

**TATIANA HELFENSTEIN**

**BLOQUEIO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA ATENUA LESÕES EM ÓRGÃOS-ALVO EM  
MODELO DE DIABETES *MELLITUS* TIPO 2 E HIPERCOLESTEROLEMIA INDUZIDOS POR DIETA**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de São Paulo para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências.

**SÃO PAULO**

**2009**

**TATIANA HELFENSTEIN**

**BLOQUEIO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA ATENUA LESÕES EM ÓRGÃOS-ALVO EM  
MODELO DE DIABETES *MELLITUS* TIPO 2 E HIPERCOLESTEROLEMIA INDUZIDOS POR DIETA**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de São Paulo para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Cristina de Oliveira Izar

Co-Orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dra. Sivia Saiuli Miki Ihara

Prof. Dr. Francisco Antonio Helfenstein Fonseca

**SÃO PAULO**

**2009**

Helfenstein, Tatiana

**Bloqueio do sistema renina-angiotensina atenua lesões em órgãos-alvo em modelo de diabetes *mellitus* tipo 2 e hipercolesterolemia induzidos por dieta** / Tatiana Helfenstein -- São Paulo, 2009.  
xxii, 97 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós Graduação em Cardiologia.

Título em Inglês: Blockade of renin-angiotensin system attenuates target-organ lesions in a model of type 2 diabetes *mellitus* and hypercholesterolemia induced by diet.

Descritores: 1. Coelhos. 2. Diabetes *mellitus* tipo 2. 3. Órgãos-alvo. 4. Inibidores da ECA . 5. Bloqueadores do receptor tipo I de angiotensina II

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
DISCIPLINA DE CARDIOLOGIA**

**Chefe do Departamento:** Prof.Dr. Angelo Amato Vincenzo de Paola

**Chefe da Disciplina:** Prof. Dr. Antonio Carlos de Camargo Carvalho

**Coordenador do Curso de Pós Graduação:** Prof. Dr. Valdir Ambrósio Moisés

**TATIANA HELFENSTEIN**

**BLOQUEIO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA ATENUA LESÕES  
EM ÓRGÃOS-ALVO EM MODELO DE DIABETES *MELLITUS* TIPO 2 E  
HIPERCOLESTEROLEMIA INDUZIDOS POR DIETA**

Presidente da Banca: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Cristina de Oliveira Izar

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais

Agradeço-lhes pelo apoio, incentivos constantes e amor incondicional.

Agradeço-lhes pelos meus dias de angústia, que vocês me acalmaram em seu colo, e por estarem ao meu lado em todas as minhas conquistas, e nos poucos momentos que chorei e nos muitos que sorri.

Agradeço-lhes pelas longas conversas, pelos sorrisos diários, pelos conselhos que ouvi ou que nem sempre segui, mas que sempre pude confiar, e por todas as condições que não aceitava, mas que eram para o meu próprio bem...

Agradeço-lhes pelos mimos e também pela educação intelectual e principalmente moral.

Enfim, quero lhes agradecer por fazerem parte de minha história, e agradecer a Deus por ter me enviado aos cuidados destes meus anjos, José e Maria.

Obrigada pela vida!

## DEDICATÓRIA

Ao Flávio,

Meu amor, que chegou de mansinho e completou minha vida

*Depois de Você*

*Peguei carona no vento, e vim pra você assim.  
Tropeçando nas lembranças que deixei no trajeto.  
Dias em que ser feliz, nem era parte do projeto.  
Mas você mudou os rumos, quando me olhou assim.*

*Num curto espaço de tempo, tomou todo o meu ser.  
Que sem saber te esperava, e já sentia o sabor.  
Do tempero agri-doce e suave, do gosto do teu amor.  
Levando-nos para um futuro, antes remoto de ver.*

*Um cheiro de flor no ar devolve a paz adormecida.  
Nosso pranto arremata, e com um sorriso abriga.  
Nascendo nova manhã nas noites sem vida.*

*Juntos tornamos as perdas mais fáceis de suportar.  
Semear amor, esperar, sempre o próximo amanhecer.  
Vendo que amor regado é motivo de sobra pra viver.*

Soneto de Gloria Salles

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Cristina Izar, escrevo uma frase de Confúcio, que retrata a sua vontade de orientar *“Escolhe um trabalho de que gostes, e não terás que trabalhar nem um dia na tua vida”*.

À Profa. Dra. Silvia Ihara, de quem sou franca admiradora, por ter me ajudado a realizar este projeto

Ao mestre das idéias Prof. Dr. Francisco Fonseca, um grande sonhador, que consegue concretizar tudo o que realmente acredita.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Camargo de Carvalho e Prof. Dr. Ângelo Amato Vicenzo de Paola, por terem aberto as portas desta Universidade e me dado a oportunidade de realizar o doutorado.

Aos meus irmãos Vanessa e Eduardo, pelo carinho, força e atenção.

Aos meus familiares, que me incentivaram para que este projeto fosse concluído com êxito.

À minha querida amiga Silvia Ramos pela imensa ajuda, colaboração e incentivo.

À Juliana Bottós e Tathiana Orsi pelo profissionalismo, carinho, grande apoio e colaboração na realização das angiofluoresceinografias.

A Vânia, Edileuza e Christina pela organização e apoio durante o curso.

Aos colegas do Setor de Lípidos, Aterosclerose e Biologia Vasculare, Gabriel Relvas, Carlos Monteiro, Sergio Brandão, Daniela Tegani, Carolina França, Soraia Kasma, Célia Bittencourt, Henrique Fonseca, Henrique Tria, Nelson Farias, Carlos Eduardo, Valéria Machado Celma Muniz, Darce, Thereza, Monica, Mira, Izilda, Ana Maria, Cristina Biava, Marcelo, Simone e Simone Fischer pelo profissionalismo, carinho e troca de experiências.



Ao Edson Augusto Bibiano, que se ausentou momentaneamente, mas que em breve estará de volta para continuar a nos auxiliar com os modelos experimentais, sempre com seu sorriso no rosto.

A todos que participaram da minha vida durante os nove anos de aprendizado nesta Instituição.

Este projeto recebeu auxílio pesquisa da Agência de Fomento do Estado de São Paulo (FAPESP) sob o número 07/51058-8

Esta tese foi realizada com o auxílio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

## SUMÁRIO

Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vii
Lista de figuras.....	xii
Lista de tabelas.....	xvi
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xviii
Resumo.....	xxi
Abstract.....	xxii
1. Introdução.....	1
1.1 Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2.....	1
1.2. Mecanismos de Sinalização da Insulina .....	3
1.3. Mecanismos de Sinalização da Angiotensina II .....	4
1.4. Mecanismos de resistência à insulina.....	5
1.5. Ativação do sistema renina angiotensina e função das células beta pancreáticas.....	7
1.6. Nefroproteção pelo bloqueio ao sistema renina angiotensina.....	8
1.7. A Nova Visão do Sistema Renina Angiotensina.....	9
1.8. Efeitos do bloqueio ao SRA na aterosclerose experimental.....	11
2. Objetivos.....	13
3. Métodos.....	14
3.1. Desenvolvimento do estudo.....	14
3.2. Desenho do estudo.....	15
3.3. Análises laboratoriais.....	16
3.4. Análise estatística.....	22
4. Resultados.....	23
4.1. Animais.....	23
4.2. Peso.....	23
4.3. Perfil lipídico.....	24
4.4. Parâmetros glucometabólicos.....	28
4.5. Função Hepática.....	37
4.6. Função Renal.....	40
4.7. Sistema Renina Angiotensina.....	42
4.8. Análise Patológica.....	45
4.9. Retinopatia diabética .....	54
5. Discussão.....	62
5.1. O modelo de diabetes tipo 2 e hipercolesterolemia induzidos por dieta.....	62
5.2. Efeitos do bloqueio do sistema renina-angiotensina.....	65
6. Conclusões.....	69
7. Referências.....	70
Anexo	

## Lista de figuras

Figura 1. Modelo simplificado da sinalização por insulina.....	3
Figura 2. Modelos de sinalização da Angiotensina 2 pelo receptor AT1.....	5
Figura 3. Vias de sinalização do receptor de insulina em situação fisiológica e nos estados de resistência à insulina.....	5
Figura 4. Interação das vias de sinalização do receptor de insulina em situação fisiológica e nos estados de resistência à insulina no endotélio, adipócito e célula muscular esquelética.....	6
Figura 5. Imunohistoquímica de macrófagos em glomérulos (x400). Grupo I e GIII não tratados com quinapril; GII, GIV e GV tratados com quinapril. GII, GIV GV apresentaram redução de infiltração de macrófagos.....	8
Figura 6. Fotomicrografia do rim de coelhos diabéticos e hipercolesterolêmicos. Corado por HE. A) Vacuolização tubular (flechas) – original x400 B) Calcificação tubular (flechas) – original x200.....	8
Figura 7. A nova visão do sistema renina-angiotensina.....	10
Figura 8. <i>Boxplots</i> da evolução do peso (g) no grupo 1.....	24
Figura 9. <i>Boxplots</i> da evolução dos níveis de Colesterol Total (mg/dL) no grupo 1.....	25
Figura 10. <i>Boxplots</i> da evolução dos níveis de LDL-C (mg/dL) no grupo 1.....	25
Figura 11. <i>Boxplots</i> da evolução dos níveis de HDL-C (mg/dL) no grupo 1.....	26
Figura 12. <i>Boxplots</i> da evolução dos níveis de Triglicérides (mg/dL) no grupo 1.....	26
Figura 13. <i>Boxplots</i> da evolução dos níveis de Glicemia (mg/dL) no grupo 1.....	28
Figura 14. Área sob a curva dos valores de Glicemia (mg/dL) no grupo 1.....	29
Figura 15. Área sob a curva dos valores de Glicemia (mg/dL) no grupo 2.....	30
Figura 16. Área sob a curva dos valores de Glicemia (mg/dL) no grupo 3.....	30
Figura 17. Área sob a curva dos valores de Glicemia (mg/dL) no grupo 4.....	30
Figura 18. <i>Boxplots</i> da evolução dos níveis de Frutosamina ( $\mu\text{mol/L}$ ) no grupo 1.....	31
Figura 19. <i>Boxplots</i> da evolução dos níveis de Frutosamina ( $\mu\text{mol/L}$ ) entre os três grupos.....	32
Figura 20. Área sob a curva dos valores de Insulina ( $\mu\text{UI/mL}$ ) no grupo 1.....	33
Figura 21. Área sob a curva dos valores de Insulina ( $\mu\text{UI/mL}$ ) no grupo 2.....	34
Figura 22. Área sob a curva dos valores de Insulina ( $\mu\text{UI/mL}$ ) no grupo 3.....	34
Figura 23. Área sob a curva dos valores de Insulina ( $\mu\text{UI/mL}$ ) no grupo 4.....	34
Figura 24. <i>Boxplots</i> da evolução dos valores de HOMA-IR no grupo 1.....	35
Figura 25. <i>Boxplots</i> da evolução dos valores de HOMA- $\beta$ no grupo 1.....	35
Figura 26. <i>Boxplots</i> da evolução dos valores de ALT no grupo 1.....	38
Figura 27. Evolução dos valores de ALT entre os três grupos.....	38
Figura 28. <i>Boxplots</i> da evolução dos valores de Albumina no grupo 1.....	39
Figura 29. <i>Boxplots</i> da evolução dos valores de Creatinina (mg/dL) no grupo 1.....	40
Figura 30. <i>Boxplots</i> da evolução dos valores de Creatinina (mg/dL) entre os três grupos.....	41
Figura 31. <i>Boxplots</i> da evolução dos valores da ECA (mU/mL) nos três grupos.....	43
Figura 32. <i>Boxplots</i> da evolução dos valores de Angiotensina II (pmol/mL) nos três grupos.....	44
Figura 33. <i>Boxplots</i> da evolução dos valores de Angiotensina 1-7 (pmol/mL) nos três grupos.....	44
Figura 34. Espécimes de aortas de coelho abertas longitudinalmente e coradas com	

	Sudan III evidenciando placas ateroscleróticas em vermelho.....	45
Figura 35.	Fotomicrografia de aorta de coelho: A, B e C – coloração HE - 100x; D, E e F - coloração com Verhoeff para fibras elásticas – 100x. Fragmento da região do arco aórtico (A e D); aorta torácica (B e E) e abdominal (C e F).....	46
Figura 36.	Fotomicrografia da íntima de arco aórtico (400x) corado com picosirius nos quatro grupos.....	46
Figura 37.	Fotomicrografia de rim de coelho: coloração HE (A), coloração picosirius (B) e PAS (C) e RAM-11 (D). Aumento: 400x.....	47
Figura 38.	Fotomicrografias de rins de coelhos. Glomérulo normal (A) corado com HE (400x); glomérulo com espessamento de membrana basal (B) corado com PAS (400x); glomérulo fibrosado (C e D) corados com picosirius (400x), sob luz polarizada (D); fibrose intersticial (E e F) corados com picosirius (100x), sob luz polarizada (F).....	48
Figura 39.	Fotomicrografias de rins de coelhos mostrando glomérulos renais corados com RAM-11 nos 4 grupos. Aumento: 400x.....	49
Figura 40.	Fotomicrografia de fígado de coelhos corado com picosirius (400x) nos quatro grupos.....	51
Figura 41.	Fotomicrografia de fígado de coelhos: A, B, C e D – coloração HE; E e F – coloração com Picosirius; F sob luz polarizada (400x). Observa-se parênquima normal (A), com balonização (B), esteatose microvesicular (C), foco inflamatório mononuclear (D) e proliferação de colágeno e fibrose (D e E).....	52
Figura 42.	Fotomicrografia de pâncreas (400x) corado com HE nos quatro grupos.....	53
Figura 43.	Fotomicrografia, imunohistoquímica de pâncreas para insulina (400x) nos quatro grupos.....	53
Figura 44.	Fotomicrografia, imunohistoquímica de pâncreas para AT1R (400x) nos quatro grupos.....	54
Figura 45.	Retinografia (A) e angiofluoresceinografia (B) mostrando a presença de pontos hiperfluorescentes compatíveis com microaneurismas. Em (C) detalhe de microaneurismas (setas).....	55
Figura 46.	Número (A) e grau (B) de microaneurismas no modelo de diabetes (G1) no período basal, com 3 e 6 meses.....	55
Figura 47.	Fotografias de fundo de olho representativas dos animais do estudo mostrando o disco óptico. Animais normais; G1, coelhos com diabetes tipo 2 induzido por dieta; G2, coelhos diabéticos tratados com olmesartana; G3, coelhos diabéticos tratados com quinapril e G4, coelhos diabéticos tratados com a associação de olmesartana e quinapril, no 6º mês.....	57
Figura 48.	Detalhe de fotografias de fundo de olho mostrando microaneurismas, Animais normais; G1, coelhos com diabetes tipo 2 induzido por dieta; G2, coelhos diabéticos tratados com olmesartana; G3, coelhos diabéticos tratados com quinapril e G4, coelhos tratados com a associação de olmesartana e quinapril, no 6º mês.....	58
Figura 49.	Angiofluoresceinografias representativas dos animais do estudo. Animais normais; G1, coelhos com diabetes tipo 2 induzido por dieta; G2, coelhos diabéticos tratados com olmesartana; G3, coelhos diabéticos tratados com quinapril e G4, coelhos tratados com a associação de olmesartana e quinapril, no 6º mês.....	59
Figura 50.	Detalhe de angiofluoresceinografias representativas dos animais do estudo.	

	Animais normais; G1, coelhos com diabetes tipo 2 induzido por dieta; G2, coelhos diabéticos tratados com olmesartana; G3, coelhos diabéticos tratados com quinapril e G4, coelhos tratados com a associação de olmesartana e quinapril, no 6º mês.....	60
Figura 51.	Número (A) e grau (B) de microaneurismas de retina nos animais do estudo. Animais normais; G1, coelhos com diabetes tipo 2 induzido por dieta; G2, coelhos diabéticos tratados com olmesartana; G3, coelhos diabéticos tratados com quinapril, no 6º mês.....	61
Figura 52.	Número (A) e grau (B) de microaneurismas de retina nos animais do estudo. Animais normais; G1, coelhos com diabetes tipo 2 induzido por dieta; G2, coelhos diabéticos tratados com olmesartana; G3, coelhos diabéticos tratados com quinapril; G4, coelhos diabéticos tratados com olmesartana e quinapril no 6º mês.....	61
Figura 53.	Angiofluoresceinografias de coelhos normais (A) e hipercolesterolêmicos (B).....	65

## Lista de tabelas

Tabela 1. DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS DE ACORDO COM O PESO (g) EM RELAÇÃO AO TEMPO.....	24
Tabela 2. DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS DE ACORDO COM OS VALORES DE COLESTEROL TOTAL, FRAÇÕES E TRIGLICÉRIDES (mg/dL) EM RELAÇÃO AO TEMPO.....	27
Tabela 3. DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS DE ACORDO COM OS VALORES DE GLICEMIA (mg/dL) EM RELAÇÃO AO TEMPO.....	29
Tabela 4. DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS DE ACORDO COM OS VALORES DE INSULINA ( $\mu$ UI/mL) EM RELAÇÃO AO TEMPO.....	33
Tabela 5. DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS DE ACORDO COM OS ÍNDICES DE HOMA-IR E HOMA B EM RELAÇÃO AO TEMPO.....	36
Tabela 6. DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS DE ACORDO COM OS ÍNDICES de AST e GGT EM RELAÇÃO AO TEMPO.....	37
Tabela 7. DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS DE ACORDO COM OS NÍVEIS DE ALBUMINA (g/dL) E TEMPO.....	39
Tabela 8. VALORES DE ALBUMINA (mg/L) E CREATININA (mg/L) URINÁRIAS NOS QUATRO GRUPOS.....	41
Tabela 9. DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS DE ACORDO COM OS VALORES DA TAXA DE ALBUMINA SOBRE CREATININA (mg/g) URINÁRIA.....	42
Tabela 10. DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS DE ACORDO COM OS VALORES DE ANG I, ANG II E ANG 1-7 (pmol/mL) EM RELAÇÃO AO TEMPO.....	43
Tabela 11. DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS DE ACORDO COM OS VALORES DE ANÁLISE PATOLÓGICA DA AORTA.....	45
Tabela 12. DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS DE ACORDO COM O GRAU DE ESTEATOSE HEPÁTICA.....	50
Tabela 13. DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS DE ACORDO COM O GRAU DE BALONIZAÇÃO.....	50
Tabela 14. DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS DE ACORDO COM O GRAU DE INFLAMAÇÃO.....	50
Tabela 15. DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS DE ACORDO COM O GRAU DE FIBROSE.....	51
Tabela 16. DISTRIBUIÇÃO DOS COELHOS DE ACORDO COM ANÁLISE PATOLÓGICA DO PÂNCREAS.....	52
Tabela 17. DISTRIBUIÇÃO DOS COELHOS DE ACORDO COM O NÚMERO E O GRAU DE MICROANEURISMAS NO SEXTO MÊS.....	56

