



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

SAMIRA ITANA DE SOUZA

ALTERAÇÕES RENAIIS E METABÓLICAS INDUZIDAS PELA
DIETA HIPERLIPÍDICA E HIPERSÓDICA EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS.

Vitória da Conquista

2012

SAMIRA ITANA DE SOUZA

**ALTERAÇÕES RENAIIS E METABÓLICAS INDUZIDAS PELA
DIETA HIPERLIPÍDICA E HIPERSÓDICA EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS.**

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 Ciências Fisiológicas.

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

2012

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira - UFBA

Souza, Samira Itana de

Alterações renais e metabólicas induzidas pela dieta hiperlipídica e hipersódica em ratas ovariectomizadas / Samira Itana de Souza - 2012.

98 f. : il.

Orientadora: Profª. Drª. Telma de Jesus Soares; Profª. Drª. Terezila Machado Coimbra.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2012.

1. Dieta Hiperlipídica. 2. Cloreto de Sódio na Dieta. 3. Ovariectomia. 4. Obesidade. I. Universidade Federal da Bahia. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. II. Título.

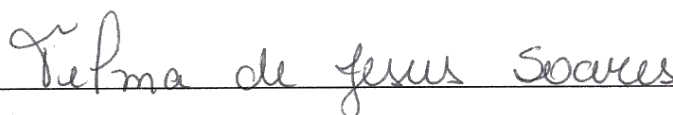
CDU – 615.874.25

SAMIRA ITANA DE SOUZA

**ALTERAÇÕES RENAIS E METABÓLICAS INDUZIDAS
PELA DIETA HIPERLIPÍDICA E HIPERSÓDICA EM
RATAS OVARIECTOMIZADAS.**

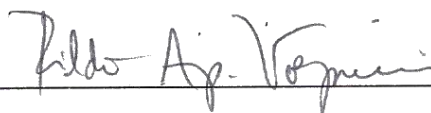
Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Fisiologia e aprovada em sua forma final pelo Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas – SBFIS da Universidade Federal da Bahia.

Vitória da Conquista – BA, 26 de março de 2012.



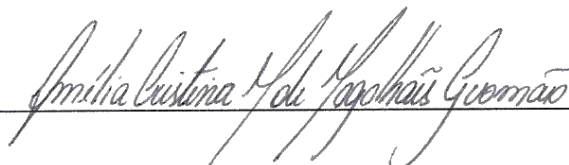
Prof^a. Dr^a. Telma de Jesus Soares

Universidade Federal da Bahia



Prof. Dr. Rildo Aparecido Volpini

Universidade de São Paulo



Profa. Dra. Amélia Cristina Mendes de Magalhães Gusmão

Universidade Federal da Bahia

À Deus, por sempre iluminar meus caminhos.

Aos meus pais pelo imenso amor, proteção, força e carinho.

Aos meus queridos irmãos Sanaia, Sanio e Maria Lúcia pela cumplicidade, apoio e afeto.

Ao meu namorado pelo companheirismo, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por conceder a mim a oportunidade de ingressar no mestrado e também pela imensa proteção e força nos momentos difíceis.

Aos meus pais pelo amor, proteção e palavras de incentivo e afeto que me fortaleceram durante toda a jornada.

Aos meus irmãos Sanaia, Sânio e Maria Lúcia pelo companheirismo, carinho e momentos de alegria.

Ao meu namorado e aos meus sogros pelo apoio e carinho.

À prof^a Telma de Jesus Soares, minha orientadora, que com muita tranquilidade e serenidade soube me conduzir e transmitir seus conhecimentos, contribuindo grandemente para meu amadurecimento profissional. Agradeço também pela confiança depositada em mim, pelos conselhos e pelo carinho com que me tratou durante os dois anos de mestrado.

À prof^a Terezila Machado Coimbra pela co-orientação do trabalho e pela contribuição para concretização do mesmo, disponibilizando o seu laboratório para realização de alguns experimentos.

Ao prof José Rodrigues Antunes pela idealização do Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, descentralizando a pesquisa científica e possibilitando a difusão dos conhecimentos na área de fisiologia.

À prof^a Amélia Cristina Mendes de Magalhães pela disponibilidade em ajudar, pelas sugestões e contribuição para a construção do trabalho.

Às professoras Najara de Oliveira Belo e Regiane Yatsuda pela contribuição para realização do trabalho e pelo bom funcionamento do programa.

Ao prof Cândido Celso Coimbra, do Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo do ICB na Universidade Federal de Minas Gerais, pela realização do radioimunoensaio para insulina.

À prof^a Josmara Bartolomei Fregoneze pelo 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.

Aos colegas de laboratório Anna Carolina, Everaldo, Kelle, Leda, Lilianny, Daniela, Raimundo, Thiago Henrique, Gleisy, Luciano, Grazielle e Jussara pela convivência harmoniosa.

Aos colegas de iniciação científica, Thiago Trindade, Welber, Fernanda, Jéssica, Roberta, Higor, Gabriela, Bárbara, Cleidiani, Emanuele, Amanda Rocha, Amanda, Samuel, pela ajuda nos experimentos e dedicação ao projeto.

À Heloísa e Éveling, alunas de pós-doutorado e doutorado respectivamente, do laboratório de Fisiologia Renal da FMRP/USP, pelo carinho com que me receberam e também pela contribuição na realização de alguns 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, pelos cortes histológicos.

À técnica do departamento de Farmacologia da FMRP/USP, Giuliana Bertozzi Francisco pela realização do ELISA.

Aos professores e colegas das Universidades Nucleadoras da FMRP/USP e UFRJ pelo acolhimento.

À CAPES e FAPESB, pela concessão de bolsa e pelo auxílio financeiro para o projeto que possibilitaram a realização deste trabalho.

*“Feliz o homem que acha sabedoria, e o homem que
adquire conhecimento; porque melhor é o lucro que
ela dá do que o da prata, e melhor a sua renda do
que o ouro mais fino. Mais preciosa é do que
pérolas, e tudo o que podes desejar não é
comparável a ela”*

(Pv, 3.13-15)

SOUZA, Samira Itana de. Alterações renais e metabólicas induzidas pela dieta hiperlipídica e hipersódica em ratas ovariectomizadas. 97 f. il. 2012. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2012

RESUMO

O consumo de dieta hiperlipídica e hipersódica está associado ao aumento da pressão arterial, do peso corporal e do tecido adiposo visceral. O excesso de peso e a sobrecarga de sal podem promover alterações renais. Contudo, a influência dessa dieta sobre a função e estrutura renal durante a redução dos hormônios ovarianos tem sido pouco documentada. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica e hipersódica sobre a pressão arterial e os parâmetros renais e bioquímicos em ratas ovariectomizadas. Vinte e quatro ratas *Wistar* foram ovariectomizadas (OV) e divididas nos seguintes grupos: DCO - ratas OV submetidas à dieta padrão contendo 12,39% do total de calorias advindas de gordura e 0,3% de cloreto de sódio (n=6); DLO - ratas OV submetidas à dieta hiperlipídica contendo 51,1% do total de calorias advindas de gordura e 0,3% de cloreto de sódio (n=8); e DLSO - ratas OV submetidas à dieta hiperlipídica contendo 56,1% do total de calorias advindas de gordura e 8% de cloreto de sódio (n=10). O peso e a pressão sanguínea foram determinados semanalmente. Amostras de sangue foram coletadas para análise de função renal e para determinação da glicose, colesterol total, triglicerídeos, insulina e da tolerância a glicose. Amostras de urina de 24h foram utilizadas para análise de função renal. Os animais foram sacrificados após 24 semanas de dieta e os rins removidos para a realização dos estudos histológicos, morfométricos e imunoistoquímicos. O tecido adiposo visceral foi também removido. Os resultados demonstraram que o grupo DLO apresentou maior ganho de peso corporal e ingestão calórica quando comparado ao grupo DCO, enquanto o grupo DLSO não apresentou alterações significativas desses parâmetros. Os grupos DLO e DLSO demonstraram aumento do tecido adiposo abdominal e da pressão arterial sistólica (PAS) quando comparado ao grupo DCO. O grupo DLSO apresentou ainda maior PAS em relação ao DLO. Esses animais não apresentaram diferenças nos níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos e de glicose, porém, demonstraram redução da tolerância a glicose quando comparado ao grupo controle. As ratas do grupo DLO apresentaram elevação dos níveis séricos de insulina, do índice HOMA-IR, da proteinúria e redução da fração de excreção de sódio (FENa⁺) comparado ao controle. Contudo, a proteinúria e a FENa⁺ foram mais elevados no grupo DLSO. Não foram observadas alterações significativas da creatinina plasmática e da taxa de filtração glomerular entre os grupos. O grupo DLO apresentou alterações discretas no compartimento túbulo-intersticial do córtex renal, caracterizadas por infiltrado inflamatório, fibrose intersticial e dilatação e atrofia tubular. Essas alterações não foram observadas no grupo DLSO. O número de macrófagos/monócitos estava aumentado no córtex renal das ratas dos grupos DLO e DLSO em relação ao grupo DCO. Os nossos resultados demonstram que a adição de sal à dieta hiperlipídica em ratas ovariectomizadas pode contribuir para elevação da PAS e do tecido adiposo visceral, redução da tolerância a glicose, proteinúria e infiltração de macrófagos/monócitos no tecido renal.

Palavras-chave: Dieta hiperlipídica; Cloreto de sódio na dieta; Ovariectomia; Obesidade.

SOUZA, Samira Itana de. Renal and metabolic alterations induced by high fat and high salt diet in ovariectomized rats. 97 pp. ill. 2012. Máster Dissertation – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2012.

ABSTRACT

The consumption of high fat and high salt diet is associated with increased blood pressure, body weight and visceral adipose tissue. Excess of weight and high salt diet may promote renal alterations. However, the influence of this diet on renal function and structure during the reduction of ovarian hormones has been less documented. The aim of this study was to evaluate the effects of high fat plus high salt diet on blood pressure and renal and biochemical parameters in ovariectomized rats. Twenty-four Wistar rats were ovariectomized (OV) and divided into the following groups: OSD – OV rats submitted to the standard diet containing 12,39% of total calories from fat and 0,3% of sodium chloride (n=6), OHFD – OV rats submitted to high-fat diet containing 51,1% of total calories from fat and 0,3% of sodium chloride (n=8) and OHFSD - OV rats submitted to high-fat diet containing 56,1% of total calories from fat and 8% of sodium chloride (n=10). Weight and blood pressure were measured weekly. Blood samples were collected for analysis of renal function and to determine serum glucose, total cholesterol, triglycerides, insulin and glucose tolerance. Urine samples collected over a 24-hour period were used 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. The visceral adipose tissue was also removed. The results demonstrated that OHFD group presented higher weight gain and caloric intake compared to the OSD group, while OHFSD group didn't show any significant alterations of these parameters. The OHFD and OHFSD group rats showed increased visceral adipose tissue and systolic blood pressure (SBP) when compared to the OSD group. The OHFSD group had a higher systolic arterial pressure than in the OHFD group. These animals didn't show any difference in the total cholesterol, triglycerides and glucose serum levels, but showed reduction of glucose tolerance compared to the control group. The OHFD rats presented elevated insulin serum levels, HOMA-IR index, proteinuria and reduced and fractional excretion of sodium ($FENa^+$) compared to the control. However, the proteinuria and $FENa^+$ were higher in the OHFSD group. There were not significant differences in plasma creatinine and glomerular filtration rate between the groups. The OHFD group showed slight alterations in tubulointerstitial compartment of the renal cortex, characterized by interstitial inflammatory infiltrates, interstitial fibrosis, dilation and atrophy tubular. These changes were not observed in OHFSD group. The number of macrophages/monocytes was increased in the renal cortex of OHFD and OHFSD rats than in the OSD rats. Our results demonstrate that

high-fat plus high salt diet in ovariectomized rats may contribute to the increases in systolic blood pressure and visceral adipose tissue, reduced glucose tolerance, proteinuria and macrophage/monocytes infiltration in the renal cortex of these animals.

Keywords: High fat diet; Sodium chloride in the diet; Ovariectomy; Obesity.

LISTA DE ABREVIATURAS

All	Angiotensina II
CTI	Compartimento túbulo-intersticial
Dahl S	Ratos sensíveis ao sal
DCO	Ratas submetidas à dieta controle e ovariectomia
DLO	Ratas submetidas à dieta hiperlipídica e ovariectomia
DLSO	Ratas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica e ovariectomia
ECA	Enzima conversora da angiotensina
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ER- α	receptor de estrógeno alfa
FENa+	Fração de excreção de sódio
HOMA-IR	Homeostatic model assessment
IL-6	Interleucina 6
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPL	Lipoproteína lipase
LTI	Lesão túbulo-intersticial
MCP-1	proteína quimiotática de monócitos
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
PA	Pressão arterial
PPAR γ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma Gama
PAS	Pressão arterial sistólica
PCR	Proteína C reativa
RIA	Radioimunoensaio

RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
SNS	Sistema nervoso simpático
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TAM	Tecido adiposo mesentérico
TAP	Tecido adiposo peritoneal
TAR	Tecido adiposo retroperitoneal
TAV	Tecido adiposo visceral
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.** Ganho de peso corporal de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), 24 semanas após o tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM. * $p < 0,05$ versus DCO; *** $p < 0,001$ versus DCO e DLO.....52
- Figura 2.** Peso do tecido adiposo visceral de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), 24 semanas após o tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM. * $p < 0,05$ versus DCO.....52
- Figura 3.** Ingestão Calórica de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), 24 semanas após o tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM. * $p < 0,05$ versus DCO e DLSO.....53
- Figura 4.** Pressão arterial sistólica (PAS) de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), 24 semanas após o tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM. *** $p < 0,001$ versus DCO; ### $p < 0,001$ versus DCO e DLO.....55
- Figura 5.** Medidas da glicemia sérica nos tempos 0', 30', 60' e 90' após administração intraperitoneal de glicose (A); e área sob a curva (B) de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), 24 semanas após o tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM. * $p < 0,05$ versus DCO; # $p < 0,05$ versus DCO e DLSO.....57

Figura 6. Concentração sérica de insulina de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), 24 semanas após o tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM. *** $p < 0,05$ versus DCO e DLSO.....58

Figura 7. Evolução do fluxo urinário de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), durante as 24 semanas de tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM. *** $p < 0,001$ versus DCO e DLO.....59

Figura 8. Evolução da fração de excreção de sódio de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), durante as 24 semanas de tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM. * $p < 0,05$ versus DCO; *** $p < 0,001$ versus DCO e DLO.....60

Figura 9. Excreção urinária de proteínas de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), após 24 semanas de tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM. * $p < 0,05$ versus DCO, *** $p < 0,001$ versus DCO.....60

Figura 10. Cortes histológicos de rins corados com Tricômio de Masson no córtex renal de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO) (A), de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) (B) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO) (C), 24 semanas após o tratamento dietético. Notar em B, a presença de infiltrado de células intersticiais, fibrose intersticial e atrofia tubular. Aumento de 20x.....62

Figura 11. Escore para lesão túbulo-intersticial no córtex renal de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à

dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), 24 semanas após o tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM. *** $p < 0,001$ versus DCO e DLSO.....62

Figura 12. Área do tufo glomerular de glomérulos corticais de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), de ratas ovariectomizadas submetida à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), 24 semanas após o tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM. * $p > 0,05$ versus DCO.....63

Figura 13. Área do tufo glomerular de glomérulos justamedulares de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), de ratas ovariectomizadas submetida à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), 24 semanas após o tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM.....63

Figura 14. Imunolocalização de células ED-1 positivas (macrofágos/monócitos) no CTI no córtex renal de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO) (A), ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) (B) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO) (C), 24 semanas após o tratamento dietético (40x).....64

Figura 15. Quantificação do número de células ED-1-positivas no CTI no córtex renal de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), 24 semanas após o tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ versus DCO.....64

Figura 16. Dosagem de TNF α sérico de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), 24 semanas após o tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM. * $p < 0,05$ versus DCO.65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proporções dos ingredientes nas dietas experimentais controle (DC) e hiperlipídica (DL) e hiperlipídica e hipersódica (DLS).....	40
Tabela 2 – Composição bromatológica das dietas experimentais controle (DC) e hiperlipídicas (DL) e hiperlipídica e hipersódica (DLS).....	41
Tabela 3 – Contribuição das frações de proteínas, carboidratos e gorduras no total da energia metabolizável nas dietas experimentais e hiperlipídica e hipersódica (DLS).....	42
Tabela 4 – Contribuição das frações de amido de milho, farelo de soja, caseína, sacarose e maltodextrina na composição dos carboidratos totais nas dietas experimentais e hiperlipídica e hipersódica (DLS).....	42
Tabela 5 – Índice uterino dos grupos DCO, DLO e DLSO, após 24 semanas de dieta.....	51
Tabela 6 – P Peso corporal (g), pesos dos tecidos adiposos (mg/pc) e ingestão alimentar (g/dia) e calórica (Kcal/dia) dos grupos DCO, DLO e DLSO, após 24 semanas de dieta.....	54
Tabela 7 – Pressão arterial sistólica, pressão diastólica e pressão média (mmHg) e frequência cardíaca (bpm) dos grupos DCO, DLO e DLSO, após 24 semanas de dieta.....	55
Tabela 8 – Parâmetros bioquímicos dos grupos experimentais DCO, DLO e DLSO, após 24 semanas de dieta.....	56
Tabela 9 – Índice de resistência a insulina (HOMA-IR) dos grupos experimentais DCO, DLO e DLSO, após 24 semanas de dieta.....	58
Tabela 10 – Parâmetros de função renal dos grupos experimentais DCO, DLO e DLSO, após 24 semanas de dieta.....	59
Tabela 11 – Análise histológica, morfométrica e imunoistoquímica de ratas DCO, DLO e DLSO, após 24 semanas de dieta.....	65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	Obesidade e Injúria Renal.....	23
2.2	Obesidade, sal e hipertensão.....	28
2.3	Sal, Hipertensão e Lesão Renal.....	30
2.4	Estrógenos, obesidade, sensibilidade ao sal e injúria renal.....	32
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	Objetivo Geral.....	37
3.2	Objetivos Específicos.....	37
4	HIPÓTESES.....	38
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
5.1	Animais.....	39
5.2	Procedimentos Experimentais.....	39
5.3	Dietas.....	40
5.4	Procedimento cirúrgico.....	42
5.5	Determinação da Pressão Arterial e do Peso Corporal.....	43
5.6	Avaliação da ingestão alimentar e calórica.....	43
5.7	Análise do perfil bioquímico.....	43
5.7.1	Dosagem de colesterol total.....	43
5.7.2	Dosagem de triglicerídeos.....	44
5.7.3	Glicemia sérica.....	44

5.8	Teste de Tolerância a glicose.....	45
5.9	Dosagem de insulina sérica (RIA).....	45
5.10	Homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR).....	45
5.11	Análise da Função Renal.....	46
5.11.1	Quantificação de creatinina nas amostras de sangue e de urina.....	46
5.11.2	Quantificação de Na ⁺ e K ⁺ nas amostras de sangue e de urina.....	47
5.11.3	Quantificação da proteína urinária.....	47
5.12	Análise Histológica Renal	48
5.12.1	Lesões Túbulo-intersticiais.....	48
5.13	Análise Morfométrica Glomerular	48
5.14	Análise Imunoistoquímica para macrófagos/monócitos.....	49
5.15	Dosagem de TNF α sérico/ENZIMAIMUNOENSAIO- ELISA.....	49
5.16	Análise Estatística.....	50
6	RESULTADOS.....	51
6.1	Índice uterino.....	51
6.2	Ganho de peso e peso do tecido adiposo visceral.....	51
6.3	Ingestão alimentar e calórica.....	53
6.4	Pressão Arterial e Frequência Cardíaca	54
6.5	Parâmetros Bioquímicos.....	55
6.6	Teste de tolerância a glicose.....	56
6.7	Insulina Sérica/HOMA-IR.....	57
6.8	Parâmetros de Função Renal.....	58
6.9	Análise Histológica e Morfométrica do Rim.....	61

6.10	Imunomarcacão para macrófagos/monócitos.....	63
6.11	Dosagem sérica de TNF- α	65
7	DISCUSSÃO.....	66
7.1	Limitações.....	79
8	CONCLUSÃO.....	80
	REFERÊNCIAS.....	81

1. INTRODUÇÃO

Os estudos epidemiológicos têm documentado um rápido crescimento na incidência de obesidade sendo a mesma considerada uma doença epidêmica que atinge mais de 400 milhões de pessoas globalmente. Igualmente, a incidência de complicações associadas à obesidade também tem crescido nas últimas décadas (YEPURU et al., 2010; KOTSIS et al., 2010; HURT et al., 2010). A obesidade envolve vários distúrbios no metabolismo energético, como dislipidemia, resistência a insulina, aumento de citocinas pró-inflamatórias, caracterizando um estado de síndrome metabólica que aumenta o risco para o desenvolvimento de hipertensão arterial (STEPPAN, LAZAR, 2004; O'ROURKE, 2009). Além disso, estudos evidenciam que a obesidade pode contribuir para o aumento da pressão sanguínea em resposta ao excesso de sal, caracterizando elevada sensibilidade da pressão arterial ao sal na hipertensão induzida pela obesidade (NAGAE et al., 2009; SARTORI-VALINOTTI et al., 2009). De fato, a hipertensão sensível ao sal representa aproximadamente 50% dos adultos hipertensos e está associada a fatores metabólicos, hemodinâmicos e renais que podem aumentar os riscos de morbidades cardiovasculares e renais (CAMPESE, 1994; CHAMARTHI et al., 2010).

A maior parte das complicações atribuídas à obesidade está relacionada aos riscos cardiovasculares associados à secreção de citocinas derivadas do tecido adiposo, vias neurohumorais e fatores metabólicos capazes de provocar maior acometimento sobre a microvasculatura e sobre os órgãos-alvo (SOWERS, 1998; SHI, CLEGG, 2009; BROWN, CLEGG, 2010; KOTSIS et al, 2010). A obesidade constitui, então, um importante indicador de risco metabólico e cardiovascular, estando frequentemente associada à síndrome metabólica (SOWERS, 2003). Contudo, seus efeitos sobre os rins têm sido menos documentados (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 acúmulo de

tecido adiposo, particularmente a adiposidade visceral, está associado a alterações da função renal caracterizadas pelo aumento da reabsorção de sódio, promovendo expansão de volume e elevação da pressão sanguínea durante o ganho excessivo de peso. Por outro lado, a hipertensão e as anormalidades metabólicas associadas com a obesidade, podem contribuir para o desenvolvimento de doenças renais (HALL et al., 2003). A retenção de sódio e o fluido extracelular estão aumentados na obesidade induzida pela dieta em modelos experimentais e em humanos obesos (HALL et al., 1997). Experimentos com animais obesos demonstram também alterações da estrutura renal, incluindo expansão da cápsula de *Bowman*, proliferação celular no glomérulo e espessamento da membrana basal glomerular e tubular. Esses achados foram associados a maior expressão glomerular do *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) (HENEGAR et al., 2001). Em pacientes obesos foi observado glomerulopatia relacionada a obesidade, incluindo glomeruloesclerose segmental focal, glomerulomegalia e hiperplasia mesangial (PAPAFRAGKAKI, TOLIS, 2005). O acúmulo de lipídeos no glomérulo e na cápsula de *Bowman* também são alterações histológicas associadas ao alto consumo de gordura (DEJI et al., 2009; HALL et al., 2010).

