptor específico (Ob-Rb) de leptina no hipotálamo é modulado pelos níveis plasmáticos de estradiol, uma vez que a ovariectomia reduziu a expressão desses receptores em ratos, podendo parcialmente explicar o aumento

do consumo alimentar e a redução do gasto energético, apesar dos altos níveis de leptina circulantes nesses animais (MELI et al., 2004).

O estradiol também é capaz de modular o eixo somatotrófico, aumentando a secreção do hormônio do crescimento (GH). A secreção de GH é maior em mulheres na pré-menopausa quando comparadas às mulheres na pós-menopausa e aos homens, sendo que o pico de GH ocorre um pouco antes da ovulação, sugerindo um efeito estimulante do estradiol sobre a secreção desse hormônio (BERNARDI et al., 1998). BORSKI et al. (1996) demonstraram aumento do peso corporal em ratas ovariectomizadas quando comparadas às ratas controles intactas, e reversão desse efeito promovido pelo tratamento de reposição hormonal com estradiol. Além disso, estes autores associaram o tratamento hormonal à elevação dos níveis séricos de GH. Além do efeito clássico do GH sobre o crescimento corporal, esse hormônio induz preferencialmente a utilização dos estoques de gordura como fonte de energia, ao invés de carboidratos, através do aumento da mobilização dos ácidos graxos e redução da velocidade de utilização da glicose. O GH pode também inibir a lipogênese pela redução da atividade da lipoproteína lipase, inibindo a esterificação e deposição de ácidos graxos (BORSKI et al., 1996).

Dentre os mecanismos propostos para explicar a modulação do estradiol sobre o tecido adiposo está a influência desse hormônio sobre a lipoproteína lipase. O estradiol pode inibir a lipogênese pela redução da atividade da lipoproteína lipase, resultando em inibição da esterificação e deposição de ácidos graxos circulantes nos adipócitos. Esses efeitos podem explicar, pelo menos em parte, o aumento da deposição de tecido adiposo e ganho de peso consequentes da redução dos níveis plasmáticos de estradiol, como em ratas ovariectomizadas ou em mulheres na pós-menopausa (HOMMA et al., 2000). Além disso, o estradiol também aumenta a lipólise (PALIN et al., 2003), bem como o efeito lipolítico da epinefrina (ACKERMAN et al., 1981) e da beta-oxidação (MISSO et al., 2003), colaborando, desta maneira, para a redução dos estoques de tecido adiposo.

O consumo de alimentos palatáveis, principalmente aqueles ricos em gordura e açúcares, pode causar alterações no sistema de controle central do comportamento alimentar e do gasto energético, resultando em aumento do peso corporal (LINDQVIST et al., 2005). Alimentos palatáveis podem afetar as vias de recompensa

do cérebro, as quais parecem modular núcleos hipotalâmicos que regulam a homeostase energética. Assim, a ingestão sustentada de alimentos ricos em gordura promove ingestão calórica muito superior às necessidades fisiológicas, tanto em animais experimentais, quanto em humanos, sendo potencialmente capaz de elevar o peso corporal (SAPER; CHOU; ELMQUIST, 2002). Sustentando essa hipótese, recentemente foi demonstrada a relação entre a ingestão sustentada de alimentos palatáveis e o perfil hormonal favorável ao ganho de peso corporal, ou seja, a maior ingestão de gordura e carboidratos na dieta foi acompanhada por menores concentrações plasmáticas de leptina e maiores concentrações de grelina (hormônio estimulador do apetite), em mulheres na pós-menopausa obesas e com sobrepeso (KONG et al., 2009).

A associação da dieta hiperlipídica e ovariectomia promoveu também aumento significativo da pressão arterial sistólica no grupo DLO em relação aos demais grupos experimentais. Esse resultado é compatível com os dados de peso corporal e tecidos adiposos, ou seja, o quadro de obesidade ou a deficiência de estradiol isoladamente, não foram suficientes para alterar a pressão arterial do grupo DCO e DLS. Contudo, a união das duas condições parece ter oferecido um maior risco para o aumento da pressão arterial nos animais DLO. Esses resultados corroboram com dados da literatura. Em um modelo de síndrome metabólica induzida por dieta com 60% de frutose, foi verificado aumento da pressão arterial sistólica de ratas ovariectomizadas com síndrome metabólica, contudo não se observou aumento de PA quando essas condições foram consideradas isoladamente, ou seja, apenas ovariectomia ou apenas síndrome metabólica (GALIPEAU; VERMA; MCNEILL, 2002). Resultados semelhantes foram demonstrados recentemente em um modelo de síndrome metabólica induzida por solução de sacarose 30% em ratas ovariectomizadas (PÉREZ-TORRES et al., 2009). Nesse modelo, as ratas com síndrome metabólica não-ovariectomizadas, bem como as ratas controles ovariectomizadas, não apresentaram aumento da pressão arterial. Por outro lado, as ratas com síndrome metabólica submetidas à ovariectomia apresentaram aumento significativo da PA, a qual foi revertida após o tratamento com estradiol.

No entanto, é possível que os parâmetros de peso corporal e níveis pressóricos em machos sejam diferentes do que em fêmeas em resposta a uma dieta hiperlipídica. Nesse sentido, um modelo de síndrome metabólica induzida por uma dieta

hiperlipídica por 12 semanas, utilizando camundongos machos, na qual 60% das calorias eram provenientes de gordura, desde a oitava semana do experimento os animais com síndrome metabólica já apresentavam um aumento significativo na pressão sanguínea sistólica quando comparados aos seus controles, associado a um aumento considerável de depósito de tecido adiposo visceral (DEJI et al., 2009). Todas essas evidências sugerem um efeito cardioprotetor do estradiol sobre as fêmeas, pelo menos nesses modelos experimentais.

Os mecanismos pelos quais o estradiol regula a pressão sanguínea não estão totalmente esclarecidos, no entanto, é provável que este hormônio module o tônus vascular por meio de sua influência sobre substâncias vasoativas. Evidências sugerem que o efeito vasodilatador agudo do estradiol seja largamente mediado pela produção de óxido nítrico (NO), uma vez que este efeito é rapidamente bloqueado na presença de inibidores da síntese de NO e antagonistas de receptores de estradiol (DUBEY; JACKSON, 2001). Por outro lado, o estradiol parece inibir a produção de hormônios vasoconstritores, como por exemplo a Angiotensina II, tanto em humanos quanto em animais (DUBEY; JACKSON, 2001). A ovariectomia parece aumentar a expressão da enzima conversora da angiotensina (ECA), a síntese de Angiotensina II, bem como os níveis plasmáticos de renina, enquanto que a reposição hormonal pode contribuir para a reversão desses eventos (LINDSEY et al., 2009; XU et al., 2008). Portanto, é provável que a falta de regulação dos peptídeos vasoativos provocado pelo déficit de estradiol, com a redução de substâncias vasodilatadoras e aumento das vasoconstrictoras, pode, pelo menos em parte, contribuir para o aumento dos níveis pressóricos durante o período da pós-menopausa.

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado ampla relação entre obesidade e hipertensão, evidenciando que o ganho de peso está frequentemente associado ao aumento da pressão sanguínea e que, ao contrário, a perda de peso pode ser capaz de reduzir seus níveis (HALL et al., 2002; DEJI et al., 2009). O tecido adiposo possui alta capacidade de produzir e secretar moléculas envolvidas em numerosas funções, incluindo reprodução, metabolismo e inflamação. A obesidade tem sido reconhecida como um estado inflamatório devido a produção de citocinas ou adipocinas pró-inflamatórias pelos adipócitos, incluindo TNF- α , leptina, interleucina 6 (IL-6) e resistina, que podem contribuir para o desenvolvimento de complicações associadas

à obesidade incluindo hipertensão (BASTARD et al., 2006; GREGOR, HOTAMISLIGIL, 2011).