## Lista de abreviaturas e símbolos

AGF	Angiofluoresceinografia
Akt	Proteína-serina/treonina quinase
ALT	Alanino-aminotransferase
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
Apo	Apoproteína
AST	Alanino-aspartatotransferase
AT-1R	Receptores tipo 1 de angiotensina II
AT-2R	Receptores tipo 2 de angiotensina II
BRA	Bloqueador do receptor tipo I de Angiotensina II
B/S/C	Dieta banha/sacarose/colesterol
BSA	Soro albumina bovina
CEDEME	Centro de desenvolvimento de modelos experimentais
Cols	Colaboradores
db/db	Diabetes e dislipidemia
DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
EGF	Fator de crescimento endotelial
e-NO	Óxido nítrico endotelial
EUA	Estados Unidos da América
FAK	Quinase de adesão focal
Fyn	Fyn quinase
GGT	Gama-glutamil tranferase
GLM	Análise de variância com medidas repetidas
GLUT-4	Transportador tipo 4 de glicose
HDL-C	Lipoproteína colesterol de alta densidade
HE	Hematoxilina eosina
HOMA	Modelo de avaliação da Homeostase
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IECA	Inibidor da enzima conversora da angiotensina
IKKB	Inibidor do fator nuclear kappa B quinase
IL-6	Interleucina-6
I/M	Íntima/média
IRS	Substrato do receptor de Insulina
JAK	Janus quinase
JNK	c-Jun N-terminal quinases
LDL-C	Lipoproteína colesterol de baixa densidade
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos
MCSF	Fator de crescimento de colônia de macrófagos
NaCl	Cloreto de sódio
NEP	Neuroendopeptidases
NF-Kb	Fator nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Fosfato salino tamponado
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PDK1	Quinase 1 fosfoinositide dependente
PEAD	Polietileno de alta densidade
PKC	Proteína quinase C



PI3-K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PIP-3	Fosfoinositol 3-quinase
Pyk2	Tirosina rica em prolina quinase 2
Receptor AT1	Receptor Tipo I de Angiotensina II
SRA	Sistema renina-angiotensina
Src	Proto-oncogene
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa
UKPDS	<i>United Kingdom Prospective Study</i>
UNIFESP	Universiadade Federal de São Paulo
VCAM-1	Molécula de adesão vascular - 1
Y-P	Fosforilação da tirosina
Yes	Yes quinase
ZDF	<i>Zucker Diabetic Fatty</i>
Z-Phe-His-Leu	Carbobenzoxi-fenilalanina-histidina-leucina

## RESUMO

Com o crescente aumento da prevalência mundial de diabetes *mellitus*, tem-se buscado modelos experimentais para melhor compreensão de sua fisiopatologia e tratamento que atendam de maneira mais adequada à preservação de células beta, proteção de órgãos-alvo e atenuação da aterosclerose. **Objetivos:** Desenvolver modelo experimental de diabetes *mellitus* tipo 2 induzido por meio de dieta, e utilizá-lo para examinar os efeitos de um inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA) e de um bloqueador do receptor de angiotensina (BRA) na proteção de órgãos-alvo. **Métodos:** Coelho machos Nova Zelândia (n=49) receberam dieta acrescida de banha (10%), sacarose (40%) durante todo o protocolo do estudo além de colesterol (0,5% nos três primeiros meses e 0,1% nos meses subsequentes). Os animais receberam aleatoriamente: apenas a dieta sem fármacos (G1), olmesartana 5 mg (G2), quinapril 30 mg (G3), ou a combinação de ambos (G4), acrescidos à mesma dieta por seis meses. Foram analisados lípides, frutossamina, glicose e insulina em jejum com cálculo dos índices para resistência à insulina e função de células beta pancreáticas. Foram ainda examinadas as áreas sob as curvas de insulina e glicose, após infusão de glicose intraperitoneal. Angiofluoresceinografias e análises histopatológicas avaliaram lesões em órgãos-alvo. **Resultados:** Os coelhos ganharam peso, e houve aumento dos níveis de glicose, colesterol total, LDL-C e triglicérides e redução do HDL-C ( $p < 0,05$  vs. basal). A frutossamina e o HOMA-IR se elevaram, enquanto houve redução do HOMA- $\beta$  ( $p < 0,05$  vs. basal). Sinais precoces de retinopatia diabética foram observados a partir do terceiro mês, progredindo até o final do experimento ( $p < 0,0005$ ). Lesões ateroscleróticas em aorta, esteatofibrose hepática e infiltrado glomerular de macrófagos constituíram os principais achados histomorfológicos. O bloqueio do sistema renina-angiotensina modificou favoravelmente a glicemia e o HOMA- $\beta$  ( $p < 0,05$ ) e houve atenuação do número e grau dos microaneurismas pelo tratamento com BRA isoladamente ou combinado com IECA ( $p < 0,05$  vs. G1). **Conclusões:** Nosso modelo reproduziu várias características glucometabólicas do diabetes *mellitus* tipo 2 humanóide, incluindo déficit de secreção e resistência à insulina. O bloqueio do sistema renina-angiotensina atenuou algumas alterações bioquímicas e as lesões microvasculares em retina.

Palavras-chaves: Coelhos, diabetes *mellitus* tipo 2, órgãos-alvo; Inibidor da ECA; bloqueador do receptor AT1 da angiotensina II

## ABSTRACT

With the increasing prevalence of diabetes *mellitus* worldwide, new experimental models are required to better understand the pathophysiology of this disease and to offer therapeutic options that can preserve pancreatic beta-cells, protect target organs and attenuate atherosclerosis. **Objective:** The aims of this study were to develop an experimental model of type 2 diabetes mellitus induced by diet and assess on this model the effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEI) and an antagonist of the angiotensin II type1 receptor (AT1R) on target organ protection. **Methods:** New Zealand male white

rabbits (n=49) were fed high-fat/high-sucrose (10/40%) during the study protocol and cholesterol-enriched diet (0.5% in the first three months followed by 0.1% until the end of the study). These animals were randomized to receive: diet alone (G1), olmesartan 5 mg (G2), quinapril 30mg (G3), or combination of both drugs (G4), added to the same diet for six months. Fasting lipids, fructosamine, glucose and insulin, with calculation of insulin resistance and beta-cell function indexes were evaluated. The areas under the curves for glucose and insulin were obtained after intraperitoneal glucose bolus injection. Fluorescein angiography and histopathological analyses were performed to assess target-organs lesions. **Results:** The animals gained weight, and there were increases in blood glucose, total cholesterol, LDL-C and triglycerides, and decrease in HDL-C ( $p < 0.05$  vs. baseline). Fructosamine levels and the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) were increased, while there was a reduction in the HOMA- $\beta$  ( $p < 0.05$  vs. baseline). Early clinical features of diabetic retinopathy were seen since the third month, progressing up to the end of the experiment ( $p < 0.0005$ ). Aortic atherosclerosis, hepatic steatofibrosis and glomerular macrophage infiltration were the main histomorphologic findings of this study. The renin-angiotensin system (RAS) blockade favorably modified blood glucose and the HOMA- $\beta$  ( $p < 0.05$ ) and promoted attenuation of the number and grade of microaneurysms in retina in the group of animals receiving AT1R antagonist or combined therapy with the ACEI ( $p < 0.05$  vs. G1). **Conclusion:** Our model reproduced several glucometabolic characteristics of humanoid type 2 diabetes, including decreased insulin secretion and insulin resistance. The RAS blockade attenuated some biochemical abnormalities and the diabetic retinopathy.

**Keywords:** Rabbits, type 2 diabetes *mellitus*, target-organs, ACE inhibitor, angiotensin II receptor blocker

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Diabetes *mellitus* tipo 2

A Organização Mundial de Saúde (OMS) vem alertando sobre uma eminente epidemia mundial de diabetes. Em 1985 estimava-se que 30 milhões de pessoas possuíam diabetes *mellitus* (DM), atualmente são aproximadamente 171 milhões e em 2030 este número deverá duplicar se nenhuma ação mais efetiva for tomada. De acordo com a OMS, o DM já constitui a quinta causa de morte em todo o mundo (seis mortes por minuto<sup>(1)</sup>) e deverá crescer ainda mais, face aos múltiplos mecanismos associados à doença aterotrombótica<sup>(2)</sup>. Estima-se que o Brasil esteja em sexto lugar na lista de países com maior número de pessoas com diabetes<sup>(1)</sup>.

Além da mortalidade cardiovascular, o diabetes constitui a principal causa de doença renal em estágio final<sup>(3)</sup> e a primeira causa de cegueira na vida adulta. Muitos

dos medicamentos empregados hoje no controle glicêmico não parecem evitar a progressiva falência das células beta-pancreáticas. O estudo UKPDS (1998)<sup>(4)</sup> mostrou de forma nítida a necessidade progressiva de mais medicamentos e controle pouco satisfatório da glicemia e complicações macro e microvasculares. De fato, mais recentemente se têm buscado novos fármacos que atendam de maneira mais adequada à preservação das células beta e combinem proteção de órgãos-alvo e atenuação da aterosclerose. Neste cenário, o uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina e de bloqueadores do receptor AT1 associou-se com nefro-proteção e redução de desfechos cardiovasculares com benefícios além da redução pressórica. Nos últimos anos, se tornou evidente que estes medicamentos também reduzem o aparecimento de novos casos de DM, sendo propostos alguns mecanismos de redução da resistência periférica à insulina e, mais recentemente, de proteção das células beta-pancreáticas<sup>(5)</sup>.

A diretriz de 2007 da Sociedade Brasileira de Diabetes<sup>(6)</sup> define como glicemia de jejum alterada em humanos valores acima de 100 e abaixo de 126 mg/dL e tolerância diminuída à glicose, níveis de glicemia após sobrecarga de 75 g de glicose entre 140 e 199 mg/dL, ambas condições consideradas como pré-diabetes, embora os valores para a glicemia de jejum alterada ainda não tenham sido oficializados pela OMS<sup>(7)</sup>.

A incidência de DM tipo 2, com deficiência na produção de insulina e/ou resistência periférica à insulina, aumenta com a idade, sendo que quase 1/3 dos indivíduos com idade superior a 60 anos, têm diabetes ou apresentam glicemia de jejum alterada<sup>(8, 9)</sup>. Também com o envelhecimento, a prevalência de hipertensão arterial aumenta, especialmente entre os pacientes diabéticos<sup>(10, 11)</sup>.

Uma das condições mais importantes relacionadas às doenças metabólicas é a obesidade. O tecido adiposo modula o metabolismo liberando ácidos graxos não esterificados e glicerol, além de hormônios (leptina e adiponectina), e citocinas pró-inflamatórias<sup>(12-14)</sup>.

De fato, a maior mobilização de ácidos graxos, a hiperglicemia e o estímulo à hiperinsulinemia parecem contribuir para uma maior ativação do sistema nervoso simpático, disfunção endotelial e reabsorção tubular de sódio, explicando a alta prevalência de hipertensão arterial entre os diabéticos. De forma interessante, alguns dos medicamentos mais comumente utilizados no controle pressórico parecem agravar

alguns dos distúrbios metabólicos dos pacientes diabéticos, como os betabloqueadores e diuréticos.

Além da obesidade, existem outras co-morbidades importantes comuns ao diabetes *mellitus* tipo 2 como a retinopatia, nefropatia diabéticas e doenças cardiovasculares<sup>(7)</sup>.

A importância do DM como preditor de eventos coronarianos tem sido fortemente estabelecida a partir de estudos observacionais, na Europa ou na América, envolvendo populações de baixo ou alto risco, para ambos os sexos<sup>(15)</sup>.

A partir destes dados, diretrizes internacionais, como a proposta nos EUA pelo *Adult Treatment Panel*<sup>(16)</sup>, pela força-tarefa européia<sup>(17)</sup> e brasileira<sup>(18)</sup> passaram a considerar todos os pacientes portadores de DM como de alto risco para a ocorrência de eventos coronarianos, como o infarto do miocárdio e a morte cardiovascular.

Segundo a Associação Americana de Diabetes, a nefropatia ocorre em 40% dos indivíduos com DM<sup>(19)</sup>, quando a excreção de albumina excede 300 mg em 24 horas, entretanto a microalbuminúria (30-299 mg/24 horas ou 30-299 mg/g creatinina em amostra isolada) deve ser levada em consideração como o primeiro sinal de lesão renal<sup>(20)</sup>.

As principais lesões oftalmológicas encontradas no DM são o edema de mácula, a formação de novos vasos e microaneurismas em retina. No estado do Rio de Janeiro, Oliveira e cols. estimaram a prevalência de 19,5% de retinopatia diabética em pacientes ambulatoriais<sup>(21)</sup>, nos Estados Unidos da América, estas lesões resultam em cegueira de aproximadamente dez mil indivíduos por ano<sup>(22)</sup>, um fato interessante, é que estas alterações podem ter início sete anos antes do diagnóstico clínico, dificultando o tratamento e prevenção.

As alterações em órgãos-alvo, como pâncreas, retina, fígado e rins, decorrentes do DM, estão relacionadas com as lesões microvasculares, que sofrem ação direta do sistema renina-angiotensina.

## **1.2. Mecanismos de Sinalização da Insulina**

Em condições normais quando a insulina se liga a seu receptor ocorrem mudanças conformacionais e reações de fosforilação no domínio tirosino-quinase com substrato do receptor de insulina que ativam a fosfoinositol-3-quinase gerando fosfatidilinositol trifosfato que se liga a um domínio da Akt, ocorrendo nova fosforilação

e subsequente translocação do transportador tipo 4 de glicose (GLUT-4) para membrana celular<sup>(23)</sup> (figura 1).

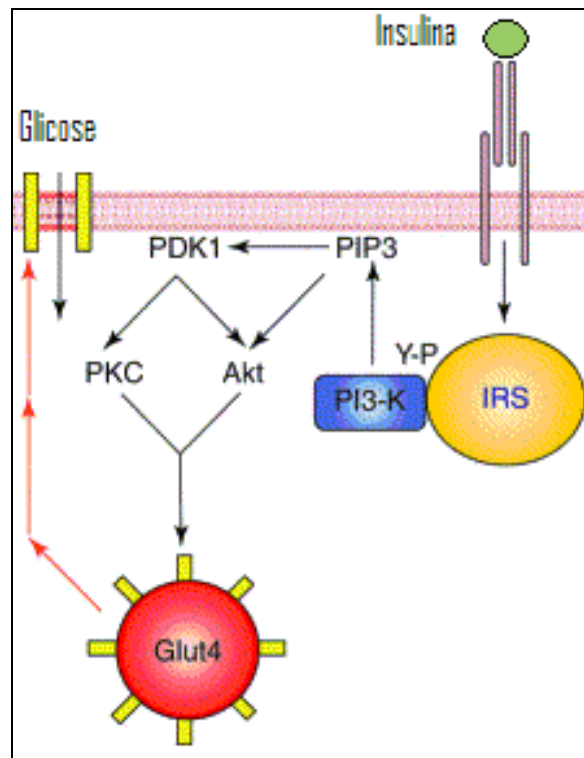


Figura 1. Modelo simplificado da sinalização por insulina. IRS (substrato de receptor de insulina) Y-P (fosforilação da tirosina); PI3-K (fosfatidilinositol 3-quinase); PIP-3 (fosfoinositol 3-quinase); PDK1 (quinase 1 fosfoinosítide dependente); PKC (proteína quinase C); Akt (proteína-serina/treonina quinase); GLUT 4 (transportador tipo 4 de glicose)<sup>(24)</sup>.

### 1.3. Mecanismos de Sinalização da Angiotensina II

A transdução do sinal celular ocorre por mecanismos complexos e apesar de muito estudados, não estão completamente esclarecidos. As tirosino-quinases catalizam a transferência de fosfato do ATP para um resíduo de tirosina de uma proteína celular alvo específica. A ativação das tirosino-quinases pela ativação do receptor AT1 pode ocorrer por tipos não-receptores e receptores. Todos os receptores tirosino-quinases possuem estrutura semelhante: uma região correspondente ao sítio de ligação extracelular, um domínio hidrofóbico transmembrana e uma porção intracelular (citoplasmática). Já as tirosino-quinases não receptores são condutores intermediários de diversas vias de sinalização intracelulares, sendo que muitos estão associados a receptores transmembrana, como os receptores de hormônios, citocinas, receptores de fatores de crescimento; são ativados pela ligação entre receptores e ligantes extracelulares ou componentes de adesão celulares<sup>(25)</sup>.

A angiotensina II (Ang II) se liga ao receptor AT-1, que é acoplado a uma proteína G, estimula fosfolipase C induzindo a formação de inositol trifosfato e diacilglicerol, levando a ativação da proteína-quinase C (PKC). A interação de Ang II com receptor AT1 também determina ativação da via das tirosino-quinases com os substratos dos receptores de insulina (IRS-1 e 2), havendo ligação com a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K). Entretanto, ao contrário da insulina, a Ang II promove inibição da atividade da enzima PI3-K<sup>(26)</sup>, e também pode aumentar a fosforilação da serina com IRS-1, que também diminui a ação da PI3-K<sup>(27)</sup>. A fosforilação das tirosino-quinases pela ativação do receptor AT1 pode ocorrer por tipos não-receptores da família Src [Fyn, Yes, de ampla expressão; Pyk2, FAK, e Janus kinase 2 (JAK2)] e tipo receptores (receptores de EGF e PDGF)<sup>(25)</sup>. Essas tirosino-quinases regulam vias efetoras intracelulares, incluindo a Ras-Raf-MAPK quinase (MEK)-ERK, e a JAK/STAT (*signal transducers and activator of transcription*)<sup>(28, 29)</sup>, muitas destas enzimas relacionadas à sinalização de fatores de crescimento e citocinas (figura 2).

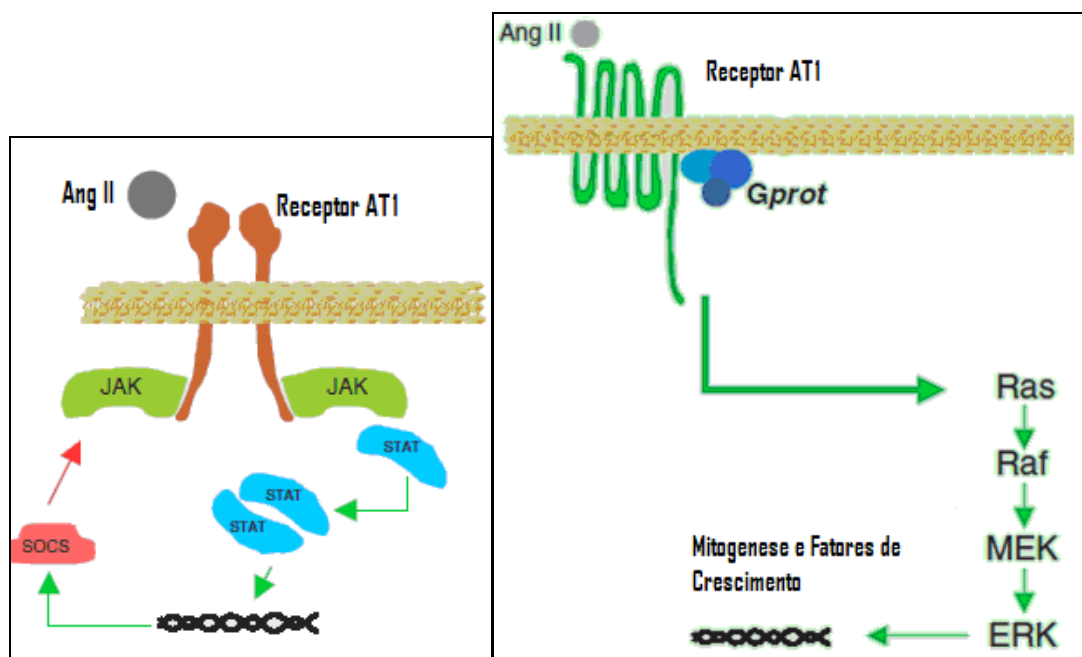


Figura 2. Modelos de sinalização da Angiotensina 2 pelo receptor AT1<sup>(30)</sup>

#### 1.4. Mecanismos de resistência à insulina

Estudos recentes têm mostrado que a resistência à insulina parece decorrente de uma interferência na seqüência de reações de fosforilação da insulina e que culmina com a translocação do transportador de glicose<sup>(31)</sup> (figura 3).