A dieta hipersódica pode contribuir para o desenvolvimento da hipertensão, no entanto, os mecanismos envolvidos ainda não estão totalmente esclarecidos. As alterações no volume sanguíneo, na secreção de renina e aldosterona, nos níveis plasmáticos de angiotensina II (All) e óxido nítrico, a hiperatividade do sistema nervoso simpático (SNS) e o estado redox parecem estar envolvidos nesse processo. Além disso, estudos sugerem que a resistência a insulina com hiperinsulinemia desempenhe função importante na elevação da pressão arterial induzida pela dieta hipersódica (MUNTZEL, DRUEKE, 1992; VASDEV et al., 2007). A hipertensão induzida pelo excesso de sal durante período prolongado está associada com aumento da injúria renal e mudanças importantes na expressão de citocinas renais relacionadas com a resposta pró-inflamatória, deposição de matriz extracelular no tecido renal e disfunção endotelial (GU et al., 2006; DRENJANČEVIĆ-PERIĆ et al., 2011).

A redução dos hormônios ovarianos, no período da pós-menopausa ou em ratas ovariectomizadas, está frequentemente associada a alterações do perfil

hemodinâmico e da função endotelial, distúrbios no metabolismo energético, estado redox, obesidade, dislipidemias e alterações renais (WISE et al., 1999). A menopausa pode ser acompanhada também por aumento na sensibilidade ao sal (FUJITA, 2007). As mulheres na pós-menopausa apresentam maior risco de desenvolver hipertensão sensível ao sal, sugerindo que os hormônios sexuais influenciam no balanço de sódio e na regulação da pressão sanguínea. (HINOJOSA-LABORDE et al., 2004; SARTORI-VALINOTTI et al., 2009). Os estrógenos modulam a atividade e expressão do NO e AII, e a sua deficiência produz alterações desses dois fatores, resultando em disfunções no balanço de sódio renal, estado redox e hipertensão (HERNANDEZ, RAIJ, 2006; MAJID, KOPKAN, 2007). No modelo experimental de ratas *Dahl S*-sensíveis ao sal foi constatada hipertensão após a ovariectomia, indicando que os estrógenos podem promover proteção contra o desenvolvimento de hipertensão (HINOJOSA-LABORDE et al., 2004).

Algumas formas de hipertensão, incluindo a hipertensão associada à obesidade são influenciadas pelo aumento da ingestão diária de sódio. Modelos experimentais de obesidade e hipertensão sensível ao sal têm sido desenvolvidos, contudo esses modelos muitas vezes não representam as alterações observadas em humanos, pois utilizam animais geneticamente modificados como ratos *Dahl S*, DOCA-salt ou ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Além disso, existem poucos estudos analisando os efeitos de dietas ricas em gorduras e/ou sal sobre os rins, principalmente em situação de diminuição dos hormônios ovarianos. Diante disso, dentre os objetivos do nosso estudo destaca-se o desenvolvimento de um modelo experimental de obesidade e hipertensão induzido por dieta hiperlipídica e hipersódica, que possa ser utilizado para o estudo das alterações hemodinâmicas, metabólicas e dos parâmetros de função e estrutura renal em ratas ovariectomizadas, mimetizando as alterações encontradas em humanos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Obesidade e Injúria Renal

A obesidade pode ser definida como uma condição caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, sendo consequência de balanço energético positivo e que acarreta repercussões à saúde (EKNOYAN, 2011). Existem evidências de que fatores genéticos e ambientais estão relacionados ao desenvolvimento de obesidade, porém, estudos têm demonstrado que os fatores ambientais como alimentação hipercalórica e sedentarismo são os principais responsáveis pelo acúmulo de tecido adiposo e ganho de peso (HURT et al., 2010; ANUBHUTI, ARORA, 2008)

Várias complicações estão relacionadas a obesidade, incluindo doenças cardiovasculares, por acometimento da microvasculatura e de órgãos-alvo, e distúrbios metabólicos (SOWERS, 1998; SHI, CLEGG, 2009; BROWN, CLEGG, 2010). Além disso, a obesidade é frequentemente acompanhada por inflamação sistêmica com elevadas concentrações plasmáticas de marcadores inflamatórios como interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral α (TNF α) e proteína C reativa (PCR), citocinas associadas com risco aumentado para o desenvolvimento de resistência a insulina, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão e dislipidemia (TILG, MOSCHEN, 2006; POU et al., 2007).

Embora a obesidade seja largamente reconhecida como um fator que contribui para essa série de alterações fisiopatológicas, sua função na iniciação e progressão da doença renal é menos documentada (HALL et al., 2002; ABRASS, 2004; DO CARMO et al., 2009). Atualmente, estudos experimentais e epidemiológicos têm demonstrado a relação entre obesidade e injúria renal. A incidência de doença renal crônica aumenta paralelamente ao aumento da prevalência da obesidade. Isso porque a obesidade acarreta uma sobrecarga metabólica e dá início a uma série de eventos, incluindo hipertensão arterial e diabetes mellitus, que são as principais

causas da doença renal crônica. Além disso, a obesidade se apresenta como um fator de risco independente para o desenvolvimento de injúria renal, uma questão pouco abordada. Os mecanismos fisiopatológicos relacionados não são completamente compreendidos, mas envolvem alterações hemodinâmicas, metabólicas e inflamatórias, como resistência a insulina, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, ativação do SRAA e ainda alterações no metabolismo lipídico, que contribuem para o de lesão renal (GUEDES, 2010; TESAURO et al., 2011).

- *Mecanismos hemodinâmicos*

Com aumento das necessidades metabólicas ocasionado pela obesidade, há elevação do fluxo sanguíneo para os tecidos, do débito cardíaco e da pressão arterial. Assim, o fluxo sanguíneo renal, em menor extensão, e a taxa de filtração glomerular encontram-se elevados na obesidade (HALL et al., 2003). A hiperfiltração resulta em hipertrofia glomerular acompanhada por expansão mesangial e albuminúria. Estas alterações foram observadas por Deji et al., (2009) em estudo realizado com camundongos C57BL/6 submetidos a dieta hiperlipídica por um período de 12 semanas, foi observado também acúmulo de lipídios e de colágeno tipo IV no tecido renal, além de infiltrado inflamatório. A restrição de gordura com controle de peso foi eficaz em prevenir as alterações renais.

Outros experimentos com animais obesos demonstram também expansão da cápsula de *Bowman*, proliferação celular no glomérulo, espessamento da membrana basal glomerular e tubular. Esses achados foram associados a maior expressão do TGF- β glomerular (HENEGAR et al., 2001). E ainda, estudos avaliando a estrutura renal de pacientes obesos observaram glomerulopatia relacionada a obesidade, incluindo glomeruloesclerose segmental focal, glomerulomegalia e hiperplasia mesangial (PAPAFRAGKAKI, TOLIS, 2005). Desta forma, é possível que alterações hemodinâmicas decorrentes da obesidade se correlacionem com iniciação e evolução da lesão renal.

A hiperfiltração glomerular associada à elevação da fração de filtração na obesidade é um importante fator contribuinte para a retenção de sódio o que, por sua vez, contribui para elevação do volume do fluido extracelular e da pressão arterial (CHAGNAC et al., 2008). A hiperatividade simpática renal e os níveis elevados de

All, característicos da obesidade, também estão relacionados ao aumento da reabsorção de sódio no túbulo proximal (WAHBA, MAK, 2007). Combinada com a hipertensão, a hiperfiltração contribui potencialmente para o desenvolvimento de injúria renal (MARIC, HALL, 2011).

- *Mecanismos metabólicos*

Além das alterações hemodinâmicas, a fisiopatologia da obesidade envolve alterações metabólicas que contribuem para o desenvolvimento e evolução da doença renal. As principais alterações metabólicas associadas ao dano renal incluem a resistência a insulina, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, dislipidemias e secreção e atividade aumentada de componentes do SRAA pelos adipócitos (MADDOX et al., 2002; PAPAFRAGKAKI, TOLIS, 2005; WAHBA, MAK, 2007).

A sensibilidade reduzida a insulina constitui a alteração central na síndrome metabólica e é a mais importante ligação entre obesidade e injúria renal, pois a hiperinsulinemia está associada com glomerulopatia renal por meio de mecanismos indiretos e diretos. Em estudo com ratos *Zucker* obesos foi observado correlação positiva entre hiperinsulinemia e elevação da pressão arterial, possivelmente por seus efeitos sobre o SNS, SRAA e retenção de sódio (MADDOX et al., 2002; CHAGNAC, et al., 2000). Este aumento na pressão arterial estaria envolvido com injúria renal a medida que maior pressão sanguínea sistêmica gera maior pressão hidráulica a que os capilares glomerulares são expostos, submetendo o a vasculatura glomerular a maior estresse (WAHBA, MAK, 2007).

Além disso, aos efeitos pressóricos, a hiperinsulinemia em ratos obesos também possui ações diretas associadas à injúria glomerular, incluindo hipertrofia e hiperplasia mesangial e aumento da produção celular dos componentes da matriz mesangial (ABRASS et al., 1995). Além disso, a insulina pode contribuir para a lesão renal potencializando a resposta vascular e das células mesangiais à All e à aldosterona, aumentando a pressão arterial sistêmica e a pressão intraglomerular e exacerbando a proteinúria. A insulina também aumenta o estado redox intrarrenal que aumenta a expressão de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento acelerando o processo aterosclerótico no rim (BIDDINGER, KAHN, 2006; WAHBA, MAK, 2007; SAVINO et al., 2010).

A hiperleptinemia relacionada à obesidade também parece afetar a função e estrutura renal. Este hormônio, como a insulina, possui mecanismos de lesão renal indiretos e diretos. A ativação do SNS e retenção de sódio com resultante elevação da pressão arterial constituem em um mecanismo indireto pelo qual a hiperleptinemia contribui para injúria renal (PAPAFRAGKAKI, TOLIS, 2005). Os mecanismos diretos são aqueles que não estão necessariamente ligados a hipertensão. O tecido adiposo produz e secreta todos os componentes do SRAA, a expressão de angiotensinogênio no tecido adiposo visceral se aproxima da expressão hepática, classicamente considerada a principal fonte de angiotensinogênio (GUERRE-MILLO, 2004; HUNLEY et al., 2010). Na obesidade a hiperleptinemia, hiperinsulinemia, estimulação simpática e o número aumentado de adipócitos são os mecanismos responsáveis pela hiperatividade do SRAA (BIDDINGER, KAHN, 2006; STIEFEL et al., 2011). Assim, o aumento nos níveis circulantes de All e a expressão renal de receptores do tipo 1 para All promove uma potente combinação para elevar a vasoconstrição arteriolar eferente, pressão glomerular e fração de filtração, bem como a proliferação celular mesangial que culmina em dano renal (MATSUSAKA et al., 1996).

As alterações no metabolismo lipídico decorrentes da obesidade também podem contribuir diretamente para o dano renal. Sob condições de alterações da glicemia e do metabolismo lipídico ocorre desequilíbrio entre a lipogênese e lipólise no rim e em outros tecidos, essas alterações contribuem para o acúmulo de lipídios no tecido renal e lipotoxicidade, fatores associados à injúria renal (REDDY, RAO, 2006; KUME et al., 2007). Estudos realizados com ratos obesos *Zucker* observaram que a elevação nos níveis séricos de lipídios contribuiu para injúria glomerular, possivelmente relacionada a elevações nas lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Isso se deve ao fato de que células mesangiais possuem receptores para LDL, em níveis elevados o LDL aumenta a produção mesangial de moléculas quimioatraentes de monócitos, promovendo infiltração de células inflamatórias no interstício renal (ROVIN, TAN, 1993). Hipercolesterolemia também estimula a produção de fatores que atraem os macrófagos pelas células mesangiais bem como aumenta a expressão de RNAm para TGF- β nestas células (MADDOX et al., 2002). Além disso, estudos in vitro com células mesangiais humanas expostas a LDL, LDL oxidado e LDL glicado em concentrações próximas aquelas encontradas na circulação

aumentam significativamente a síntese mesangial de componentes da matriz como fibronectina e laminina (SANTINI et al., 2008).

- Mecanismos inflamatórios

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 que podem promover ou intensificar a lesão tecidual (RODRÍGUEZ-ITURBE et al., 2004; NAVA et al., 2003). 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 podem iniciar e influenciar o curso da inflamação e da fibrose intersticial (RIYUZO, 2002).

A presença de linfócitos no tecido renal 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 , 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 evidenciaram 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., 2002a). 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., 2002). O aumento da produção de AII renal promove diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG), com conseqüente redução da carga de filtrada 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).

2.2 Obesidade, sal e hipertensão

A obesidade é um fator de risco que pode acentuar a resposta da pressão arterial ao sal. Em um estudo realizado com 60 adolescentes obesos e 18 não obesos foi verificado a presença de sensibilidade ao sal induzida pela obesidade. Estes adolescentes foram submetidos a uma semana de dieta hipersódica seguida de uma semana com dieta hipossódica. Os adolescentes obesos que deixaram de receber dieta hipersódica e passaram a consumir a dieta hipossódica apresentaram queda significativa da pressão arterial, enquanto que os adolescentes não-obesos não apresentaram redução da pressão arterial após redução da carga de sal ingerida. Este resultado sugere que a pressão arterial de adolescentes obesos é mais dependente da ingestão de sódio que a pressão arterial de adolescentes não-obesos (ROCCHINI, 1990). Em outro estudo foi demonstrado que indivíduos com síndrome metabólica apresentaram maior resposta depressora diante de uma dieta hipossódica e uma maior resposta pressórica diante de dieta hipersódica comparada aos indivíduos do grupo controle sem síndrome metabólica (CHEN, et al., 2009)

Os mecanismos subjacentes ao aumento da sensibilidade ao sal em indivíduos obesos com síndrome metabólica ainda não estão completamente compreendidos, mas parecem estar associados à alteração da natriurese pressórica, comumente observada na obesidade. A natriurese pressórica consiste no aumento ou diminuição da excreção de sódio e água devido à elevação ou redução da pressão arterial, respectivamente, agindo como um componente chave do sistema de *feedback* para

estabilizar a pressão arterial e o volume do fluido corporal (KARPPANEN, MERVAALA, 2006). Durante a obesidade, antes da perda de néfrons por injúria glomerular, ocorre primariamente aumento na reabsorção de sódio, esta mudança é, então, compensada com vasodilatação que provoca elevação da filtração glomerular aumentando a quantidade de água e eletrólitos filtrados, porém essa compensação não é completa e o resultado final é retenção de sódio e água, com expansão de volume e conseqüente hipertensão (KOTSIS et al., 2010).

As alterações na natriurese pressórica induzidas pela obesidade podem ocorrer devido às modificações nas forças intrarrenais decorrentes de mudanças histológicas na medula renal que podem comprimir a alça de Henle e os vasos retos, lentificando o fluxo tubular e aumentando a reabsorção de sódio (HALL, 1997). Outro fator que pode alterar a natriurese pressórica e assim, aumentar a sensibilidade da pressão arterial ao sal, é a ativação do SRAA que é diretamente proporcional a adiposidade (KOTSIS et al., 2010). Estudos demonstram que humanos obesos apresentam aumento na atividade da renina plasmática, nos níveis plasmáticos de angiotensinogênio, All e aldosterona (RUANO et al., 2005; HUNLEY et al., 2010; STIEFEL et al., 2011). Ainda, em estudo experimental realizado por Deji et al., (2009), foi demonstrado que camundongos submetidos a dieta hiperlipídica apresentaram retardo na excreção urinária de sódio e elevação da pressão arterial sistólica quando receberam sobrecarga aguda de sal. A expressão renal de RNAm para renina, ECA e angiotensinogênio deste animais estava aumentada quando comparado com os animais com dieta hipolipídica, sugerindo que a ativação do SRAA constitui um dos mecanismos de lesão renal e hipertensão sensível ao sal induzidos pela obesidade.

A sensibilidade ao sal, observada em sujeitos obesos, está também correlacionada a hiperinsulinemia resultante da resistência a insulina, já que hiperinsulinemia é responsável, pelo menos em parte, pela retenção de sódio (DOBRIAN et al., 2003). A hiperinsulinemia crônica pode promover retenção de sódio devido ao estímulo direto a reabsorção de sódio no túbulo proximal (FUJITA, 2008); e indiretamente pelo aumento da responsividade adrenal a All aumentando a secreção de aldosterona; aumento da atividade simpática (NAGAE et al., 2009a), e portanto, pode aumentar indiretamente a retenção de sódio (ROCCHINI, 1990).

2.3 Sal, Hipertensão e Lesão Renal

O alto consumo de sal parece ser um dos principais fatores contribuintes para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Um estudo realizado em indivíduos de 32 países constatou que o consumo médio de sal é de 9,9 g/dia (INTERSALT COOPERATIVE RESEARCH GROUP, 1988), quando a ingestão diária de sódio recomendada pela Organização Mundial de Saúde é 5g/dia ou menos (HE, MACGREGOR, 2003).

O excesso de sal na dieta é relativamente recente em termos de evolução, já que há alguns milhões de anos atrás a quantidade ingerida era menor que 1g/dia. A adição de sal na comida só passou a acontecer há 5.000 – 10.000 anos atrás com o início da agricultura (PIERRE et al., 2005). Antes da refrigeração, o sal era o mecanismo mais utilizado para a conservação do alimento (MOHAN, CAMPBELL, 2009). Na atualidade, a maior parte do sal consumido diariamente está presente nos alimentos industrializados (HE, MACGREGOR, 2003).

A primeira associação entre a ingestão de sal e o desenvolvimento de hipertensão foi constatada pelo pesquisador Louis Dahl em 1960. Os estudos demonstraram relação linear entre a prevalência de hipertensão e a média do consumo de sal em cinco populações. Desde então, diversos experimentos com animais, estudos epidemiológicos e triagens clínicas têm expandido as observações feitas por Dahl, evidenciando os efeitos da dieta hipersódica sobre o sistema cardiovascular e também sobre sistema renal (BROWN et al., 2009). Nas populações onde o consumo de sal excede 3g/dia, a proporção de indivíduos com hipertensão aumenta com a idade, sendo este fenômeno ainda mais pronunciado quanto maior for a ingestão de sal (PIERRE et al., 2005). Em contrapartida, estudos com populações que consomem baixas quantidades de sal na dieta têm encontrado baixos níveis de pressão arterial (INTERSALT COOPERATIVE RESEARCH GROUP, 1988).

O balanço do sódio e, conseqüentemente, da água é realizado pelos rins que equilibram o consumo com a excreção deste cátion. Uma dieta hipersódica pode gerar acúmulo de sódio no líquido extracelular, com retenção de água e expansão do volume sanguíneo. O aumento da volemia, por sua vez, está associado à

elevação da pressão arterial que pode ser ainda mais evidente quando associada a habilidade limitada dos rins de excretar completamente o excesso de sódio consumido (MOHAN, CAMPBELL, 2009). Apesar de estudos demonstrarem que a dieta hipersódica pode promover elevação da pressão arterial, a intensidade com a qual esta elevação ocorre diante da sobrecarga de sal é variável, correspondendo a sensibilidade da pressão arterial ao excesso de sal. Indivíduos com pressão arterial sensíveis ao sal respondem a sobrecarga aguda ou crônica de sal com aumento exacerbado da pressão arterial, enquanto em indivíduos normais, a pressão arterial apresenta pouco ou nenhum aumento com incremento de sal na dieta (DRENJANČEVIĆ-PERIĆ et al., 2006; KOPKAN, ČERVENKA, 2009).

Aproximadamente metade da população com hipertensão essencial possui pressão arterial sensível ao sal. Os mecanismos fisiopatológicos que levam a sensibilidade ao sal são complexos e apenas parcialmente entendidos. Alguns estudos têm focado na ação patogênica dos rins, já que respostas alteradas da hemodinâmica renal à sobrecarga de sal na dieta e também manipulação anormal do sódio nos segmentos tubulares têm sido sugeridos como os fatores causais da variação da resposta da pressão sanguínea ao sal (CHAMARTHI et al., 2010).

Além disso, grande número de estudos investiga a associação de dieta hipersódica e pressão arterial elevada. Os mecanismos pelos quais o aumento do sal na dieta leva ao desenvolvimento de hipertensão dependente de sal não estão completamente esclarecidos. Além disso, a expansão de volume, altas concentrações de sódio podem também ter outras ações hipertensivas como alteração do funcionamento e regulação do SRAA, ativação de NF- κ B nas células tubulares proximais desencadeando processo inflamatório no tecido renal, indução de estado redox alterando a biodisponibilidade do óxido nítrico, hipertrofia de células musculares lisas e ativação do sistema nervoso simpático (GU et al., 1998; GU et al., 2006; DRENJANČEVIĆ-PERIĆ et al., 2006; KOPKAN, ČERVENKA, 2009).

Em estudo realizado por Gu et al., (2008), utilizando ratos *Sprague-Dawley* normotensos submetidos a dieta hipersódica (8% de cloreto de sódio) por 8 semanas, foi verificado aumento significativo da pressão arterial, excreção urinária de albumina e inflamação renal. Neste caso, ratos normotensos desenvolveram hipertensão arterial mais lentamente quando expostos a dieta hipersódica, havendo

elevação da pressão arterial paralela a aumento ao estado redox e o dano renal. Observações experimentais demonstram que a dieta hipersódica, a longo prazo, causa hipertensão e lesão renal com alteração na expressão de citocinas inflamatórias no tecido renal de ratos *Sprague-Dawley*, além disso a sobrecarga de sal também parece estimular a formação de matriz e disfunção endotelial (GU et al., 2009). O tratamento com o antiinflamatório micofenolato mofetil promoveu redução de NF- κ B renal, da infiltração de macrófagos/monócitos e linfócitos e da albuminúria, melhorando assim, a função e estrutura renal e reduzindo a pressão arterial em ratos Dahl S alimentados com dieta contendo 8% ou 4% de sal. Os efeitos benéficos da terapia com antiinflamatório demonstram que o aumento da pressão arterial e do dano renal estão relacionadas a infiltração de células inflamatórias no tecido renal induzida pela dieta (TIAN et al., 2007a, DE MIGUEL et al., 2010).