Os mecanismos que associam hipertensão à obesidade, não estão totalmente esclarecidos. Entretanto parece que as alterações metabólicas, bem como os danos vasculares, podem estar mais associados ao aumento dos depósitos de tecido adiposo visceral em detrimento do acúmulo do tecido adiposo subcutâneo (FURUKAWA et al., 2004). Nesse sentido, Furukawa et al. (2004) demonstraram em camundongos KKAy obesos e diabéticos que os depósitos de tecido adiposo visceral, quando comparados aos depósitos subcutâneos, apresentam maior expressão de RNAm de várias moléculas biologicamente ativas, tais como NADPH oxidase (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase), inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), IL-6, TNF- α e ERO, as quais contribuem para o desenvolvimento de alterações metabólicas, estresse oxidativo e processo inflamatório sistêmico, podendo resultar em lesões do endotélio vascular e desregulação de peptídeos vasoativos, contribuindo dessa forma para o desenvolvimento e sustentação da hipertensão arterial (FURUKAWA et al., 2004).

A perda da função ovariana, nas mulheres no período da pós-menopausa e em ratas ovariectomizadas, está associada a aumento da ingestão alimentar, de peso corporal e a acúmulo de gordura nos depósitos intra-abdominais, resultando em maior risco de desenvolver as complicações associadas à obesidade (MCELROY; WADE, 1987; CHEN; HEIMAN, 2001; LOBO, 2008; BROWN; CLEGG, 2010). Assim, no período da pré-menopausa, o estradiol promove deposição subcutânea do tecido adiposo, enquanto que o padrão de deposição, tanto em ratas ovariectomizadas quanto em homens e mulheres na pós-menopausa, é predominantemente visceral (DUBEY; JACKSON, 2001; CHEN; HEIMAN, 2001). Essas observações sugerem que a redução dos níveis plasmáticos de estradiol pode contribuir, pelo menos em parte, para o aumento da adiposidade visceral, o qual pode estar correlacionado com maior risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão e outras desordens verificadas durante esse período.

Estudos têm demonstrado que o aumento do peso corporal está associado a alterações da estrutura e função renal, incluindo aumento da taxa de filtração glomerular, diminuição da excreção renal de sódio, aumento da excreção urinária de

albumina, glomeruloesclerose, lesão de podócitos e do compartimento tubulointersticial (COIMBRA et al., 2000; CHAGNAC et al., 2000; HALL et al., 2003; RUTKOWSKI et al., 2006). Contudo, existem poucos estudos demonstrando os efeitos da obesidade sobre os parâmetros renais, principalmente no período de diminuição dos hormônios ovarianos induzidos pela pós-menopausa ou ovariectomia em ratas.

Os estudos clínicos e experimentais sugerem que a obesidade está associada ao aumento da TFG, do fluxo sanguíneo renal e a redução na resistência vascular renal (HENEGAR et al., 2001; DO CARMO et al., 2009; WUERZNER et al., 2010). No presente estudo não se observou alterações significativas da creatinina plasmática, do fluxo urinário e da TFG entre os grupos experimentais, apesar da discreta elevação da TFG no grupo DLO. Em um modelo genético de obesidade, utilizando camundongos nocautes para o gene do receptor M4 da melanocortina, foi demonstrado aumento moderado da TFG quando comparados aos camundongos selvagens (DO CARMO et al., 2009). No modelo de obesidade induzida por dieta em cães, foram observados também aumentos no FPR e na TFG quando comparados aos seus respectivos controles (HALL et al., 2003).

Wuerzner et al. (2010), em um estudo com humanos obesos, observaram que a prevalência da hiperfiltração glomerular, tanto em homens quanto em mulheres, correlaciona-se positivamente com o aumento do índice de massa corpórea. É provável que a hiperfiltração em indivíduos obesos seja provocada por uma maior pressão hidrostática, visto que o aumento da TFG é maior do que o aumento o fluxo plasmático renal (FPR), culminando em aumento na fração de filtração (CHAGNAC et al., 2000; CHAGNAC et al., 2008). Contudo, Chen et al. (2010), semelhantemente aos nossos dados, também não observaram alteração significativa na TFG em pacientes obesos, apesar da presença de marcadores de síndrome metabólica e proteinúria nesses indivíduos. Na obesidade crônica associada à hipertensão, a TFG é menor tanto em homens quanto em mulheres quando comparados a indivíduos não-obesos e normotensos. Essa queda da TFG em estágios crônicos de obesidade pode estar relacionada à lesão do parênquima renal e consequente perda de néfrons (MIYATAKE et al., 2010).

Os resultados do presente estudo demonstraram alterações significativas da função

renal, caracterizadas pela diminuição da fração de excreção de sódio ($FENa^+$) e aumento da proteinúria e microalbuminúria nos animais DLO. Essa redução da $FENa^+$ nos animais do grupo DLO corroboram com os dados descritos na literatura, os quais demonstram que a obesidade está associada com alterações da excreção urinária de sódio (HALL, 2003; SARZANI et al., 2008). A retenção de sódio e o aumento do líquido extracelular estão presentes na obesidade induzida por dieta em animais experimentais (HALL, 1997) e em humanos obesos (MESSERLI et al., 1981). No entanto, as causas do aumento da reabsorção tubular de sódio na obesidade não estão completamente elucidadas. Estudos têm demonstrado que a obesidade está relacionada a aumento da atividade do sistema nervoso simpático, do sistema renina-angiotensina-aldosterona e redução dos níveis plasmáticos de ANP (FUGITA, 2008; SARZANI et al., 2008). Esses fatores podem explicar, pelo menos em parte, as alterações na excreção de sódio e de pressão arterial observadas na obesidade.

Robles et al. (1993) demonstraram que o tratamento de cães obesos com o antagonista da All ou inibidores da enzima conversora de All promove diminuição da retenção de sódio e da expansão do volume, e conseqüentemente da pressão arterial. A atividade simpática aumentada também parece elevar a pressão sanguínea principalmente através dos nervos simpáticos renais, uma vez que a desnervação diminui a retenção de sódio e atenua o aumento na pressão sanguínea associada com a obesidade induzida pela dieta em cães (KASSAB et al., 1995). O aumento da pressão intersticial renal causado pela gordura circundante nos rins e o aumento da pressão abdominal podem dificultar a excreção renal de sódio e contribuir para as alterações da pressão arterial associada à obesidade (HALL, 2003; KOTSIS et al., 2010). Além disso, estudos anteriores do nosso laboratório demonstraram menores níveis plasmáticos de ANP e maior expressão de NPr-C, receptor responsável pelo clearance do ANP, tanto nos adipócitos quanto no tecido renal do grupo DLO, quando comparados aos demais grupos experimentais (ANDRADE et al., 2010).

Com relação ao aumento da proteinúria e microalbuminúria observadas nas ratas DLO, vários estudos utilizando diferentes modelos experimentais de síndrome metabólica, (HALL, 1997; PÉREZ-TORRES et al., 2009; DO CARMO et al., 2009; DEJI et al., 2009) assim como estudos clínicos em humanos (STRAZZULLO et al.,

2001; STRAZZULLO et al., 2006; CHAGNAC et al., 2008), com obesidade prolongada ou doença renal pré-existente, demonstraram associação entre alterações histológicas renais e alterações dos parâmetros de função renal e perfil metabólico, incluindo aumento da proteinúria, resistência à insulina, hiperinsulinemia e aumento do LDL (lipoproteína de baixa densidade), os quais podem contribuir para a lesão renal. De fato, estudos paralelos realizados em nosso laboratório, utilizando o mesmo modelo experimental, demonstraram que os animais do grupo DLO apresentaram hiperinsulinemia, resistência à glicose, aumento dos níveis plasmáticos de colesterol e da ingestão calórica. Todos esses resultados, apesar de significativos, não caracterizaram o quadro de obesidade crônica, e sim a obesidade em seu estágio inicial. Diante disso, é possível que o fornecimento da dieta rica em gordura por um período mais prolongado promova alterações mais pronunciadas dos parâmetros funcionais renais, incluindo proteinúria e albuminúria, para níveis indicativos de lesão da estrutura renal.