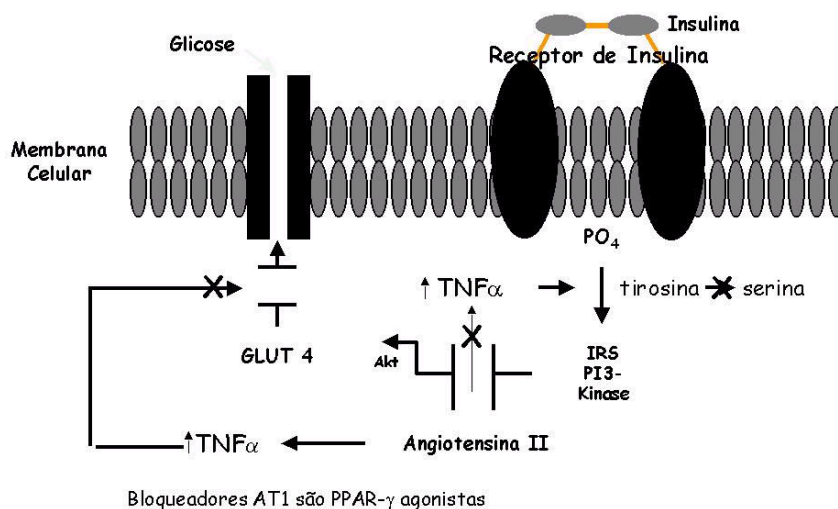


Figura 3. Vias de sinalização do receptor de insulina em situação fisiológica e nos estados de resistência à insulina.

A obesidade visceral é altamente prevalente entre os pacientes diabéticos tipo 2 e está associada com várias e importantes alterações metabólicas. Hoje está amplamente reconhecido o papel modulador da inflamação, de alterações na hemostasia, de dislipidemia e não apenas de resistência à insulina<sup>(32, 33)</sup>.

Esta condição clínica implica em redução da sinalização pela PI3K em vários tecidos e aumento de gliconeogênese hepática<sup>(32)</sup>. O aumento de ácidos graxos não esterificados ou a diminuição do seu metabolismo intracelular resultam em aumento de diacilgliceróis e outros metabólitos que ativam a cadeia da serina/treonina quinase levando à sua fosforilação com substratos dos receptores de insulina reduzindo a capacidade de ativar PI3-K<sup>(34)</sup>, diminuindo a ação da Akt, que em células endoteliais, reduz a produção de óxido nítrico endotelial (e-NO)<sup>(35)</sup>. Concomitantemente, existe aumento de expressão de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-6 (IL-6), que estimulam as vias da JNK e IKKB/NF- $\kappa$ B resultando em regulação positiva de mediadores inflamatórios, aumento da liberação de proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), acarretando em maior recrutamento de macrófagos para tecido adiposo e endotelial (figura 4)<sup>(36, 37)</sup>.



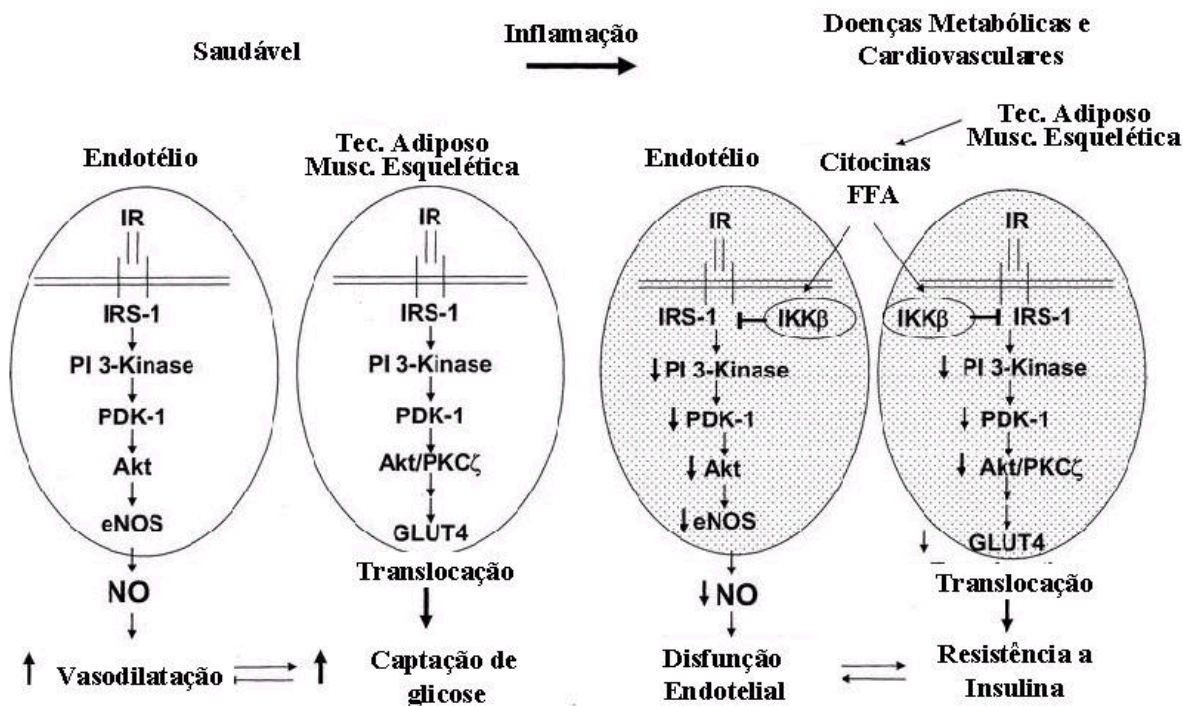


Figura 4. Interação das vias de sinalização do receptor de insulina em situação fisiológica e nos estados de resistência à insulina no endotélio, adipócito e célula muscular esquelética<sup>(38)</sup>.

Em pacientes diabéticos tem sido descrita a ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) que parece estar associada à maior expressão de citocinas inflamatórias, o que determina uma mudança na seqüência de sinalização celular a partir da interação da insulina com seu receptor, promovendo não apenas maior resistência à insulina, mas também favorecendo a ativação de outra via metabólica, relacionada à maior atividade proliferativa e à hipertensão arterial<sup>(34)</sup>. Alguns estudos mostram que em estado de hiperinsulinemia existe aumento de receptores tipo 1 de angiotensina II (AT-1R)<sup>(39-42)</sup>. Neste cenário, a disfunção endotelial também ocorre por uma menor fosforilação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), diminuindo a captação de glicose e contribuindo para a elevação da pressão arterial.

### 1.5. Ativação do sistema renina angiotensina e função das células beta pancreáticas

Em estudo experimental, ratos ZDF (*Zucker Diabetic Fatty*) receberam um inibidor da enzima conversora da angiotensina (IECA) perindopril, um bloqueador do receptor tipo I da angiotensina II (BRA) irbesartana ou placebo por dez semanas. Os

animais não tratados exibiram, nas ilhotas de Langerhans, aumento da expressão do receptor AT1 e das enzimas conversoras de angiotensina (ECA 1 e ECA 2), além de maior fibrose, apoptose e estresse oxidativo efeitos dependentes da angiotensina II, entretanto ambos os grupos tratados tanto com o IECA como com o BRA tiveram diminuição de apoptose, preservação das células beta e melhor resposta aos estímulos para secreção de insulina<sup>(43)</sup>.

Mais recentemente, Chu *et al*<sup>(44)</sup> confirmaram a maior ativação do sistema renina angiotensina em camundongos db/db e sua relação com a secreção de insulina. De maneira interessante os autores mostraram que o aumento da angiotensina II ocorria em paralelo à menor secreção de insulina e gradualmente, neste modelo experimental, havia maior expressão do SRA e menor expressão de insulina em estudos imunohistoquímicos nas ilhotas pancreáticas. Neste modelo, o pré-tratamento com losartana foi associado com melhor resposta funcional destas células pancreáticas aos estímulos da hiperglicemia.

Vistos em conjunto, estes estudos sugerem que o bloqueio do SRA pode propiciar redução de novos casos de diabetes tanto por diminuição da resistência periférica à insulina como pela maior preservação anatômica e funcional das ilhotas de Langerhans.

## **1.6. Nefroproteção pelo bloqueio ao sistema renina angiotensina**

Recentemente, nosso grupo mostrou em coelhos tornados hiperlipidêmicos pela dieta rica em colesterol e diabéticos pela lesão de células beta provocada pela aloxana, que estes animais precocemente desenvolvem alterações tubulares (vacuolização e calcificação) e glomerulares (infiltrado de macrófagos) (figuras 5 e 6).

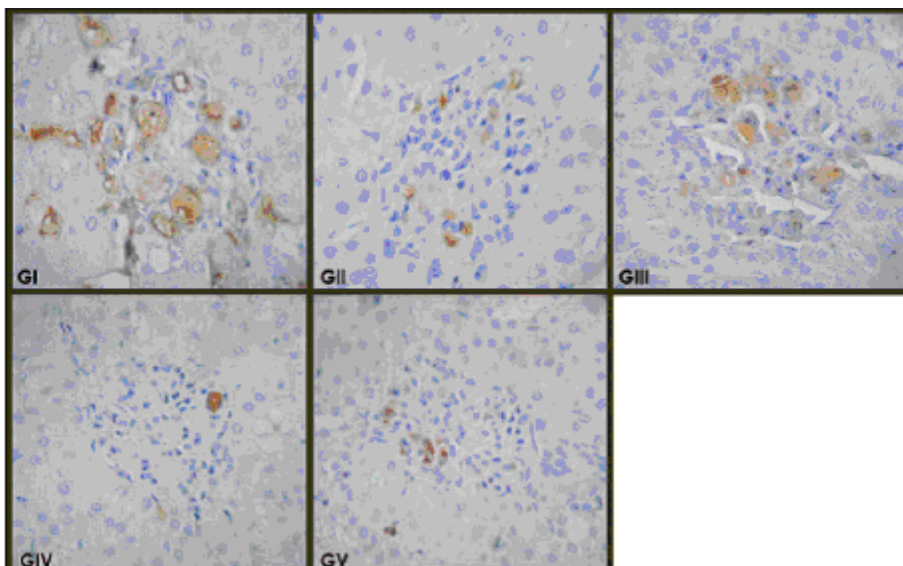


Figura 5. Imunohistoquímica de macrófagos em glomérulos (x400). Grupo I e GIII não tratados com quinapril; GII, GIV e GV tratados com quinapril. GII, GIV e GV apresentaram redução de infiltração de macrófagos

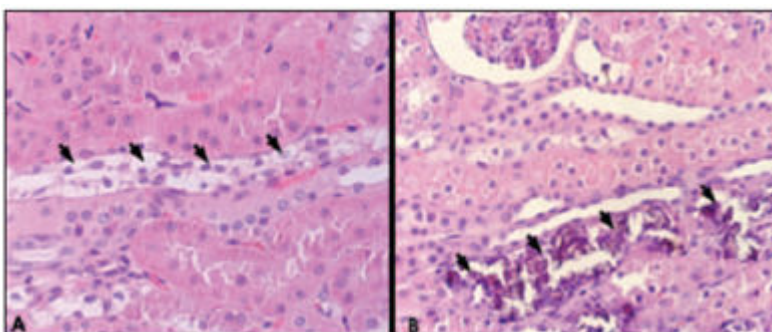


Figura 6. Fotomicrografia do rim de coelhos diabéticos e hipercolesterolêmicos. Corado por HE. A) Vacuolização tubular (flechas) – original x400 B) Calcificação tubular (flechas) – original x200

Nestes animais, verificamos que estas alterações morfológicas também se acompanharam de alterações funcionais, com significativo aumento na relação de albumina/creatinina urinária. Neste estudo, os animais tratados com o quinapril (IECA), não apenas tiveram melhor relação albumina/creatinina como também significativa redução na infiltração de macrófagos nos glomérulos<sup>(45)</sup>.

Embora a utilização de combinação de IECA e BRA não tenha sido inicialmente empregada no tratamento da hipertensão arterial, face ao pouco valor aditivo na redução da pressão arterial, mais recentemente esta associação tem sido sugerida pelo sinergismo na redução da proteinúria, especialmente em diabéticos<sup>(31)</sup>.

Todavia, menos informação se tem a respeito do possível sinergismo desta associação em parâmetros como a aterosclerose ou a própria preservação das células beta-pancreáticas.

## 1.7. A Nova Visão do Sistema Renina Angiotensina

A angiotensina II é o principal peptídeo efetor do SRA, ligando-se aos receptores AT1 e AT2<sup>(46)</sup>, sendo que a ativação do receptor AT2 exerce um papel anti-aterogênico, contrapondo-se à ação do receptor AT1. A angiotensina II, atuando no receptor AT1, exerce vários efeitos que podem se associar ao desenvolvimento de aterosclerose e suas complicações: estimula a modificação de LDL, ativa a fosforilação do fator nuclear kB, o qual promove a expressão de moléculas de adesão e fatores quimiotáticos (VCAM-1, MCP-1, MCSF), facilitando a adesão e penetração de células no espaço sub-intimal e estimula proliferação e migração de células musculares lisas da camada média para a íntima<sup>(47)</sup>. Estes resultados dão suporte para a utilização de drogas que bloqueiam o sistema renina-angiotensina (IECA ou antagonista AT1) para melhorar as alterações na função e estrutura vascular associadas com hipertensão e aterosclerose.

Outro peptídeo, a angiotensina 1-7 (Ang 1-7), pode ser formado a partir da degradação da angiotensina I pela ação das endopeptidases, como também a partir da ação da ECA2 sobre a angiotensina II<sup>(28)</sup>. A Ang 1-7 tem papel ateroprotetor, contrabalançando as ações vasculares e proliferativas da angiotensina II<sup>(48)</sup>. A maioria dos inibidores da ECA aumenta os níveis teciduais e plasmáticos de Ang 1-7, pois estes desviam a formação de angiotensina II por essa enzima a partir da angiotensina I<sup>(49)</sup>. O uso de antagonistas do receptor AT1 resulta no acúmulo de angiotensina II e, conseqüentemente, na formação de Ang 1-7. Estudos sugerem que o acúmulo de Ang 1-7 nessas condições está intimamente relacionado com os efeitos cardiovasculares produzidos pela terapia combinada de inibidores da ECA e bloqueadores do receptor AT1<sup>(26)</sup>. A figura 7 mostra a nova visão do SRA.

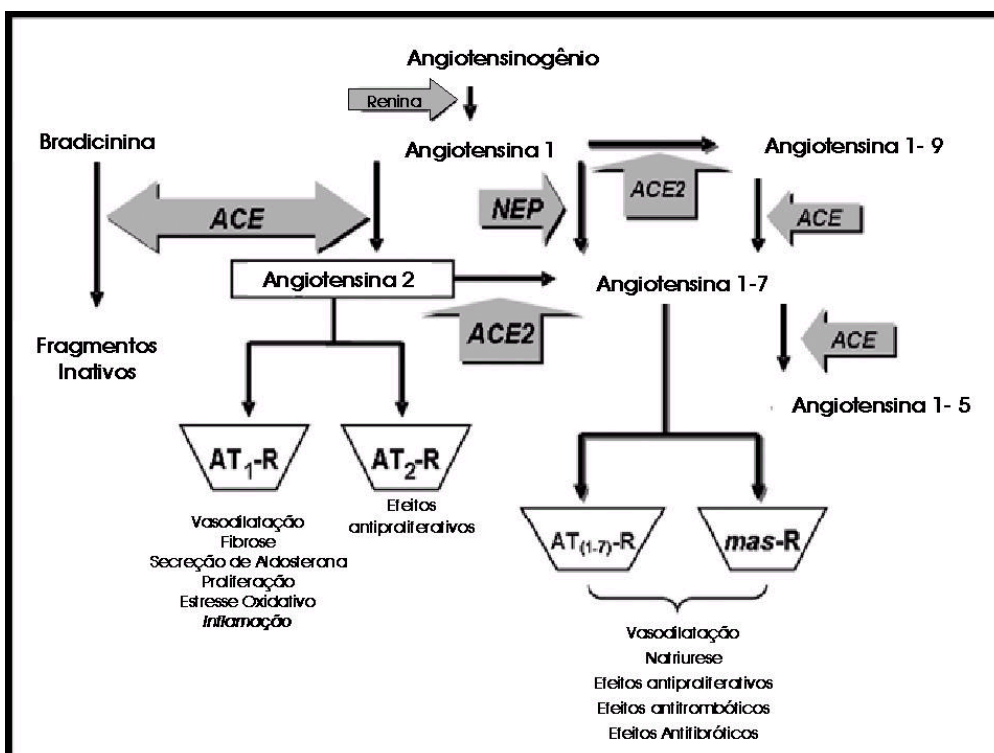


Figura 7. A nova visão do sistema renina-angiotensina<sup>(50)</sup>. ACE = enzima conversora da angiotensina; NEP = neuroendopeptidases; ACE2 = enzima conversora da angiotensina tipo 2; mas-R = receptor da angiotensina 1-7; AT1 e AT-2 = receptores da angiotensina II tipos 1 e 2.

De maneira interessante, o bloqueio do SRA (inibição da ECA) também determina menor degradação de bradicinina, substância P e outros peptídeos todos capazes de promover maior estímulo à produção de óxido nítrico e, portanto, ações anti-aterotrombóticas. Da mesma forma, o bloqueio do receptor AT1 da angiotensina II pode levar a maior expressão do receptor AT2, com benefícios na aterosclerose. Mais recentemente, com o bloqueio mais intenso do SRA pode-se esperar novas e benéficas ações quer pelos mecanismos já citados, ou por maior atividade da Ang 1-7.

Vários estudos envolvendo IECA ou BRA em populações de hipertensos, diabéticos ou de coronarianos sugeriram benefícios adicionais à redução pressórica, na proteção renal, coronariana e na redução de novos casos de diabetes<sup>(51-55)</sup>. Porém, menor informação se tem sobre os benefícios da combinação destes fármacos, especialmente em modelo experimental de aterosclerose e diabetes.

Em nosso laboratório, temos utilizado o modelo de aterosclerose induzido em coelhos Nova Zelândia, por meio da dieta hipercolesterolêmica e, mais recentemente, desenvolvido dois modelos de diabetes, pela destruição de células beta por aloxana (modelo de diabetes tipo 1) e pela dieta rica em sacarose e gorduras (modelo de

diabetes tipo 2). Estes animais desenvolvem aterosclerose marcante com a dieta, sendo adequados ao estudo de intervenções medicamentosas, permitindo quantificar neste modelo o grau de atividade plasmática da ECA e as respostas na aterosclerose e na nefropatia induzidas pela medicação.

### **1.8. Efeitos do bloqueio ao SRA na aterosclerose experimental**

O uso da IECA em modelos experimentais tem mostrado efeito benéfico no desenvolvimento de aterosclerose<sup>(56, 57)</sup>. Em coelhos, com diferentes doses, verificou-se um efeito protetor, reduzindo a gravidade da aterosclerose em animais com dieta aterogênica, de maneira independente da pressão arterial ou nível de colesterol, sugerindo um efeito direto nas células da parede do vaso, aumentando a síntese de colágeno pelas células musculares lisas e diminuindo a captação de lipoproteínas aterogênicas<sup>(58, 59)</sup>. Proteção também foi observada na reatividade vascular dependente do endotélio e lesão vascular em artérias aorta, carótidas e femorais e também em órgãos como coração e rim<sup>(60, 61)</sup>.