A inflamação renal parece estar associada com os níveis elevados de AII intrarrenal, já que ratos *Dahl S* submetidos a dieta hipersódica apresentam redução de TNF α e MCP-1 no córtex renal quando tratados com candesartan, bloqueador do receptor de AII. Foi verificado também que esse bloqueio reduziu a infiltração de macrófagos no tecido renal, atenuando a inflamação e excreção urinária de proteínas (LIN et al., 2009). Por outro lado, a elevação de citocina e quimiocinas renais, com infiltração de células inflamatórias no interstício renal, implica em aumento da AII renal, isso se deve ao fato de macrófagos e linfócitos secretarem AII (FRANCO et al., 2006). Desta forma, instala-se um ciclo vicioso que perpetua a inflamação e a elevação dos níveis de AII, resultando em lesão renal severa.

2.4 Estrógenos, obesidade, sensibilidade ao sal e injúria renal

A redução da produção de estrógenos em mulheres no período da pós-menopausa, em modelos experimentais de ovariectomia ou de envelhecimento é caracterizada pelo aumento do peso corporal total e maior acúmulo de gordura abdominal (MARIC et al., 2008; SARTORI-VALINOTTI et al., 2009). A transição menopausal promove mudanças desfavoráveis da distribuição de gordura corporal, aumentando o risco de

desenvolvimento de doenças cardiovasculares e renais, diabetes mellitus e outras alterações associadas à síndrome metabólica (WISE et al., 1999; HALL et al., 2002).

As mulheres na pré-menopausa apresentam menor índice de doenças cardiovasculares que homens na mesma idade. Observa-se também que os homens possuem maior risco para desenvolver doenças renais em comparação as mulheres. Porém, essas diferenças relacionadas ao gênero parecem diminuir após a menopausa, quando o risco de doenças cardiovasculares, a prevalência de hipertensão e o declínio da função renal se elevam nas mulheres (COGGINS et al., 1998; YANES et al., 2010). Mulheres pré-menopáusicas submetidas a ovariectomia também apresentam maior risco para doenças cardiovasculares, entretanto, a terapia de reposição hormonal parece promover proteção cardiovascular para estas mulheres (ESQUEDA et al., 2007). Adicionalmente, estudos observacionais demonstram que mulheres pós-menopáusicas que recebem terapia de reposição hormonal apresentam menor índice de doenças cardiovasculares e falência cardíaca que aquelas que não fazem reposição (THE ESHRE CAPRI WORKSHOP GROUP, 2006; ROSANO et al., 2009).

A redução dos níveis circulantes de estrógenos e as mudanças no perfil de risco cardiovascular após a menopausa em mulheres ou em animais experimentais ocorrem paralelamente ao desenvolvimento de alterações metabólicas como obesidade visceral, aumento da lipogênese e resultante dislipidemia, hiperglicemia e resistência a insulina (FIGUEIREDO et al., 2010). Estudos clínicos com mulheres menopáusicas ou experimentais com animais submetidos a ovariectomia demonstram que a redução dos estrógenos é seguida por maior ganho de peso e acúmulo de gordura, principalmente gordura visceral que está relacionado a eventos cardiovasculares observados na transição da menopausa (SUTTON-TYRRELL et al., 2010; BUTERA, 2010). Estudo experimental realizado por 20 semanas com camundongos machos, fêmeas intactas e ovariectomizadas, constatou que camundongos machos apresentam maior suscetibilidade para a obesidade e maior acúmulo de tecido adiposo que fêmeas quando expostos a dieta hipercalórica, ratas ovariectomizadas apresentaram parâmetros similares aos machos (HONG et al., 2009).

A adiposidade central relacionada à menopausa com redução dos hormônios ovarianos pode ser explicada pela ação dos estrógenos sobre a regulação do metabolismo e da distribuição de gordura, com tendência a deposição mais periférica (YEPURU et al., 2010). As ações dos estrógenos sobre o tecido adiposo são mediadas principalmente pelo receptor de estrógeno α (ER α), que são altamente expressos nos adipócitos, e incluem modulação na produção e secreção de adipocinas com elevação nos níveis de adiponectina, redução da secreção de citocinas inflamatórias pelos adipócitos e elevação na expressão de receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ) (AKOUM et al., 2011). Os estrógenos regulam ainda a ingestão alimentar e os níveis circulantes de lipídios, além de aumentar a lipólise por meio da ativação de enzima lipase hormônio sensível (PALIN et al., 2003; BUTERA, 2010).

Além da maior suscetibilidade para o desenvolvimento de obesidade, mulheres na pós-menopausa têm se mostrado mais sensíveis ao sal que mulheres na pré-menopausa, sugerindo que os hormônios sexuais influenciam o balanço de sódio e a regulação da pressão sanguínea. (HINOJOSA-LABORDE et al., 2004; SARTORIVALINOTTI et al., 2009). Parece haver uma relação inversamente proporcional entre os níveis circulantes de hormônios ovarianos e a sensibilidade ao sal após a menopausa independente do envelhecimento que pode ser importante para o desenvolvimento de hipertensão (SCHULMAN et al., 2006).

Um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento da hipertensão sensível ao sal com a redução dos hormônios ovarianos é o aumento da sensibilidade a AII e da atividade do SRAA. A ovariectomia em ratas *Dahl S* ocasiona o aumento no número de receptores do tipo 1 para AII nos glomérulos e no córtex da glândula adrenal com consequente elevação da pressão arterial, a reposição com estrógeno atenua estes efeitos da ovariectomia (HINOJOSA-LABORDE et al., 2004). Em mulheres na pós-menopausa também parece haver um bloqueio na supressão da renina pelo sal, o que também pode contribuir para hipertensão sensível ao sal (PECHÈRE-BERTSCHI et al., 2002, apud HARRISON-BERNARD et al., 2003). A hipertensão sensível ao sal após a ovariectomia está ligada também a diminuição da atividade da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) com redução do óxido nítrico, potente vasodilatador, a reposição do estrógeno preveniu esta alteração. Estes

achados suportam a importância do balanço entre AII e óxido nítrico na hemodinâmica renal e na homeostase do sódio (SCHULMAN et al., 2006). Os estrógenos modulam a atividade e expressão do NO, a atividade do SRAA e do SNS, além de reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio por diminuir a expressão de enzimas oxidantes e aumentar a expressão de enzimas antioxidantes (DUBEY et al., 2001; ROSANO et al., 2009; XUE et al., 2009). Sua deficiência produz alterações desses fatores, resultando em disfunções no balanço de sódio renal, estado redox e hipertensão (HERNANDEZ, RAIJ, 2006; MAJID, KOPKAN, 2007).

O ritmo de progressão da doença renal e hipertensão aumenta com a idade e é menor em mulheres na pré-menopausa quando comparado com homens na mesma idade, isso se deve, pelo menos em parte, aos efeitos protetores cardiorrenais dos estrógenos (BAYLIS, 2005). Consistente com achados em humanos, em ratas fêmeas *Dahl S* a severidade dos danos estruturais no tecido renal e o declínio da função renal associados ao envelhecimento são marcadamente elevados na ausência de hormônios ovarianos e estão correlacionadas ao ganho de peso. A glomeruloesclerose e a fibrose tubulointersticial nestas ratas são mais pronunciadas com a ovariectomia, enquanto a reposição com estrógeno atenuou estas alterações (ESQUEDA et al., 2007; MARIC et al., 2004).

A função renoprotetora dos estrógenos está relacionada também a ações diretas no tecido renal independentes da pressão arterial que incluem a inibição da apoptose das células mesangiais, aumento na expressão de enzimas metaloproteinases que aumentam a degradação de matriz extracelular e redução na síntese de colágeno tipo I e IV e laminina induzida pelo fator de crescimento TGF- β (DUBEY et al., 2002; GUCCIONE et al., 2002; ELLIOT et al., 2003). Além disso, os estrógenos melhoram os níveis lipídicos, aumentam a vasodilatação dependente do endotélio e protegem contra o desenvolvimento de aterosclerose e hipertensão, resguardando indiretamente a função e estrutura renal (MARIC et al., 2004). Estes achados demonstram que os estrógenos exercem efeitos protetores sobre os sistemas cardiovascular e renal (GILBERT et al., 2008).

A associação entre obesidade e dieta hipersódica está intimamente relacionada a distúrbios metabólicos, hipertensão, doenças cardiovasculares e renais. Os

mecanismos associados a estas alterações ainda não estão completamente esclarecidos. Além disso, tem sido pouco investigado os efeitos da dieta hiperlipídica e hipersódica numa condição de redução dos hormônios ovarianos, verificando os seus efeitos sobre a pressão arterial e função e estrutura renal. Desta forma, o presente estudo visa avaliar as alterações na pressão arterial, função e estrutura renal de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo é avaliar os efeitos da adição de sal à dieta hiperlipídica sobre a função e estrutura renal em ratas ovariectomizadas.

3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar o consumo alimentar, o ganho de peso corporal e peso do tecido adiposo visceral de ratas ovariectomizadas tratadas com dieta hiperlipídica e hipersódica.
2. Avaliar a pressão arterial e frequência cardíaca destes animais.
3. Determinar os níveis séricos de glicose, colesterol total e triglicerídeo, bem como a tolerância a glicose e sensibilidade a insulina.
4. Determinar os níveis plasmáticos e urinários de creatinina e Na^+ , proteína urinária e fluxo urinário.
5. Avaliar o comprometimento glomerular e túbulo-intersticial do tecido renal.
6. Analisar a infiltração de macrófagos/monócitos no tecido renal.
7. Analisar os níveis séricos de $\text{TNF}\alpha$.

4. HIPÓTESE

- A associação da dieta hiperlipídica e hipersódica por um período de 24 semanas contribui para elevação da pressão arterial, alterações metabólicas e da função e estrutura renal em ratas ovariectomizadas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizadas 24 ratas *Wistar* de 10 semanas de idade com peso corporal variando entre 150 a 250 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 003/2011).

5.2 Procedimentos Experimentais

Os animais foram alimentados com ração padronizada controle (Pragsoluções Biociências, SP) durante uma semana para adaptação. Após o período de aclimatação, os animais foram submetidos a três diferentes dietas experimentais, por um período de 24 semanas: 1) *Dieta Controle* (ração padronizada AIN 93 M – Pragsoluções Biociências, SP, (12,39% do total de calorias oriundas de gordura e 0,3% de cloreto de sódio); 2) *Dieta Hiperlipídica* (51,1% do total de calorias oriundas de gordura e 0,3% de cloreto de sódio); 3) *Dieta hiperlipídica e hipersódica* (56,1% do total de calorias oriundas de gordura e 8% de cloreto de sódio). As ratas foram ovariectomizadas com 10 semanas de idade. Os animais foram randomicamente divididos em 3 grupos distintos: DCO – Ratas submetidas à dieta controle e ovariectomia (n=6); DLO – Ratas submetidas à dieta hiperlipídica e ovariectomia (n=8); DLSO – Ratas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica e ovariectomia (n=10). O peso e a pressão arterial (PA) foram determinados semanalmente, e as amostras de sangue e urina foram coletadas a cada 3 meses para a análise dos parâmetros de função renal e parâmetros bioquímicos. Ao término das 24 semanas, os animais foram sacrificados por decapitação e os rins e os tecidos adiposos

removidos. O rim esquerdo foi fixado para os estudos histológicos, morfométricos e imunoistoquímicos. 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 ependorfs e submetido à centrifugação para separação do soro para análise da função renal e dosagem do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).

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 descrita na **Tabela 1** a seguir.

Tabela 1 – Proporções dos ingredientes nas dietas experimentais controle (DC), hiperlipídica (DL) e dieta hiperlipídica e hipersódica (DLS).

Ingredientes	DC	DL	DLS
	-----% MS-----		
Amido de milho	37,38	13,88	20,70
Farelo de soja	30,50	30,50	-
Caseína	-	-	15,60
Sacarose	6,50	6,00	7,5
Sebo bovino	0,0	24,00	26,00
Maltodextrina	10,00	10,00	7,5
Gordura Protegida de soja	7,5	7,50	5
Celulose Microcristalizada	3,17	3,17	5
L-cistina	0,30	0,30	0,3
Cloreto de colina	0,15	0,15	0,15
Cloreto de sódio ¹	-	-	7,74
Mistura mineral (AIN-93M-MX) ²	3,50	3,50	3,50
Mistura Vitamínica (AIN-93-VX) ³	1,00	1,00	1,00

Ingredientes	DC	DL	DLS
	-----% MS-----		
Tert-butil-hidroquinona (BHT)	0,001	0,003	0,005
Total	100,00	100,00	100,00

¹Cloreto de sódio: 0,3% de cloreto de sódio das dietas estão contidos na mistura mineral AIN-93G-MX, sendo que na dieta hiperlipídica e hipersódica foi adicionado 7,74% de cloreto de sódio.

²Mistura mineral AIN-93G-MX: 35,7% de carbonato de cálcio; 25% de fosfato monabásico de potássio; 7,4% de cloreto de sódio, equivalente a 0,3% de cloreto de sódio na composição da dieta; 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.

³Mistura 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.

A composição bromatológica, calculada com base nos valores das análises laboratoriais dos alimentos e da proporção dos ingredientes, encontra-se descrita na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Composição bromatológica das dietas experimentais controle (DC), hiperlipídica (DL) e dieta hiperlipídica e hipersódica (DLS).

Item	Dietas Experimentais		
	DC	DL	DLS
Matéria seca (g.kg⁻¹)	82,93	85,25	85,04
Cinzas (g.kg⁻¹)	2,78	2,74	8,91
Proteína Bruta (g.kg⁻¹)	15,1	15,0	14,2
Extrato etéreo (g.kg⁻¹)	6,97	30,85	30,16
Carboidratos totais (g.kg⁻¹)	66,76	42,97	36,55
Valores estimados de energia metabolizável			
Energia Metabolizável (Mcal.kg⁻¹)	3,99	5,19	4,75

As contribuições das frações de proteínas, carboidratos e gorduras no total de energia metabolizável das dietas experimentais encontram-se descritas na **Tabela 3**.

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

Item	Dietas experimentais		
	DC	DL	DLS
Energia Metabolizável (Mcal/kg⁻¹)	3,99	5,19	4,75
% de contribuição das frações dietéticas na Energia Metabolizável			
Proteína	32,36	24,89	16,51
Carboidratos	54,25	23,24	26,34
Gorduras	12,39	51,1	56,14
Vitaminas	1,00	0,77	0,88

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	DLS
Carboidratos totais (g.kg⁻¹)	66,76	42,97	36,55
Contribuição das fontes de carboidratos na dieta (g.kg⁻¹)			
Amido de milho	37,06	13,76	20,52
Farelo de soja	13,42	13,42	-
Caseína	-	-	1,08
Sacarose	6,49	5,99	7,48
Maltodextrina	9,8	9,8	7,46

5.4 Procedimento cirúrgico

Para a realização da ovariectomia, 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, para a remoção dos ovários. Em seguida, o músculo e a pele foram suturados. Como medida profilática contra

infecção pós-operatória, os animais receberam a dose de 5mg/Kg de antibiótico enrofloxacino (Flotril® 2,5%). Com a finalidade de confirmar a ovariectomia, o útero dos animais foi pesado e o índice uterino calculado (mg/100g pc).

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 conscientes, em ambiente livre de ruídos para evitar estresse do animal e interferências nos resultados. Para aferição da pressão arterial, as ratas foram aquecidas a 35°C por 5 minutos para determinação da pressão pelo método de pletismografia de cauda (*LE 5001 Electro-Sphygmomanometer* - Panlab, Spain). Para a pesagem dos animais, foi utilizada balança digital Acculab®.

5.6 Avaliação da ingestão alimentar e calórica

Durante o período experimental, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais por quatro dias, com livre acesso a água e a ração. Assim, foi feita a avaliação da ingestão alimentar (g/dia) por subtração da quantidade de ração fornecida pela quantidade remanescente após 24 horas, obtendo-se a quantidade ingerida pelo animal. Para encontrar o valor calórico ingerido (kcal/dia) em 24 horas, multiplicou-se a quantidade ingerida em gramas pela densidade energética da dieta.

5.7 Análise do perfil bioquímico

O perfil bioquímico foi analisado por meio de dosagens de colesterol total, triglicerídeos e glicemia de jejum.

5.7.1 Dosagem do colesterol total

O colesterol total foi determinado utilizando-se *kit* comercial colorimétrico (Bioclin®). Este se baseia na reação catalisada pela enzima lipoproteína lipase que degrada ésteres de colesterol em colesterol e ácidos graxos. Na seqüência “colesterol oxidase” é a enzima atuante que converte colesterol livre em colesterol-3-ona e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), na presença de O_2 , o H_2O_2 reage com a 4-aminoantipirina e o Fenol, reação catalisada pela peroxidase que forma um cromógeno vermelho. A intensidade da cor gerada nesta reação é lida em espectrofotômetro (SP-220-Biospectro) no comprimento de onda de 500nm. Os resultados foram expressos em mg/dL.

5.7.2 Dosagem de triglicerídeos

Para determinação dos níveis séricos de triglicerídeos também foi utilizado o *kit* comercial colorimétrico (Bioclin®). A reação catalisada pela enzima lipoproteína lipase degrada triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos livres na presença de H_2O . Em seguida, o glicerol é convertido em glicerol-3-fosfato e ADP pelas enzimas “glicerol kinase Mg^{2+} ” em presença de ATP. Posteriormente, a enzima glicerol fosfato oxidase converte glicerol-3-fosfato em presença de H_2O em fosfato dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A reação catalisada pela peroxidase onde H_2O_2 reage com a 4-aminoantipirina e p-clorofenol resulta na formação do cromógeno vermelho, cuja intensidade da cor também é lida em espectrofotômetro (SP-220-Biospectro) no comprimento de onda de 500nm. Os resultados foram expressos em mg/dL.

5.7.3 Glicemia sérica

A glicemia sérica também foi determinada de *kit* comercial colorimétrico (Bioclin®). Neste método, a glicose é convertida em ácido glicurônico e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima glicose oxidase na presença de O_2 e H_2O . O H_2O_2 formado interage com a 4-aminoantipirina e Fenol, reação catalisada pela peroxidase. Após estas reações, é realizada leitura desse parâmetro bioquímico foi realizada em espectrofotômetro (SP-220-Biospectro) no comprimento de onda de 505nm. Os resultados foram expressos em mg/dL.

5.8 Teste de Tolerância a Glicose

Ao final do período experimental foi realizado o teste de tolerância a glicose com o objetivo de avaliar a tolerância a glicose. Após 12 horas de jejum, foi determinada a glicemia basal por meio de incisão na cauda do animal, correspondendo esta primeira medida ao tempo 0 (zero). Subsequente a obtenção da glicemia de jejum, os animais foram submetidos a injeção intraperitoneal de glicose a 50% na dose de 1g/kg ou 0,2mL/100g de peso corporal. Com esta sobrecarga de glicose foi feita glicemia dos animais nos tempos 30, 60 e 90 minutos posteriores a injeção. Para dosagem da glicemia, foi utilizado glicosímetro digital (Accu-chek Performa®)

5.9 Dosagem de insulina sérica por radioimunoensaio (RIA)

A dosagem de insulina sérica foi realizada por meio de radioimunoensaio (RIA) Linco Research® de fase sólida marcado com iodo 125I, por meio de *kits* Coat a Count® (DPC - *Diagnostic Products Corporation*) no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

As dosagens de insulina foram realizadas em 100µL de plasma, em tampão TRIS 100 mM, pH 7,0, com BSA (Proteína do Soro Bovino) a 0,25% incubados a 37°C por 40 minutos com insulina marcada com iodo 125I e anticorpos específicos. A separação do hormônio ligado pelo anticorpo foi conseguida com polietilenoglicol (P.M. 6000) a 17% e a contagem realizada de imediato em curva padrão preparada na véspera.

5.10 Homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR)

A resistência a insulina foi avaliada por meio do cálculo HOMA-IR, utilizando a concentração plasmática de glicose (mmol/L) e insulina (µUI/mL) obtidas após período de jejum (MATTHEWS et al., 1985; AKOUM et al., 2011), a fórmula utilizada foi a seguinte:

$$\text{HOMA-IR (mmol/L x } \mu\text{UI/mL)} = \text{Glicose de jejum (mmol/L) x Insulina de jejum (}\mu\text{UI/mL)/22.5.}$$

Considerou-se os valores do HOMA-IR $\geq 2,7$ como indicativos de resistência a insulina (GELONEZE et al., 2009).

5.11 Análise da Função Renal

A avaliação da função renal foi determinada utilizando-se amostras de sangue e de urina de 24 horas coletadas no tempo 0 (uma semana após o início do fornecimento das dietas; tempo 1 (3 meses após o fornecimento); e tempo 2 (6 meses após o fornecimento da dieta). Os animais foram colocados 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 de 24 horas. As amostras de sangue também foram coletadas por meio de incisão na ponta da cauda dos animais após aquecimento em caixa térmica. O sangue foi coletado em *ependorfs* e, em seguida, centrifugado para separação do soro que foi armazenado para posteriores análises da função renal.

5.11.1 Quantificação de creatinina nas amostras de sangue e de urina

A análise da creatinina sérica e urinária foi realizada por método colorimétrico enzimático utilizando ácido pícrico (Labtest®) (HAYGEN, 1953). O método se fundamenta na reação entre a creatinina e outros cromógenos do soro com o ácido pícrico ou picrato do *kit* em meio alcalino formando o picrato de creatinina e os cromógenos-picrato, respectivamente, a reação resulta em uma solução com coloração amarelada. Após esta reação, foi realizada leitura absorvância da solução por espectrofotometria com absorção máxima de 510nm. Por conta da interferência dos outros cromógenos presentes na amostra, o mesmo foi acidificado para quantificar a creatinina verdadeira contida no soro. A análise da creatinina urinária também foi realizada com o princípio da reação entre o cromógeno da amostra e o

ácido pícrico do *kit*, porém, não houve a etapa de acidificação. A taxa de filtração glomerular (TFG¹) foi determinada pelo *Clearance* de Creatinina.

5.11.2 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), uma técnica analítica baseada em espectroscopia atômica. A amostra contendo cátions é aspirada e inserida em uma chama ocorrendo alguns fenômenos físicos e químicos, como evaporação e vaporização, que converte a amostra líquida em aerossol, e atomização gerando radiação. A radiação emitida quando os elementos liberam a energia recebida pela chama é proporcional a concentração deste elemento na amostra. O comprimento de onda da radiação é característico para cada elemento (OKUMURA, CAVALHEIRO, 2004). Após as determinações das concentrações plasmáticas e urinárias de sódio e potássio, foram calculadas as cargas e as frações de excreção (FE²) destes íons.