As alterações renais decorrentes da obesidade, observadas tanto em estudos clínicos quanto experimentais, incluem diversas adaptações estruturais e funcionais, tais como remodelamento e hipertrofia renal, proliferação da matriz extracelular, hipertrofia glomerular, aumento da TFG e do FSR e retenção de sódio (HALL, 1997; DO CARMO et al., 2009; DANILEWICZ; WAGROWSKA-DANILEWICZ, 2009; ARESU et al., 2010). A lesão histológica renal mais comum em indivíduos obesos é a glomeruloesclerose segmentar focal (GESF), a qual caracteriza-se por aumento da matriz extracelular, adesão da cápsula de *Bowman*, redução dos capilares glomerulares, espessamento da membrana basal glomerular, hipercelularidade e infiltrado de células imunes (DANILEWICZ; WAGROWSKA-DANILEWICZ, 2009; ARESU et al., 2010).

Os resultados histológicos do presente estudo revelaram a presença de alterações morfológicas iniciais, com padrão focal de distribuição no CTI do córtex renal das ratas DLO quando comparadas aos demais grupos experimentais. Essas alterações foram caracterizadas por infiltrado de células inflamatórias, atrofia e dilatação tubular e fibrose intersticial. Além disso, foram observadas também alterações da estrutura glomerular, incluindo áreas de esclerose, hipercelularidade, redução da luz dos capilares glomerulares e adesão da cápsula de *Bowman*. Esses dados permitem concluir que a dieta hipertlipídica em ratas ovariectomizadas promoveu alterações

histológicas renais discretas e focais, com conservação de áreas do córtex renal suficiente para manter a função renal em níveis próximos dos normais. O fornecimento desta dieta por um período mais prolongado pode causar lesões mais pronunciadas da estrutura renal com maior extensão de fibrose e acometimento dos glomérulos e túbulos renais nesses animais.

Além dos efeitos causados pela obesidade sobre os rins, a sua associação com a condição de deficiência do estrógeno promovida pela ovariectomia em nossos animais, pode estar contribuindo para as alterações renais observadas nesses animais. As mulheres na pré-menopausa são protegidas da progressão da doença renal, e evidências a partir de estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais sugerem que os hormônios ovarianos sejam responsáveis por essa proteção renal (DUBEY; JACKSON, 2001). O tratamento com estradiol reduziu a proteinúria, glomeruloesclerose, infiltração celular e preveniu a lesão tubular em ratas ovariectomizadas com rejeição renal crônica, sugerindo que o estradiol pode ser benéfico em limitar a progressão da doença renal (MARIC et al., 2004; MARIC et al., 2008). O estradiol inibe a síntese de vários fatores conhecidos por induzir glomeruloesclerose e elevar a pressão sanguínea. De particular relevância para o rim, o estradiol diminui: 1) a síntese local de Ang II no rim; 2) a produção de endotelina-1; 3) os níveis plasmáticos de homocisteína, fator endógeno que causa lesão glomerular e induz glomeruloesclerose; 4) radicais livres; 5) colesterol; 6) peroxidação lipídica. O estradiol com esses múltiplos mecanismos protege o rim contra a ação de agentes lesivos. Desta forma, a proteção renal induzida pelo estradiol pode contribuir para a habilidade deste hormônio em manter a pressão sanguínea normal (DUBEY; JACKSON, 2001).

Com o intuito de caracterizar melhor o modelo experimental proposto, as alterações renais induzidas pela dieta hiperlipídica em ratas ovariectomizadas foram analisadas por outros parâmetros individuais, incluindo morfometria da área glomerular, imunistoquímica para vimentina (marcador de lesão tubular após insulto) e para PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular).

Os estudos morfométricos demonstraram aumento discreto da área glomerular dos glomérulos corticais nos animais do grupo DLO e em menor grau nos animais do grupo DLS, quando comparados aos grupos DCS e DCO, sendo indicativo de início

de hipertrofia glomerular. Vários trabalhos utilizando modelos experimentais de obesidade, tanto induzida por dieta (HALL et al., 2003; PÉREZ-TORRES et al., 2009; DEJI et al., 2009) quanto por alterações genéticas (COIMBRA et al., 2000; DO CARMO et al., 2009) sugerem que a obesidade pode provocar hipertrofia glomerular, provavelmente devido à alterações hemodinâmicas decorrentes dessa condição. Estudos em humanos portadores de GESF induzida por obesidade (GESF-O) ou idiopaticamente (GESF-I) demonstraram através de biópsia renal que os indivíduos com GESF-O apresentaram uma maior área glomerular total quando comparados aos indivíduos com GESF-I (DANILEWICZ; WAGROWSKA-DANILEWICZ, 2009; KAMBHRAM et al., 2001). Apesar dos mecanismos fisiopatológicos que associam obesidade à hipertrofia glomerular não estejam totalmente esclarecidos, parece que os aumentos do FPS e da TFG desempenham um importante papel nesse processo (DO CARMO et al., 2009).

A marcação para vimentina estava aumentada no CTI do córtex renal dos animais do grupo DLO, indicando que as células tubulares do córtex renal desses animais estavam em processo de regeneração celular após injúria recente (GRÖNE et al., 1987). A expressão de vimentina é considerada um marcador de lesão tubular e de regeneração em vários modelos experimentais incluindo o modelo de proteinúria maciça induzida por anticorpos (KIKUCHI et al., 2000), envelhecimento renal (NAKATSUJI et al., 1998), nefropatia por adriamicina (SHU et al., 2002) e lesão isquêmica (VILLANUEVA et al., 2006). Coimbra et al. (2000) em estudos com ratos Zucker obesos e com diabetes do tipo II também observaram maior expressão dessa proteína no CTI do córtex renal, mais especificamente nos túbulos proximais desses animais. A expressão de vimentina também está aumentada no CTI do córtex renal em outros modelos de lesão renal, como por exemplo em ratos com restrição alimentar durante a vida intra uterina (GIL et al., 2005) e em casos de tumor misto epitelial e estromal de rim em humanos (HUANG et al., 2008). Os resultados demonstraram ainda maior expressão do PCNA no CTI do córtex renal dos animais do grupo DLO, sugerindo aumento de proliferação celular. Esse resultado encontra-se de acordo com estudos utilizando outros modelos experimentais de síndrome metabólica, como por exemplo em ratos obesos diabéticos ZSF1, nos quais a expressão do PCNA sofreu redução mediante os tratamentos com 2-hydroxyestradiol, um metabólito do estradiol (ZHANG et al., 2007) e com Tempol

(TOFOVIC et al., 2007) e em ratos espontaneamente diabéticos do tipo II SHR/N-cp (GROSS et al., 2004).

Os estudos imunoistoquímicos revelaram também aumentos significativos de células ED-1 (macrófagos/monócitos), linfócitos e All positivas no CTI do córtex renal dos animais DLO. Estudos têm demonstrado que a obesidade e a hipertensão são caracterizadas pela presença de infiltrado intersticial de macrófagos e monócitos e produção anormal de citocinas pró-inflamatórias no tecido renal (RODRÍGUEZ-ITURBE et al., 2004; OHTOMO et al., 2010). A inflamação intersticial renal associada à hipertensão é acompanhada pelo aumento da produção local de ERO e de All, tanto nas células inflamatórias infiltrantes como nas células do parênquima renal (NAVA et al., 2003). A inflamação local, o estresse oxidativo e a All nos rins participam de um ciclo que promove e mantém a hipertensão. Por outro lado, a hipertensão promove a inflamação via regulação de citocinas inflamatórias mediadas pelo estresse oxidativo, citocinas e moléculas de adesão. Foi demonstrado que a infiltração túbulo-intersticial de linfócitos e macrófagos está associada com a geração de ERO e All em alguns modelos experimentais de doenças renais (RANGAN et al., 1999; NAVA et al., 2003; SOARES et al., 2006). A redução desse infiltrado inflamatório pelo uso de agentes anti-inflamatórios ou antioxidantes promoveu a melhora ou prevenção da hipertensão em alguns modelos experimentais (MULLER et al., 2000; TIAN et al., 2005).