Em relação à utilização de BRA, o uso de valsartana em coelhos com dieta hipercolesterolêmica também foi associado a menor desenvolvimento de aterosclerose<sup>(62)</sup> e melhora da função endotelial<sup>(63)</sup>. Utilizando-se um modelo de ruptura de placa com formação de trombos, em coelhos, verificou-se com o bloqueio do receptor de angiotensina com candersartana, atenuação do grau de aterosclerose e redução da ruptura da placa, menor acúmulo de macrófagos e aumento de deposição de colágeno na aorta nestes animais<sup>(64)</sup>.

Os efeitos da combinação dos fármacos são muito menos descritos na aterosclerose, mas na nefroproteção, foi mostrado que a utilização de valsartana com perindopril em ratos diabéticos diminuiu a glomerulosclerose em comparação ao uso isolado de cada agente<sup>(27)</sup>.

A expressão da ECA e receptor AT1 tem sido descrita não apenas em tecido aterosclerótico de coelhos<sup>(56)</sup>, mas também em humanos. Utilizando-se do modelo de aterosclerose induzida pela dieta em coelhos Nova Zelândia, foi demonstrada a maior expressão de ECA2 e receptor AT2, embora o significado da maior expressão destes componentes do SRA nas placas destes animais não esteja elucidado<sup>(47)</sup>.

Com o crescente interesse em modelo experimental de diabetes tipo 2, testamos um modelo de indução desta condição em coelhos pela dieta rica em gorduras e

sacarose, conforme relatado por Yin (2002)<sup>(65)</sup>. Em estudo piloto desenvolvido em nosso laboratório conseguimos reproduzir os achados deste autor, observando-se hiperglicemia, baixos níveis de HDL-c e hipertrigliceridemia, após seis meses de dieta, nestes animais. Com a utilização concomitante de colesterol à dieta proposta é possível combinar as alterações lipídicas às modificações no metabolismo dos carboidratos. Acreditamos que este modelo possa contribuir para o estudo da aterosclerose, nefropatia e preservação de células beta, além de estudos da retinopatia diabética, permitindo, ainda, o exame de intervenções terapêuticas que possam atenuar a morbidade do diabetes e suas repercussões em órgãos-alvo.

Todos estes dados indicam a relevância do diabetes na morbi-mortalidade por doença cardiovascular e demandam a criação de um modelo experimental para melhor entender a fisiopatologia desta doença e buscar formas de prevenção de lesões macro e microvasculares.

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos desse estudo foram:

1 - Induzir o desenvolvimento de DM tipo 2 em modelo experimental de coelhos, por meio de uma dieta rica em banha de porco, sacarose e colesterol, para avaliar alterações glucometabólicas e lesões em órgãos-alvo;

2 – Avaliar os efeitos de um inibidor da enzima conversora da angiotensina, de um bloqueador do receptor AT1 da angiotensina II, ou de sua combinação na atenuação das alterações observadas neste modelo experimental.



### 3. MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP sob o nº1937/06, estando de acordo com todas as normas de regulamentação para uso de animais de laboratório do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

#### 3.1. Desenvolvimento do estudo

##### 3.1.2. Animais

Todos os animais deste estudo foram coelhos machos da raça Nova Zelândia, brancos, procedentes e alocados no CEDEME, UNIFESP-EPM.

Os animais ficaram em gaiolas individuais de polietileno de alta densidade (PEAD), receberam água *ad libitum* e suas camas, água e ração foram trocadas diariamente, permanecendo em sala climatizada, com ciclo de luz claro/escuro 12/12horas. Para evitar estresse de cativeiro nenhum procedimento foi realizado na sala de manutenção.

Após um período de aclimação de 15 dias os animais iniciaram os procedimentos do estudo. Nos tempos 0 e 3 meses foram realizadas apenas coleta de sangue da artéria central da orelha, com escalpe 21, para análises laboratoriais. Por ocasião do sacrifício foram feitas também coletas por punção intra-cardíaca, sob anestesia. Os animais foram sacrificados logo após os procedimentos no tempo 6 meses, por excesso de anestésico.

O estudo teve início com 49 coelhos aleatorizados em quatro grupos, com peso entre 2000 g e 2500 g, mas após fase de aclimação três animais foram excluídos por questões clínicas, desta forma o protocolo com a dieta banha/sacarose/colesterol (B/S/C), seguiu da seguinte maneira:

- Grupo 1 - controle só com dieta, sem tratamento (n=13)
- Grupo 2 - coelhos tratados com bloqueador do receptor AT1 (n=11)
- Grupo 3 – coelhos tratados com inibidor da ECA (n=11)
- Grupo 4 – coelhos tratados com bloqueador do receptor AT1 e inibidor da ECA (n=11)



### 3.3. Análises laboratoriais

#### 3.3.1. Dosagens Bioquímicas

Foi colhido sangue da artéria central da orelha nos períodos 0, 3 e 6 meses para dosagens laboratoriais bioquímicas de colesterol total, triglicérides, glicose, insulina, frutossamina, aspartato amino transferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-glutamil transferase (GGT), albumina e creatinina. No sacrifício foram feitas dosagens de glicose e insulina nos tempos 0, 2, 5, 10 e 15 minutos após infusão intraperitoneal de glicose (1g/kg de peso), e posteriormente calculados os índices de HOMA-IR<sup>(66)</sup>  $[\text{insulina basal} \times (\text{glicemia}/18)] / 22,5$  para avaliar a resistência à insulina e HOMA- $\beta$ <sup>(66)</sup>  $[(20 \times \text{insulina basal}) / (\text{glicemia}/18 - 3,5)]$ , para avaliar a função das células beta.

Também foram realizadas no dia do sacrifício, dosagens urinárias de nitritos, albumina e creatinina via cistocentese, com cálculo da relação albumina/creatinina em amostra isolada de urina.

As dosagens bioquímicas foram realizadas no Laboratório Central da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP. O soro e o plasma foram separados, mantidos a temperatura ultrabaixa (-80° C) e descongelados em temperatura ambiente por ocasião das análises.

As análises bioquímicas foram feitas em aparelho automatizado da marca Olympus AU 640 (Olympus, Nagano, Nagano, Japão). O colesterol total e os triglicérides foram mensurados por método enzimático colorimétrico, o HDL-C foi dosado após precipitação das lipoproteínas contendo Apo B, no sobrenadante, utilizando-se reagentes específicos para aparelho Olympus AU 640 (Nagano, Nagano, Japão). O LDL-C foi estimado pela fórmula de Friedewald<sup>(67)</sup>. A albumina foi mensurada por método colorimétrico, a gama-glutamil transferase e creatinina por método cinético colorimétrico. AST, ALT foram mensuradas por método cinético. Frutossamina foi dosada por método cinético de tempo fixo.

As glicemias foram mensuradas com glucosímetro (OneTouch® Ultra®, LifeScan Inc., Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil), utilizando-se tiras reagentes de mesma marca. A insulina foi mensurada por quimiluminescência em

aparelho Immulite, utilizando-se os reagentes L2KIN2 (Diagnostic Products Corporation, Siemens, Los Angeles, CA, EUA). Albumina e creatinina foram dosadas na urina. Os nitritos urinários foram dosados por método de química seca utilizando-se tiras reagentes Multistix (Siemens Healthcare Diagnostics, West Sacramento, CA, USA), que fornecem resultados semi-quantitativos.

### 3.3.2. Avaliação da função das células beta pancreáticas

Para estudar a primeira fase de secreção de insulina os animais foram anestesiados no momento do sacrifício com xilazina (5 mg/kg, Rompun®, BayerAG, São Paulo, SP, Brasil) e ketamina (35 mg/kg, Vetaset®, Fordodge, São Paulo, SP, Brasil) e um *bolus* de glicose 50% (1g/kg de peso) foi administrado por via intraperitoneal. Foram colhidas amostras de sangue para dosagens de glicose e insulina nos tempos 0, 2, 5, 10 e 15 minutos por punção intra-cardíaca. A primeira fase de secreção de insulina foi estimada pela área incremental sob a curva de insulina entre 0 e 15 minutos após a infusão de glicose<sup>(19)</sup>. Foi também avaliada a área sob a curva da glicose nas mesmas condições.

### 3.3.3. Retinografia e angiofluoresceinografia

Retinografia e angiofluoresceinografia (AFG) foram realizadas no período basal, 3 e 6 meses pelo Departamento de Oftalmologia, Disciplina de Retina, coordenadas pelo Prof. Michel Farah, e com a participação da aluna de pós-graduação, Juliana Bottós. Em todos os exames utilizou-se a anestesia intramuscular de 35 mg/kg de peso de hidrocloreto de ketamina e 5 mg/kg de peso de hidrocloreto de xilazina. As pupilas foram dilatadas anteriormente aos procedimentos, com instilação no saco conjuntival de uma gota de tropicamida a 1% (Bausch & Lomb Pharmaceuticals Inc., Rochester, NY, EUA) e hidrocloreto de fenilefrina 5% (Bausch & Lomb Pharmaceuticals Inc., Rochester, NY, EUA).

A técnica angiográfica para o exame contrastado consistiu de injeção endovenosa de 0,1 ml de fluoresceína sódica (10%, 0.1 mL; Ophthalmos, São Paulo, SP, Brasil), vagorosamente na veia auricular marginal dos animais. Fotografias do fundo de olho foram obtidas com a câmera TRC (50X; Topcon Inc., Tóquio, Japão). Após a injeção, o animal foi posicionado e a unidade de câmera alinhada com o olho.

Foram realizadas fotografias a intervalos de dez a quinze segundos e, seqüencialmente, a cada dez segundos até que transcorresse um minuto. Outras fotografias também foram realizadas cinco minutos após a injeção para analisar a fase de realce tardio. Foram considerados como portadores de microaneurismas os olhos com evidência de hiperfluorescência puntiforme adjacentes aos vasos retinianos.

Pelas características anatômicas da retina de coelhos (as artérias não apresentam disposição em arcada, como no ser humano, mas sim linear), foi feita uma adaptação na padronização da contagem dos microaneurismas. A prevalência de microaneurismas foi determinada com base em fotografias padrão, com um raio equivalente ao diâmetro aproximado do disco óptico (1.500 micra), considerando a área a 1.500 micra do bordo do disco óptico. O número de microaneurismas foi graduado em quatro níveis: I < 10; II 11-30; III 31-50; IV > 50 microaneurismas. Todas as avaliações foram realizadas de maneira cega.

#### 3.3.4. *Imunohistoquímica e Histomorfometria*

Os animais foram sacrificados logo após os procedimentos por excesso de anestésico. Após o sacrifício, aorta, pâncreas, rim e olho foram retirados para estudo histopatológico. Histologia, histomorfometria e imunohistoquímica foram realizadas no Departamento de Patologia, Disciplina de Patologia Aplicada, sob supervisão da Prof<sup>a</sup>. Sílvia Saiuli Miki Ihara.

As aortas foram retiradas desde o arco aórtico até a bifurcação da ilíaca, abertas longitudinalmente, fixadas em suporte rígido e imersas em formol 10% tamponado (pH= 7,4) por 24 horas. Após a fixação, a aorta foi corada com Sudam III (Science Lab, Houston, TX, EUA) para análise macroscópica da presença de placas ateroscleróticas. A extensão de aorta coberta por placa aterosclerótica foi estimada por planimetria computadorizada, utilizando-se o *Image Tool*® software versão 3,0 (Image Tool for Windows, University of Texas Health Science Center in San Antonio, UTHSCSA, San Antonio, TX, EUA).

Um fragmento do arco aórtico, um da aorta torácica e outro da aorta abdominal foram retirados para análises histológicas. Secções dessas amostras (cerca de 4 mm) foram coradas por hematoxilina e eosina (HE, Nuclear, Alkimia, Maringá, PR, Brasil) para observação geral e por Verhoef (Nuclear, Alkimia, Maringá, PR, Brasil) para fibras

elásticas, permitindo a determinação da área da íntima ocupada por placa (I), da área da média (M) e da relação íntima/média (I/M), utilizando-se do programa *Image Tool*.

Macrófagos e células musculares lisas foram identificados por reação imunohistoquímica, utilizando-se os seguintes anticorpos monoclonais: anti-macrófagos de coelhos na diluição de 1:400, em BSA 1% (RAM-11- M 0633- DAKO Corp, Carpinteria, EUA), e anti-alfa actina para músculo liso humano, na diluição 1:200 em BSA 1% (1A 4 –M0851, DAKO Corp, Carpinteria, EUA). O ensaio imunohistoquímico baseou-se no método imunoenzimático indireto em três etapas, utilizando-se o complexo estreptoavidina-biotina-peroxidase (C-004, DAKO Corp, Carpinteria, CA, EUA). Cortes histológicos com 3 um de espessura foram colhidos em lâminas silanizadas (Sigma, ST Louis, MO, EUA) e após desparafinização, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, com uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seguido de lavagem em PBS (fosfato salino tamponado; pH=7,4). Os anticorpos primários foram incubados a 4°C *overnight*. Após lavagens em solução de PBS, as secções foram incubadas com o anticorpo secundário IgG de coelho anti-camundongo biotinilado na diluição de 1: 400 (E-0354 – DAKO Corp, Carpinteria, CA, EUA) por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram incubados com a solução do complexo streptoavidina-peroxidase na concentração de 1:200 (C-004, DAKO Corp, Carpinteria, CA, EUA) durante 30 minutos, seguida de lavagens em PBS. A revelação foi realizada com substrato cromógeno 3,3 diamino-benzidina-peróxido de hidrogênio (DAB líquido K-3468, DAKO Corp, Carpinteria, CA, EUA). Os cortes foram lavados em água corrente, contracolorados com Hematoxilina de Harris (Nuclear, Alkimia, Maringá, PR, Brasil) e montados em *Entellan* (Merck Chemicals, Darmstadt, Germany).

Para quantificar os macrófagos e células musculares lisas na camada íntima, imagens de duas secções histológicas da placa aterosclerótica (400x) foram capturadas e digitalizadas. As imagens digitalizadas foram inicialmente tratadas no programa Corel *Photo-paint* (Mountainview, CA, EUA), a fim de isolarem-se as áreas positivamente coradas pela reação imunohistoquímica. A maior lesão observada na secção foi analisada, incluindo-se as áreas com maior marcação e enquadrando a imagem a partir do endotélio junto à luz do vaso. As áreas marcadas positivamente foram determinadas pelo programa morfométrico *Image Tool* 3.0. Determinou-se a área marcada positivamente pela reação imunohistoquímica e a área da íntima na mesma imagem, calculando-se a porcentagem de área da íntima ocupada por macrófagos ou

células musculares lisas. Os resultados foram expressos como áreas marcadas e áreas fracionais da camada íntima.

Fragmentos de pâncreas, e rim foram processados para análise histopatológica, realizando colorações por HE e Picrosírius (para colágeno, Nuclear, Alkimia, Maringá, PR, Brasil). O ácido periódico de Schiff (PAS, Nuclear, Alkimia, Maringá, PR, Brazil) foi utilizado para marcar a membrana basal nos rins.

Estudo imunohistoquímico foi realizado nos tecidos, com anticorpos anti-macrófagos (RAM-11, DAKO), anti-insulina e anti-AT1R (ambos da Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EUA). O número de macrófagos nos rins foi contado em 50 glomérulos.

Para a avaliação da área total de ilhotas foi utilizado anticorpo anti-insulina. Foram realizados três cortes transversais do pâncreas de cada animal, e examinadas 25 ilhotas, escolhidas aleatoriamente. Foi determinada a área da ilhota e o número de células por ilhota. A área de ilhotas pancreáticas marcadas para insulina bem como a densidade de marcação para a insulina foram analisadas usando um sistema automático de análises<sup>43</sup>. A área total de células beta foi estimada nas secções coradas para insulina e AT1R utilizando-se a fórmula: Área total de células beta ( $\mu\text{m}^2$ ) =  $\Sigma$  das áreas de todas as ilhotas contadas ( $\mu\text{m}^2$ ). Foram determinados a área das ilhotas e o número de células por ilhota. A área da ilhota marcada para insulina e AT1R, assim como a densidade da marcação foram analisadas automaticamente utilizando-se o *ImageJ software* (Image Processing and Analysis in Java, acessado em: <http://rsbweb.nih.gov/ij/features.html>). Por este programa, a soma dos valores de *pixels* na seleção é calibrada para ser equivalente aos *plots* das áreas dos valores médios de cinzas. O grau de esteatose e balonização do fígado foram distribuídos semiquantitativamente em 4 categorias (ausente, leve, moderada e grave). A fibrose hepática nas secções foi categorizada em grau 0, correspondendo ao parênquima normal; 1, presença de septos incompletos, espessamento de fibras colágenas próximo à veia centrolobular, com projeções para dentro do parênquima; 2, presença de septos completos ou incompletos entre a veia centrolobular e o espaço portal; e 3, presença de septos completos ou incompletos, e nódulos anormais com subversão do parênquima.

Os olhos foram removidos, fixados em formol tamponado (pH = 7,4) para análises histopatológicas (HE e PAS) para avaliar sinais precoces de retinopatia.

### 3.3.5. Angiotensinas

A quantificação de angiotensinas foi determinada no Laboratório de Rim e Hormônios da Disciplina de Nefrologia da UNIFESP sob orientação da Prof. Dra. Dulce Elena Casarini. Foram colhidas amostras no momento basal, 3 e 6 meses. A extração das angiotensinas plasmáticas foi realizada em colunas Oasis C<sub>18</sub> (Gen-Pak FAX Columns, Waters Corp, Milford, MA, EUA) previamente ativadas com metanol (5 mL), tetrahidrofurano (5 mL), hexano (5 mL) e água (10 mL), todos da Merck (Merck Chemicals, Darmstadt, Germany). Após a ativação, as amostras foram aplicadas nas colunas, lavadas com água e eluídas na mistura etanol/ácido acético/água na proporção 90%/4%/6%. Os eluatos foram então liofilizados, redissolvidos em 500 µL de fase móvel A (5% de acetonitrila em 0,1% de ácido ortofosfórico; Merck Chemicals, Darmstadt, Germany) e filtrados com membrana 0,22 µm para serem analisados por HPLC.

Os peptídeos foram separados em uma coluna de fase reversa Aquapore ODS 300 (250 x 4,6 mm), 7 µm (Brownlee NewGuard Cartridge Column RP-18, Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA), utilizando 5 min de gradiente isocrático seguido por 20 minutos de gradiente linear de 5% a 35% de fase móvel B (95% Acetonitrila em ácido trifluoroacético 0,1%; Merck Chemicals, Darmstadt, Germany), sob um fluxo de 1,5 mL/min por 40 minutos por HPLC.

As angiotensinas de cada amostra foram identificadas, comparando-as com o tempo de retenção das angiotensinas padrão no HPLC.

### 3.3.6. Atividade da Enzima Conversora da Angiotensina

A atividade da ECA foi mensurada no Laboratório de Rim e Hormônios da Disciplina de Nefrologia da UNIFESP. Foram colhidas amostras de soro nos momentos basal, 3 e 6 meses.

Determinada fluorimetricamente, em solução contendo hipuril-histidil-leucina (HHL, Sigma-Aldrich, Palo Alto, CA, EUA)<sup>(68)</sup> e Carbobenzoxy-fenilalanina-histidina-leucina (Z-Phe-His-Leu, Sigma-Aldrich, Palo Alto, CA, EUA)<sup>(68, 69)</sup> como substratos sintéticos para a ECA. O tampão padrão utilizado para os ensaios foi o borohidrato de



sódio 100 mM pH 8,3, contendo NaCl 300 mM e ZnSO<sub>4</sub> 0,1 mM (Merck Chemicals, Darmstadt, Germany).