5.11.3 Quantificação da proteína urinária

A quantificação da proteína urinária foi realizada pelo método colorimétrico, utilizando o *kit* comercial *Sensiprot* (Labtest®, MG, Brasil). A proteína presente na amostra de urina reage com o vermelho de pirogalol e molibdato de sódio do *kit* originando um complexo de cor violácea. Após a reação, é feita quantificação da intensidade da coloração em espectrofotômetro utilizando um comprimento de onda de 600 nm, cuja absorbância proporcional à concentração de proteína da amostra.

$$^1 \text{TFG} = \frac{\text{Concentração de Creatinina Urinária} \times \text{Volume Urinário}}{\text{Concentração de Creatinina Plasmática}}$$

$$^2 \text{FENa} = \frac{\text{Concentração de Na}^+ \text{ Urinário} \times \text{Concentração de Creatinina Plasmática}}{\text{Concentração de Na}^+ \text{ Plasmático} \times \text{Concentração de Creatinina Urinária}} \times 100$$

5.12 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 depois o fixador foi substituído por álcool etílico hidratado 70° INPM. O tecido renal foi então parafinado, cortado em secções de 4 µm de espessura e corado com Tricrômio de Masson que marca de azul as áreas de fibrose para estimar o grau de fibrose (YHEE et al., 2008) e avaliar o comprometimento glomerular e túbulo-intersticial do córtex renal dos animais.

5.12.1 Lesões Túbulo-intersticiais

Para avaliar as lesões túbulo-intersticiais (LTI) foi realizada a leitura de 30 campos do córtex renal, por meio de microscopia de luz no aumento de 40x, baseando-se na presença de fibrose túbulo-intersticial, infiltrado inflamatório, dilatação ou atrofia tubular. Estas alterações foram quantificadas seguindo o escore padronizado 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% do córtex.

5.13 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 do corte renal de cada animal dos diferentes grupos experimentais. As imagens obtidas pela microscopia de luz, com aumento de 40x, 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.

5.14 Análise Imunoistoquímica para macrófagos/monócitos

Além dos estudos histológicos, o tecido renal foi submetido à análise imunoistoquímica. As secções de 4 µm de tecido renal foram desparafinizadas e incubadas com o anticorpo anti-ED-1 (macrófagos/monócitos - 1/1000), monoclonal (AbD serotec®), durante 60 minutos em temperatura ambiente (SOARES et al., 2007; DOMINGUEZ et al., 2007). O produto da reação foi detectado pelo complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame®, CA, USA) e a cor desenvolvida com 3,3-diaminobenzidina (DAB) (Easypath®). A contracoloração foi feita com *Metil green*.

Para análise quantitativa da infiltração de macrófagos/monócitos, as células ED-1 positivas foram contabilizadas em 30 campos (0,245 mm²) do compartimento túbulo intersticial (CTI) do córtex renal, com aumento de 40x. Após a quantificação foi calculada o número médio de células ED-1 positivas de cada animal. Foi realizado um controle negativo para a reação de imunoistoquímica, o qual foi submetido às mesmas condições da reação correspondente, omitindo-se o anticorpo primário.

5.15 Dosagem do TNF α sérico/ ENZIMAIMUNOENSAIO - ELISA

A quantificação de TNF- α nas amostras de soro foi realizada pelo método imunoenzimático (ELISA) tipo sanduíche na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, no departamento de farmacologia. Os anticorpos policlonais anti TNF- α foram colocados numa placa de 96 canais e deixados durante a noite, em seguida, as placas foram lavadas e bloqueadas com solução de albumina bovina 1%. As amostras experimentais foram colocadas na placa e deixadas durante a noite. Após a lavagem da placa, a quantidade de citocina fixada foi detectada usando-se um anticorpo secundário conjugado à peroxidase e um substrato cromogênico. A intensidade da cor gerada nesta reação é proporcional a concentração de TNF- α da amostra.

5.16 Análise Estatística

Para a análise dos dados de fluxo urinário foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis*, não paramétrico, com comparações múltiplas pelo teste de *Dunn*. Para a análise estatística dos dados de proteinúria, cada dado individual foi transformado para escala de logaritmo em base 10 (Proteinúria $\mu\text{g}/24\text{h} - \log 10$). Esses dados de proteinúria, bem como os demais dados experimentais 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 aceita.

6. RESULTADOS

6.1 Índice uterino

O índice uterino foi o parâmetro utilizado para avaliar a eficácia da ovariectomia. O estrógeno é responsável por estimular o crescimento das células estromais e das glândulas do endométrio. Dessa forma, a deficiência desse hormônio no organismo promove uma gradativa involução do endométrio e, conseqüentemente, redução do volume e peso do útero em comparação as ratas controle, cujo o índice uterino é em torno de 180mg/100g de peso corporal. Todas as ratas do presente estudo apresentaram redução no peso uterino, indicando atrofia uterina devido a redução nos níveis circulantes de hormônios ovarianos (Tabela 5).

Tabela 5. Índice uterino dos grupos DCO, DLO e DLSO, após 24 semanas de dieta.

	DCO	DLO	DLSO
Índice Uterino (mg/100g pc)	30,4±7,31	30,0±2,59	33,8±5,05

Dados são expressos como média±EPM.

6.2 Ganho do peso corporal e peso do tecido adiposo visceral

Não houve diferença significativa do peso corporal entre os grupos experimentais, após 24 semanas do fornecimento das dietas. Contudo, a análise do ganho de peso corporal ao longo das 24 semanas de dieta demonstrou maior ganho de peso nas ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO), ($p < 0,05$). As ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO) apresentaram menor ganho de peso quando comparado aos grupos DCO e DLO ($p < 0,001$) (Figura 1). Já a soma dos depósitos do tecido adiposo visceral (mesentérico, parametrial e retroperitoneal) foi maior nos grupos DLO e DLSO quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$), conforme ilustrado na Figura 2. Os

pesos dos tecidos adiposos mesentérico, parametrial e retroperitoneal, assim como a média do tecido adiposo visceral total e do peso corporal são apresentados na Tabela 6.

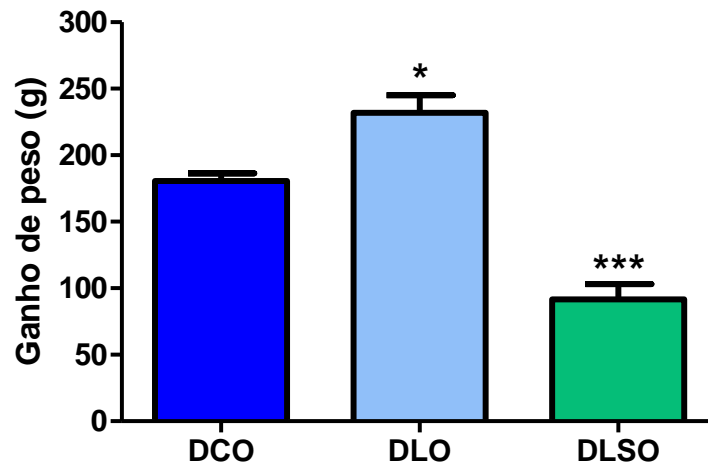


Figura 1. Ganho de peso corporal de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), 24 semanas após o tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM. * $p < 0,05$ versus DCO; *** $p < 0,001$ versus DCO e DLO.

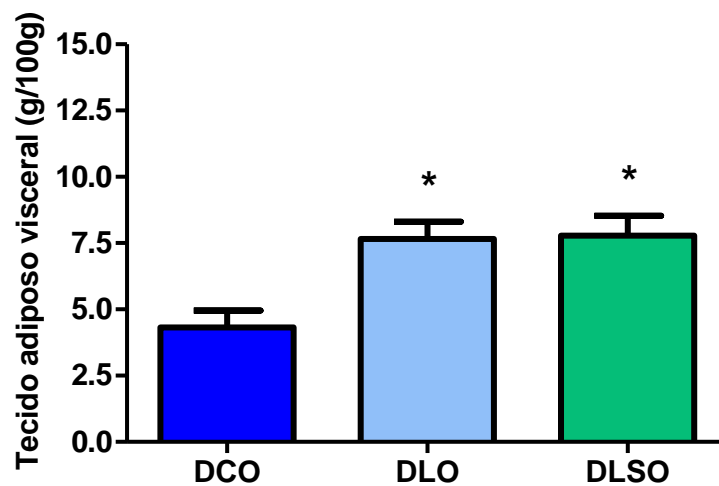


Figura 2. Peso do tecido adiposo visceral de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), 24 semanas após o tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM. * $p < 0,05$ versus DCO.

6.3 Ingestão alimentar e calórica

Não houve alterações significativas da ingestão alimentar (g) entre os grupos experimentais. Apesar disso, a ingestão calórica diária foi maior nos animais do grupo DLO quando comparado aos animais do grupo DCO ($p < 0,001$). O grupo DLSO não apresentou aumento significativo da ingestão calórica quando comparado ao grupo controle, apesar da alta densidade energética dessa dieta (Figura 3). A ingestão alimentar e calórica média dos grupos são apresentadas na Tabela 5.

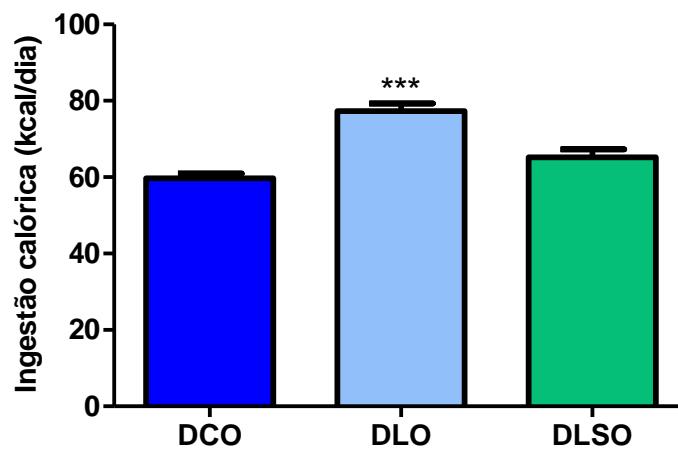


Figura 3. Ingestão Calórica de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), 24 semanas após o tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM. *** $p < 0,001$ versus DCO.

Tabela 6. Peso corporal (g), pesos dos tecidos adiposos (mg/pc) e ingestão alimentar (g/dia) e calórica (Kcal/dia) dos grupos DCO, DLO e DLSO, após 24 semanas de dieta.

Tecidos	DCO	DLO	DLSO
Peso Corporal	416,3±5,22	442,4±11,38	433,9±15,95
TAM	0,91±0,14	1,45±0,08*	1,19±0,15
TAP	2,09±0,32	3,16±0,34*	3.49±0,22*
TAR	1,32±0,25	3,05±0,39*	3.10±0,6*
Gordura Visceral Total	4,32±0,63	7,66±0,64*	7,78±0,74*
Ingestão alimentar (g/dia)	14,97±0,31	14,9±0,37	14,06±0,42
Ingestão calórica (kcal/dia)	59,73±1,23	77,33±1,96***	66,8±1,94

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<0,05 versus DCO, ***P<0,001 versus DCO.

6.4 Pressão arterial e frequência cardíaca

Após 24 semanas de dieta foi observado aumento significativo da pressão arterial sistólica no grupo DLO quando comparado ao grupo controle (p<0,001). A adição de sal à dieta hiperlipídica, no grupo DLSO, resultou em maior elevação da pressão arterial sistólica em relação ao grupo DCO (p<0,001) e ao grupo DLO (p<0,001), como pode ser observado na Figura 4. Não houve alterações significativas na pressão arterial diastólica e média e na frequência cardíaca entre os grupos (Tabela 7)

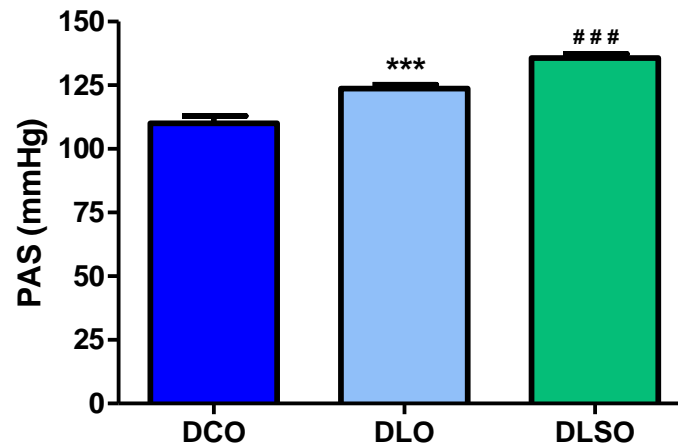


Figura 4. Pressão arterial sistólica (PAS) de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), 24 semanas após o tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM. *** $p < 0,001$ versus DCO; ### $p < 0,001$ versus DCO e DLO.

Tabela 7. Pressão arterial sistólica, pressão diastólica e pressão média (mmHg) e frequência cardíaca (bpm) dos grupos DCO, DLO e DLSO, após 24 semanas de dieta.

Parâmetros Analisados	DCO	DLO	DLSO
Pressão arterial sistólica	109,1±3,12	120,6 ± 2,25***	135,7±1,61###
Pressão arterial diastólica	92,60±4,32	96,21±2,90	100±4,96
Pressão arterial média	97,70±3,82	105,0±2,35	111,7±3,57
Frequência cardíaca	400,9±10,00	411,3±6,46	396±7,90

Dados são expressos como média±EPM. *** $p < 0,001$ versus DCO; ### $p < 0,001$ versus DCO e DLO.

6.5 Parâmetros bioquímicos

Não houve diferença nas concentrações séricas de glicose, colesterol e triglicérides entre os grupos experimentais (Tabela 8).

Tabela 8. Parâmetros bioquímicos dos grupos experimentais DCO, DLO e DLSO, após 24 semanas de dieta.

Parâmetros Bioquímicos (mg/dL)	DCO	DLO	DLSO
Glicose	99,7±4,8	86,4±1,9	99,8±4,7
Colesterol	128,2±6,3	123,2±15,9	111,6±5,4
Triglicérides	104,3±15,5	129,4±10,9	92,5±7,9

Dados são expressos como média±EPM.

6.6 Teste de tolerância a glicose

Não foram encontradas alterações na glicemia de jejum dos diferentes grupos experimentais. Porém, após 30 minutos da sobrecarga de glicose, os grupos DLO e DLSO apresentaram glicemia elevada quando comparados ao grupo DCO. Nos tempos 60' e 90' seguintes a administração intraperitoneal de glicose apenas o grupo DLO permaneceu com a glicemia plasmática elevada em relação aos demais grupos e não retornou aos níveis glicêmicos basais de jejum. No cálculo da área sob a curva de tolerância a glicose foi observado que os grupos DLO e DLSO apresentaram maiores áreas sob a curva que o grupo DCO. Os valores da curva da glicemia obtidos no decorrer do teste de tolerância a glicose e os valores resultantes do cálculo da área sobre a curva glicêmica estão expostos na Figura 5A e 5B.

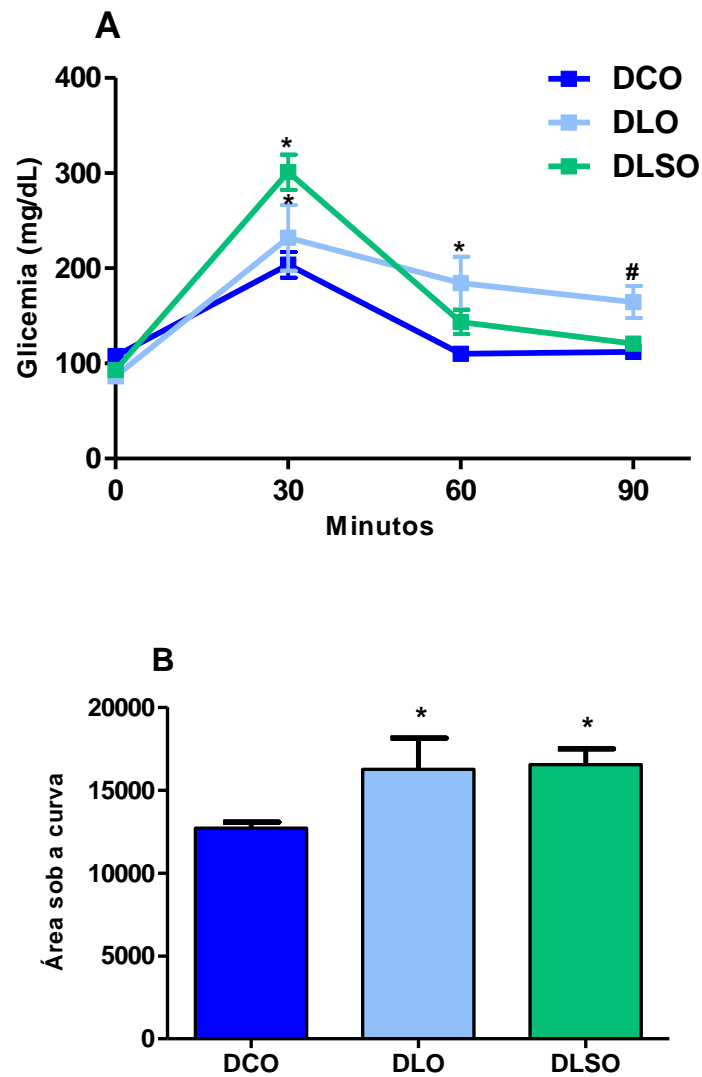


Figura 5. Medidas da glicemia sérica nos tempos 0', 30', 60' e 90' após administração intraperitoneal de glicose (A); e área sob a curva de glicose (B) de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), 24 semanas após o tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM. * $p < 0,05$ versus DCO; # $p < 0,05$ versus DCO e DLSO.

6.7 Insulina sérica/ HOMA-IR

Os níveis séricos de insulina apresentaram aumento significativo no grupo DLO em relação aos demais grupos experimentais (Figura 6). O índice HOMA-IR que avalia a resistência a insulina foi maior que o valor de cut-off que é 2,7 no grupo DLO consistente com resistência a insulina (Tabela 9).

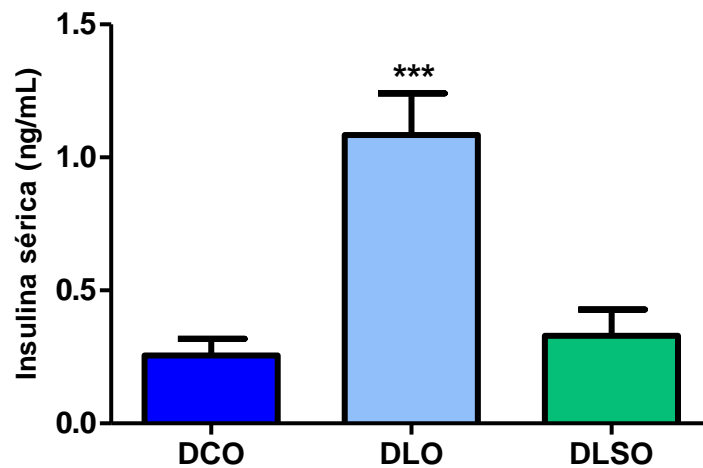


Figura 6. Concentração sérica de insulina de jejum em ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), 24 semanas após o tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM. *** $p < 0,05$ versus DCO e DLSO.

Tabela 9. Índice de resistência a insulina (HOMA-IR) dos grupos experimentais DCO, DLO e DLSO, após 24 semanas de dieta.

	DCO	DLO	DLSO
HOMA-IR	2,03±0,17	6,78±1,8	1,92±0,53

Dados são expressos como média±EPM.

6.8 Parâmetros de função renal

Em relação aos parâmetros de função renal, os nossos resultados demonstraram que o fluxo urinário e a fração de excreção de sódio ($FENa^+$) foram maiores no grupo DLSO quando comparado aos grupos DCO e DLO ($p < 0,001$) (Figuras 7 e 8). O grupo DLO apresentou redução da $FENa^+$ quando comparado ao grupo DCO ($p < 0,05$) (Figura 8). Foi observada também maior excreção urinária de proteínas nos animais dos grupos DLO ($p < 0,05$) e DLSO ($p < 0,001$) quando comparado aos animais do grupo DCO (Figura 9). Não houve alteração significativa dos níveis

séricos de creatinina e da taxa de filtração glomerular entre os grupos experimentais (Tabela 10).

Tabela 10. Parâmetros de função renal dos grupos experimentais DCO, DLO e DLSO, após 24 semanas de dieta.

Parâmetros Analisados	DCO	DLO	DLSO
Creatinina Plasma	0,74±0,04	0,60±0,10	0,53±0,05
TFG	0,35±0,08	0,39±0,06	0,30±0,05
FENa⁺	0,42±0,05	0,18±0,02*	6,26±1,29 [#]
FEK⁺	42,46±14,6	39,48±8,38	22,7±4,97
Fluxo Urinário	5,7(2,5; 6,9)	6,0(4,5; 6,9)	22,2(13,9;30,2) [#]
Proteinúria	3,59±0,10	4,06±0,15*	4,38±0,11***

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 (µg/24h – log 10). Dados são expressos como média±EPM, com exceção dos dados de fluxo urinário que são expressos como mediana e percentil 25 e 75. *p<0,05 versus DCO; ***p<0,001 versus DCO; [#]p<0,001 versus DCO e DLO.

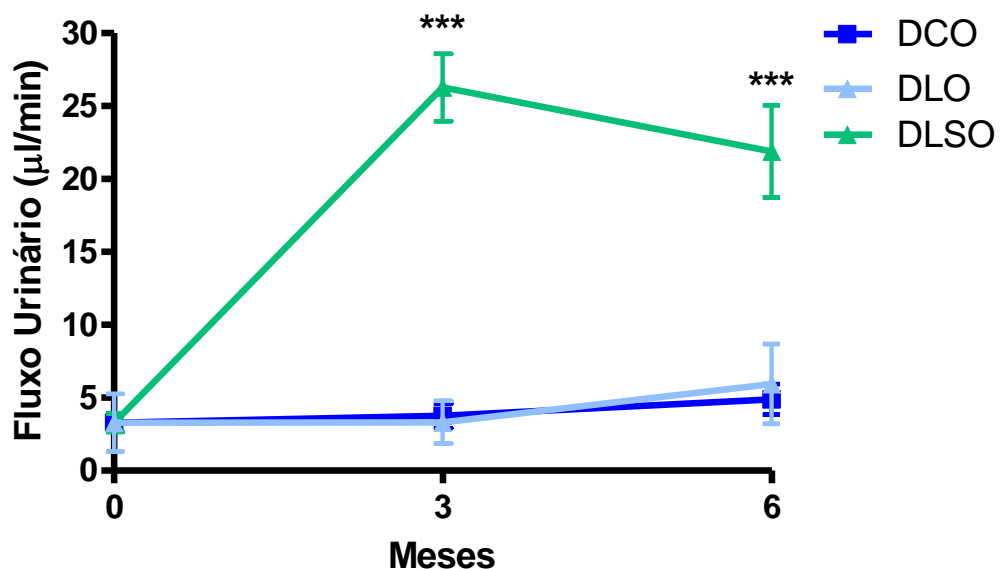


Figura 7. Evolução do fluxo urinário de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), durante as 24 semanas de tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM. ***p<0,001 versus DCO e DLO.