Os mecanismos pelos quais a infiltração de células inflamatórias no tecido renal contribui para as alterações renais induzidas pela obesidade não estão totalmente elucidados, no entanto, é provável que exista uma complexa relação entre este infiltrado, geração de estresse oxidativo e produção exarcebada de All. Rodríguez-Iturbe et al. (2001; 2002a) demonstraram que a infiltração de células inflamatórias como macrófagos/monócitos e linfócitos no tecido renal pode ter contribuído para o aumento da retenção de sódio, independente de alterações hemodinâmicas, participando, dessa forma, no desenvolvimento e sustentação da hipertensão arterial em ratos sensíveis ao sal. O acúmulo de células All positivas no córtex renal de pacientes com síndrome nefrótica pode ser uma das principais causas para a retenção de sódio nesses pacientes (RODRÍGUEZ-ITURBE; HERRERA-ACOSTA; JOHNSON, 2002). Dessa forma, em nosso estudo, a retenção de sódio observada nos animais do grupo DLO pode ser explicada, pelo menos em parte, pela maior

expressão de macrófagos/monócitos, linfócitos e All no CTI do córtex renal desses animais. Esse processo inflamatório local induzido pela dieta hiperlipídica em ratas ovariectomizadas pode estar contribuindo para as alterações iniciais da função e estrutura renais observadas no nosso modelo experimental. A obesidade prolongada pode causar a progressão dessas lesões renais e promover maiores alterações funcionais e estruturais nesses animais.

Os animais tratados com dieta hiperlipídica e submetidos à ovariectomia apresentaram também aumento da expressão de NF- κ B predominantemente nas células intersticiais, localizadas nas áreas de lesão do córtex renal. O NF- κ B é um importante fator de transcrição nuclear, responsável por controlar a transcrição de muitos genes celulares que regulam a resposta inflamatória, a sobrevivência e proliferação celular. A ativação do NF- κ B aumenta a expressão de vários genes envolvidos na inflamação, como citocinas, fatores quimiotáticos para monócitos e macrófagos (MCP-1), interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8) e moléculas de adesão vascular e intracelular (GUIJARRO, EGIDO, 2001; VAN DEN BERG et al., 2001).

Os resultados de imunistoquímica para NF- κ B estão de acordo com os dados encontrados na literatura (GÓMEZ-GARREZ et al., 2001; KRANZHOFER et al., 1999; FUJIHARA et al., 2007). Em um modelo de doença renal crônica, foi verificado aumento da expressão do NF- κ B nas células intersticiais do córtex renal de ratos com ablação renal 5/6. A análise imunistoquímica revelou também aumento da expressão de macrófagos e do número de células All positivas no córtex renal desses animais. O tratamento com PDTC, inibidor do NF- κ B, atenuou a lesão renal, a inflamação e a expressão do NF- κ B nas células intersticiais (FUJIHARA et al., 2007). Os nossos resultados revelaram também aumentos da infiltração de macrófagos e monócitos e do número de células All positivas no córtex renal, associados ao aumento da expressão de NF- κ B nas células intersticiais das ratas ovariectomizadas tratadas com dieta hiperlipídica. Apesar da identidade das células intersticiais NF- κ B positivas não ter sido determinada no presente estudo, é possível que parte dessas células intersticiais sejam macrófagos ativados, expressando a subunidade p65 do NF- κ B (KRANZHOFER et al., 1999; FUJIHARA et al., 2007).

O NF- κ B pode ser ativado por diferentes estímulos, como citocinas (IL-1, IL-2, TNF α), agentes vasoativos (All e endotelina), estresse oxidativo (CHEN et al., 1999;

GÓMEZ-GARRE et al., 2001; VAN DEN BERG et al., 2001). Recentemente estudos têm demonstrado aumento da expressão de NF- κ B induzido pela obesidade. PERCY et al. (2009), em um modelo de envelhecimento e obesidade em ratos, demonstraram aumento da expressão renal de NF- κ B nesses animais quando comparados aos ratos controles magros. Esse estudo demonstrou também que a obesidade estava associada à fibrose renal, apoptose tubular e infiltração de macrófagos no tecido renal. Philip et al., (2009), utilizando ratos Zucker obesos (*fa/fa*) e ratos Zucker magros heterozigotos (*fa/+*), evidenciaram maior expressão de RNAm para NF- κ B e TNF- α no córtex renal de ambos os grupos de animais submetidos à dieta hiperlipídica quando comparados aos grupos de ratos alimentados com uma dieta controle. Além disso, o consumo da dieta rica em gordura nesses animais estava associado a maior produção de ERO cortical e maiores níveis plasmáticos de creatinina, lipídeos, insulina, proteína C reativa e maior excreção de albumina urinária.

Os nossos resultados demonstraram também aumento da expressão de RNAm para TNF- α no córtex renal dos animais DLO quando comparado ao controle DCS. O TNF- α é produzido pelos macrófagos e está associado à inflamação em vários modelos de lesão renal, incluindo glomerulonefrite, insuficiência renal aguda e lesão túbulointersticial (CUNNINGHAM et al., 2002; WAHBA; MAK, 2007). Esse fator promove aumento da infiltração de macrófagos, estimulação de citocinas inflamatórias e ativação do NF- κ B, os quais participam de um ciclo inflamatório causando mais produção de citocinas inflamatórias, que pode resultar em início e progressão de lesões renais. Diante disso, é possível que o TNF- α e AII estejam promovendo a ativação do NF- κ B nas células intersticiais das ratas ovariectomizadas tratadas com dieta hiperlipídica, regulando a resposta inflamatória renal, a qual pode estar contribuindo para as alterações na estrutura e função renal observadas nesses animais.

7.1 Limitações

A principal limitação desse trabalho refere-se à ausência de resultados da expressão gênica do TNF- α dos grupos experimentais DCO e DLS. As amostras de cDNA do tecido renal pertencentes aos animais desses grupos experimentais mostraram-se não-funcionais no momento da amplificação, tanto para o TNF- α quanto para a β -actina, provavelmente devido às dificuldades no momento da extração do RNAm.

8 CONCLUSÃO

A realização deste estudo permitiu padronizar um modelo experimental de obesidade induzida por dieta hiperlipídica em ratas ovariectomizadas, com o intuito de avaliar o impacto da obesidade em fase inicial e da deficiência de estradiol sobre a estrutura e função renal, analisando o perfil inflamatório desses animais. Os resultados desse estudo sugerem que a dieta rica em gordura associada à diminuição dos hormônios ovarianos, induzida pela ovariectomia, promoveu aumentos do peso corporal, do tecido adiposo abdominal e da pressão arterial sistólica, acompanhados por retenção de sódio, alterações histológicas discretas e focais e processo inflamatório renal. As alterações morfológicas e funcionais renais encontradas nesse modelo podem representar uma condição precursora para o desenvolvimento de lesões renais mais intensas, características da obesidade prolongada, particularmente se o desenvolvimento de hipertensão arterial estiver presente no decorrer desse processo.

REFERÊNCIAS

ABRASS, C. K. Lipid metabolism and renal disease. **Contributions to Nephrology**, v. 151, p. 106–121, 2006.

ABRASS, K. C. Obesity: What does it have to do with kidney disease? **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, p. 2775-2791, 2004.