Alíquotas dos soros (10 µL) dos coelhos foram incubadas a 37° C, com 200 µL do substrato ZPhe-HL, durante um período de 10 minutos, sendo que as reações enzimáticas foram interrompidas com 1,5 mL de NaOH 0,28 N. O dipeptídeo His-Leu liberado foi acoplado ao marcador fluorescente ortoftaldialdeído (20 mg/mL, em metanol), sendo a reação fluorimétrica interrompida após 10 minutos pela adição de 200 µL HCl 3 N (Merck Chemicals, Darmstadt, Germany). A seguir, a leitura da fluorescência (excitação: 360 nm; emissão: 500 nm) foi feita no espectrofluorímetro (Hitachi Spectrofluorometer F-2000, Hitachi, Tóquio, Japão).

### 3.4. Análise estatística

As variáveis categóricas foram comparadas entre os grupos pelo teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fisher, com partição; para as variáveis numéricas foram apresentadas as medidas descritivas e os *boxplots* ou barras. Os grupos foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo método de comparações múltiplas de *Tukey*, ou por análise de variância com medidas repetidas (GLM *repeated measures*) com pós-teste de *Bonferroni* através do *software* SPSS 11.5. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal pelo teste Kolmogorov-Smirnov, estas foram transformadas em logaritmo de base natural sendo posteriormente aplicados os testes mais adequados. Foram considerados significantes valores de  $p \leq 0,05$ , com intervalo de confiança de 95%.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Animais

Para o modelo de indução de DM tipo 2, foram incluídos 13 coelhos, entretanto um animal teve reação idiossincrásica ao anestésico e foi a óbito no terceiro mês durante procedimento para realização de AGF. Também utilizamos dois animais controle, normais e dois hipercolesterolêmicos para algumas análises oftalmológicas.

Para avaliar os efeitos dos medicamentos que bloqueiam o sistema renina angiotensina, foram incluídos 49 animais alocados aleatoriamente em 4 grupos, destes, 36 animais concluíram o protocolo. O grupo 1 foi composto dos mesmos animais utilizados para o desenvolvimento do modelo.

G1-12 coelhos

G2-10 coelhos

G3-11 coelhos

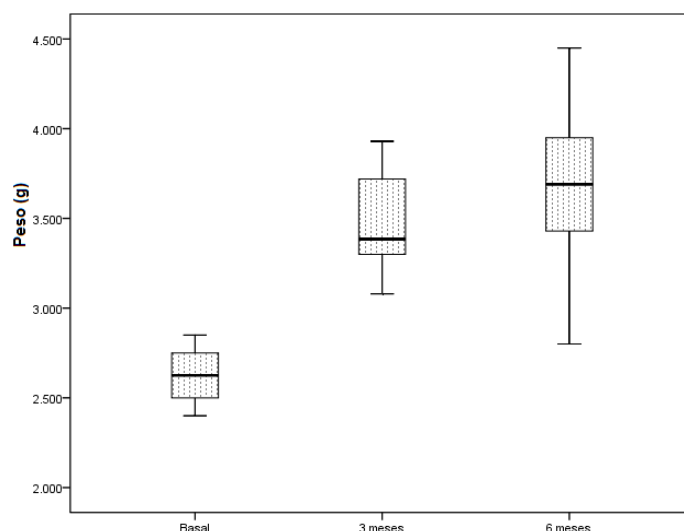
G4-03 coelhos

Em virtude da alta mortalidade ocorrida no grupo 4 (72%) antes de completarem os 3 meses de estudo e, por diferentes causas de óbito, os dados destes animais não foram utilizados para as análises estatísticas, mas estão descritos em caráter ilustrativo.

### 4.2. Peso

Os coelhos começaram a dieta (momento basal), após período de aclimação (15 dias), sem diferença de peso, e consumiram, em média, 100 g de ração por dia.

Avaliando apenas os animais utilizados para o desenvolvimento do modelo de DM tipo 2 (Grupo 1), com relação ao peso, houve ganho ponderal no terceiro mês, sendo mantido até o final do estudo (Figura 8).



GLM: tempos  $p < 0,001$ : basal vs. 3 e 6 meses ( $p < 0,001$ )  
 Figura 8. *Boxplots* da evolução do peso (g) no grupo 1

Comparando os animais em seus respectivos grupos, os que concluíram o protocolo ganharam peso significativo no primeiro trimestre, permanecendo estável até o final do protocolo. Não houve diferença entre os grupos (tabela 1), e o consumo de ração foi semelhante entre os animais.

**Tabela 1. DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS DE ACORDO COM O PESO (G) EM RELAÇÃO AO TEMPO**

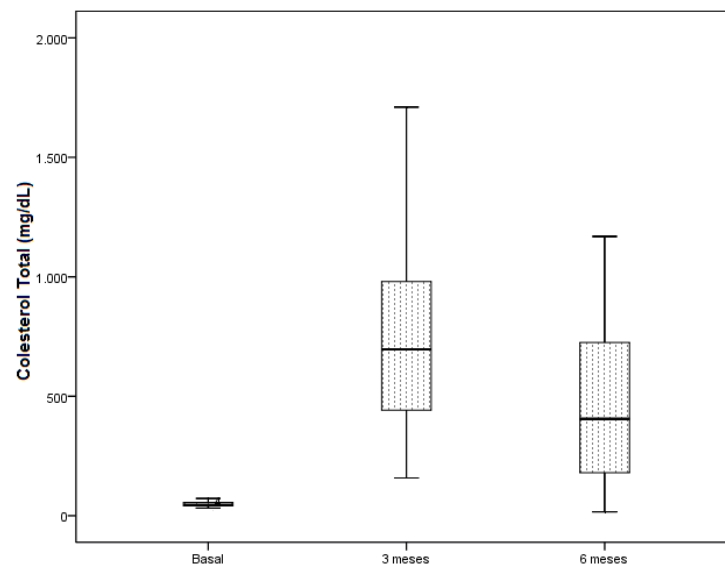
	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
<b>N</b>	12	10	11	3
<b>Peso (g) Basal (EPM)</b>	2617 (47)	2565 (51)	2740 (49)	2816 (94)
<b>Peso (g) 3 meses (EPM)</b>	3487 (96)	3525 (141)	3793 (1008)	3233 (192)
<b>Peso (g) 6 meses (EPM)</b>	3651 (121)	3600 (132)	3858 (126)	3760 (241)

GLM: tempos  $p < 0,001$ : peso basal < 3 meses ( $p < 0,001$ ) e 6 meses ( $p < 0,001$ ).  
 Grupos: G1=G2=G3 ( $p = 0,066$ ).

### 4.3. Perfil Lipídico

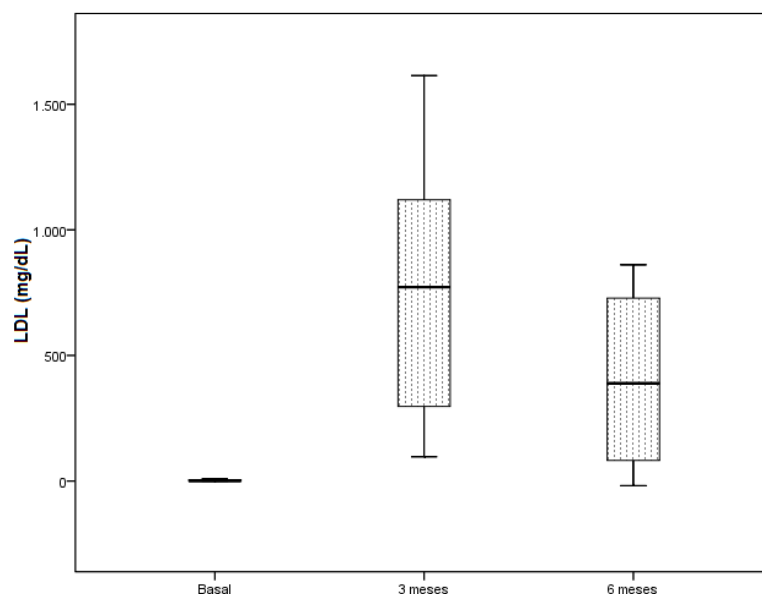
Neste modelo (Grupo 1) houve aumento dos níveis plasmáticos de colesterol total (figura 9) e LDL-C (figura 10) já no terceiro mês de dieta, com uma redução no 6º

mês, relacionada à redução do teor de colesterol adicionado à ração de 0,5% para 0,1% no 3º mês. O mesmo comportamento ocorreu quanto ao nível de colesterol total e LDL-C comparado entre os três grupos (tabela 2). Entretanto, os níveis séricos de HDL-C foram menores no sexto mês comparados ao momento basal e 3 meses, tanto isoladamente no grupo 1 (figura 11) como na comparação entre os três grupos (tabela 2).



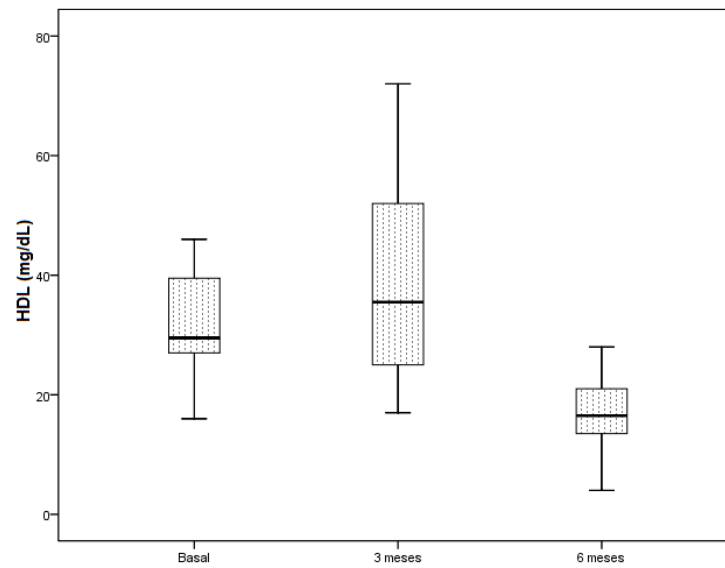
GLM: tempos  $p=0,02$ : Basal < 3 meses ( $p=0,001$ ) e 6 meses ( $p=0,005$ ); 3 meses > 6 meses ( $p=0,014$ ).

Figura 9. *Boxplots* da evolução dos níveis de Colesterol Total (mg/dL) no grupo 1



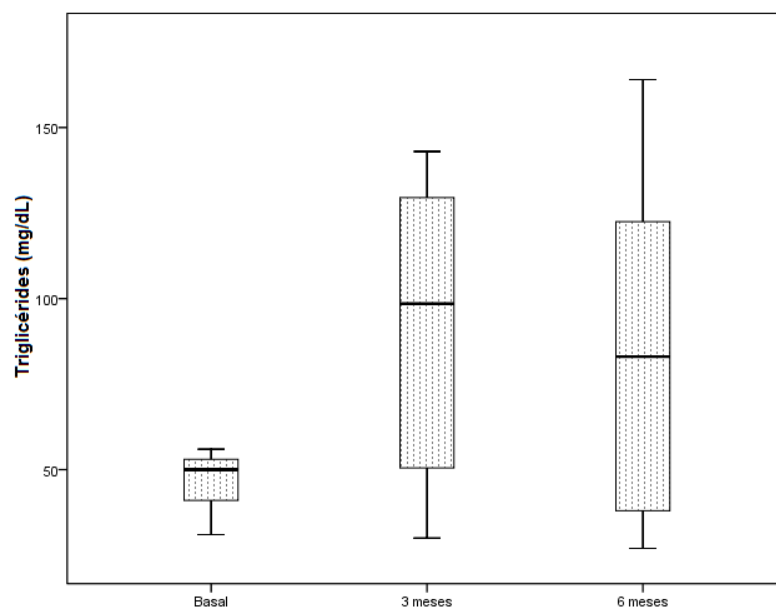
GLM: tempos  $p=0,001$ : Basal < 3 meses ( $p=0,001$ ) e 6 meses ( $p=0,004$ ); 3 meses > 6 meses ( $p=0,017$ ).

Figura 10. *Boxplots* da evolução dos níveis de LDL-C (mg/dL) no grupo 1



GLM: tempos  $p < 0,001$ : 6 meses  $<$  Basal  $p = 0,001$  e 3 meses  $p = 0,001$   
 Figura 11. *Boxplots* da evolução dos níveis de HDL-C (mg/dL) no grupo 1

Os níveis de triglicérides aumentaram no 3º mês sendo mantidos até o final do estudo, isoladamente no grupo 1 (figura 12) e na comparação entre os três grupos (tabela 2).



GLM: tempos  $p = 0,015$ : Basal  $<$  3meses ( $p = 0,004$ ) e 6 meses ( $p = 0,050$ )  
 Figura 12. *Boxplots* da evolução dos níveis de Triglicérides (mg/dL) no grupo 1

**Tabela 2. DISTRIBUIÇÃO DOS COELHOS DE ACORDO COM OS VALORES DE COLESTEROL TOTAL, FRAÇÕES E TRIGLICÉRIDES (mg/dL) EM RELAÇÃO AO TEMPO**

	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
<b>N</b>	12	10	11	3
<b>Colesterol total Basal (EPM)</b>	44 (3)	53 (4)	48 (4)	40 (7)
<b>Colesterol total 3meses (EPM)</b>	847 (116)	762 (127)	777 (142)	405 (231)
<b>Colesterol total 6meses (EPM)</b>	442 (96)	445 (105)	444 (117)	748 (192)
<b>LDL-C Basal (EPM)</b>	3 (2)	6 (2)	1 (2)	3 (3)
<b>LDL-C 3meses (EPM)</b>	788 (112)	714 (123)	727 (137)	347 (224)
<b>LDL-C 6meses (EPM)</b>	409 (94)	407 (103)	412 (115)	700 (188)
<b>HDL-C Basal (EPM)</b>	32 (3)	38 (3)	36 (3)	23 (5)
<b>HDL-C 3meses (EPM)</b>	39 (4)	29 (4)	29 (5)	19 (8)
<b>HDL-C 6meses (EPM)</b>	16 (2)	17 (2)	20 (2)	13 (4)
<b>Triglicérides Basal (EPM)</b>	48 (4)	44 (5)	50 (5)	67 (9)
<b>Triglicérides 3meses (EPM)</b>	92 (21)	98 (23)	104 (26)	191 (43)
<b>Triglicérides 6meses (EPM)</b>	83 (16)	99 (18)	58 (20)	175 (33)

GLM: **Colesterol total** – tempos  $p < 0,001$ : basal < 3 meses ( $p < 0,001$ ) e 6 meses ( $p < 0,001$ ); 3 meses > 6 meses ( $p = 0,002$ ). Grupos: G1=G2=G3 ( $p = 0,952$ ).

**LDL-C**– tempos  $p < 0,001$ : basal < 3 meses ( $p < 0,001$ ) e 6 meses ( $p < 0,001$ ). Grupos: G1=G2=G3 ( $p = 0,163$ ).

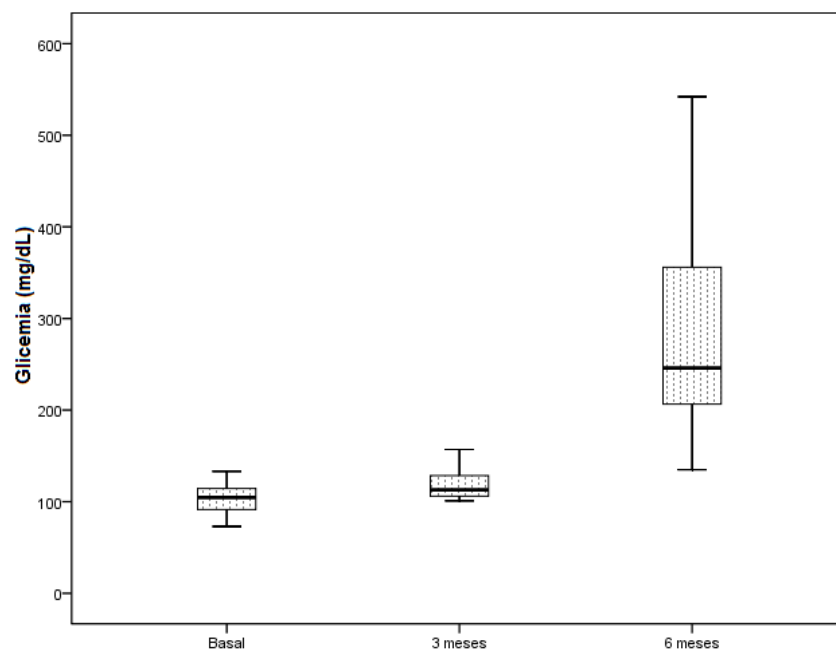
**HDL-C**– tempos  $p < 0,001$ : 6 meses < basal ( $p < 0,001$ ) e 3 meses ( $p < 0,001$ ) Grupos: G1=G2=G3 ( $p = 0,925$ ).

**Triglicérides**– tempos  $p = 0,001$ : basal < 3 meses ( $p = 0,004$ ) e 6 meses ( $p = 0,003$ ) Grupos: G1=G2=G3 ( $p = 0,794$ ).

## 4.4 Parâmetros glucometabólicos

### 4.4.1. Glicemia

Neste modelo experimental (G1) os níveis de glicemia aumentaram a cada trimestre (figura 13), mas considerando os valores da OMS<sup>(7)</sup> os animais puderam ser considerados diabéticos apenas no sexto mês (média 289 mg/dL EPM 39).



GLM: tempos  $p=0,001$ : Basal < 3meses ( $p=0,050$ ) e 6 meses ( $p=0,002$ ); 3meses < 6meses ( $p=0,004$ ).

Figura 13. *Boxplots* da evolução dos níveis de Glicemia (mg/dL) no grupo 1

Realizando a análise entre os três grupos, também foi verificado que houve aumento a cada três meses nos níveis glicêmicos em jejum de 12 horas, mas também, apenas no sexto mês os grupos apresentavam valores compatíveis com diabetes. De fato, o grupo 1 apresentou níveis mais elevados de glicemia no sexto mês em relação aos grupos 2 e 3 (tabela 3).

**Tabela 3. DISTRIBUIÇÃO DOS COELHOS DE ACORDO COM OS VALORES DE GLICEMIA (mg/dL) EM RELAÇÃO AO TEMPO**

	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
<b>N</b>	12	10	11	3
<b>Glicemia (mg/dL) Basal (EPM)</b>	104 (6)	111 (9)	91 (8)	106 (13)
<b>Glicemia (mg/dL) 3meses (EPM)</b>	118 (5)	122 (7)	124 (6)	148 (10)
<b>Glicemia (mg/dL) 6meses (EPM)</b>	289 (31)	161 (44)	182 (39)	228 (63)

GLM: tempos  $p < 0,001$ : Basal < 3 meses ( $p = 0,001$ ) e 6 meses ( $p < 0,001$ ); 3 meses < 6 meses ( $p = 0,002$ ). Grupos  $p = 0,048$ : G1 > G2 ( $p = 0,046$ ) e G3 ( $p = 0,035$ ); G2 = G3 ( $p = 0,961$ ).