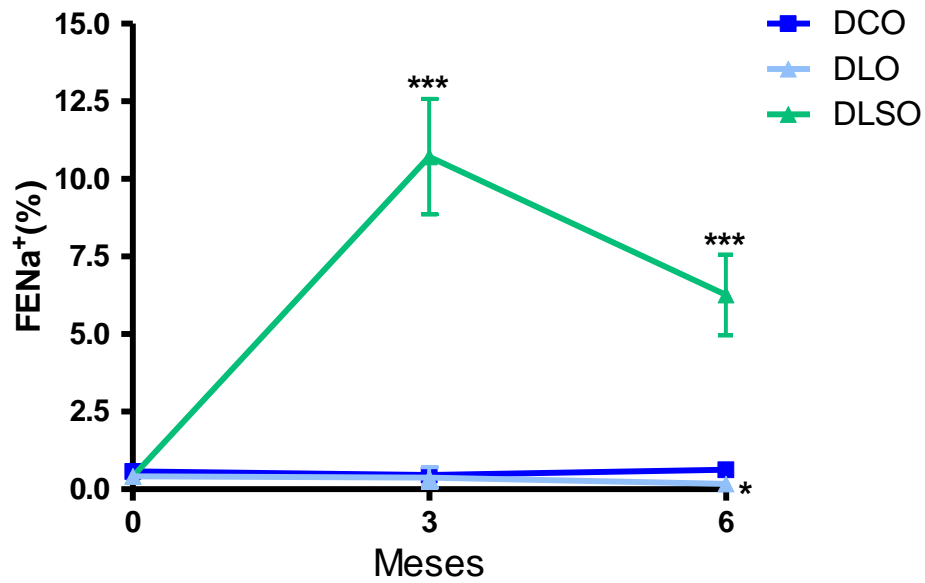


Figura 8. Evolução da fração de excreção de sódio de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), durante as 24 semanas de tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM. * $p < 0,05$ versus DCO; *** $p < 0,001$ versus DCO e DLO.

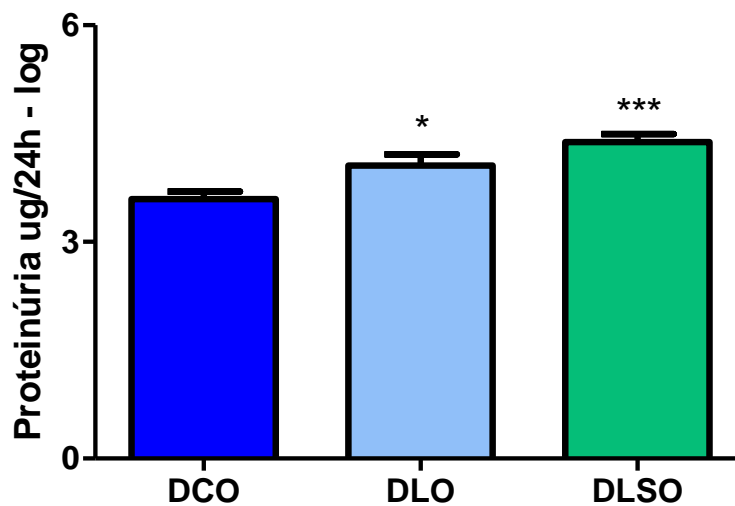


Figura 9. Excreção urinária de proteínas de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), após 24 semanas de tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM. * $p < 0,05$ versus DCO, *** $p < 0,001$ versus DCO.

6.9 Análise Histológica e Morfométrica do Rim

Na análise histológica do rim foram observadas áreas discretas de lesões, caracterizadas por infiltração de células inflamatórias, atrofia ou dilatação tubular e fibrose túbulo-intersticial, com distribuição focal no compartimento túbulo-intersticial o córtex renal das ratas DLO quando comparadas às ratas do grupo DCO e DLSO. O grupo DLSO apresentou áreas focais de infiltrado inflamatório e fibrose intersticial, porém a quantificação não demonstrou diferença significativa em relação ao grupo controle (Tabela 11, Figuras 10 e 11). Os estudos morfométricos evidenciaram maior área do tufo glomerular nos glomérulos corticais das ratas do grupo DLO comparado ao grupo DCO ($p < 0,05$). As ratas do grupo DLSO não apresentaram alteração significativa na área do tufo glomerular quando comparado ao grupo DCO (Tabela 11, Figura 12). Já a análise morfométrica dos glomérulos justamedulares não verificou diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (Tabela 11, Figura 13).

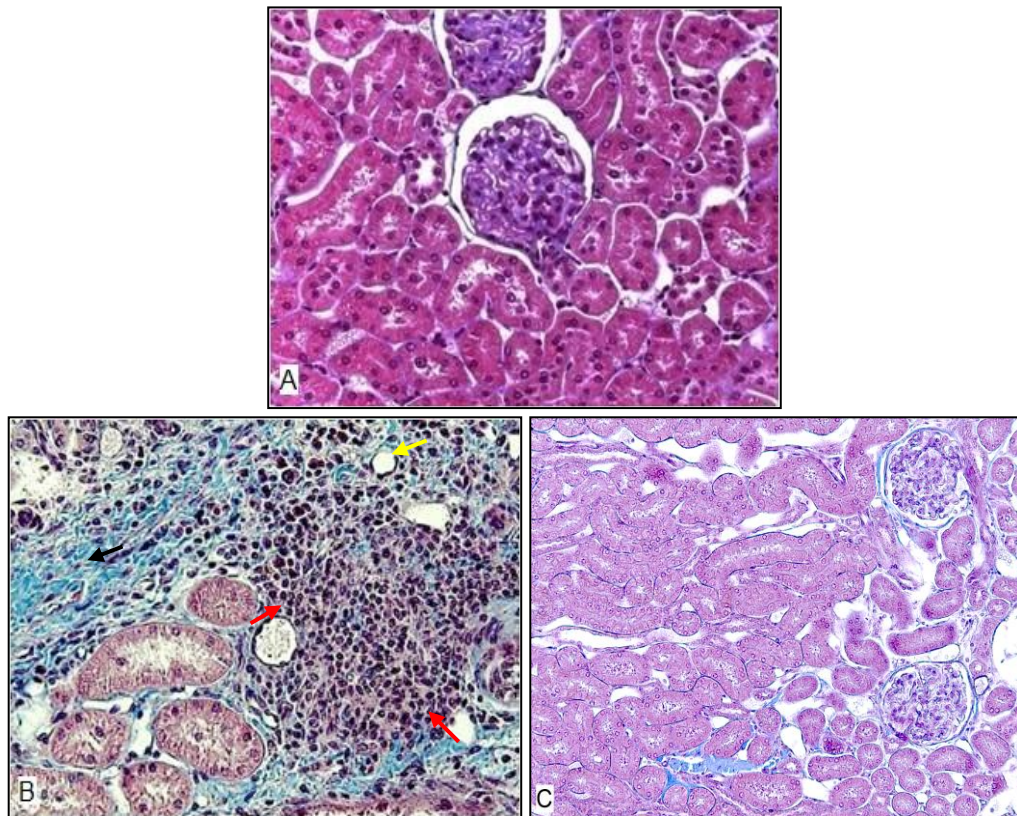


Figura 10. Cortes histológicos de rins corados com Tricômio de Masson no córtex renal de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO) (A), de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) (B) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO) (C), 24 semanas após o tratamento dietético. Notar em B, a presença de infiltrado de células intersticiais (setas vermelhas), fibrose intersticial (setas pretas) e atrofia tubular (setas amarelas). Aumento de 20x.

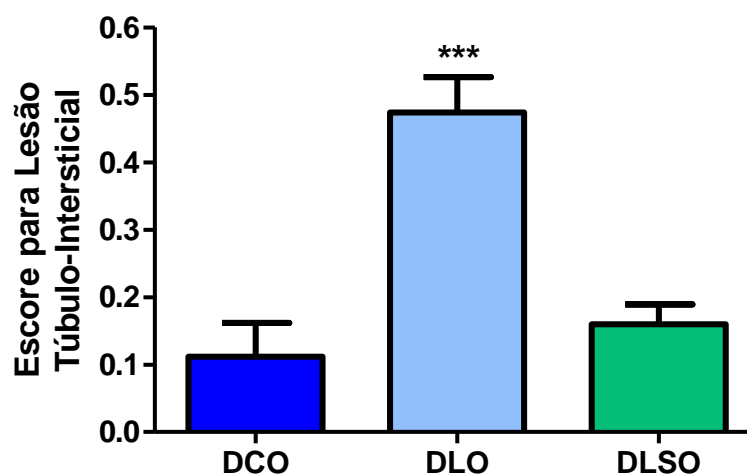


Figura 11. Escore para lesão túbulo-intersticial no córtex renal de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), 24 semanas após o tratamento dietético. Dados são expressos como média ± EPM. *** $p < 0,001$ versus DCO e DLSO.

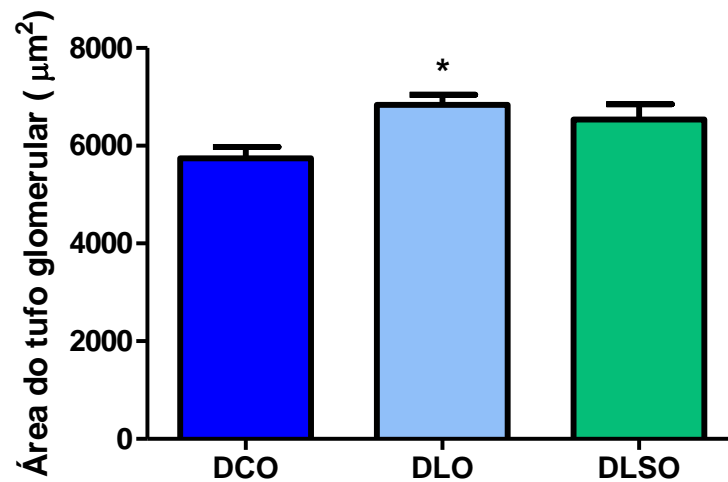


Figura 12. Área do tufo glomerular de glomérulos corticais de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), de ratas ovariectomizadas submetida à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), 24 semanas após o tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM. * $p > 0,05$ versus DCO.

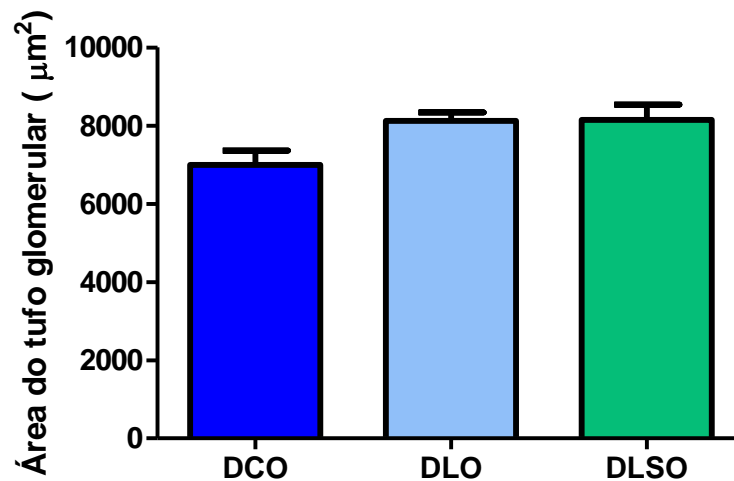


Figura 13. Área do tufo glomerular de glomérulos justamedulares de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), de ratas ovariectomizadas submetida à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), 24 semanas após o tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM.

6.10 Imunomarcção renal para macrófagos/monócitos

Os estudos imunoistoquímicos evidenciaram aumento significativo da marcação de células ED-1 positivas (macrófagos/monócitos) com padrão de distribuição focal na

área intersticial do córtex renal do grupo DLO e DLSO em relação ao grupo controle (Figuras 14 e 15, Tabela 12).

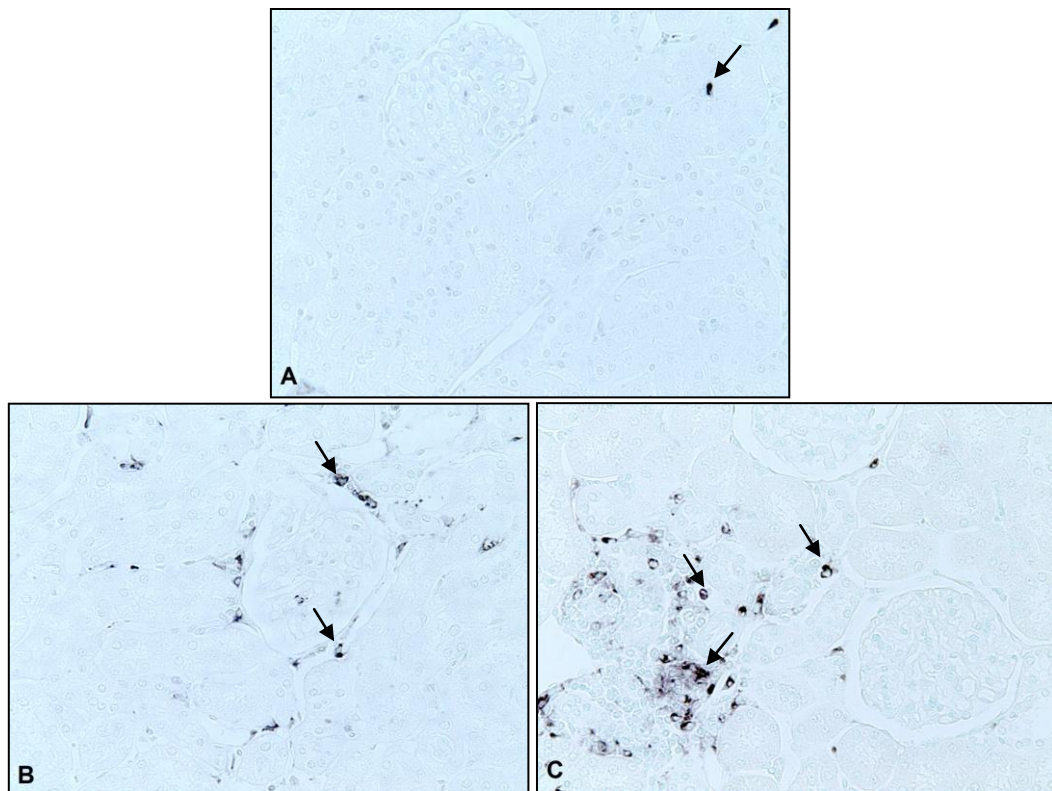


Figura 14. Imunolocalização de células ED-1 positivas (macrofágos/monócitos) no CTI no córtex renal de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO) (A), ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) (B) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO) (C), 24 semanas após o tratamento dietético (40x).

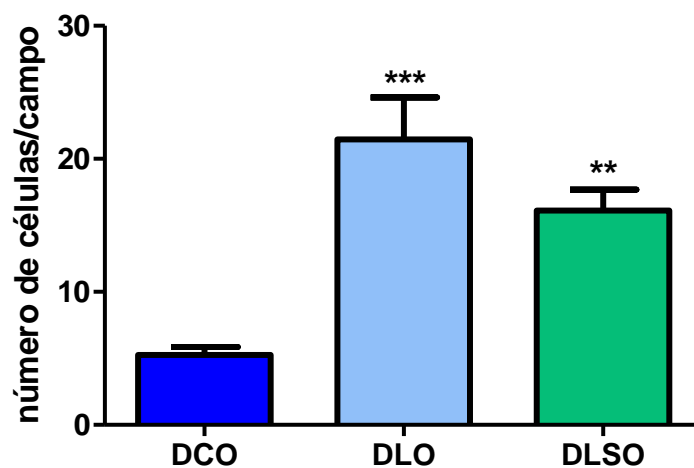


Figura 15. Quantificação do número de células ED-1-positivas no CTI no córtex renal de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO), ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica (DLO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), 24 semanas após o tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ versus DCO.

Tabela 11. Análise histológica, morfométrica e imunoistoquímica de ratas DCO, DLO e DLSO, após 24 semanas de dieta

Parâmetros analisados	DCO	DLO	DLSO
Lesão Túbulo-intersticial	0,11±0,05	0,50±0,05***#	0,16±0,02
Área glomerular, μm^2 dos GC	5744±232,4	6835±208,6*	6539±310,9
Área glomerular, μm^2 dos GCM	6998±366,5	8124±213,0	8149±388,4
ED-1 (número de células/campo)	5,26±0,60	21,4±3,16***	16,1±1,56*

GC= glomérulos corticais; GCM= glomérulos corticomedulares. Dados são expressos como média±EPM. * $p<0,05$ versus DCO; *** $p<0,001$ versus DCO; # $p<0,001$ versus DLSO.

6.11 Dosagem de $\text{TNF}\alpha$ sérico

A dosagem de $\text{TNF}\alpha$ evidenciou aumento dos níveis séricos desta citocina pró-inflamatória nos animais do grupo DLSO quando comparado aos animais do grupo DCO ($p<0,05$) (Figura 16).

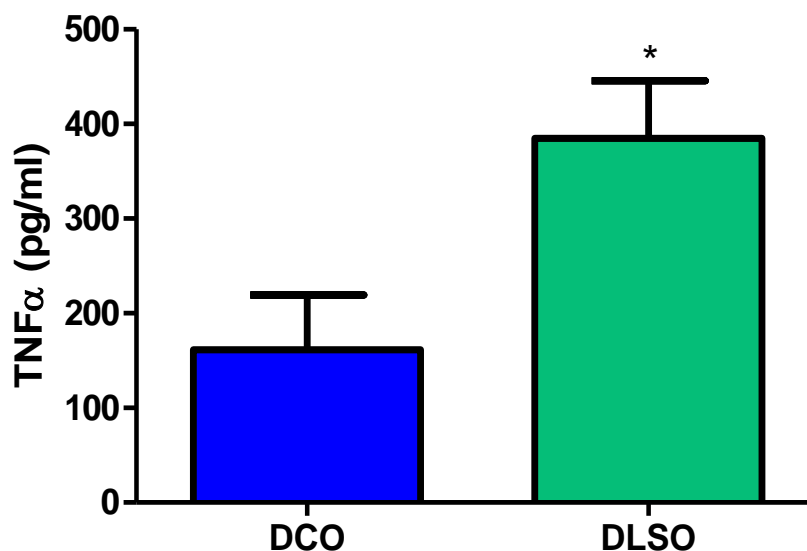


Figura 16. Dosagem de $\text{TNF}\alpha$ sérico de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta controle (DCO) e de ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica e hipersódica (DLSO), 24 semanas após o tratamento dietético. Dados são expressos como média±EPM. * $p<0,05$ versus DCO.

7. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hiperlipídica, durante o período de vinte e quatro semanas, apresentaram elevação do ganho de peso corporal, do peso do tecido adiposo visceral e da pressão arterial sistólica, além de promover alterações da função e estrutura renal. Essas alterações foram caracterizadas por redução da fração de excreção de sódio, aumento da proteinúria, aumento da área do tufo glomerular e a presença de lesões discretas e focais no córtex renal. Os estudos imunoistoquímicos evidenciaram aumento do número de macrófagos no córtex renal desses animais. A dieta hiperlipídica provocou ainda redução da tolerância a glicose, porém, não alterou as concentrações plasmáticas de colesterol e triglicérides. A adição de sal a dieta hiperlipídica promoveu aumento do peso do tecido adiposo visceral, e aumento mais pronunciado da pressão arterial sistólica e da proteinúria. A imunomarcagem para macrófagos revelou também aumento do número destas células no interstício do córtex renal. O perfil bioquímico foi semelhante ao observado nos animais submetidos somente a dieta hiperlipídica.

A associação da dieta hiperlipídica e ovariectomia resultou em maior ganho de peso e também em maior acúmulo de tecido adiposo visceral quando comparado ao grupo de ratas ovariectomizadas tratadas com dieta controle. Contudo, as ratas submetidas à dieta hiperlipídica associada com sobrecarga de sal apresentaram menor do ganho de peso, embora tenham apresentado aumento do tecido adiposo visceral. Apesar de não terem sido encontradas alterações na ingestão alimentar entre os diferentes grupos, a ingestão calórica foi maior nos animais do grupo DLO em relação ao grupo controle. Esta diferença está relacionada ao maior valor energético da dieta consumida pelo grupo DLO. Embora os animais do grupo DLSO também tenham consumido dieta hipercalórica, a ingestão calórica neste grupo não apresentou aumento significativo.

Os estudos em humanos ou em animais experimentais demonstram que a deficiência de estrógenos está associada a alterações no metabolismo energético com acúmulo de tecido adiposo e risco aumentado para o desenvolvimento da

síndrome metabólica (CLEGG et al., 2006). Camundongos fêmeas ovariectomizadas, alimentadas com dieta hiperlipídica e submetidas a reposição com estrógenos por 13 semanas, apresentaram redução significativa do peso corporal e da massa adiposa e, ainda, melhora no perfil lipídico quando comparadas com o grupo submetido a dieta hiperlipídica sem reposição hormonal (JEONG, YOON, 2007).

Os estrógenos podem também controlar a ingestão alimentar por meio de suas ações centrais no hipotálamo mediadas pelos receptores de estrógeno alfa ($ER\alpha$) e receptores de estrógeno beta ($ER\beta$) (LIANG et al., 2002; ROESCH, 2006; BUTERA, 2010). Em um estudo realizado com ratas *Wistar* ovariectomizadas tratadas com estrógenos, foi observado redução da ingestão alimentar por meio da redução na expressão de peptídeos orexinogênicos e aumento na expressão de mediadores anorexínicos como receptores de leptina, sugerindo que a hipofagia induzida pelos estrógenos é mediada por modulação de neuropeptídeos hipotalâmicos no centro regulador da ingestão e aumento sensibilidade a leptina (BROWN, CLEGG, 2010). A ausência de diferença na ingestão alimentar entre os grupos no presente estudo pode estar relacionada ao fato de que todas as ratas são ovariectomizadas e, portanto, experimentam baixos níveis de estrógeno.