ACKERMAN, G. E. et al. Potentiation of epinephrine-induced lipolysis by catechol estrogens and their methoxy derivatives. **Endocrinology**, v. 109, p. 2084–2088, 1981.

ANDRADE, Everaldo Nery de. **Peptídeo Natriurético Atrial em um Modelo de Obesidade e Hipertensão Induzidas por Dieta em Ratas Ovariectomizadas**. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciências Fisiológicas, Departamento de Instituto Multidisciplinar em Saúde - Ims, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2010.

ARESU, L. et al. M. Severe renal failure in a dog resembling human focal segmental glomerulosclerosis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 143, p. 190-194. February, 2010.

AUBIN, M. et al. Female Rats Fed a High-Fat Diet Were Associated with Vascular Dysfunction and Cardiac Fibrosis in the Absence of Overt Obesity and Hyperlipidemia: Therapeutic Potential of Resveratrol. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 325, p. 961-968, 2008.

BASTARD, J. P. et al. Recent advances in relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *European Cytokine News*, v. 17, n.1, p.4-12, 2006.

BERNARDI.; F. et al. Somatotropic axis and body weight in pre-menopausal and postmenopausal women: evidence for a neuroendocrine derangement, in absence of changes of insulin-like growth factor binding protein concentrations. **Human Reproduction**, v. 13(2), p.279-284, 1998.

BIRBACH, A. et al. Signaling molecules of the NF-kB pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 10842-10851, 2002.

BORSKI, R. J. et al. Regulation of somatic growth and the somatotropic axis by gonadal steroids: primary effect on insulin-like growth factor I gene expression and secretion. **Endocrinology**, v. 137(8), p. 3253-32, 1996.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. .. POF 2008-2009: desnutrição cai e peso das crianças brasileiras ultrapassa padrão

internacional. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1699&id_pagina=1>. Acesso em: 12 jan. 2011.

BROWN, L. M.; CLEGG, D. J. Central effects of estradiol in the regulation of food intake, body weight, and adiposity. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 122, p. 65–73, 2010.

BRUSCHI, F. et al. Effect of oral or transdermal hormone replacement therapy on homocysteine levels: a randomized clinical trial. **Maturitas**, v. 48(1), p. 33-38, 2004.

CAGNACCI, A. et al. Physiological doses of estradiol decrease nocturnal blood pressure in normotensive postmenopausal women. **American Journal of Physiology**, v. 276, n. 45, p. H1355-H1360, 1999.

CHAGNAC, A. et al. Glomerular hemodynamics in severe obesity. **American Journal Physiology Renal Physiology**. v. 278(5), p. F817–22. 2000.

CHAGNAC, A. et al. Obesity-induced glomerular hyperfiltration: its involvement in the pathogenesis of tubular sodium reabsorption. **Nephrology Dialysis Transplantation**.. v. 23, p. 3946–3952. 2008.

CHEN, F. et al. New insights into the role of nuclear factor-kB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. **Clinical Chemistry**. 45, p. 7-17, 1999.

CHEN, H. M.; CHEN, Y.; ZHANG, Y. D.; ZHANG, P. P.; CHEN, H. P.; WANG, Q. W.; LI, L. S.; LIU, Z. H. Evaluation of Metabolic Risk Marker in Obesity-related Glomerulopathy. **Journal of Renal Nutrition**,v. 10, September, p. 1051-2276, 2010.

CHEN, J. et al. The Metabolic Syndrome and Chronic Kidney Disease in U.S. Adults. **Annals of Internal Medicine**. v.140, p. 167-74. 2004.

CHEN, Y.; HEIMAN, M. L. Increased weight gain after ovariectomy is not a consequence of leptin resistance. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 280, n. 2, p. 315-322, February, 2001.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by Acid Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**. v. 162, n.1, p. 155-159, apr. 1987.

COHEN, J. A. et al. Influence of estrogen depletion and salt loading on renal angiotensinogen expression in the mRen(2). Lewis strain. **American Journal Physiology Renal Physiology**. v. 299(1), p. F35-42, 2010.

COIMBRA, T. M. et al. Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes. **Kidney International.**, v. 57(1), p. 167-182, 2000.

COIMBRA, T.M. et al. Effects of administration of cationic and native homologous albumin on the kidney. **Nephron**, v. 33, p. 208-215, 1983.

COSTEROUSSÉ, O. et al. Angiotensin II-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. **Biochem J**, v. 290, p.333-340, 1993.

CUNNINGHAM, P. N. et al. Acute renal failure in endotoxemia is caused by TNF acting directly on TNF receptor-1 in kidney. **Journal of Immunology**. v. 168(11), p. 5817-23. 2002.

DANILEWICZ, M.; WAGROWSKA-DANILEWICZ, M. Morphometric and immunohistochemical insight into focal segmental glomerulosclerosis in obese and non-obese patients. **Nefrología**, v. 29(1), p. 35-41, 2009.

DE PAULA, R. B.; DA SILVA, A. A.; HALL, J. E. **Hypertension**, v. 43, p. 41-47, 2004.

DEJI, N. et al. Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice. **American Journal Physiology Renal Physiology**, v. 296, p.F118–F126, 2009.

DENGEL, D. R. et al. Insulin resistance, elevated glomerular filtration fraction, and renal injury. **Hypertension**. v. 28, p. 127–132, 1996.

DESSI-FULGHERI, P.; SARZANI, R.; RAPPELLI, A. The natriuretic peptide system in obesity-related hypertension: new pathophysiological aspects. **Journal of Nephrology**, v. 11, p. 296-299, 1998.

DIXON, A.; MARIC, C. 17 beta-Estradiol attenuates diabetic kidney disease by regulating extracellular matrix and transforming growth factor-beta protein expression and signaling. **American Journal Physiology Renal Physiology**, v. 293(5), p. F1678-F1690, 2007.

DO CARMO, J. M. et al. Impact of obesity on renal structure and function in the presence and absence of hypertension: evidence from melanocortin-4 receptor-deficient mice. **American Journal Physiology Regul Integr Comp Physiology** 297, p. R803–R812, 2009.

DOBRIAN, A. D. et al. Development of Hypertension in a Rat Model of Diet-Induced Obesity. **Hypertension**, v. 35, p. 1009-1015, 2000.

DUBEY, R. K.; JACKSON, E. K. Estrogen-induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical, and molecular mechanisms. **American Journal of Physiology**. v. 280, p. 365-388. 2001.

DUNN, B. R. et al. Prevention of glomerular capillary hypertension in experimental diabetes mellitus obviates functional and structural glomerular injury. **Journal Hypertension** Suppl 4, p. S251–S254, 1986.

ENGELI, S.; SHARMA, A. M. The renin-angiotensin system and natriuretic peptides in obesity-associated hypertension. **Journal of Molecular Medicine**. v. 79, p. 21–29, 2001.

FLANDERS, K. C. et al. Transforming growth factor beta 1: histochemical localization with antibodies to different epitopes. **The Journal of Cell Biology**., v. 108, p. 653-660, 1989.

FLEGAL, K. M. et al. Prevalence and Trends in Obesity Among US Adults, 1999-2008. **Journal of the American Medical Association**. v. 303(3), p. 235-241, 2010.

FLEGAL, K. M. et al. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999–2000. **Journal of the American Medical Association**. v. 288, p. 1723–27. 2002.

FOX, C. S. et al. Predictors of new-onset kidney disease in a community-based population. **Journal of the American Medical Association**. v. 291, p. 844–850, 2004.

FUJIHARA, C. K. et al. Chronic inhibition of nuclear factor- κ B attenuates renal injury in the 5/6 renal ablation model. **American Journal Physiology Renal Physiology**. v 292, p. F92–F99, 2007.

FUJITA, T. Aldosterone in salt-sensitive hypertension and metabolic syndrome. **Journal of Molecular Medicine**, v. 86, p.729–734, 2008.