No momento do sacrifício foi realizada curva glicêmica nos tempos 0, 2, 5, 10 e 15 minutos para avaliar a resposta de liberação rápida de insulina pelo pâncreas. Na figura 14 podemos verificar o rápido aumento dos valores de glicemia no grupo 1 (AUC 105931 EPM 54160). Nas figuras 15, 16 e 17 verificamos o mesmo comportamento nos grupos 2 (AUC 83175 EPM 16140), 3 (AUC 81416 EPM 43718) e 4 (AUC 93639 EPM 41029) respectivamente (ANOVA: G1=G2=G3  $p = 0,879$ ). As áreas sob as curvas foram calculadas pela soma das áreas dos trapézios.

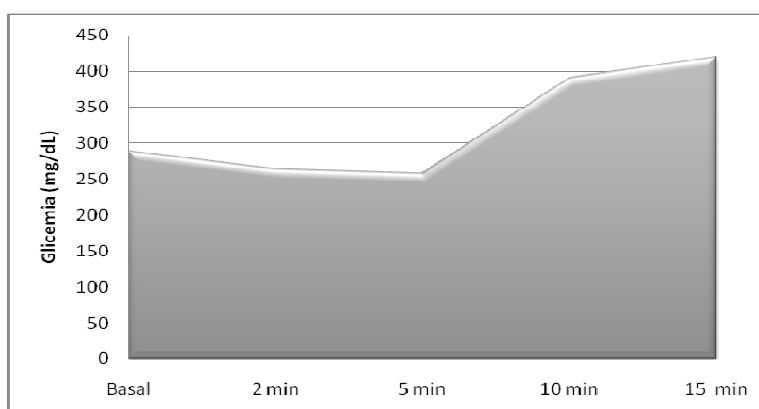


Figura 14. Área sob a curva dos valores de Glicemia (mg/dL) no grupo 1



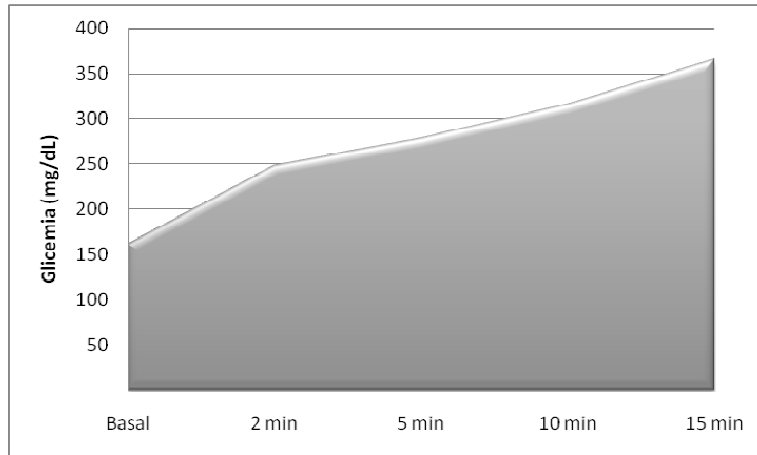


Figura 15. Área sob a curva dos valores de Glicemia (mg/dL) no grupo 2

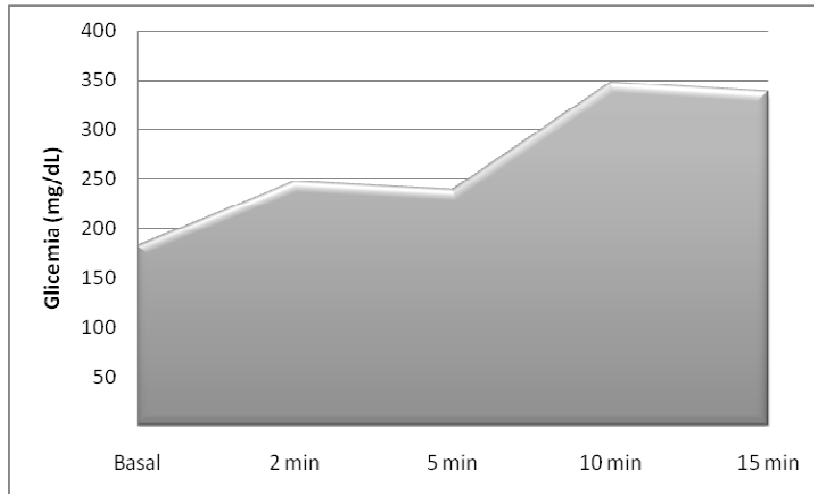


Figura 16. Área sob a curva dos valores de Glicemia (mg/dL) no grupo 3

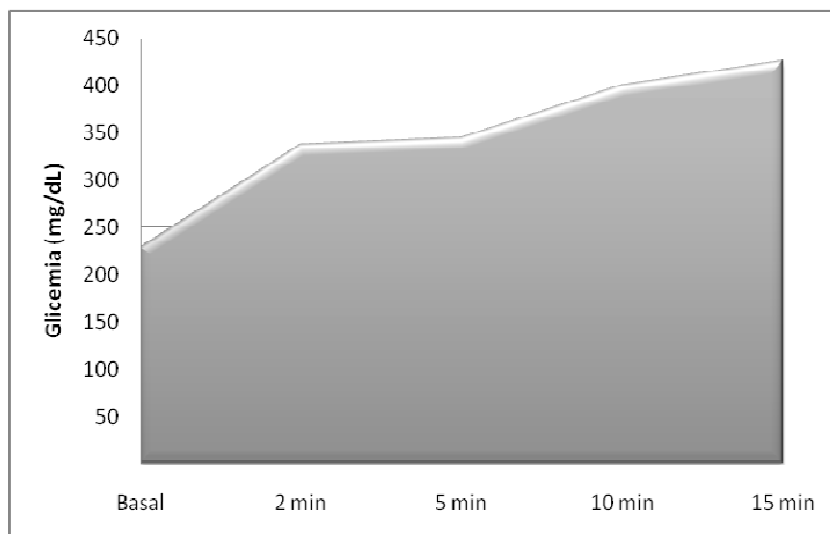
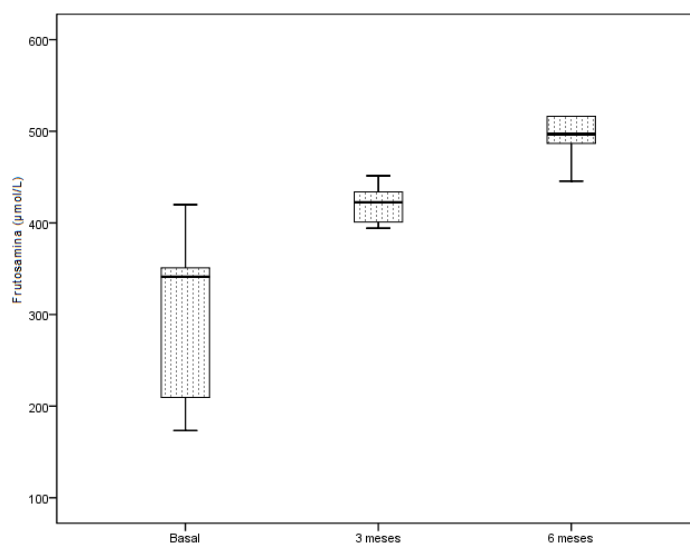


Figura 17. Área sob a curva dos valores de Glicemia (mg/dL) no grupo 4

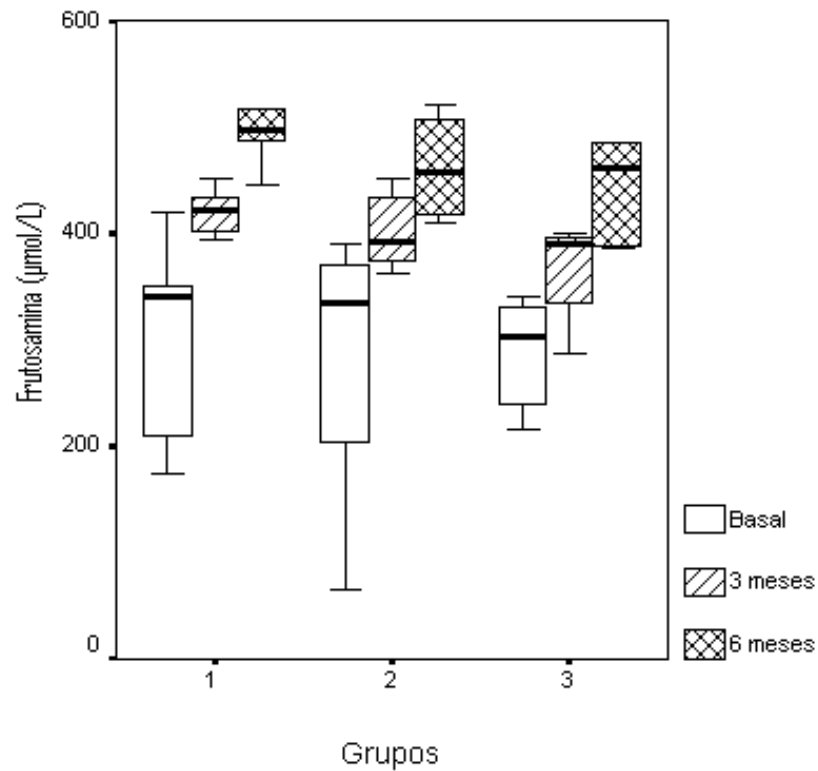
#### 4.4.2. Frutosamina

O grupo que recebeu apenas dieta rica em gordura, colesterol e açúcar (G1) apresentou níveis de frutosamina maiores a cada período (figura 14). O mesmo comportamento foi apresentado com relação aos níveis de frutosamina entre os três grupos, e apesar dos níveis de glicemia terem sido maiores no grupo 1, estas diferenças não foram significantes (figura 15). O grupo 4 apresentou valor basal igual a 120 (31), aumentando com 3 meses 353 (6) sendo mantido até o sexto mês 366 (2).



GLM: tempos  $p=0,001$ : Basal < 3meses ( $p=0,004$ ) e 6 meses ( $p=0,001$ );  
3meses < 6meses ( $p=0,005$ ).

Figura 18. *Boxplots* da evolução dos níveis de Frutosamina ( $\mu\text{mol/L}$ ) no grupo 1



GLM: tempos  $p < 0,001$ : Basal < 3meses ( $p < 0,001$ ) e 6 meses ( $p < 0,001$ ); 3meses < 6meses ( $p < 0,001$ ). Grupos: G1=G2=G3 ( $p = 0,797$ )

Figura 19. *Boxplots* da evolução dos níveis de Frutosamina ( $\mu\text{mol/L}$ ) entre os três grupos

#### 4.4.3. Insulina

Não houve diferença entre os valores de insulina no grupo de indução de DM tipo 2 (G1) no decorrer do estudo (GLM:  $p = 0,187$ ). Os níveis de insulina também não diferiram na análise realizada entre os três grupos, nem em relação ao tempo de indução ou tratamento (tabela 4).

**Tabela 4. DISTRIBUIÇÃO DOS COELHOS DE ACORDO COM OS VALORES DE INSULINA ( $\mu\text{UI}/\text{mL}$ ) EM RELAÇÃO AO TEMPO**

	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
<b>N</b>	12	10	11	3
<b>Insulina (<math>\mu\text{UI}/\text{mL}</math>) Basal (EPM)</b>	2,9 (0,5)	2,3 (0,6)	2,8 (0,6)	7,2 (1,7)
<b>Insulina (<math>\mu\text{UI}/\text{mL}</math>) 3meses (EPM)</b>	1,8 (0,4)	4,0 (0,4)	2,3 (0,4)	9,6 (2,0)
<b>Insulina (<math>\mu\text{UI}/\text{mL}</math>) 6meses (EPM)</b>	1,9 (0,2)	2,1 (0,2)	2,0 (0,2)	4,9 (1,0)

GLM: tempos  $p=0,142$ . Grupos:  $G1=G2=G3$  ( $p=0,130$ ).

No momento do sacrifício foi realizada curva de insulina nos tempos 0, 2, 5, 10 e 15 minutos. Na figura 20 podemos verificar o rápido aumento dos valores de glicemia no grupo 1 (AUC 3,10 EPM 0,38). Nas figuras 21, 22 e 23 verificamos o mesmo comportamento nos grupos 2 (AUC 2,20 EPM 0,67), 3 (AUC 9,60 EPM 11,52) e 4 (AUC 15,90 EPM 12,03) respectivamente (ANOVA:  $G1=G2=G3$   $p=0,136$ ). As áreas sob as curvas foram calculadas pela soma das áreas dos trapézios.

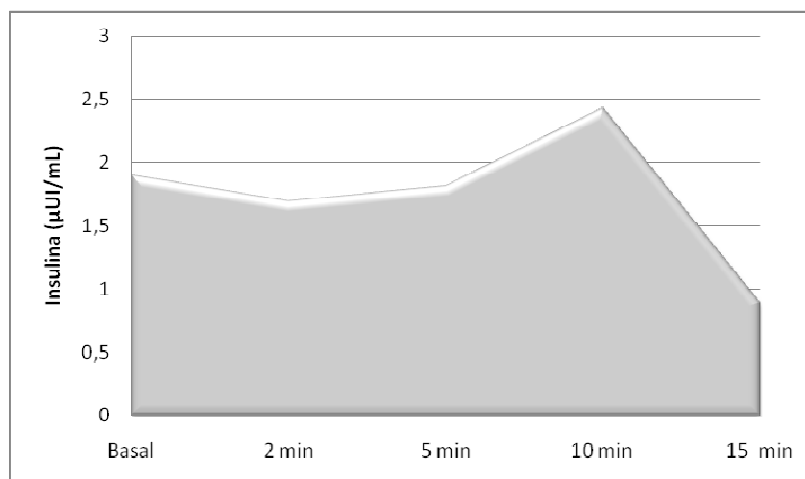


Figura 20. Área sob a curva dos valores de Insulina ( $\mu\text{UI}/\text{mL}$ ) no grupo 1

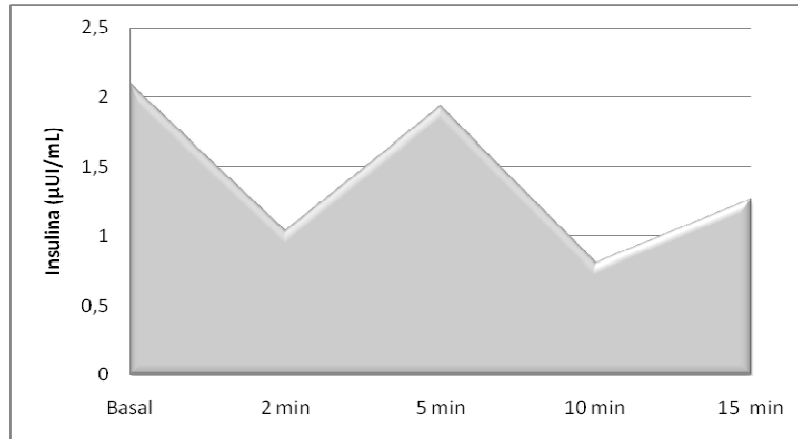


Figura 21. Área sob a curva dos valores de Insulina (µUI/mL) no grupo 2

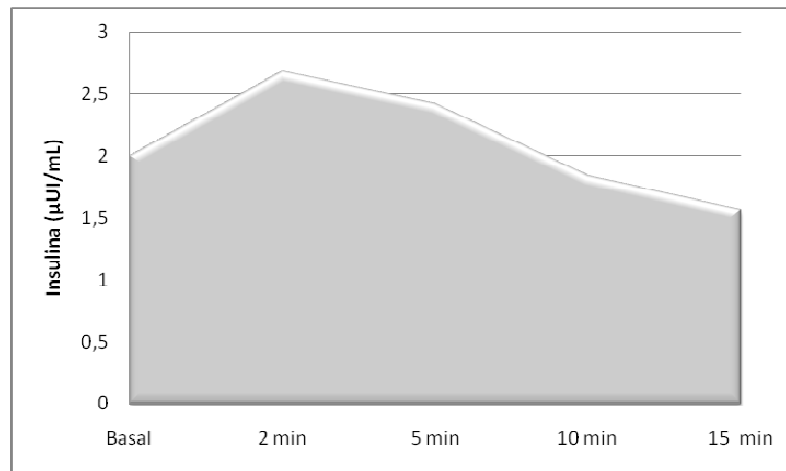


Figura 22. Área sob a curva dos valores de Insulina (µUI/mL) no grupo 3

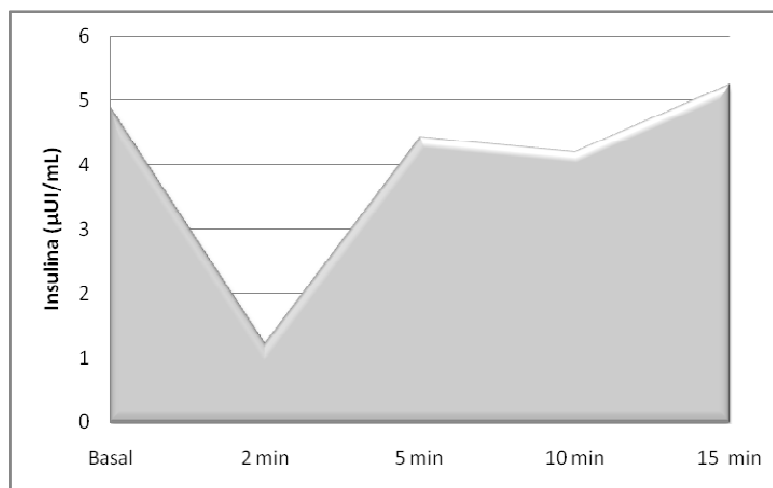
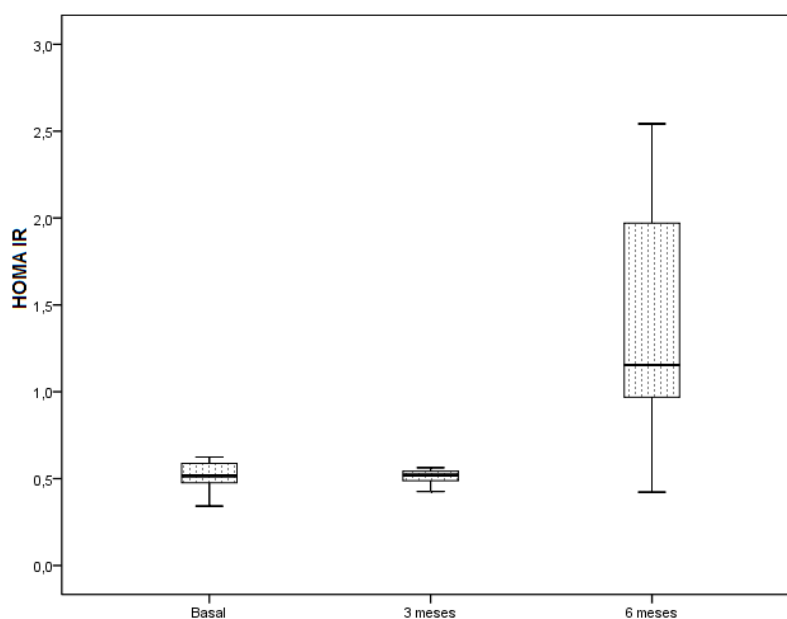


Figura 23. Área sob a curva dos valores de Insulina (µUI/mL) no grupo 4

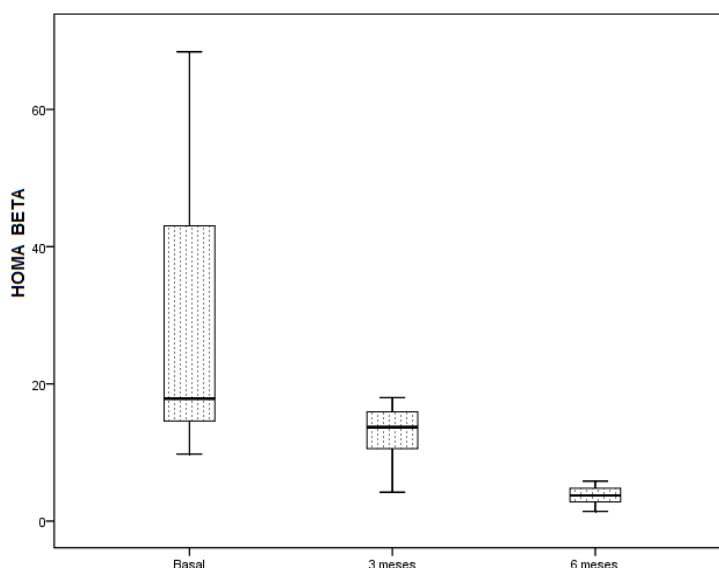
#### 4.4.4. Cálculo de índices de resistência à insulina e de função de células beta

O índice de HOMA-IR no Grupo 1 foi maior aos 6 meses comparados ao terceiro mês (figura 17), e o HOMA- $\beta$  quando analisado somente no grupo de indução do modelo (G1), foi diminuindo a cada período (figura 18).