Os receptores estrogênicos, $ER\alpha$ e $ER\beta$, estão presentes também no tecido adiposo sugerindo que este hormônio possui uma via direta para alterar o metabolismo lipídico nos adipócitos (YEPURU et al., 2010). Quando os níveis de estrógenos estão elevados, acima dos níveis fisiológicos, observa-se alteração nos processos metabólicos do tecido adiposo caracterizada por reduzido ritmo lipogênico e menor deposição de gordura (HEINE et al. 2000). Em contrapartida, camundongos com deficiência do receptor de estrógeno alfa ($ER-\alpha$) apresentam aumento da massa adiposa sem diferenças paralelas na ingestão, sugerindo que a ação estrogênica envolva mecanismos biológicos no tecido adiposo (FAULDS et al., 2012).

Os estrógenos são capazes de reduzir ainda a expressão e a atividade da lipoproteína lipase (LPL), diminuindo a deposição de ácidos graxos circulantes nos adipócitos e, assim, restringindo o acúmulo de gordura nestas células (HOMMA et al., 2000). Estudos com roedores e com humanos sustentam estes achados demonstrando que a ovariectomia e a menopausa são acompanhadas por aumento

da lipogênese e do tecido adiposo associado a níveis elevados de LPL, alterações que são revertidas com a reposição do estrógeno (IVENUS, BRUNZELL, 1988; PEINADO-ONSURBE et al., 1993).

A adição de sal a dieta hiperlipídica não promoveu alteração do ganho de peso em ratas ovariectomizadas. Semelhante ao nosso estudo, a dieta com elevado teor de sódio (8% NaCl), em ratos machos sensíveis ao sal, não promoveu diferenças no peso corporal e no consumo alimentar em relação à dieta normossódica (0,3% NaCl) (OGIHARA et al., 2001). Estudo realizado com ratos machos *Wistar* submetidos à dieta hipersódica, durante 6 semanas, demonstrou que a sobrecarga de sal resultou em aumento nos depósitos de tecido adiposo branco subcutâneo e visceral quando comparados a animais com dieta normossódica. Contudo, não houve diferenças significativas no peso corporal entre os grupos, os autores sugerem que essa similaridade no peso corporal dos animais com ou sem sobrecarga de sal pode estar relacionada à redução da massa magra em animais submetidos à dieta hipersódica. O aumento na adiposidade induzida pela dieta hipersódica parece estar relacionado com a elevada capacidade lipogênica do tecido adiposo branco (FONSECA-ALANIZ et al., 2007; FONSECA-ALANIZ et al., 2008).

A dieta hiperlipídica ou dieta hiperlipídica com sobrecarga de sal em ratas ovariectomizadas promoveu também elevação da pressão arterial sistólica que pode estar associada ao maior acúmulo de tecido adiposo visceral e aos efeitos do sal sobre a natriurese pressórica numa condição de níveis reduzidos de estrógenos. A relação entre redução dos níveis plasmáticos de estrógenos e a elevação da pressão arterial tem recebido maior atenção nos últimos anos, devido as ações cardioprotetoras desempenhadas por este hormônio que previnem a elevação da pressão arterial (DUBEY et al., 2002a). ROBERTS et al. (2001) demonstraram que machos intactos e ratas ovariectomizadas submetidos a dieta hiperlipídica e hipersacarídica por 7 meses apresentaram hipertensão de maneira mais rápida quando comparado as fêmeas intactas tratadas com essa mesma dieta por 24 meses, apresentando aumento da pressão arterial mais tardiamente. O tratamento das ratas ovariectomizadas com estradiol normalizou a pressão arterial. Por outro lado, as ratas ovariectomizadas submetidas à dieta hipolipídica associada a carboidratos complexos não apresentaram elevação da pressão arterial, achado

semelhante ao encontrado em nosso estudo referente às ratas ovariectomizadas com dieta controle. Isto sugere que, na ausência dos estrógenos, dieta normolipídica ou hipolipídica mantém a pressão arterial em níveis normais. Assim, a hipertensão induzida pela dieta hiperlipídica sofre influência dos hormônios ovarianos, exercendo função protetora sobre a função cardiovascular.

A obesidade associada à síndrome metabólica é acompanhada por aumento da atividade do sistema nervoso simpático. Estudos recentes indicam que o excesso de ganho de peso, principalmente relacionado a adiposidade visceral, promove aumento seletivo da atividade do sistema nervoso simpático (SNS) que constitui um dos mecanismos envolvidos na elevação da pressão arterial (ESLER et al., 2006; SILVA et al., 2009). Os fatores que parecem ser responsáveis pelo aumento da atividade simpática na obesidade incluem alteração na sensibilidade dos barorreceptores, aumento nos níveis circulantes de ácidos graxos livres, AII, leptina e insulina (SILVA et al., 2009; MORGAN, RAHMOUNI, 2010; HALL et al., 2010). A associação entre dieta hipersódica e hipertensão é amplamente conhecida. Alguns estudos epidemiológicos demonstram correlação positiva entre a carga de sódio na dieta e a elevação da pressão arterial (HE, MACGREGOR, 2003; FRANCO, OPARIL, 2006a). Modelos experimentais evidenciam que dieta hipersódica é acompanhada por aumento da pressão arterial associado a maior risco de doenças cardiovasculares (MOHAN, CAMPBELL, 2009; KATORI, MAJIMA, 2006) e a restrição de sódio é eficaz em reduzir a pressão arterial (KARPPANEN, MERVAALA, 2006). Aproximadamente metade da população com hipertensão essencial é sensível ao sal (CHAMARTHI et al., 2010). Os mecanismos de hipertensão relacionados ao sal incluem a disfunção endotelial, alteração na atividade SRAA e hiperatividade simpática por alterar a sensibilidade do barorreflexo (HINOJOSA-LABORDE et al, 2004; LIANG, LEENEN, 2007; LI et al., 2009; BUGENHAGEN et al., 2010).

A hiperleptinemia é outro possível fator que associa a obesidade à hipertensão. O acúmulo de tecido adiposo resulta em maior secreção de leptina e resistência às suas ações metabólicas (RASOULI, KERN, 2008). Entretanto, o estímulo que a leptina exerce sobre a atividade simpática permanece inalterado e este é o principal mecanismo pelo qual a leptina contribui para a elevação da pressão arterial

(RAHMOUNI et al., 2005; KOTSIS et al., 2010). A hiperleptinemia associada a obesidade contribui também para disfunção endotelial por alterar a expressão da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e provocar depleção de óxido nítrico (NO), potencializando seu efeito pressórico via SNS (KORDA et al., 2008).

Estudos têm demonstrado que a sensibilidade a insulina apresenta-se reduzida na obesidade, resultando em resistência a insulina e hiperinsulinemia que parece contribuir para a elevação da pressão arterial por meio da ativação do SNS (WILCOX, 2005; KOTSIS et al., 2010) e de sua ação sobre a retenção de sódio e água com elevação do volume extracelular. Apesar do quadro de resistência a insulina, os rins permanecem sensíveis a insulina e a mesma promove, através de ação direta, aumento na reabsorção tubular de sódio e conseqüente hipertensão (D'ELIA et al., 2009). No presente estudo, as ratas do grupo DLO apresentaram níveis elevados de insulina sérica, acompanhado por elevado índice HOMA-IR que caracteriza redução da sensibilidade a insulina. Essas alterações podem estar contribuindo parcialmente para o aumento da reabsorção de sódio e elevação da pressão arterial observada nesses animais. O grupo DLSO não apresentou alteração nos níveis séricos de insulina ou no índice HOMA-IR, apesar do aumento de pressão arterial, que pode estar associado, em parte, aos efeitos da sobrecarga de sal.

O perfil bioquímico destes animais também foi avaliado e não foram observadas diferenças significativas nos níveis plasmáticos de colesterol total, triglicérides e glicose entre os grupos experimentais. Contudo, no teste de tolerância a glicose, constatou-se redução da tolerância a glicose nos grupos DLO e DLSO em relação ao grupo controle. A dieta hiperlipídica no grupo DLO acompanhada por aumento no ganho de peso e maior acúmulo de tecido adiposo visceral podem estar associados à diminuição na sensibilidade a insulina, já que o tecido adiposo visceral secreta várias adipocinas envolvidas na resistência a insulina como resistina, TNF α , IL-6 e MCP-1 (WARNE, 2003; KANDA et al., 2006; KAMEI, 2006). Assim, a obesidade é frequentemente associada a um quadro de intolerância a glicose acompanhada por hiperinsulinemia e sensibilidade reduzida às ações metabólicas da insulina, condição definida como resistência a insulina (KOTSIS et al., 2010). Akoum et al., (2011) demonstraram que camundongos submetidos a dieta hiperlipídica por 20 semanas

apresentaram correlação positiva entre elevado índice HOMA-IR e acúmulo de tecido adiposo visceral, apresentando ainda elevados níveis circulantes de resistina. No nosso modelo foi demonstrado que dieta hiperlipídica associada a redução dos hormônios ovarianos causou aumento do tecido adiposo visceral com hiperinsulinemia relacionada.

Além dos efeitos deletérios relacionados à obesidade induzida pela dieta, estudos demonstram que a ovariectomia aumenta a sensibilidade da pressão arterial ao sal, contribuindo para o desenvolvimento de hipertensão neste período (WEINBERGER, 2006; HINOJOSA-LABORDE et al., 2004). No modelo sensível ao sal, ratas *Dahl S* intactas submetidas a dieta hipossódica desenvolveram hipertensão associada ao envelhecimento. Por outro lado, nas ratas *Dahl S* ovariectomizadas, a elevação da pressão arterial ocorreu mais precocemente, sugerindo que a redução dos estrógenos potencializa e acelera os efeitos do envelhecimento sobre a pressão arterial. A reposição hormonal retarda o desenvolvimento de hipertensão nestes animais (HINOJOSA-LABORDE et al., 2004).

Outros estudos com ratas *Dahl S* evidenciaram que a ovariectomia foi acompanhada por elevação da pressão arterial após 15 semanas de idade, independente da carga de sódio na dieta (YANES et al., 2009; HARRISON-BERNARD et al., 2003). Corroborando com estes achados, um estudo realizado com mulheres pré-menopáusicas normotensas verificou maior sensibilidade ao sal nas mesmas 4 meses após serem submetidas a ovariectomia, sugerindo que a redução dos hormônios ovarianos e o resultante aumento da sensibilidade da pressão arterial ao sal é um importante fator para o desenvolvimento de hipertensão pós-menopausal (SCHULMAN et al., 2006). O modelo utilizado no presente estudo não é sensível ao sal, e mesmo assim, os nossos resultados demonstraram que a pressão arterial sistólica foi maior nas ratas tratadas com dieta rica em gordura e sal.

A obesidade e a dieta hipersódica são condições comumente associadas a alterações na função e estrutura renal que, por sua vez, podem contribuir para o desenvolvimento de hipertensão arterial (GUEDES et al., 2010; MOHAN, CAMPBELL, 2009). A redução nos níveis circulantes de estrógenos também está relacionada a injúria renal já que os estrógenos possuem ações renoprotetoras (GILBERT et al., 2008). As mudanças no balanço renal do sódio são frequentemente

encontradas em casos de sobrepeso e obesidade. Hall et al., (1993) constataram em modelo experimental que a obesidade está associada a retenção de sódio. Estudo clínico realizado com homens com sobrepeso e homens com peso normal evidenciou correlação positiva entre o índice de massa corporal (IMC) e a circunferência abdominal com a reabsorção tubular de sódio. Estes indivíduos também apresentaram hiperinsulinemia, resistência a insulina e pressão arterial elevada (STRAZZULLO et al., 2001).

Os nossos dados de função renal demonstraram diminuição de fração de excreção de sódio no grupo DLO em relação ao grupo controle no final do período experimental. Enquanto que as ratas tratadas com dieta hiperlipídica e hipersódica apresentaram aumento significativo da excreção de sódio em resposta à sobrecarga de sal. Contudo, a análise da evolução da fração de excreção de sódio nas ratas do grupo DLSO ao longo do período experimental evidenciou uma tendência a diminuição da excreção urinária de sódio nestes animais. O fluxo urinário do grupo DLSO também apresentou tendência a redução no final do experimento, apesar de não significativa. Esses achados sugerem que o fornecimento da dieta por um período mais prolongado poderia promover maiores implicações na excreção de sódio, promovendo redução da excreção deste íon e conseqüentemente alterações mais pronunciadas da pressão arterial.

Os indivíduos obesos geralmente apresentam aumento da atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Na obesidade, a hiperatividade desse sistema é um dos mecanismos centrais das desordens metabólicas e hemodinâmicas relacionadas ao excesso de tecido adiposo (OKADA et al., 2010). Este desajuste no controle do SRAA se deve ao fato do tecido adiposo produzir e secretar todos os componentes do sistema, incluindo angiotensinogênio, renina, enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptor de angiotensina tipo 1, em roedores e humanos (ESLER et al., 2006). Os efeitos da All incluem vasoconstrição sistêmica, retenção direta de sódio e água e aumento na produção de aldosterona. Outro potencial mecanismo dos SRAA é a elevação crônica do tônus simpático, causando vasoconstrição renal e aumento na secreção de renina (KOTSIS et al., 2010).

O aumento na expressão de renina, ECA e angiotensinogênio no tecido renal foi observado em camundongos submetidos a dieta hiperlipídica, sugerindo que a

ativação do SRAA intrarrenal está realmente envolvido nos distúrbio do balanço de sódio. Estes animais apresentaram ainda declínio na excreção urinária de sódio quando os animais foram submetidos a sobrecarga aguda ou crônica de sal (DEJI et al., 2009). A hiperatividade simpática em ratos sensíveis ao sal também altera a excreção renal de sódio (ZICHA et al., 2001). Cães alimentados com dieta hiperlipídica por 5 semanas submetidos a desnervação renal apresentaram menor pressão arterial quando comparados as animais controle. Além disso, enquanto o grupo controle apresentou balanço positivo de sódio em paralelo a alta pressão arterial e ao ganho de peso, o grau de retenção de sódio nos animais desnervados foi bem menor, sugerindo a importância da atividade simpática na retenção de sódio associada a obesidade (KASSAB et al., 1995).

A dieta hipersódica, a longo prazo, também parece afetar o balanço renal do sódio por aumentar os níveis intrarrenais de All e contribuir para o estado redox, dois fatores associados a elevação da reabsorção tubular de sódio (RECKELHOFF, ROMERO, 2003). A dieta hipersódica diminuiu a atividade do SRA plasmático, porém ativou o SRA tecidual em alguns órgãos, incluindo o cérebro, coração e rins (FRANCO et al., 2006; LIN et al., 2009). Em ratos *Dahl S*, a sobrecarga de sal elevou a expressão de RNAm para a ECA e sua atividade, bem como aumentou a densidade de receptores de All tipo 1 (AT1) em alguns tecidos (LIANG, LEENEN, 2007). As alterações da natriurese pressórica, com redução da excreção renal de sódio, têm sido reportadas também em mulheres na pós-menopausa e em ratas *Dahl S* como fator contribuinte para elevação da pressão arterial (PECHÈRE-BERTSCHI, BURNIER, 2004; OTSUKA et al., 1996).

Outro parâmetro de função renal avaliado foi a excreção urinária de proteínas. As ratas do grupo DLO apresentaram aumento da proteinúria em relação ao grupo controle. Contudo, o grupo DLSO apresentou aumento ainda mais significativo da proteinúria quando comparado ao grupo DCO. A relação entre obesidade e proteinúria tem sido evidenciada em estudos clínicos e experimentais. Os indivíduos obesos, quando submetidos a tratamento dietético e exercício físico com redução de peso, apresentaram uma diminuição de 30% da proteinúria (SHEN et al., 2010; TESAURO et al., 2011). Em estudo experimental com ratos *Zucker*, a perda de peso

também resultou em redução da proteinúria e melhora da glomerulopatia relacionada a obesidade (LIAO et al., 2007).

O excesso de sal contribui também para o aumento da proteinúria, como observado no presente estudo. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) apresentam altos graus de proteinúria quando submetidos a sobrecarga de sal na dieta (MATAVELLI et al., 2007). Além disso, ratos *Dahl S*, tratados com dieta hipersódica durante 7 dias, apresentaram mudanças na estrutura da barreira de filtração glomerular acompanhada por proteinúria (DAHLY-VERNON et al., 2005). A elevação da proteinúria foi atenuada com o bloqueio do receptor de angiotensina em ratos SHR, após 4 semanas de dieta hipersódica, sugerindo a participação do SRAA (SUSIC et al., 2011). Terapias que utilizam inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) também são eficazes em reduzir proteinúria em modelos de lesão renal induzida pelo sal (XU et al., 2005; ZHOU, TURNER, 2010; LIN et al., 2010). A associação de dieta hiperlipídica com dieta hipersódica também resulta em proteinúria como observado em estudo realizado com ratos *Dahl S* alimentados com dieta hiperlipídica com posterior adição de sal que apresentaram considerável elevação na proteína urinária quando comparado a ratos *Dahl S* com dieta normolipídica e sobrecarga de sal (NAGAE et al., 2009).

Apesar de não terem sido observadas alterações na TFG, o ganho de peso com acúmulo de tecido adiposo, em modelos experimentais e em humanos, está associado a mudanças na hemodinâmica renal que incluem aumento no fluxo sanguíneo renal e hiperfiltração (HENEGAR et al., 2001; PECLY et al., 2006). A perda de peso em sujeitos com obesidade severa resultou em redução da TFG, FSR, FF e também da pressão arterial. A melhora da hiperfiltração parece estar associada a prevenção de glomerulopatia relacionada a obesidade (CHAGNAC et al., 2003). O principal fator contribuinte para estas alterações hemodinâmicas induzidas pela obesidade é a vasodilatação da arteríola aferente com consequente elevação do gradiente de pressão hidrostática transcápsular nos capilares glomerulares (GUEDES et al., 2010). A vasoconstrição da arteríola eferente, devido ao estímulo do SRAA e do nervo simpático renal, também parece contribuir para elevação da pressão hidrostática e hiperfiltração (EKNOYAN, 2011).

A dieta hipersódica também possui efeito sobre a TFG por alterar a hemodinâmica renal. Ratos SHR submetidos a dieta hipersódica apresentaram redução da TFG paralelo queda do fluxo sanguíneo e proteinúria (MATAVELLI et al., 2006; VARAGIC et al., 2010). A atividade simpática renal aumentada parece estar relacionada a estas alterações já que a desnervação unilateral de ratos *Sprague-Dawley* promoveu aumento na TFG, fluxo urinário e excreção fracional de sódio quando submetidos a sobrecarga de sal em relação ao grupo controle sem desnervação (SALMAN et al., 2010). Elevada AII intrarrenal associada a redução do óxido nítrico também estão relacionados a diminuição da TFG diante da sobrecarga de sal (KOPKAN, ČERVENKA, 2009).

Os nossos estudos histológicos demonstraram discretas lesões na área intersticial do córtex renal nas ratas do grupo DLO. As alterações incluem áreas de fibrose no interstício, infiltrado inflamatório e atrofia e dilatação tubular. Esses dados sugerem que a dieta hiperlipídica associada a ovariectomia promoveu alterações iniciais da estrutura renal que podem estar associadas a mudanças discretas, porém significativas, da função renal. A adição de sal a dieta hiperlipídica em ratas ovariectomizadas não promoveu essas alterações histológicas apesar do aumento da infiltração de macrófagos.

Existem evidências demonstrando a relação entre obesidade e alterações da estrutura e função renal. As alterações metabólicas e hormonais como hiperleptinemia e hiperinsulinemia, distúrbios no perfil inflamatório, lipotoxicidade, hiperatividade do SRAA e hiperfluxo renal são alguns dos fatores que ligam a obesidade à injúria renal (PAPAFRAGKAKI, TOLIS, 2005; MADDOX et al., 2002; XU et al., 2005; GUEDES et al., 2010). As alterações encontradas na injúria renal induzida por obesidade, em modelos experimentais e estudos clínicos, incluem aumento da área do tufo glomerular, glomeruloesclerose, expansão mesangial, espessamento da cápsula de *Bowman*, infiltrado inflamatório e acúmulo de lipídios no tecido renal (KAMBHAM et al., 2001; WU et al., 2006; ALTUNKAYNAK et al., 2008; DEJI et al., 2009). As alterações hemodinâmicas que resultam em aumento da taxa de filtração glomerular parecem estar relacionadas ao dano glomerular (CHAGNAC et al., 2000). Em nosso estudo, apesar de não terem sido observadas alterações na TFG, a análise morfométrica evidenciou aumento da área do tufo

glomerular na região cortical das ratas DLO. Esses dados indicam modificações iniciais da estrutura glomerular, indicando que o fornecimento mais prolongado da dieta poderia acarretar em maior aumento da TFG e hiperfiltração nesses animais.

A análise imunoistoquímica demonstrou aumento significativo do número de macrófagos e monócitos no córtex renal dos animais DLO e DLSO em relação ao grupo controle. A obesidade e hipertensão são caracterizadas pelo aumento do processo inflamatório no tecido renal associado à infiltração de células inflamatórias e produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas (RODRÍGUEZ-ITURBE et al., 2004). Ratos *Zucker* obesos apresentam aumento do número de macrófagos e monócitos no tecido renal relacionado a elevação na expressão das citocinas inflamatórias IL-6 e MCP-1, glomeruloesclerose e proteinúria. Estas alterações foram prevenidas com uso do bloqueador de receptor de angiotensina tipo 1, evidenciando a participação da AII na progressão da doença renal (XU et al., 2005). Ratos SHR submetidos a dieta hiperlipídica, por 10 semanas, apresentaram aumento no número de macrófagos no córtex renal, promovendo também a secreção aumentada de citocinas inflamatórias e alteração da função renal (KNIGHT et al., 2008). Os macrófagos infiltrados no tecido renal estão associados a liberação de espécies reativas de oxigênio, citocinas inflamatórias e AII, que podem promover e intensificar a lesão tecidual (NAVA et al., 2003). Além disso, é provável que este aumento nos níveis intrarrenais de AII esteja envolvido com a reabsorção aumentada de sódio, podendo contribuir para a manutenção da hipertensão (RODRÍGUEZ-ITURBE et al., 2002).