FUJITA, T. Aldosterone in salt-sensitive hypertension and metabolic syndrome. **Journal of Molecular Medicine**. v. 86, p. 729–734. 2008.

FUJIWARA, K. et al. Saruta T. Renal protective effect of troglitazone in Wistar fatty rats. **Metabolism**. v. 49, p. 1361–1364, 2000.

FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 12, p.1752-1761, 2004.

GALIPEAU, D.; VERMA, S.; MCNEILL, J. H. Female rats are protected against fructose-induced changes in metabolism and blood pressure. **American Journal of Physiology**. v. 283, p. H2478–H2484, 2002.

GIL, F. Z. et al. Effects of Intrauterine Food Restriction and Long-Term Dietary Supplementation with L-Arginine on Age-Related Changes in Renal Function and Structure of Rats. **Pediatric Research**. Vol. 57, No. 5, 2005.

GÓMEZ-GARRE, D. et al. Activation of NF- κ B in Tubular Epithelial Cells of Rats With Intense Proteinuria. Role of Angiotensin II and Endothelin-1. **Hypertension**, v. 37, p. 1171-1178, 2001.

GREGOR, M. F.; HOTAMISLIGIL, G. O. S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 415–445, 2011.

GRÖNE H. J. et al. Coexpression of keratin and vimentin in damaged and regenerating tubular epithelia of the Kidney. **American Journal Pathol.** v.129, p. 1–8, 1987.

GROSS, M. L. et al. Comparison of renal morphology in the Streptozotocin and the SHR/N-cp models of diabetes. **Laboratory Investigation**, v. 84, n. 4, p. 452-464, April, 2004.

GUEDES, A. M. et al. O risco renal da obesidade. **Acta Médica Portuguesa**. 23, p. 853-858. 2010.

GUIJARRO, C.; EGIDO, J. Transcription factor- κ B (NF- κ B) and renal disease. **Kidney International** 59, p. 415-424, 2001.

HALL, J. E. et al. Mechanisms of obesity-associated cardiovascular and renal disease. **The American Journal of the Medical Sciences**. v. 324, p. 127–137, 2002.

HALL, J. E. et al. Role of renin-angiotensin system in obesity hypertension. **Circulation**, v. 96, p. 1-33, 1997.

HALL, J. E. Mechanisms of abnormal renal sodium handling in obesity hypertension. **American Journal Hypertens**; v. 10(5 Pt 2), p. 49S–55S, 1997.

HALL, J. E. The kidney, hypertension, and obesity. **Hypertension**. v. 41, p. 625-633. 2003.

HALL, J. E. et al. Obesity-Induced Hypertension: Renal Function and Systemic Hemodynamics. **Hypertension**, v. 22, p. 292-299, 1993.

HALL, J. E.; BRANDS, M. W.; HENEGAR, J.R. Mechanisms of hypertension and kidney disease in obesity. **The New York Academy of Sciences**. v. 18; p. 91-107. 1999.

HALL, J. E. et al. Obesity-induced hypertension: role of sympathetic nervous system, leptin, and melanocortins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 23, p. 17271-17276, June, 2010.

HAYGEN, H. N. The determination of "endogenous creatinine" in plasma and urine. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 5, p. 48-57, 1953.

HEINE, P.A. et al. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p.12729-12734, 2000.

HENEGAR, J. et al. Functional and structural changes in the kidney in the early stages of obesity. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12(6), p. 211-217, 2001.

HIGASHI, Y. et al. Effect of Estrogen replacement therapy of endothelial function in peripheral resistance arteries in normotensive and hypertensive postmenopausal women. **Hypertension**, v. 37, n. 2, p. 651-657, 2001.

HILL, C. S.; TREISMAN, R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. **Cell**. v. 80, p. 199-211, 1995.

HOEG, J. M.; WILLIS, L. R.; WEINBERGER, M. H. Estrogen attenuation of the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology**, v. 233, n. 3, p. H369-H373, 1977.

HOMMA, H. et al. Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. Existence of a unique estrogen response element on the lipoprotein lipase promoter. **J Biol Chem**, v. 275, p. 11404-11411, 2000.

HUANG, Y. J. et al. Pathological characteristics mixed epithelial and stromal tumor of kidney. **Beijing Da Xue Xue Bao**. v. 40, n. 4, p. 415-418, 2008.

JI, H. et al. Female protection in progressive renal disease is associated with estradiol attenuation of superoxide production. **Gend Med**, v. 4(1), p. 56-71, 2007.

JI, H. et al. Role of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin(1-7) in 17beta-oestradiol regulation of renal pathology in renal wrap hypertension in rats. **Exp Physiology**, v. 93(5), p. 648-657, 2008.

JONES, M. E. et al. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p.12735-12740, 2000.

KAMBHAM, N. et al. Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic. **Kidney International**. v. 59, p. 1498-509. 2001.

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

KARIM, R. et al. Associations between markers of inflammation and Physiologyogical and pharmacological levels of circulating sex hormones in postmenopausal women. **Menopause**, v. 17, n. 4, p. 785-790, 2010.

KASSAB, S. et al. Renal denervation attenuates the sodium retention and hypertension associated with obesity. **Hypertension**. v. 25, p. 893-897. 1995.

KHALIL, R.A. Sex hormones as potential modulators of vascular function in hypertension; **Hypertension**, v. 46, n. 2, p. 249-254, 2005.

KIKUCHI, H. et al. Severe proteinuria, sustained for 6 months, induces tubular epithelial cell injury and cell infiltration in rats but not progressive interstitial fibrosis. **Nephrology Dialysis Transplantation**.. v. 15(6), p. 799-810. 2000.

KLIEM, V. et al. Mechanism involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. **Kidney International**, v. 49, p. 666-678, 1996.

KONG, A. et al. Higher habitual intake of dietary fat and carbohydrates are associated with lower leptin and higher ghrelin concentrations in overweight and obese postmenopausal women with elevated insulin levels. **Nutrition Research**, v. 29, n. 11, p. 768–776, November, 2009.

KOTSIS, V. et al. Mechanisms of obesity-induced hypertension. **Hypertension Research**. v. 33, p. 386-393. 2010.

KRAMER, H. Obesity and chronic kidney disease. **Contrib Nephrol**. v. 151, p. 1-18. 2006.

KRANZHOFER, R. et al. Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor-kappaB in human monocytes. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 257, p. 826–828, 1999.

KURUKULASURIYA, L. R. et al. Hipertension in obesity, **Endocrinol. Metab Clin**, v. 37, p. 647-662, 2008.

LAURELL, C. B. Electroimmunoassay. Scand. **Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation**, Suppl. 124, p. 21-23, 1972.

LEWERS, D. T. et al. Long-term follow-up of renal function and histology after acute tubular necrosis. **Ann. Intern. Med.**, v. 73, p. 523 – 529, 1970.

LINDQVIST, A. et al. Overeating of palatable food is associated with blunted leptin and ghrelin responses. **Regulatory Peptides**, v. p.123–32. 2005.

LINDSEY, S. H. et al. Chronic Treatment with the G Protein-Coupled Receptor 30 Agonist G-1 Decreases Blood Pressure in Ovariectomized mRen2.Lewis Rats. **Endocrinology**, v. 150(8), p. 3753–3758, 2009.

LOBO, R. A. Metabolic syndrome after menopause and the role of hormones. **Maturitas**, v. 60, p. 10–18, 2008.

MARIC, C. et al. Glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis are attenuated with 17 β -estradiol in the aging dahl salt sensitive rat. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, p. 1546-1556, 2004.

MARIC, C. et al. Age-related renal disease in female Dahl salt-sensitive rats is attenuated with 17 β -estradiol supplementation by modulating nitric oxide synthase expression. **Gender medicine**, p. 2-13, 2008.