GLM: tempos  $p=0,010$ : 3 meses < 6 meses ( $p<0,001$ )

Figura 24. Boxplots da evolução dos valores de HOMA IR no grupo 1



GLM: tempos  $p<0,001$ : basal > 3meses ( $p=0,004$ ) e 6 meses ( $p<0,001$ ); 3 meses > 6 meses ( $p=0,001$ )

Figura 25. Boxplots da evolução dos valores de HOMA  $\beta$  no grupo 1

Analisando conjuntamente os três grupos, não houve diferença no modelo de HOMA-IR entre os grupos no decorrer do protocolo (tabela 5), índice que avalia resistência à insulina.

Entretanto o HOMA- $\beta$ , que avalia a função das células beta pancreáticas, apresentou níveis maiores no momento basal e estes valores foram caindo significativamente a cada trimestre. Houve ainda diferença entre o grupo de indução do modelo e o grupo de animais que fazia uso de inibidor da ECA, o G1 apresentou níveis de HOMA- $\beta$  menores comparados ao G3 (tabela 5).

**Tabela 5. DISTRIBUIÇÃO DOS COELHOS DE ACORDO COM OS ÍNDICES DE HOMA-IR E HOMA-B EM RELAÇÃO AO TEMPO**

	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
<b>N</b>	12	10	11	3
<b>HOMA-IR (mg/dL)</b> <b>Basal (EPM)</b>	0,74 (0,19)	0,57 (0,09)	0,62 (0,12)	1,29 (0,47)
<b>HOMA-IR (mg/dL)</b> <b>3meses (EPM)</b>	0,50 (0,02)	1,46 (0,30)	0,74 (0,13)	3,44 (2,65)
<b>HOMA-IR (mg/dL)</b> <b>6meses (EPM)</b>	1,39 (0,20)	0,78 (0,09)	0,86 (0,16)	1,79 (0,87)
<b>HOMA-<math>\beta</math> (mg/dL)</b> <b>Basal (EPM)</b>	28,26 (5,65)	29,23 (6,32)	46,62 (12,77)	30,52 (11,62)
<b>HOMA-<math>\beta</math> (mg/dL)</b> <b>3meses (EPM)</b>	12,24 (1,27)	30,80 (5,25)	15,97 (3,60)	42,14 (33,60)
<b>HOMA-<math>\beta</math> (mg/dL)</b> <b>6meses (EPM)</b>	4,03 (0,63)	13,58 (6,12)	9,64 (2,31)	29,61 (27,30)

GLM: HOMA-IR - tempos  $p=0,168$ . Grupos: G1=G2=G3 ( $p=0,285$ ).

GLM: HOMA- $\beta$  - tempos  $p=0,004$ : basal > 3 meses ( $p=0,05$ ) e 6 meses ( $p=0,002$ ); 3 meses > 6 meses ( $p=0,020$ ). Grupos  $p=0,029$ : G1<G3 ( $p=0,038$ ).

## 4.5. Função Hepática

### 4.5.1. ALT, AST e GGT

Em relação às enzimas hepáticas, os níveis de AST não se modificaram durante o estudo no grupo 1 (GLM  $p=0,524$ ), bem como os níveis de GGT (GLM  $p=0,478$ ). Entretanto, no G1 os níveis de ALT foram menores aos seis meses comparados aos três meses e ao momento basal (figura 26). Quando realizada a comparação entre os três grupos, foi observado o mesmo comportamento em relação às enzimas AST, GGT (tabela 6) e ALT, além do grupo 1 apresentar níveis mais altos de ALT comparados ao G2 (figura 27).

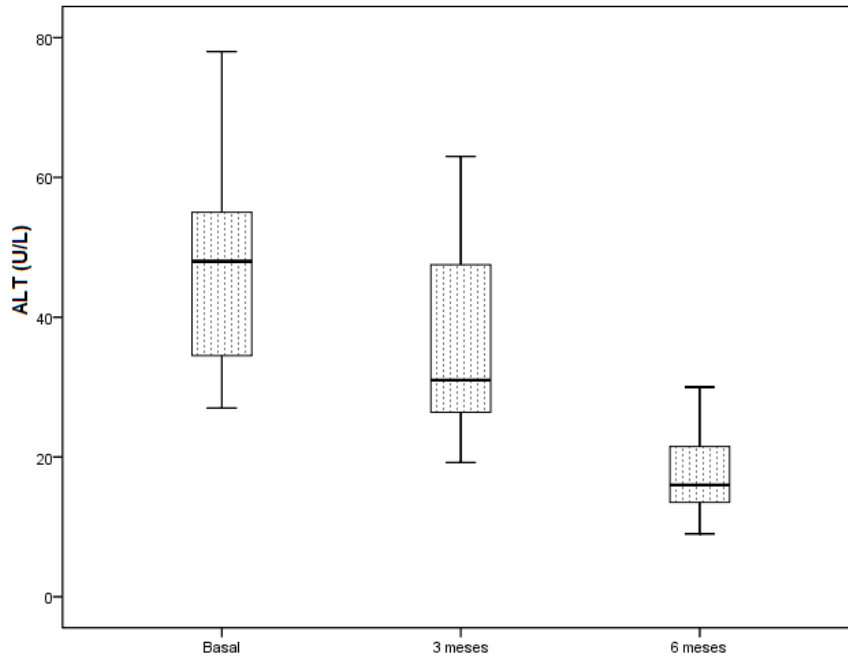
**Tabela 6. DISTRIBUIÇÃO DOS COELHOS DE ACORDO COM OS ÍNDICES de AST e GGT EM RELAÇÃO AO TEMPO**

	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
<b>N</b>	12	10	11	3
<b>AST (U/L) Basal (EPM)</b>	34 (4)	31 (5)	37 (5)	25 (8)
<b>AST (U/L) 3meses (EPM)</b>	38 (3)	29 (4)	30 (6)	28 (7)
<b>AST (U/L) 6meses (EPM)</b>	41 (3)	43 (3)	45 (3)	44 (5)
<b>GGT (U/L) Basal (EPM)</b>	6 (1)	5 (1)	6 (1)	6 (1)
<b>GGT (U/L) (mg/dL) 3meses (EPM)</b>	5 (1)	5 (1)	5 (1)	4 (1)
<b>GGT (U/L) (mg/dL) 6meses (EPM)</b>	5 (1)	5 (1)	5 (2)	5 (2)

GLM: AST - tempos  $p=0,166$ . Grupos: G1=G2=G3  $p=0,274$

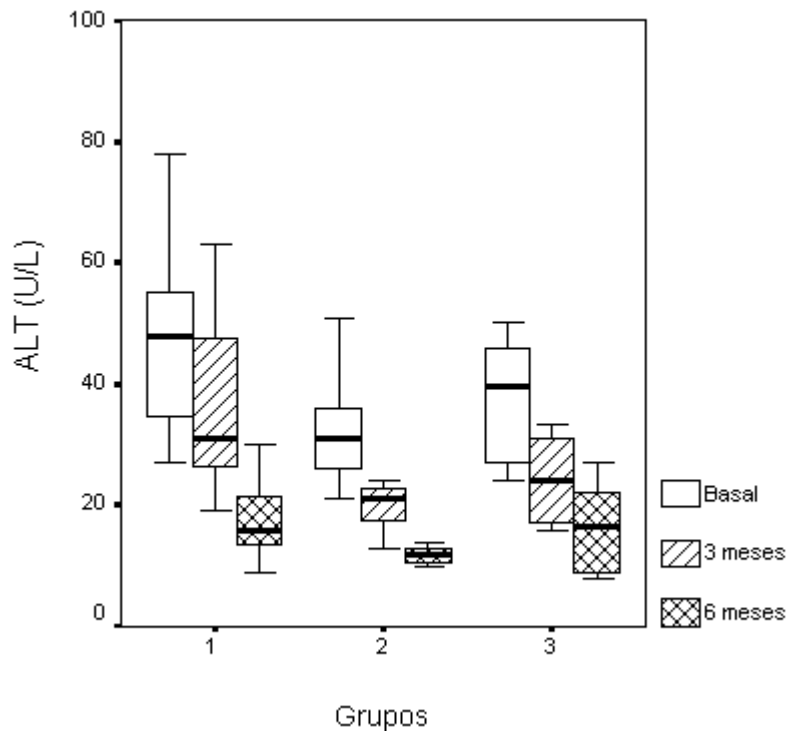
GGT - tempos  $p=0,450$ . Grupos: G1=G2=G3  $p=0,901$





GLM: tempos  $p=0,001$ : basal > 6 meses ( $p<0,001$ ); 3 meses > 6 meses ( $p=0,002$ )

Figura 26. Boxplots da evolução dos valores de ALT no grupo 1

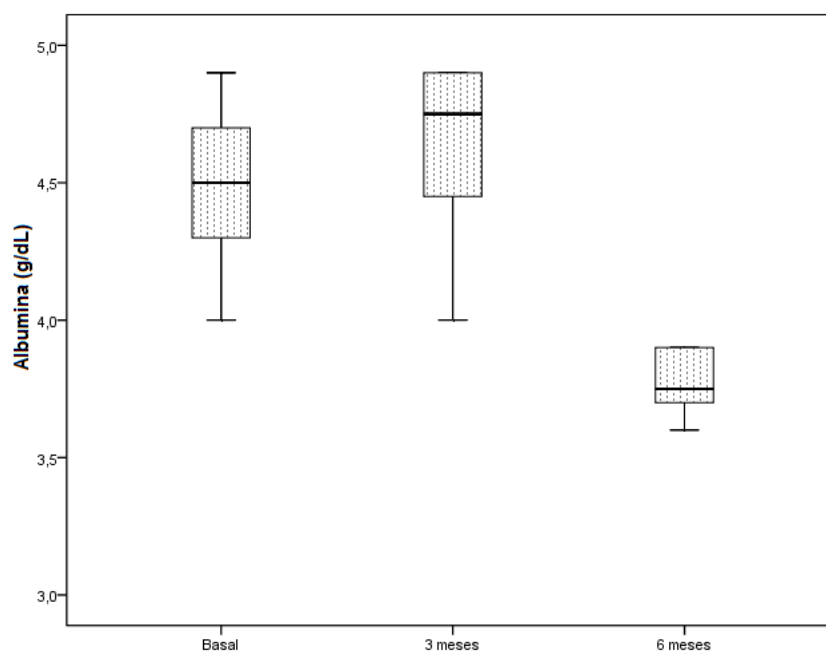


GLM: tempos  $p<0,001$ : basal > 3 meses ( $p<0,001$ ) e 6 meses ( $p<0,001$ ); 3 meses > 6 meses ( $p=0,013$ ); Grupos  $p=0,010$ : G1 > G2 ( $p=0,010$ ).

Figura 27. Evolução dos valores de ALT entre os três grupos

#### 4.5.2. Albumina Sérica

Os níveis de albumina sérica foram menores no sexto mês de indução de dieta no grupo 1 (figura 28) em relação ao momento basal e 3 meses; o mesmo comportamento ocorreu com relação ao tempo quando a análise foi realizada entre os três grupos, e não houve diferença entre os tratamentos (tabela 5).



GLM: tempos  $p < 0,001$ : basal > 6 meses ( $p < 0,001$ ); 3 meses > 6 meses ( $p < 0,001$ )

Figura 28. *Boxplots* da evolução dos valores de Albumina no grupo 1

**Tabela 7. DISTRIBUIÇÃO DOS COELHOS DE ACORDO COM OS NÍVEIS DE ALBUMINA (g/dL) E TEMPO**

	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
<b>N</b>	12	10	11	3
<b>Albumina Basal (EPM)</b>	4,5 (0,8)	4,6 (0,1)	4,3 (0,1)	4,3 (0,2)
<b>Albumina 3meses (EPM)</b>	4,6 (0,1)	4,4 (0,1)	4,4 (0,1)	4,4 (0,2)
<b>Albumina 6meses (EPM)</b>	3,8 (0,1)	3,7 (0,1)	3,6 (0,1)	3,9 (0,2)

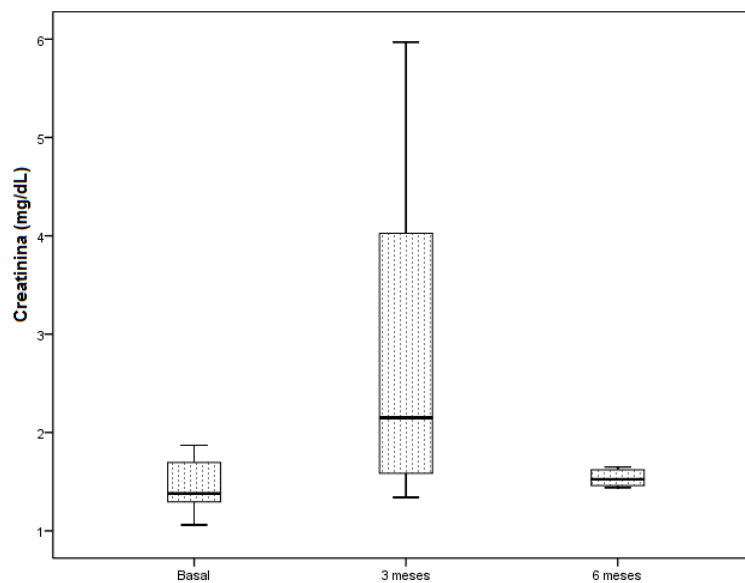
GLM: tempos  $p < 0,001$ : 6 meses < basal ( $p < 0,001$ ) e 3 meses ( $p < 0,001$ ).

Grupos: G1=G2=G3  $p = 0,279$ .

## 4.6. Função Renal

### 4.6.1. Creatinina Sérica

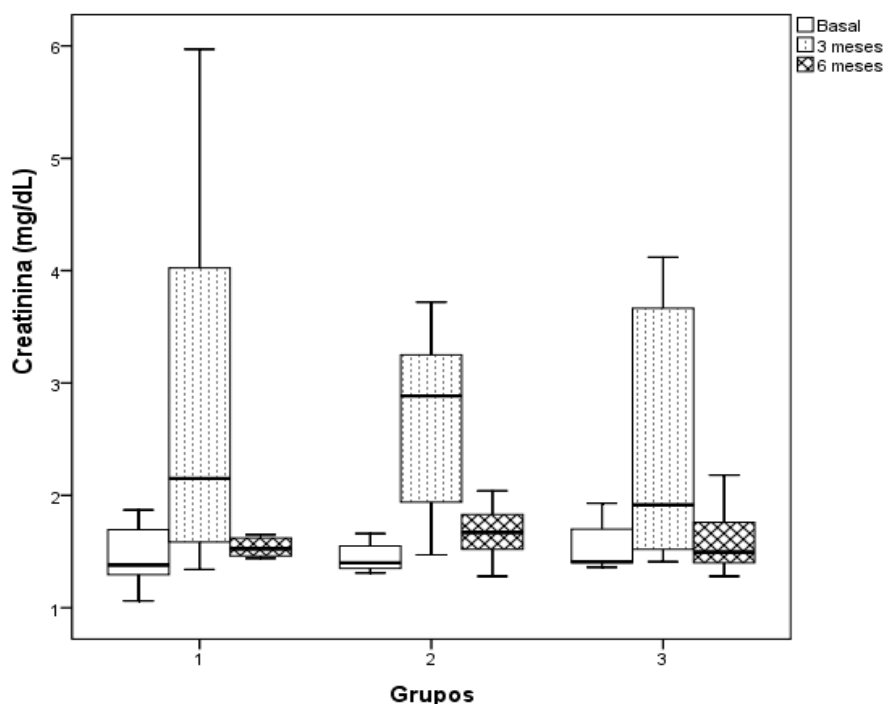
No grupo de animais com diabetes (G1), os níveis de creatinina sérica foram mais elevados aos três meses (2,85 EPM 0,44) em relação ao momento basal (1,46 EPM 0,70) e aos seis meses (1,56 EPM 0,81) (figura 29).



GLM: tempos  $p=0,011$ : basal < 3 meses ( $p=0,025$ ) meses; 3 meses > 6 meses ( $p=0,041$ )

Figura 29. *Boxplots* da evolução dos valores de Creatinina (mg/dL) no grupo 1

Entretanto, na análise realizada entre os três grupos, os níveis de creatinina foram menores no basal em relação a 3 meses e a 6 meses, além do grupo 4 apresentar níveis mais elevados em relação aos demais grupos (figura 30).



GLM: tempos  $p < 0,001$ : basal < 3 meses ( $p < 0,001$ ) e 6 meses ( $p < 0,001$ ).

Grupos  $p < 0,001$ : G4 > G1, G2 e G3 ( $p < 0,001$ )

Figura 30. *Boxplots* da evolução dos valores de Creatinina Sérica (mg/dL) entre os três grupos

#### 4.6.2. Albumina, Creatinina e Nítrito Urinário

Os nitritos urinários não foram detectados nos animais dos grupos estudados no momento do sacrifício. Os valores de albumina e creatinina urinárias (tabela 8), dosados uma única vez no momento do sacrifício, não diferiram entre os grupos 1, 2 e 3.

**Tabela 8. VALORES DE ALBUMINA (mg/L) E CREATININA (mg/L) URINÁRIAS NOS QUATRO GRUPOS**

	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
<b>N</b>	12	10	11	3
<b>Albumina (EPM)</b>	27 (7)	31 (9)	15 (4)	19 (6)
<b>Creatinina (EPM)</b>	2104 (289)	2462 (332)	1929 (299)	1527 (384)

ANOVA: Albumina Urinária - Grupos: G1=G2=G3  $p=0,250$ .

ANOVA: Creatinina Urinária- Grupos: G1=G2=G3  $p=0,482$ .

#### 4.6.3. Microalbuminúria

Segundo a Associação Americana de Diabetes<sup>(20)</sup> os níveis de microalbuminúria podem ser analisados em amostra isolada de urina, na equação de níveis de albumina (mg) por creatinina (g). Considerando esta fórmula, neste estudo nenhum grupo apresentou microalbuminúria, além de não haver diferença entre eles (tabela 9). De fato, apenas 4 animais apresentaram taxa maior que 30mg/g, dois coelhos do G1, um do G2 e outro do G4.