A infiltração de células inflamatórias no tecido renal foi demonstrada também em ratos *Dahl S* com sobrecarga de sal, os quais apresentaram maior atividade do fator de transcrição NF- κ B. O tratamento com antiinflamatório resultou em redução do infiltrado inflamatório, melhora da hemodinâmica renal e redução da pressão arterial, sugerindo que a infiltração renal de células imunes possui importante contribuição para o desenvolvimento de hipertensão e lesão renal (TIAN et al., 2007). O aumento do estado redox no tecido renal de ratos alimentados com dieta hipersódica pode contribuir para o processo inflamatório por ativar NF- κ B que aumenta a transcrição de citocinas e quimiocinas resultando no recrutamento de macrófagos para o parênquima renal (GU et al., 2006; TIAN et al., 2007a; TIAN et al., 2008). A elevação

dos níveis intrarrenais de AII também parece estimular a infiltração renal de células inflamatórias, uma vez que o uso de bloqueadores do receptor de angiotensina em ratos *Dahl S* com excesso de sal na dieta apresenta redução do dano renal, do infiltrado inflamatório e das citocinas e quimiocinas, assim como melhora na hemodinâmica renal (LIN et al., 2009). Estes estudos demonstram que a infiltração renal por células inflamatórias participa de forma significativa no desenvolvimento de hipertensão e doença renal induzidas pelo sal.

O TNF- α é considerado uma importante citocina envolvida na injúria renal, promovendo inflamação, apoptose e acúmulo de matriz extracelular (SANCHEZ-NIÑO et al., 2010). A elevação dos níveis plasmáticos de TNF- α pode estar associada ao aumento do tecido adiposo visceral, já que esta é a principal citocina inflamatória secretada pelos adipócitos viscerais. O TNF- α promove infiltração de macrófagos para o tecido renal e estimula a expressão gênica de citocinas inflamatórias por ativar o NF- κ B, responsável pela transcrição de várias citocinas inflamatórias e moléculas de adesão (WAHBA, MAK, 2007; CUNNINGHAM et al., 2002). Em nosso estudo foi verificado aumento dos níveis plasmáticos de TNF- α nas ratas do grupo DLSO em relação ao grupo controle. Estudos anteriores do nosso laboratório demonstraram também aumento da expressão gênica de TNF- α no tecido renal das ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta hiperlipídica, sugerindo também o envolvimento dessa citocina sobre as alterações renais observadas nesse modelo experimental (AMARAL et al., 2011).

Os níveis elevados de TNF- α foram encontrados em modelos de hipertensão sensível ao sal. Em ratos DOCA-salt (acetato de desoxicorticosterona), modelo de hipertensão associado a mineralocorticóides, com sobrecarga de sal, apresentaram hipertensão, ativação de NF- κ B, aumento na excreção urinária de endotelina e MCP-1 e também albuminúria. O tratamento destes animais com inibidor do receptor de TNF- α preveniu estas alterações apesar de não afetar a pressão arterial (ELMARAKEY et al., 2008). Foi observado também que elevados níveis de TNF- α participam na elevação da pressão arterial e injúria renal em ratos com hipertensão induzida por AII (ELMARAKEY et al., 2006). Desta forma, alterações inflamatórias caracterizadas por elevados níveis de citocinas inflamatórias, principalmente TNF- α , estão estreitamente relacionadas ao desenvolvimento e manutenção da hipertensão

e injúria renal. Contudo, no nosso estudo, embora tenha sido observado aumento de macrófagos e de TNF- α , essas alterações não foram capazes de induzir maiores implicações da função e estrutura renal nas ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta hiperlipídica e hipersódica.

O modelo experimental utilizado contribuiu para o estudo das repercussões pressóricas e renais em resposta à administração de uma dieta rica em gordura e sódio associada à diminuição dos hormônios ovarianos induzida pela ovariectomia. Contudo, essas alterações foram discretas e iniciais, apesar da sobrecarga de sal. Provavelmente, o tempo de fornecimento da dieta poderia desenvolver uma maior sensibilidade ao sal e conseqüentemente maiores alterações pressóricas e renais, além dos efeitos da própria dieta rica em gordura, sobre os parâmetros estudados, tornando possível uma melhor caracterização do modelo experimental. Além disso, outros fatores podem estar colaborando para os efeitos observados, como as diferenças da sensibilidade ao sal entre os animais estudados, e até mesmo um possível fator compensatório em resposta a essa elevada carga de sal na dieta. Portanto, mais estudos são necessários para tentar elucidar os mecanismos envolvidos na patogênese da hipertensão sensível ao sal e obesidade associada à diminuição dos hormônios ovarianos.

7.1 Limitações

A limitação encontrada no presente trabalho refere-se à ausência de resultados dos níveis séricos de TNF- α do grupo DLO. A falta destes resultados está relacionada a problemas no armazenamento das amostras de soro destes animais inviabilizando a análise dos níveis circulantes de TNF- α nas mesmas.

8. CONCLUSÃO

Os nossos resultados demonstram que a dieta hiperlipídica e hipersódica em ratas com diminuição dos hormônios ovarianos, induzida pela ovariectomia, promoveu elevação da pressão arterial sistólica, proteinúria e infiltrado de macrófagos e monócitos, sugerindo o desenvolvimento inicial de alterações renais induzidas pela dieta.

REFERÊNCIAS

- ABRASS, C.K., SPICER, D., RAUGI, G.J., Induction of nodular sclerosis by insulin in rat mesangial cells in vitro: Studies of collagen. **Kidney International**, v.47, p.25–37, 1995.
- ABRASS, C.K., Overview: Obesity: what does it have to do with kidney disease? **Journal of American Society of Nephrology**, v.15, p.2768–2772, 2004.
- AKOUM, S.E., LAMONTAGNE, V., CLOUTIER, I., TANGUAY, J., Nature of fatty acids in high fat diets differentially delineates obesity-linked metabolic syndrome components in male and female C57BL/6J mice. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v.3, n.34, p.1-41, 2011.
- ALONSO-MAGDALENA, P., ROPERO, A.B., CARRERA, M.P., CEDERROTH, C.R., BAQUIE, M., GAUTHIER, B.R., NEF, S., STEFANI, E., NADAL, A., Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER-alpha. **PLoS ONE**, v.3, n.4, p.1-11, 2008.
- ALTUNKAYNAK, M.E., ÖZBEK, E., ALTUNKAYNAK, B.Z., CAN, I., UNAL, D., UNAL, B., The effects of high-fat diet on the renal structure and morphometric parametric of kidneys in rats. **Journal of Anatomy**, v.212, p.845-852, 2008.
- AMARAL, Lilianny Souza de Brito, **Efeitos da dieta hiperlipídica sobre a função, estrutura e o perfil inflamatório renal em ratas ovariectomizadas**, 2011, 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciências Fisiológicas, Departamento de Instituto Multidisciplinar em Saúde - IMS, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2011.
- ANUBHUTI, ARORA S., Leptin and its metabolic interactions – an update. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.10, p.1-21, 2008.
- BAYLIS, C., Changes in renal hemodynamics and structure in the aging kidney; sexual dimorphism and the nitric oxide system. **Experimental Gerontology**, v.40, n.4, p.271–278, 2005.
- BIDDINGER, S.B., KAHN, C.R., From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. **Annual Review of Physiology**, v.68, p.123-158, 2006.
- BROWN, L.M., CLEGG, D.J., Central effects of estradiol in the regulation of food intake, body weight, and adiposity. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.122, p.65-73, 2010.
- BROWN, I.J., TZOULAKI, I., CANDEIAS, V., ELLIOTT, P., Salt intakes around the world: implications for public health. **International Journal of Epidemiology**, v.38, p.791–813, 2009.

BUGENHAGEN, S.M., COWLEY JR, A.W., BEARD, D.A., Identifying physiological origins of baroreflex dysfunction in salt-sensitive hypertension in the Dahl SS rat. **Physiological Genomics**, v.42, p.23–41, 2010.

BUTERA, P.C., Estradiol and the control of food intake. **Physiology Behavior**, v.99, n.2, p.1-11, 2010.

CAMPESE, V.M., Salt sensitivity in hypertension. Renal and cardiovascular implications. **Hypertension**, v.23, p.531–550, 1994.

CHAGNAC, A., WEINSTEIN, T., KORZETS, A., RAMADAN, E., HIRSCH, J., GAFTER, U., Glomerular hemodynamics in severe obesity. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v.278, p.F817–F822, 2000.

CHAGNAC, A., WEINSTEIN, T., HERMAN, M., HIRSH, J., GAFTER, U., ORI, Y., The effects of weight loss on renal function in patients with severe obesity. **Journal of American Society of Nephrology**, v.14, p.1480–1486, 2003.

CHAGNAC, A., HERMAN, M., ZINGERMAN, B., ERMAN, A., ROZEN-ZVI, B., HIRSH, J., GAFTER, U., Obesity-induced glomerular hyperfiltration: its involvement in the pathogenesis of tubular sodium reabsorption. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.23, p.3946-3952, 2008.

CHAMARTHI, B., WILLIAMS, J.S., WILLIAMS, G.H., A mechanism for salt sensitive hypertension: abnormal dietary sodium mediated vascular response to Angiotensin II. **Journal of Hypertension**, v.28, n.5, p.1020–1026, 2010.

CHEN, J., GU, D., HUANG, J., RAO, D.C., JAQUISH, C.E., HIXSON, J.E., CHEN, C.S., CHEN, J., LU, F., HU, D., RICE, T., KELLY, T.N., HAMM, L.L., WHELTON, P.K., HE, J., Metabolic syndrome and salt sensitivity of blood pressure in non-diabetic people in China: a dietary intervention study. **Lancet**, v.373, p.829–835, 2009.

CLEGG, D.J., BROWN, L.M., WOODS, S.C., BENOIT, S.C., Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. **Diabetes**, v.55, n.4, p.978–987, 2006.

COGGINS, C.H., BREYER, L.J., CAGGIULA, A.W., CASTALDO, L.S., KLAHR, S., WANG, S.R., Differences between women and men with chronic renal disease. **Nephrology Dial Transplant**, v.13, p.1430–1437, 1998.

COSTEROUSSE, O., ALLEGRINI, J., LOPEZ, M., ALHENC-GELAS, F., Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. **Biochemical Journal**, v. 290, p. 33–40, 1993.

CUNNINGHAM, P.N., DYANOV, H.M., PARK, P., WANG, J., NEWELL, K.A., QUIGG, R.J., Acute renal failure in endotoxemia is caused by TNF acting directly on TNF receptor-1 in kidney. **Journal of Immunological Methods**, v.168, p.5817-23, 2002.

DAHLY-VERNON, A.J., SHARMA, M., MCCARTHY, E.T., SAVIN, V.J., LEDBETTER, S.R., ROMAN, R.J., Transforming Growth Factor- β , 20-HETE Interaction and Glomerular Injury in Dahl Salt-Sensitive Rats. **Hypertension**, v.45, p.643-648, 2005.

D'ELIA, J.A., ROSHAN, B., MASKI, M., WEINRAUCH, L.A., Manifestation of renal disease in obesity: pathophysiology of obesity-related dysfunction of the kidney. **International Journal of Nephrology and Renovascular Disease**, v.2, p.39-49, 2009.

DEJI, N., KUME, S., ARAKI, S., SOUMURA, M., SUGIMOTO, T., ISSHIKI, K., CHINKANASAKI, M., SAKAGUCHI, M., KOYA, D., HANEDA, M., KASHIWAGI, A., UZU, T., Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v.296, p.F118-F126, 2009.

DE MIGUEL, C., DAS, S., LUND, H., MATTSON, D.L., T lymphocytes mediate hypertension and kidney damage in Dahl salt-sensitive rats. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.298, p.R1136-R1142, 2010.

DOBRIAN, A.D., SCHRIVER, S.D., LYNCH, T., PREWITT, R.L., Effect of salt on hypertension and oxidative stress in a rat model of diet-induced obesity. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v.285, p.F619-F628, 2003.

DO CARMO, J. M., TALLAM, L.S., ROBERTS, J.V., BRANDON, E.L., BIGLANE, J., SILVA, A.A., HALL, J.E., Impact of obesity on renal structure and function in the presence and absence of hypertension: evidence from melanocortin-4 receptor-deficient mice. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.297, p.R803-R812, 2009.

DOMINGUEZ, J., WU, P., PACKER, C.S., TEMM, C., KELLY, K.J., Lipotoxic and inflammatory phenotypes in rats with uncontrolled metabolic syndrome and nephropathy. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v.293, p.F670-F679, 2007.

DRENJANČEVIĆ-PERIĆ, I., JELAKOVIĆ, B., LOMBARD, J.H., KUNERT, M.P., KIBEL, A., GROS, M., High-Salt Diet and Hypertension: Focus on the Renin-Angiotensin System. **Kidney Blood Pressure Research**, v.34, p.1-11, 2011.

DUBEY, R.K., JACKSON, E.K., KELLER, P.J., IMTHURN, B., ROSSELLI, M., Estradiol Metabolites Inhibit Endothelin Synthesis by an Estrogen Receptor-Independent Mechanism. **Hypertension**, v.37, p.640-644, 2001.

DUBEY, R.K., GILLESPIE, D.G., KELLER, P.J., IMTHURN, B., ZACHARIA, L.C., JACKSON, E.K., Role of methoxyestradiols in the growth inhibitory effects of estradiol on human glomerular mesangial cells. **Hypertension**, v.39, p.418-424, 2002.

DUBEY, R.K., OPARIL, S., IMTHURN, B., JACKSON, E.K., Sex hormones and hypertension. **Cardiovascular Research**, v.53, p.688–708, 2002a.

EKNOYAN, G., Obesity and chronic kidney disease. **Revista Nefrologia**, v.31, n.4, p.397-403, 2011.

ELLIOT, S.J., KARL, M., BERHO, M., POTIER, M., ZHENG, F., LECLERCQ, B., STRIKER, G.E., STRIKER, L.J., Estrogen deficiency accelerates progression of glomerulosclerosis in susceptible mice. **American Journal of Pathology**, v.162, p.1441–1448, 2003.

ELMARAQBY, A.A., QUIGLEY, J.E., POLLOCK, D.M., IMIG, J.D., Tumor necrosis factor alpha blockade increases renal Cyp2c23 expression and slows the progression of renal damage in salt-sensitive hypertension. **Hypertension**, v.47, p.557–562, 2006.

ELMARAQBY, A.A., QUIGLEY, J.E., IMIG, J.D., POLLOCK, J.S., POLLOCK, DM., TNF-alpha inhibition reduces renal injury in DOCA-salt hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.294, n.1, p-1-14, 2008.

ESLER, M., STRAZNICKY, N., EIKELIS, N., MASUO, K., LAMBERT, G., LAMBERT, E., Mechanisms of sympathetic activation in obesity-related hypertension. **Hypertension**, v.48, p.787-796, 2006.

ESQUEDA, M.E.D., CRAIG, T., HINOJOSA-LABORDE, C., Effect of Ovariectomy on Renal Estrogen Receptor- β and Estrogen Receptor- α in Young Salt-Sensitive and -Resistant Rats. **Hypertension**, v.50, p.768-772, 2007.

FAULDS, M.H., ZHAO, C., DAHLMAN-WRIGHT, K., GUSTAFSSON, J., The diversity of sex steroid action: regulation of metabolism by estrogen signaling. **Journal of Endocrinology**, v.212, p.3–12, 2012.

FIGUEIREDO, J.A.N., FIGUERÊDO, E.D., BARBOSA, J.B., BARBOSA, F.F., COSTA, G.R.C., NINA, V.J.S., NINA, R.V.A.H., Metabolic Syndrome and Menopause: Cross-sectional study in gynecology clinic. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.95, n.3, pag.339-345, 2010.

FONSECA-ALANIZ, M.H., BRITO, L.C., BORGES-SILVA, C.N., TAKADA, J., ANDREOTTI, S., LIMA, F.B., High dietary sodium intake increases white adipose tissue mass and plasma leptin in rats. **Obesity**, v.15, p.2200–2208, 2007.

FONSECA-ALANIZ, M.H., TAKADA, J., ANDREOTTI, S., CAMPOS, T.B.F., CAMPAÑA, A.B., BORGES-SILVA, C.N., LIMA, F.B., High sodium intake enhances insulin-stimulated glucose uptake in rat epididymal adipose tissue. **Obesity**, v.16, n.6, p.1186-1192, 2008.

FRANCO, M., MARTÍNEZ, F., RODRÍGUEZ- ITURBE, B., JOHNSON, R.J., SANTAMARÍA, J., MONTOYA, A., NEPOMUCENO, T., BAUTISTA, R., TAPIA, E., HERRERA-ACOSTA, J., Angiotensin II, interstitial inflammation, and the

pathogenesis of salt-sensitive hypertension. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v.291, p.F1281–F1287, 2006.

FRANCO, V., OPARIL, S., Salt sensitivity, a determinant of blood pressure, cardiovascular disease and survival. **Journal of the American College of Nutrition**, v.25, n.3, p.247S–255S, 2006a.

FUJITA, T., Insulin resistance and salt-sensitive hypertension in metabolic syndrome. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 22, p.3102–7, 2007.

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

GELONEZE, B. *et al.* HOMA1-IR and HOMA2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome – Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.53, n. 2, p. 281–287, 2009.

GILBERT, J.S., NIJLAND, M.J., Sex differences in the developmental origins of hypertension and cardiorenal disease. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.295, p.R1941–R1952, 2008.

GU, J.W., ANAND, V., SHEK, E.W., MOORE, M.C., BRADY, A.L., KELLY, W.C., ADAIR, T.H., Sodium induces hypertrophy of cultured myocardial myoblasts and vascular smooth muscle cells. **Hypertension**, v.31, p.1083–1087, 1998.

GU, J.W., TIAN, N., SHPARAGO, M., TAN, W., BAILEY, A.P., MANNING JR, R.D.: Renal NF-kappaB activation and TNF-alpha upregulation correlate with salt-sensitive hypertension in Dahl salt-sensitive rats. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.291, p.R1817–R1824, 2006.

GU, J.W., BAILEY, A., SHPARAGO, M., Long-term high salt diet causes hypertension and alters renal pro-inflammatory gene expression profiles in Sprague-Dawley rats. **Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.19, p. 275–285, 2008.

GU, J.W., YOUNG, E., PAN, Z.J., TUCKER, K.B., SHPARAGO, M., HUANG, M., BAILEY, A.P., Long-term high salt diet causes hypertension and alters renal cytokine gene expression profiles in Sprague-Dawley rats. **Beijing Da Xue Xue Bao**, v.41, p.505–515, 2009.

GUCCIONE, M., SILBINGER, S., LEI, J., NEUGARTEN, J., Estradiol upregulates mesangial cell MMP-2 activity via the transcription factor AP-2. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v.282, p.F164–F169, 2002.

GUEDES, A.M., CABRITA, A., PINHO, A.T., SILVA, A.P., LOPES, A., SANTOS, V., NEVES, P.L., O risco renal da obesidade. **Acta Médica Portuguesa**, v.23, p.853–858, 2010.

GUERRE-MILLO, M., Adipose tissue and adipokines: for better or worse. **Diabetes Metabolism**, v.30, p.13-19, 2004.

HALL, J.E., BRANDS, M.W., DIXON, W.N., SMITH JR, M.J., Obesity induced hypertension. Renal function and systemic hemodynamics. **Hypertension**, v.22, p.292–299, 1993.

HALL, J.E., Mechanisms of abnormal sodium handling in obesity hypertension. **American Journal of Hypertension**, v.10, p.S49–S55, 1997.

HALL, J.E., HENEGAR, J.R., SHEK, E.W., BRANDS, M.W., Role of renin-angiotensin system in obesity hypertension. **Circulation**, v.96, p.I –33, 1997a.

HALL, J.E., CROOK, E.D., JONES, D.W., WOFFORD, M.R., DUBBERT, P.M., Mechanisms of obesity-associated cardiovascular and renal disease. **American Journal of the Medical Sciences**, v.324, p.127–37, 2002.

HALL JE, KUO JJ, SILVA AA, DE PAULA RB, LIU J, TALLAM L: Obesity-associated hypertension and kidney disease. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v.12, n.2, p.195-200, 2003.

HALL, J. E., SILVA, A. A., CARMO, J.M., DUBINION, J., HAMZA, S., MUNUSAMY, S., SMITH, G., STEC, D.E., Obesity-induced hypertension: role of sympathetic nervous system, leptin, and melanocortins. **The Journal of Biological Chemistry**, v.285, n.23, p.17271–17276, 2010.

HARRISON-BERNARD, L.M., SCHULMAN, I.H., RAI, L., Postovariectomy hypertension is linked to increased renal AT1 receptor and salt sensitivity. **Hypertension**, v.42, p.1157-1163, 2003.

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.

HE, F.J., MACGREGOR, G.A., How Far should salt intake be reduced? **Hypertension**, v. 42, p.1093-1099, 2003.

HEINE, P.A., TAYLOR, J.A., IWAMOTO, G.A., LUBAHN, D.B., COOKE, P.S., 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.

HERNANDEZ, S.I., RAIJ, L., Salt sensitivity and hypertension after menopause: role of nitric oxide and angiotensin II. **American Journal of Nephrology**, v.26, p.170-80, 2006.

HENEGAR, J., BIGLER, S., HENEGAR, L., TUAGI, S., HALL, J., Functional and structural changes in the kidney in the early stages of obesity. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.12, p.1211-1217, 2001.

HINOJOSA-LABORDE, C., CRAIG, T., ZHENG, W., JI, H., HAYWOOD, J.R., SANDBERG, K., Ovariectomy augments hypertension in aging female Dahl salt-sensitive rats. **Hypertension**, v.44, p.405-409, 2004.

HOMMA, H., KURACHI, H., NISHIO, Y., TAKEDA, T., YAMAMOTO, T., ADACHI, K., MORISHIGE, K., OHMICHII, M., MATSUZAWA, Y., MURATA, Y., Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v.275, n.15, p.11404–11411, 2000.

HONG, J., STUBBINS, R.E., SMITH, R.R., HARVEY, A.E., NÚÑEZ, N.P., Differential susceptibility to obesity between male, female and ovariectomized female mice Human genetic investigations. **Nutrition Journal**, v.8, n.11, p.1-5, 2009.

HUNLEY, T.E., MA, L., KON, V., Scope and Mechanisms of Obesity-Related Renal Disease. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v.19, n.3, p.227–234, 2010.

HURT, R.T., KULISEK, C., BUCHANAN, L.A., MCCLAVE, S.A., The Obesity Epidemic: Challenges, Health Initiatives, and Implications for Gastroenterologists. **Gastroenterology & Hepatology**, v.6, 2010.

INTERSALT COOPERATIVE RESEARCH GROUP INTERSALT: An international study of electrolyte excretion and blood pressure: results for 24 h urinary sodium and potassium excretion. **British Medical Journal**, v.297, p.319–328, 1988.

IVENUS, P., BRUNZELL, J.D., Relationship between lipoprotein lipase activity and plasma sex steroid levels in obese women. **Journal of Clinical Investigation**, v.82, n.3, p.1106–1112, 1988.