MASSY, Z. A. et al. The central role of nuclear factor-kB in mesangial cell activation. **Kidney International** 71, p. S76-S79, 1999.

MCELROY, J. F.; WADE, G. N. Short- and long-term effects of ovariectomy on food intake, body weight, carcass composition, and brown adipose tissue in rats. **Physiology & Behavior**, v. 39, n. 3, p. 361-365, 1987.

MEERSMAN, R.E. et al. Estrogen replacement, vascular distensibility, and blood pressures in postmenopausal women. **American Journal Physiology**, v. 274, n .43, p. H1539-H1544, 1998.

MELI, R. et al. Estrogen and raloxifene modulate leptin and its receptor in hypothalamus and adipose tissue from ovariectomized rats. **Endocrinology**, v. 145, p. 3115–3121, 2004.

MENDELSON, M. E.; KARAS, R. H. Mechanisms of disease: the protective effects of estrogen on the cardiovascular system. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 23, p.1801-1811, 1999.

MESSERLI, F. H.; CHRISTIE, B.; De CARVALHO, J. G. et al. Obesity and essential hypertension: hemodynamics, intravascular volume, sodium excretion and plasma rennin activity. **Archives of Internal Medicine**, v. 141, p. 81-85, 1981.

MILLER, J. A.; ANACTA, L. A.; CATTRAN, D. C. Impact of gender on the renal response to angiotensin II. **Kidney International**, v. 55, p. 278-285, 1999.

MISSO, M. L. et al. Cellular and molecular characterization of the adipose phenotype of the aromatase-deficient mouse. **Endocrinology**, v. 144, p. 1474–1480, 2003.

MIYATAKE, N. et al. Relationship between Estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR) and Metabolic Syndrome in Japanese. **Acta Med Okayama**, v. 64(3), p. 203-208, 2010.

MULLER, D. N. et al. NF-KB inhibition ameliorates angiotensin II-induced renal damage in rats. **Hypertension**, v. 35, p. 193-201, 2000.

MUNGER, K.; BAYLIS, C. Sex differences in renal hemodynamics in rats. **American Journal Physiology Renal Fluid Electrolyte Physiology**, v. 254, p. F223–F231, 1988.

NAKATSUJI, S. et al. Relationship between vimentin expressing renal tubules and interstitial fibrosis in chronic progressive nephropathy in aged rats. **Virchows Arch**. v. 433(4), p. 359-67. 1998.

NAVA, M. et al. Melatonin reduces renal interstitial inflammation and improves hypertension in spontaneously hypertensive rats. **American Journal Physiology Renal**, v. 284, p. F447-F454, 2003.

NODA, M. et al. Involvement of angiotensin II in progression of renal injury in rats with genetic non-insulin-dependent diabetes mellitus (Wistar fatty rats). **The Japanese Journal of Pharmacology**. v. 85, p. 416–422, 2001.

OHTOMO, S. et al. Body Weight Control by a High-Carbohydrate/Low-Fat Diet Slows the Progression of Diabetic Kidney Damage in an Obese, Hypertensive, Type 2 Diabetic Rat Model. **Journal of Obesity**, p. 11, 2010.

OKUMURA, F.; CAVALHEIRO, E. T. G. Experimentos simples usando fotometria de chama para ensino de princípios de espectrometria atômica em cursos de química analítica . **Química Nova**, v. 27(5), p. 832-836, 2004.

PALIN, S. L. et al. 17Beta-estradiol and anti-estrogen ICI: compound 182,780 regulate expression of lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase in isolated subcutaneous abdominal adipocytes. **Metabolism**, v. 52, p. 383–388, 2003.

PAPAFRAGKAKI, D. K.; TOLIS, G. Obesity and renal disease: a possible role of leptin. **Hormones**, v. 4, p. 90-95, 2005.

PARK, S. et al. Estrogen replacement reverses olanzapine-induced weight gain and hepatic insulin resistance in ovariectomized diabetic rats. **Neuropsychobiology**, v. 61(3), p.148-61, 2010 .

PEDERSEN, S. B. et al. Estrogen controls lipolysis by up-regulating alpha2Aadrenergic receptors directly in human adipose tissue through the estrogen receptor alpha. Implications for the female fat distribution. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, p.1869–1878, 2004.

PERCY, C. J. et al. Obesity and hypertension have differing oxidant handling molecular pathways in age-related chronic kidney disease. **Mechanisms of Ageing and Development**. Mar;130(3), p. 129-38. 2009.

PÉREZ-TORRES, I. et al. Association of renal damage and oxidative stress in a rat model of metabolic syndrome. Influence of gender. **Free Radical Research**, v. 43(8), p. 761-771, 2009.

PETERS, H. et al. Selective lymphocyte inhibition by FTY720 slows the progressive course of chronic anti-thy 1 glomerulosclerosis. **Kidney International**, v. 66(4), p. 1434-1443, 2004.

PHILIP, J. et al. Diet-induced Renal Changes in Zucker Rats Are Ameliorated by the Superoxide Dismutase Mimetic. **TEMPOL Obesity** (Silver Spring). November; 17(11), p. 1994–2002. 2009.

RANGAN, G. K. et al. Inhibition of nuclear factor-kB activation reduces cortical tubulointerstitial injury on proteinuric rats. **Kidney International** 56, p. 118-134, 1999.

RECKELHOFF, J. F.; FORTEPIANI, L. A. Novel mechanisms responsible for postmenopausal hypertension. **Hypertension**, v.43, p.918-923, 2004

RECKELLOFF, J. F. Gender differences in the regulation of blood pressure. **Hypertension**, v. 37, p. 1199-1208, 2001.

REEVES, P. G. et al. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet **The Journal of Nutrition**, v. 123, p.1939-1951, 1993.

RIYUZO, A. M. C.; SOARES, V. Revisão: Papel do infiltrado inflamatório na fibrose túbulo-intersticial e evolução das glomerulopatias. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 24(1), p. 40-47, 2002.

ROBLES, R. G. et al. Effects of captopril on sympathetic activity, lipid and carbohydrate metabolism in a model of obesity-induced hypertension in dogs. **American Journal of Hypertension**. v. 6, p. 1009-1019. 1993.

ROCCHINI, A. P. The influence of obesity in hypertension. **News in Physiological Science**, v. 5, p. 245-249, 1990.

RODRÍGUEZ-ITURBE, B. et al. Mycophenolate mofetil prevents salt-sensitive hypertension resulting from angiotensin II exposure. **Kidney International**. v. 59, p. 2222–2232, 2001.

RODRÍGUEZ-ITURBE, B. et al. Oxidative stress, renal infiltration of immune cells, and salt-sensitive hypertension: all for one and one for all. **American Journal Physiology Renal Physiology**, v. 286, p. 606-616, 2004.

RODRÍGUEZ-ITURBE, B.; HERRERA-ACOSTA, J.; JOHNSON, R.J. Interstitial inflammation, sodium retention, and the pathogenesis of nephrotic edema: A unifying hypothesis. **Kidney International**. v. 62, pp. 1379–1384. 2002.

RODRÍGUEZ-ITURBE, B. et al. The role of immune cells infiltrating the kidney in the pathogenesis of salt-sensitive hypertension. **Journal Hypertension Suppl**, v. 20(3), p. 9–14, 2002a.

RODRÍGUEZ-ITURBE, B.; QUIROZ, Y.; NAVA, M. et al. Reduction of immune cells infiltrating the kidney results in lowering of the blood pressure in genetically hypertensive rats. **American Journal Physiology**. v. 282, p. 191– 201, 2002b.

RUIZ-LARREA, M. B. et al. Antioxidant activities of estrogens against aqueous and lipophilic radicals; differences between phenol and catechol estrogens. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 105, p. 179-188, 2000.

RUTKOWSKI, P. et al. Renal disease in obesity: The need for greater attention. **Journal of Renal Nutrition**, v. 16, p. 216-223, 2006.