JEONG, S., YOON, M., Inhibition of the actions of peroxisome proliferator-activated receptor α on obesity by estrogen. **Obesity**, v.15, p.1430–1440, 2007.

JONES, M.E., THORBURN, A.W., BRITT, K.L., HEWITT, K.N., WREFORD, N.G., PROIETTO, J., OZ, O.K., LEURY, B.J., ROBERTSON, K.M., YAO, S. 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., MARKOWITZ, G.S., VALERI, A.M., LIN, J., D'AGATI, V.D., "Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic". **Kidney International**, v. 59, n.4, p.1498– 1509, 2001.

KAMEI, N., TOBE, K., SUZUKI, R., et al., Overexpression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance, **The Journal of Biological Chemistry**. v.281, n.36, p.26602–26614, 2006.

KARPPANEN, H., MERVAALA, E., Sodium intake and hypertension. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v.49, p.59-75, 2006.

KATORI, M., MAJIMA, M., A missing link between a high salt intake and blood pressure increase. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.100, p.370 – 390, 2006.

KANDA, H., KAHN, S.E., ZINMAN, B., HAFFNER, S.M., O'NEILL, M.C., KRAVITZ, B.G., YU, D., FREED, M.I., HERMAN, W.H., HOLMAN, R.R., JONES, N.P., LACHIN, J.M., KAMEI, N., TOBE, K., SUZUKI, R., OHSUGI, M., WATANABE, T., KUBOTA, N., TATEYA, S., TAMORI, Y., KO KOTANI, HIASA, K., KITAZAWA, R., KITAZAWA, S., MIYACHI, H., MAEDA, S., EGASHIRA, K., KASUGA, M., MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity, **The Journal of Clinical Investigation**, v 116, n 6, p.1494-1505, 2006.

KNIGHT, S.F., QUIGLEY, J.E., YUAN, J., ROY, S.S., ELMARAKBY, A., IMIG, J.D., Endothelial dysfunction and the development of renal injury in spontaneously hypertensive rats fed a high-fat diet. **Hypertension**, v.51, p.352-359, 2008.

KASSAB, S., KATO, T., WILKINS, F.C., CHEN, R., HALL, J.E., GRANGER, J.P., Renal denervation attenuates the sodium retention and hypertension associated with obesity. **Hypertension**, v.25, p.893–897, 1995.

KOPKAN, L., ČERVENKA, L., Renal interactions of renin-angiotensin system, nitric oxide and superoxide anion: implications in the pathophysiology of salt-sensitivity and hypertension. **Physiology Research**, v.58, p.S55-S67, 2009.

KORDA, M., KUBANT, R., PATTON, S., MALINSKI, T., Leptin-induced endothelial dysfunction in obesity. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v.295, p.H1514–H1521, 2008.

KOTSIS, V., STABOULI, S., PAPAKATSIKA, S., RIZOS, Z., PARATI, G., Mechanisms of obesity-induced hypertension. **Hypertension Research**, v.36, p.386–393, 2010.

KUME, S., UZU, T., ARAKI, S., SUGIMOTO, T., ISSHIKI, K., CHIN-KANASAKI, M., SAKAGUCHI, M., KUBOTA, N., TERAUCHI, Y., KADOWAKI, T., HANEDA, M., KASHIWAGI, A., KOYA, D., Role of altered renal lipid metabolism in the development of renal injury induced by a high-fat diet. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.18, p.2715–2723, 2007.

LI, J., WHITE, J., GUO, L., ZHAO, X., WANG, J., SMART, E.J., LI, X., Salt inactivates Endothelial Nitric Oxide Synthase in endothelial cells. **Journal of Nutrition**, v.139, p.447–451, 2009.

LIANG, Y.Q., AKISHITA, M., KIM, S., AKO, J., HASHIMOTO, M., IJIMA, K., OHIKE, Y., WATANABE, T., SUDOH, N., TOBA, K., YOSHIZUMI, M., OUCHI, Y., Estrogen receptor β is involved in the anorectic action of estrogen. **International Journal of Obesity**, v.26, p.1103–1109, 2002.

LIANG, B., LEENEN, F.H.H., Prevention of salt induced hypertension and fibrosis by angiotensin converting enzyme inhibitors in Dahl S rats. **British Journal of Pharmacology**, v.152, p.903–914, 2007.

LIAO, J., RICHARDS, R., ZHANG, R., REISIN, E., Effects of a modified low calorie diet in metabolic changes and kidney histology in young obese Zucker rats. **Journal of American Society of Nephrology**, v.18, p.823A, 2007.

LIN, L., PHILLIPS, W.E., MANNING JR., R.D., Intrarenal angiotensin II is associated with inflammation, renal damage and dysfunction in dahl salt-sensitive hypertension. **Journal of American Society of Hypertension**, v.1, p.306–314, 2009.

LUBISCO, N. L., VIEIRA, S.C., SANTANA, I.V., **MANUAL DE ESTILO ACADÊMICO- Monografias, dissertações e teses**, EDUFBA, 4. ed., Salvador

MACOTELA, Y., BOUCHER, J., TRAN, T.T., KAHN, C.R., Sex and depot differences in adipocyte insulin sensitivity and glucose metabolism. **Diabetes**, v.58, p.803-812, 2009.

MADDOX, D.A., ALAVI, F.K., SANTELLA, R.N., ZAWADA, JR., E.T., Prevention of obesity-linked renal disease: Age-dependent effects of dietary food restriction. **Kidney International**, v.62, p.208–219, 2002.

MAJID, D.S.A., KOPKAN, L., Nitric oxide and superoxide interactions in the kidney and their implications in the development of salt-sensitive hypertension. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.34, p.946–952, 2007.

MARIC, C., SANDBERG, K., HINOJOSA-LABORDE, C., 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., XU, Q., SANDBERG, K., HINOJOSA-LABORDE, C., 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**, v.5, p.147-159, 2008.

MARIC, C., HALL, J.E., Obesity, metabolic syndrome and diabetic nephropathy. **Contributions to Nephrology**, v.170, p.28–35, 2011.

MATAVELLI, L.C., ZHOU, X., VARAGIC, J., SUSIC, D., FROHLICH, E.D., Salt loading produces severe renal hemodynamic dysfunction independent of arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology**, v.292, p.H814–H819, 2007.

MATSUSAKA, T., HYMES, J., ICHIKAWA, I., Angiotensin in progressive renal diseases: Theory and practice. **Journal of American Society of Nephrology**, v.7, p.2025-2043, 1996.

MATTHEWS, D.R., HOSKER, J.P., RUDENSKI, A.S., NAYLOR, B.A., TREACHER, D.F., TURNER, R.C., Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v.28, n.7, p. 412-419, 1985.

MOHAN, S., CAMPBELL, N.R.C., Salt and high blood pressure, **Clinical Science**, v.117, p.1–11, 2009.

MORGAN, D.A., RAHMOUNI, K., Differential Effects of Insulin on Sympathetic Nerve Activity in Agouti Obese Mice, **Journal of Hypertension**, v.28, n.9, p.1913–1919, 2010.

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

MUNTZEL, M., DRUEKE, T., A comprehensive review of the salt and blood pressure relationship. **American Journal of Hypertension**, v.5, p.1S-42S, 1992.

NAGAE, A., FUJITA, M., KAWARAZAKI, H., MATSUI, H., ANDO, A., FUJITA, T. Effect of high fat loading in Dahl salt-sensitive rats. **Clinical and Experimental Hypertension**, v.31, p.451–461, 2009.

NAGAE, A., FUJITA, M., KAWARAZAKI, H., MATSUI, H., ANDO, K., FUJITA, T., Sympathoexcitation by oxidative stress in the brain mediates arterial pressure elevation in obesity-induced hypertension. **Circulation**, v.119, p.978-986, 2009a.

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.

OGIHARA, T., ASANO, T., ANDO, K., CHIBA, Y., SEKINE, N., SAKODA, H., ANAI, M., ONISHI, Y., FUJISHIRO, M., ONO, H., SHOJIMA, N., INUKAI, K., FUKUSHIMA, Y., KIKUCHI, M., FUJITA, T., Insulin Resistance With Enhanced Insulin Signaling in High-Salt Diet–Fed Rats. **Diabetes**, v.50, p.573–583, 2001.

O'ROURKE, R.W., Inflammation in obesity-related diseases. **Surgery**, v.145, n.3, p.255-259, 2009.

OKADA, S., KOZUKAA, C., MASUZAKIA, H., YASUEA, S., ISHII-YONEMOTOA, T., TANAKAA, T., YAMAMOTOA, Y., NOGUCHIA, M., KUSAKABEA, T., TOMITAA, T., FUJIKURAA, J., EBIHARAA, K., HOSODAA, K., SAKAUEC, H., KOBORID, H., HAME, M., LEE, Y.S., KIME, J.B., SAITOB, Y., NAKAOA, K., Adipose tissue-specific dysregulation of angiotensinogen by oxidative stress in obesity. **Metabolism**, v.59, n.9, p.1241–1251, 2010.

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**, v.2010, p. 1-11, 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, n.5, p. 832-836, 2004.

OTSUKA, K., SUZUKI, H., SASAKI, T., ISHII, N., ITOH, H., SARUTA, T., Blunted pressure natriuresis in ovariectomized Dahl-Iwai salt-sensitive rats. **Hypertension**, v.27, p.119-124, 1996.

PALIN, S. L. MCTERNAN, P.G., ANDERSON, L.A., 17- β -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., TOLIS, G., Obesity and renal disease: A possible role of leptin. **Hormones**, v.4, n.2, p.90-95, 2005.

PECHERE-BERTSCHI, A., BURNIER, M., Female sex hormones, salt, and blood pressure regulation. **American Journal of Hypertension**, v.17, p.994–1001, 2004.

PECLY, I.M., GENELHU, V., FRANCISCHETTI, E.A., Renal functional reserve in obesity hypertension. **International Journal of Clinic Practice**, v.60, p.1198–1203, 2006.

PEINADO-ONSURBE, J., STAELS, B., VANDERSCHUEREN, D., BOUILLON, R., AUWERX, J., Effects of sex steroids on hepatic and lipoprotein lipase activity and mRNA in the rat. **Hormone Research**, v.40, p.184–188, 1993.

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

PIERRE, M., JEUNEMAITRE, X., WARDENER, H.E., MACGREGOR, G.A., Links between dietary salt intake, renal salt handling, blood pressure, and cardiovascular diseases. **Physiology Revist**, v.85, p.679–715, 2005.

POU, K.M., MASSARO, J.M., HOFFMANN, U., VASAN, R.S., MAUROVICH-HORVAT, P., LARSON, M.G., KEANEY, JR, J.F., MEIGS, J.B., LIPINSKA, I., KATHIRESAN, S., MURABITO, J.M., O'DONNELL, C.J., BENJAMIN, E.J., FOX, C.S., Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: The Framingham Heart Study. **Circulation**, v.116, p.1234-1241, 2007.

RAHMOUNI, K., MORGAN, D.A., MORGAN, G.M., MARK, A.L., HAYNES, W.G., Role of selective leptin resistance in diet-induced obesity hypertension. **Diabetes**, v.54, p.2012–2018, 2005.

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

RASOULI, N., KERN, P. A., Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. **Journal Clinic Endocrinology Metabolism**, v.93, p.S64–S73, 2008.

RECKELHOFF, J.F., ROMERO, J.C., Role of oxidative stress in angiotensin-induced hypertension. **American Journal of Physiology**, v.284, p.R893-R912, 2003.

REDDY, J.K., RAO, M.S., Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.290, p.G852–G858, 2006.

REEVES, P. G. et al. AIN-93 Purified diets for laboratories 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.

ROBERTS, C.K., VAZIRI, N.D., BARNARD, R.J., Protective effects of estrogen on gender-specific development of diet-induced hypertension. **Journal of Applied Physiology**, v.91, p.2005–2009, 2001.

ROCCHINI, A.P., The Influence of Obesity in Hypertension. **International Union of Physiology Sciences/Americ. Physiol. Sot.**, v.5, p.245-249, 1990.

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, p.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 Supplement**, v. 20, n.3, p.9–14, 2002a.

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.

ROESCH, D.M., Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats. **Physiology & Behavior**, v.87, p.39–44, 2006.

ROSANO, G.M., VITALE, C., FINI, M., Cardiovascular aspects of menopausal hormone replacement therapy, **Climacteric**. Vol.12, pag.41–46, 2009.

ROVIN, B., TAN, L.C., LDL stimulates mesangial fibronectin production and chemoattractant expression. **Kidney International**, v.43, p.218-225, 1993.

RUANO, M., SILVESTRE, V., CASTRO, R., GARCÍA-LESCÚN, M.C., RODRÍGUEZ, A., MARCO, A., GARCÍA-BLANCH, G., Morbid obesity, hypertensive disease and the renin-angiotensin-aldosterone axis. **Obesity Surgery Journal**, v.15, p.670–676, 2005.

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, n.1, p. 40-47, 2002.

SALMAN, I.M., MUNAVVAR A.S., ABDULLAH, N.A., AMEER, O.Z., HUSSAIN, F.B.N.M., Khan, M.A.H., YAM, M.F., et al., Renal functional and haemodynamic changes following acute unilateral renal denervation in Sprague Dawley rats. **Indian Journal of Medical Research**, v.131, p.76-82, 2010.

SANCHEZ-NIÑO, M.D., BENITO-MARTIN, A., GONÇALVES, S., SANZ, A.B., UCERO, A.C., IZQUIERDO, M.C., RAMOS, A., BERZAL, S., SELGAS R., RUIZ-ORTEGA, M., EGIDO, J., ORTIZ, A., TNF Superfamily: A growing saga of kidney injury modulators. **Mediators of Inflammation**, v.2010, p.1-11, 2010.

SANTINI, E., LUPI, R., BALDI, S., MADEC, S., CHIMENTI, D., FERRANNINI, E., SOLINI, A., Effects of different LDL particles on inflammatory molecules in human mesangial cells. **Diabetologia**, v.51, p.2117–2125, 2008.

SARTORI-VALINOTTI, J.C., VENEGAS-PONTA, M.R., LAMARCA, B.B., ROMERO, D.G., YANES, L.C., RACUSEND, L.C., JONES, A.V., RYANA, M.J., RECKELHOFF, J.F., Rosiglitazone reduces blood pressure in female Dahl salt-sensitive rats. **Steroids**, p.1-6, 2009.

SAVINO, A., PELLICCIA, P., CHIARELLI, F., MOHN, A., Obesity-related renal injury in childhood. **Hormone Reserch in Paediatric**, v.73, p.303–311, 2010.

SHEN, W., CHEN, H., CHEN, H., XU, F., LI, L., LIU, Z., Obesity-Related glomerulopathy: Body mass index and proteinuria. **Clinical Journal American Society of Nephrology**, v.5, p.1401–1409, 2010.

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

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

SILVA, A., CARMO, J., DUBINION, J., HALL, J.E., Role of sympathetic nervous system in obesity related hypertension. **Current Hypertension Reports**, v.11, n.3, p.206, 2009.

SCHULMAN, I.H., ARANDA, P., RAIJ, L., VERONESI, M., ARANDA, F.J., MARTIN, R., Surgical menopause increases salt sensitivity of blood pressure. **Hypertension**, v.47, p.1168-1174, 2006.

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- induce 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.1821-5, 1998.

SOWERS, J.R., Obesity as a cardiovascular risk factor, **American Journal of Medicine**, v.115, p.37S-41S, 2003.

STEPPAN, C. M., LAZAR, M. A. The current biology of resistin, **Journal of Internal Medicine**; 255: 439–447, 2004.

STIEFEL, P., VALLEJO-VAZ, A. J., GARCÍA MORILLO, S., VILLAR, J., Role of the renin-angiotensin system and aldosterone on cardiometabolic syndrome. **International Journal of Hypertension**, v.2011, p.1-8, 2011.

STRAZZULLO, P., BARBA, G., CAPPUCCIO, F.P., SIANI, A., TREVISAN, M., FARINARO, E., PAGANO, E., BARBATO, A., IACONE, R., Altered renal sodium handling in men with abdominal adiposity: a link to hypertension. **Journal of 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.

SUSIC, D., FROHLICH, E.D., KOBORI, H., SHAO, W., SETH, D., NAVAR, L.G., Salt-induced renal injury in SHR is mediated by AT1 receptor activation. **Journal of Hypertension**, v.29, p.716–723, 2011.

SUTTON-TYRRELL, K., ZHAO, X., SANTORO, N., LASLEY, B., SOWERS, M., JOHNSTON, J., MACKEY, R., MATTHEWS, K., reproductive hormones and obesity: 9 years of observation from the study of women's health across the nation. **American Journal of Epidemiology**, v.171, n.11, p.1203–1213, 2010.

TESAURO, M., CANALE, M.P., RODIA, G., DI DANIELE, N., LAURO, D., SCUTERI, A., CARDILLO, C., Metabolic syndrome, chronic kidney, and cardiovascular diseases: Role of adipokines. **Cardiology Research and Practice**, v.2011, p.1-11, 2011.

THE ESHRE CAPRI WORKSHOP GROUP, Hormones and cardiovascular health in women. **Oxford Journal**, v.12, n.5, p.483–497, 2006 .

TIAN, N., THRASHER, K.D., GUNDY, P.D., HUGHSON, M.D., MANNING JR, R.D., Antioxidant treatment prevents renal damage and dysfunction and reduces arterial pressure in salt-sensitive hypertension. **Hypertension**, v.45, p.934–939, 2005.

TIAN, N., GU, J.W., JORDAN, S., ROSE, R.A., HUGHSON, M.D., MANNING JR., R.D., Immune suppression prevents renal damage and dysfunction and reduces arterial pressure in salt-sensitive hypertension. **American Journal of Heart and Circulatory Physiology**, v.292, p.H1018–H1025, 2007.

TIAN, N. MOORE, R.S., BRADDY, S., ROSE, R.A., GU, J.W., HUGHSON, M.D., MANNING, JR, R.D., Interactions between oxidative stress and inflammation in salt-sensitive hypertension, **American Journal of Heart and Circulatory Physiology**, v.293, p.H3388–H3395, 2007a.

TIAN, N., MOORE, R.S., PHILLIPS, W.E., LIN, L., BRADY, S., PRYOR, J.S., STOCKSTILL, R.L., HUGHSON, M.D., MANNING JR. R.D., NADPH oxidase contributes to renal damage and dysfunction in Dahl salt-sensitive hypertension. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.295, p.R1858–R1865, 2008.

TILG, H., MOSCHEN, A.R., Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature**, v.6, p.772-783, 2006.

VARAGIC, J., AHMAD, S., BROSNIHAN, K.B., HABIBI, J., TILMON, R.D., SOWERS, J.R., FERRARIO, C.M., Salt-induced renal injury in spontaneously hypertensive rats: effects of nebivolol. **American Journal of Nephrology**, v.32, p557–566, 2010.

VASDEV, S., GILL, V.D., PARAI, S., GADAG, V., Effect of moderately high dietary salt and lipoic acid on blood pressure in Wistar-Kyoto rats. **Experimental and Clinical Cardiology**, v.12, n.2, p.77-81, 2007.

WAHBA, I.M., MAK, R.H., Obesity and Obesity-Initiated Metabolic Syndrome: Mechanistic Links to Chronic Kidney Disease. **Clinical Journal of American Society of Nephrology**, v.2, p.550-562, 2007.

WARNE, J.P., TNF α and adipose tissue. **Journal of Endocrinology**, v.177, p.351–355, 2003.

WASSMANN, S., STUMPF, M., STREHLOW, K., SCHMID, A., SCHIEFFER, B., BOHM, M., NICKENIG, G., Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor. **Circulation Research**, v.94, p.534–541, 2004.

WEINBERGER, M.H., Estrogens, salt, blood pressure, and cardiovascular disease in women. How do we interpret the data? **Hypertension**, v.47, p.1049-1050, 2006.

WILCOX, G., Insulin and Insulin Resistance. **Clinical Biochemist Reviews**, v.26, p. 19-30, 2005.

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

WU, Y., LIU, Z., XIANG, Z., ZENG, C., CHEN, Z., MA, X., LI, L., Obesity-related glomerulopathy: Insights from gene expression profiles of the glomeruli derived from renal biopsy samples. **Endocrinology**, v.147, n.1, p.44–50, 2006.

XU, Z., LANTING, L., VAZIRI, N.D., LI, Z., SEPASSI, L., RODRIGUEZ-ITURBE, B., NATARAJAN, R., Upregulation of angiotensin II type 1 receptor, inflammatory mediators, and enzymes of arachidonate metabolism in obese Zucker rat kidney reversal by angiotensin II type 1 receptor blockade. **Circulation**, v.111, p.1962-1969, 2005.

XUE, B., BADAUE-PASSOS JR., D., GUO, F., GOMEZ-SANCHEZ, C.E., HAY, M., JOHNSON, A.K., Sex differences and central protective effect of 17 β -estradiol in the development of aldosterone/NaCl-induced hypertension. **American Journal of Physiology - Heart Circulatory Physiology**, v.296, p.H1577–H1585, 2009.

ZHOU, Y.S., TURNER, A.N., New Ways of Thinking about Proteinuria and Progression of Renal Damage. **Nephron Experimental Nephrology**, v.116, p.e1–e2, 2010.

ZICHA, J., DOBEŠOVÁ, Z., KUNEŠ, J., Relative deficiency of nitric oxide-dependent vasodilation in salt-hypertensive Dahl rats: the possible role of superoxide anions. **Journal of Hypertension**, v.19, p.247-254, 2001.

YHEE, J., YU, C., KIM, J., SUR, J., Effects of T lymphocytes, interleukin-1, and interleukin-6 on renal fibrosis in canine end-stage renal disease. **Journal of Vet Diagnostic and Investigation**, v.20, p.585–592, 2008.

YANES, L.L., SARTORI-VALINOTTI, J.C., ILIESCU, R., ROMERO, D.G., RACUSEN, L.C., ZHANG, H., RECKELHOFF, J.F., Testosterone-dependent hypertension and upregulation of intrarenal angiotensinogen in Dahl salt-sensitive rats. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v.296, p.F771–F779, 2009.

YANES, L.L., ROMERO, D.G., ILIESCU, R., ZHANG, H., DAVIS, D., RECKELHOFF, J.F., Postmenopausal hypertension role of the renin-angiotensin system. **Hypertension**, v.56, p.359-363, 2010.

YEPURU, M., ESWARAKA, J., KEARBAY, J.D., BARRETT, C.M., RAGHOW, S., VEVERKA, K.A., MILLER, D.D., DALTON, J.T., NARAYANAN, R., Estrogen receptor- β -selective ligands alleviate high-fat diet- and ovariectomy-induced obesity in mice. **The Journal of Biological Chemistry**, v.285, n.41, p.31292–31303, 2010.