RUTKOWSKI, P. et al. Renal disease in obesity: The need for greater attention. **Journal of Renal Nutrition**, v. 16, p. 216-223, 2006.

RUTKOWSKI, P.; KLASSE, A.; SEBEKOVA, K.; HEIDLAND, A. Renal disease in obesity: The need for greater attention. **Journal of Renal Nutrition**, v. 16, p. 216-223, 2006.

SAITO, T. et al. The enhancement of aminonucleoside nephrosis by the co-administration of protamine. **Kidney International**, v. 32, p. 691–699, 1987.

SAPER, C. B.; CHOU, T. C.; ELMQUIST, J. K. The Need to Feed: Homeostatic and Hedonic Control of Eating. **Neuron** v. 36, p. 199–211. 2002.

SARAFIDIS, P. A.; RUILOPE, L. M. Insulin Resistance, Hyperinsulinemia and Renal Injury: Mechanisms and Implication. **American Journal of Nephrology**. v. 26, p. 232-244. 2006.

SARZANI, R. et al. Renin-angiotensin system, natriuretic peptides, obesity, metabolic syndrome, and hypertension: an integrated view in humans. **Journal Hypertension**. v. 26, p. 831-43. 2008.

SAXENA, K. A; CHOPRA, R. Renal Risks of an emerging Epidemic of obesity: the role of adipocyte-derived factors. **Dialysis & Transplantation**, v. 33, n. 1, p. 11-20, 2004.

SCHNACKENBERG, C.G. Physiology and pathophysiological roles of oxygen radicals in the renal microvasculature. **American Journal Physiology Regul Integr Comp Physiology**, v. 282, p.335–342, 2002.

SCHORR, U. et al. Relationship between angiotensinogen, leptin and blood pressure levels in young normotensive men. **Journal Hypertension**, v. 16, p. 1475–1480, 1998.

SHI, H.; CLEGG, D. J. Sex differences in the regulation of body weight. **Physiology. Behav.** v. 97, p. 199-204, 2009.

SHIH, W. et al. Effects of cyclosporin A on the development of immune-mediated interstitial nephritis. **Kidney International**, v. 33, p. 1113-1118, 1988.

SHU, Y. et al. Phenotypic changes and cell cycle activation in early tubulointerstitial injury of rat adriamycin nephrosis. **Pathol Int.** v. 52(3), p. 214-23. 2002.

SILBIGER, S.; NEUGARTEN, J. The impact of gender on the progression of chronic renal disease. **American Journal Kidney Disease**, v. 25, p. 515–533, 1995.

SOARES, T. J. et al. Inhibition of nuclear factor-kappa B activation reduces glycerol-induced renal injury. **Journal of Nephrology**, v. 19, n. 4, p. 439-448, 2006.

SOARES, T. J. et al. Effects of resveratrol on glycerol-induced renal injury. **Life Science**, v. 81, n. 8, p. 647-656, 2007.

SOWERS, J. R. Obesity and cardiovascular disease. **Clinical Chemistry**. v. 44, n.8, p.1821-1825, 1998.

SOWERS, J. R. Obesity as a cardiovascular risk factor. **American Journal of Medicine**, v. 8, n. 115, Suppl 8A:37S-41S, December, 2003.

STERN, J. S. et al. Calorie restriction in obesity: prevention of kidney disease in rodents. **J Nutr**, v. 131, p. 913S–917S, 2001.

STRAZZULLO, P. et al. Abnormalities of renal sodium handling in the metabolic syndrome: results of the Olivetti Heart Study. **Journal Hypertension**. v. 24, p. 1633–1639. 2006.

STRAZZULLO, P. et al. Altered renal sodium handling in men with abdominal adiposity: a link to hypertension. **Journal Hypertension**. v. 19, p. 2157–2164. 2001.

STRUTZ, F.; NEILSON, E. G. The hole of lymphocytes in the progression of interstitial disease. **Kidney International**., v. 45, p. 106-110, 1994.

SULLIVAN, J. C. et al. Effects of estradiol on renal cyclic guanosine monophosphate and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. **Gend Med**, v. 6, n. 3, p. 498-510, 2009.

TAMAYA-MORI, N.; UEMURA, K.; IGUCHI, A. Gender Differences in the Dietary Lard-Induced Increase in Blood Pressure in Rats. **Hypertension**, v. 39, p. 1015-1020, 2002.

TIAN, N. et al. Antioxidant treatment prevents renal damage and dysfunction and reduces arterial pressure in salt-sensitive hypertension. **Hypertension**, v. 45, p. 934-939, 2005.

TOFOVIC, S. P. et al. Early renal injury induced by caffeine consumption in obese, diabetic ZSF1 rats. **Renal Failure**, v. 29, n. 7, p. 891-902, 2007.

UEMARA, K.; MORI, N. Influence of age and sex on high-fat diet-induced increase in blood pressure. **Nagoya Journal of Medical Science**, v. 68, p. 109-114, 2006.

VAN DEN BERG, R. et al. Transcription factor NF- κ B as a potential biomarker for oxidative stress. **British Journal of Nutrition**. v. 86, Suppl.1, p. S121-S127, 2001.

VILLANUEVA, S. et al. Ischemic acute renal failure induces the expression of a wide range of nephrogenic proteins. **American Journal Physiology Regul Integr Comp Physiology**. v. 290(4), p. R861-70. 2006.

WADE, G. N.; GRAY, J. M.; BARTNESS, T. J. Gonadal influences on adiposity. **International Journal of Obesity**, v. 9, p. 83-92, 1985.

WAHBA, I. M.; MAK, R. H. Obesity and obesity-initiated metabolic syndrome: mechanistic links to chronic kidney disease. **Clin Journal of the American Society of Nephrology**. v. 2(3), p. 550-62. 2007.

WANG, T. J. et al. Impact of Obesity on Plasma Natriuretic Peptide Levels. **Circulation**, v. 109, p. 594-600, 2004.

WEISINGER, J.R. et al. The nephrotic syndrome: a complication of massive obesity. **Annals of Internal Medicine**, v. 81, p. 440-447, 1974.

WEST, S. et al. Transdermal estrogen reduces vascular resistance and serum cholesterol in postmenopausal women. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 84, n. 5, p. 926-933, 2001.

WHO Scientific Group on Research on the Menopause in the 1990s. Geneva, **WHO technical report series**; 866,1-107, 1996.

WILLIAMS, S. P. et al. Endothelium-dependent relaxation in estrogen-treated spontaneously hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 145, p. 295-207, 1988.

WISE, P. M. et al. Neuroendocrine influences and repercussions of the menopause. **Endocrine Reviews**, v. 20, p. 243-248, 1999.

WOFFORD, M. R. et al. Antihypertensive effect of alpha and beta adrenergic blockade in obese and lean hypertensive subjects. **American Journal Hypertension**, v. 14, p.694–698, 2001.

WUERZNER, G. et al. Marked Association Between Obesity and Glomerular Hyperfiltration: A Cross-sectional Study in an African Population. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 56, No 2 (August), p. 303-312, 2010.

XU, X. et al. Effects of ovariectomy and 17beta-estradiol treatment on the renin-angiotensin system, blood pressure, and endothelial ultrastructure. **International Journal of Cardiology**, v. 130(2), p. 196-204, 2008.

ZHANG, C. et al. Protection of podocytes from hyperhomocysteinemia-induced injury by deletion of the gp91phox gene. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 48(8), p.1109-1117, 2010.

ZHANG, X. et al. 2-Methoxyestradiol and 2-ethoxyestradiol retard the progression of renal disease in aged, obese, diabetic ZSF1 rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. Jan;49(1), p. 56-63. 2007.

ZIMMET, P. et al. Etiology of the metabolic syndrome: potential role of insulin resistance, leptin resistance, and other players. **The New York Academy of Sciences**. v.18/892, p. 25-44. 1999.