**Tabela 9. Distribuição dos Coelhos de Acordo com os Valores da Taxa de Albumina sobre Creatinina (mg/g) Urinária**

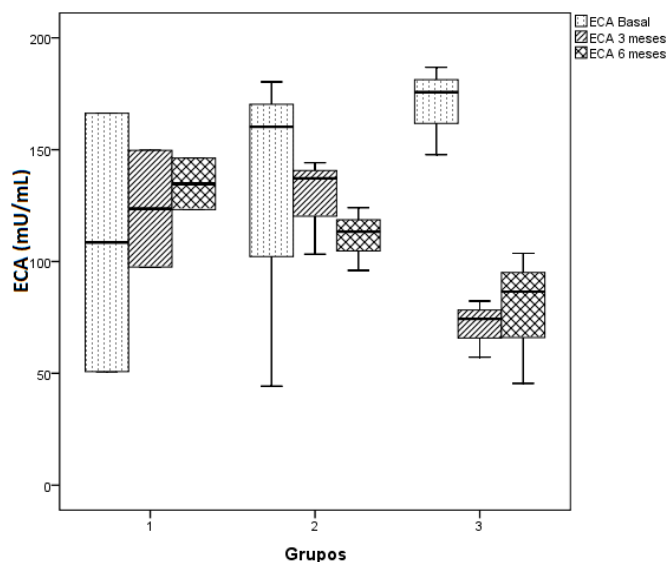
	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
N	12	10	11	3
Albumina / Creatinina (EPM)	13,8 (3,9)	12,7 (3,1)	7,7 (2,1)	16,8 (8,6)

ANOVA: Grupos: G1=G2=G3  $p=0,367$ .

#### 4.7. Sistema Renina Angiotensina

##### 4.7.1. Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)

No modelo de desenvolvimento de DM tipo 2 (G1), os níveis de atividade da ECA não se alteraram ao longo do estudo, permanecendo constantes (GLM  $p=0,818$ ). Quando a análise foi realizada entre os três grupos, não foi observado alteração dos níveis desta enzima ao longo do período, mas os Grupos 1 e 2 apresentaram valores mais elevados comparados ao grupo que fez uso de inibidor da ECA (figura 31). O grupo 4 apresentou valores médios iguais a 166 mU/mL (21) no momento basal, 95 mU/mL (27) aos três meses e 76 mU/mL (18) aos seis meses.



GLM: tempos  $p=0,295$ . Grupos  $p=0,048$ : G1 e G2 >G3 ( $p=0,023$ )  
 Figura 31. *Boxplots* da evolução dos valores de ECA (mU/mL) nos três grupos

#### 4.7.2. Angiotensinas

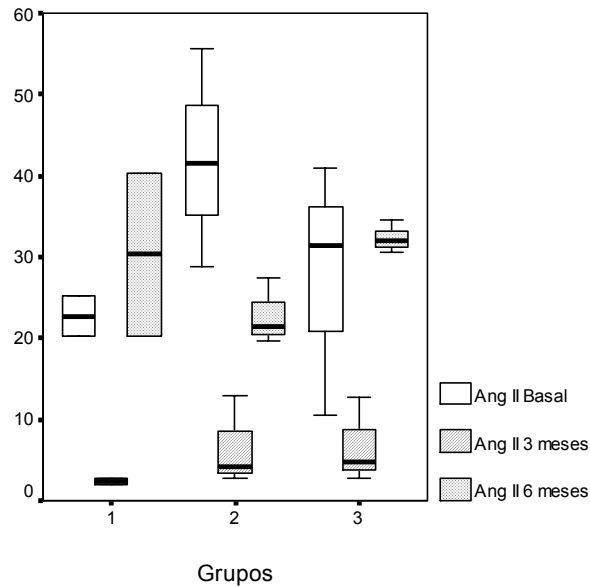
No grupo de animais com DM tipo 2 (G1), as concentrações de Ang I ( $p=0,701$ ), Ang II ( $p=0,229$ ) e Ang 1-7 ( $p=0,290$ ) não se alteraram ao longo do protocolo (tabela 10).

**Tabela 10. Distribuição dos Coelhos de Acordo com os Valores de Ang I, Ang II e Ang 1-7 (pmol/mL) em Relação ao Tempo**

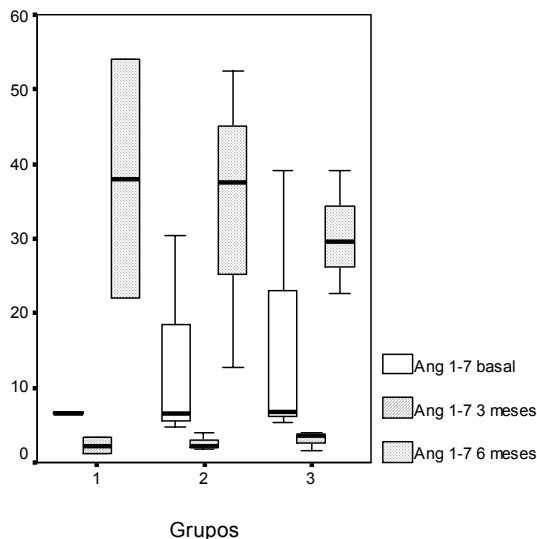
	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
n	12	10	11	3
Ang I Basal (EPM)	55 (34)	27 (27)	72 (27)	23 (23)
Ang I 3 meses (EPM)	49 (17)	28 (14)	50 (14)	34 (13)
Ang I 6 meses (EPM)	31 (6)	22 (54)	24 (5)	46 (9)
Ang II Basal (EPM)	22 (9)	42 (8)	28 (7)	37 (8)
Ang II 3 meses (EPM)	2 (3)	7 (3)	7 (3)	8 (2)
Ang II 6 meses (EPM)	30 (5)	23 (4)	32 (4)	66 (10)
Ang 1-7 Basal (EPM)	6 (11)	14 (9)	17 (9)	3 (7)
Ang 1-7 3 meses (EPM)	2 (1)	3 (1)	3 (1)	7 (3)
Ang 1-7 6 meses (EPM)	38 (12)	34 (10)	31(9)	37 (9)

GLM: Ang I: tempos  $p= 0,263$ . Grupos: G1=G2=G3  $p=0,472$   
 Ang II tempos  $p=0,005$ : 3 meses < 6 meses  $p=0,003$ . Grupos: G1=G2=G3  $p=0,656$   
 Ang 1-7: tempos  $p=0,009$ : Basal < 6 meses  $p=0,027$ ; 3 meses < 6 meses  $p=0,010$ .  
 Grupos: G1=G2=G3  $p=0,987$

Quando a análise foi realizada entre os três grupos, não foi observada alteração nos níveis de Ang I com relação ao tempo e entre os grupos (figura 35). Os níveis de Ang II (figura 36) e Ang 1-7 (figura 37) não diferiram entre os três grupos, entretanto foram maiores no 6° mês em relação ao 3°. Além disso, os valores de Ang 1-7 também foram maiores no 6° mês em relação ao momento basal.



GLM: tempos  $p=0,005$ : 3 meses < 6 meses ( $p=0,003$ ). Grupos:  $G1=G2=G3$   
 $p=0,656$   
 Figura 32. *Boxplots* da evolução dos valores de Angiotensina II (pmol/mL) nos três grupos



GLM: tempos  $p=0,009$ : Basal < 6 meses ( $p=0,027$ ); 3 meses < 6 meses ( $p=0,010$ ). Grupos:  $G1=G2=G3$   $p=0,987$   
 Figura 33. *Boxplots* da evolução dos valores de Angiotensina 1-7 (pmol/mL) nos três grupos

## 4.8. Análise Patológica

### 4.8.1. Placa, Proliferação de Células Musculares Lisas, Infiltrado de Macrófagos e Presença de Colágeno em Aorta

Não houve diferença entre os grupos em relação à porcentagem de placa na aorta (figura 34), porcentagem de células musculares lisas e presença de infiltrado de macrófagos na íntima, e relação íntima/média (I/M) (figura 35 e tabela 11).

**Tabela 11. Distribuição dos Coelhos de Acordo com os Valores de Análise Patológica da Aorta**

	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
<b>N</b>	12	10	11	3
<b>% Placa (EPM)</b>	32,97 (7,71)	33,10 (8,64)	38,64 (7,48)	5,98 (1,70)
<b>% Íntima / Média (EPM)</b>	71,49 (14,08)	59,34 (14,18)	69,75 (10,60)	6,66 (1,29)
<b>% Células musculares lisas na íntima (EPM)</b>	10,40 (1,99)	9,71 (2,53)	10,32 (2,12)	10,92 (1,73)
<b>% Macrófagos na íntima (EPM)</b>	41,28 (6,81)	25,94 (7,17)	38,11 (5,77)	45,94 (11,07)

Kruskal Wallis: % Placa G1=G2=G3  $p=0,783$

% Intima / Média G1=G2=G3  $p=0,798$

% célula muscular lisa na íntima G1=G2=G3  $p=0,919$

% macrófago na íntima G1=G2=G3  $p=0,432$

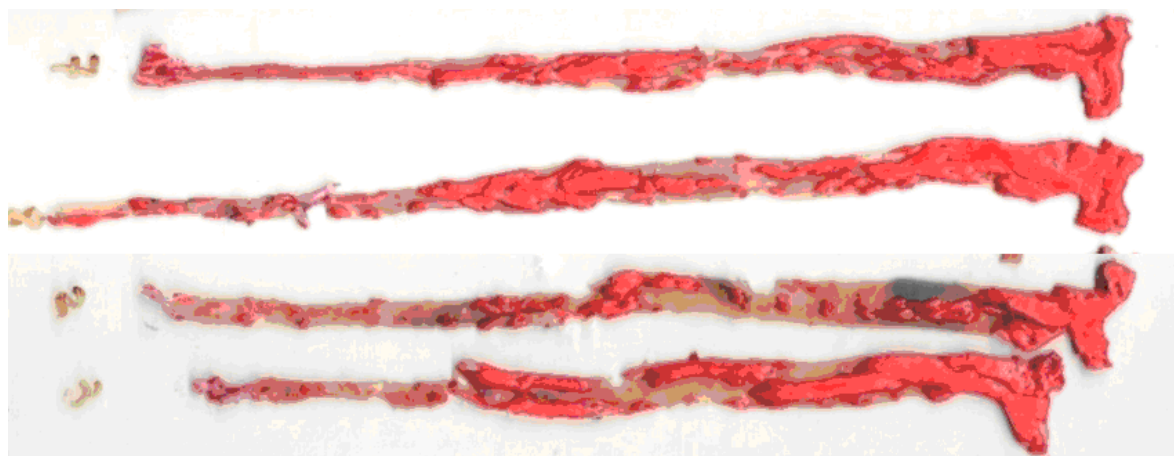


Figura 34. Espécimes de aortas de coelho abertas longitudinalmente e coradas com Sudan III evidenciando placas ateroscleróticas em vermelho.



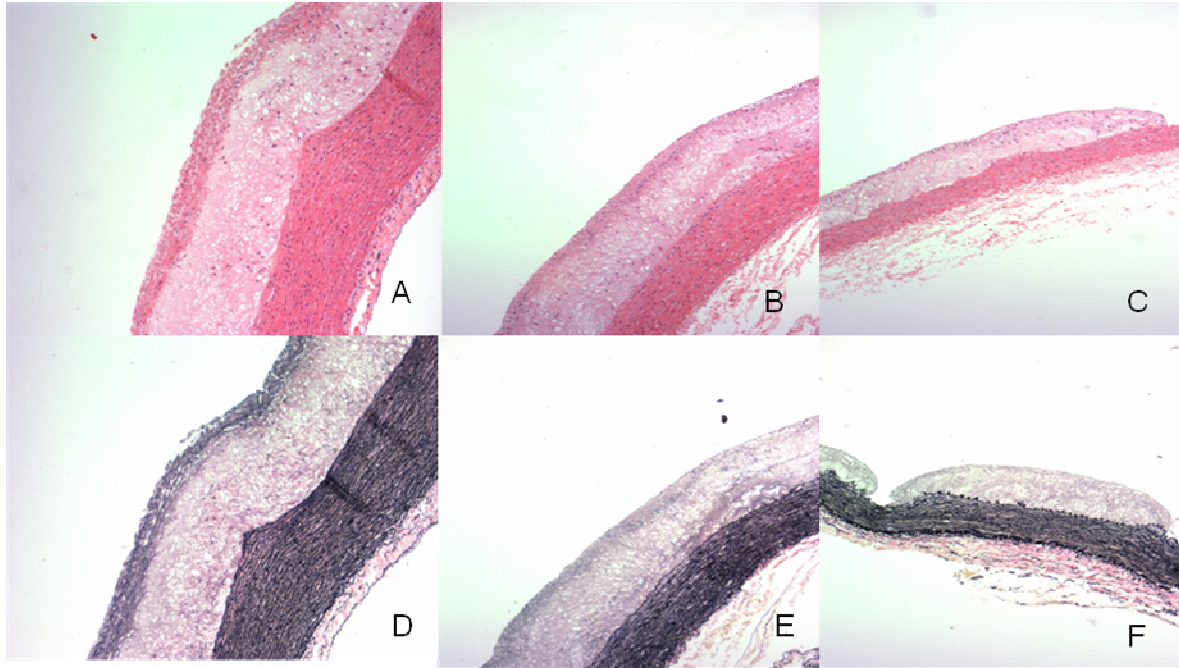


Figura 35. Fotomicrografia de aorta de coelho: A, B e C – coloração HE - 100x; D, E e F - coloração com Verhoeff para fibras elásticas – 100x. Fragmento da região do arco aórtico (A e D); aorta torácica (B e E) e abdominal (C e F).

Com relação à quantidade de colágeno em íntima de aorta, o G2 apresentou maior concentração, comparado ao G1 (ANOVA – Tukey  $p=0,049$ ) (figura 36).

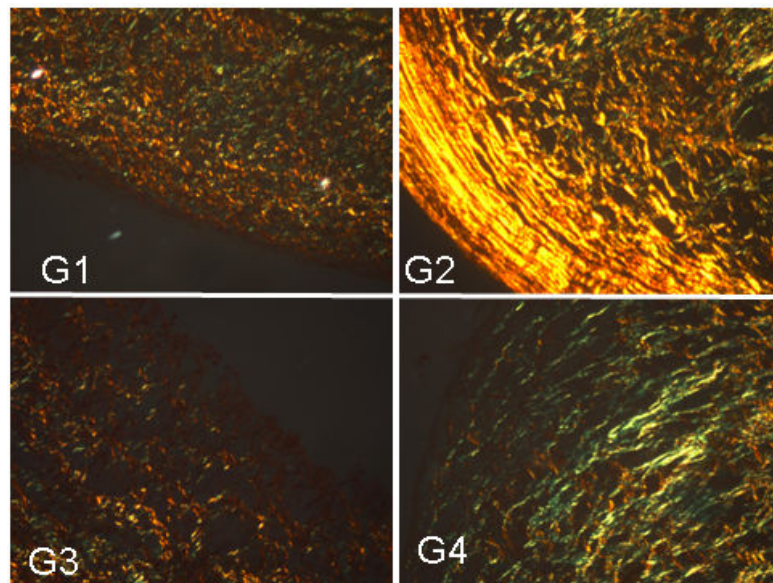


Figura 36. Fotomicrografia da íntima de arco aórtico (400x) corado com picrosirios nos quatro grupos. O colágeno se visualiza em cor amarelada em luz polarizada.

#### 4.8.2. Rins

A análise patológica dos rins no modelo de indução não mostrou alterações significativas da arquitetura do parênquima renal, o qual estava preservado, observando-se em apenas dois animais, a presença de pequeno infiltrado inflamatório, e fibrose focal intersticial, sem espessamento da membrana basal (figura 37 A-C). A análise imunohistoquímica para a presença de macrófagos (quando analisados 50 glomérulos e contados os macrófagos presentes em cada estrutura) evidenciou no modelo de indução de DM (G1) 13 macrófagos (EPM 3) por glomérulo (figura 37 D).

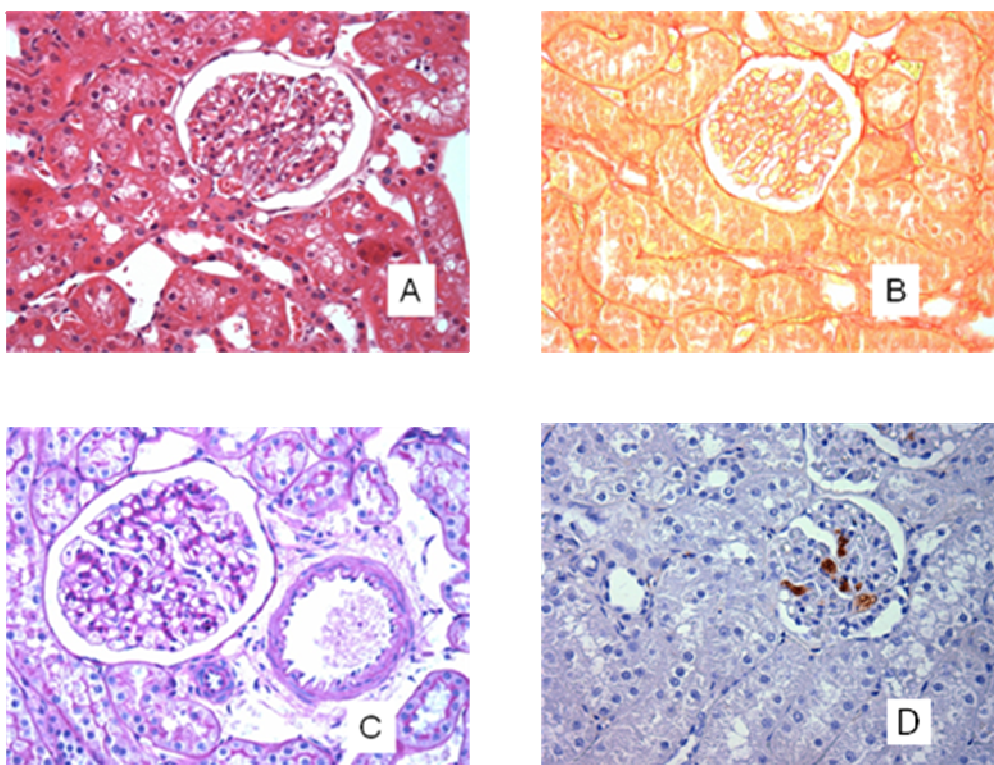


Figura 37. Fotomicrografia de rim de coelho: coloração HE (A), coloração picrosírius (B), PAS (C) e RAM-11 (D). Aumento: 400x.

Houve diferenças qualitativas no grau de fibrose renal entre os grupos de tratamento. No grupo 2, os glomérulos estavam preservados, mas verificou-se em dois animais a presença de alguns glomérulos com fibrose. Observou-se em 6 animais, presença de fibrose intersticial focal, presença de infiltrado inflamatório mononuclear e células tubulares vacuolizadas. No grupo 3, os glomérulos estavam preservados, verificando-se em 2 animais presença de alguns glomérulos fibrosados, presença de pequenos focos inflamatórios e fibrose intersticial focal. No grupo 4, que recebeu a associação de olmesartana e quinapril os glomérulos estavam preservados,

verificando-se em um dos animais presença de alguns glomérulos com fibrose, espessamento de membrana basal (PAS positivo), presença de túbulos vacuolizados com fibrose intersticial focal nos 3 animais. A presença de fibrose foi mais acentuada nos animais que receberam o antagonista do receptor AT1 (G2) e ocorreu em todos os animais que receberam a associação de um IECA e um antagonista AT1R (G4). Os achados renais de fibrose são apresentados na figura 38.

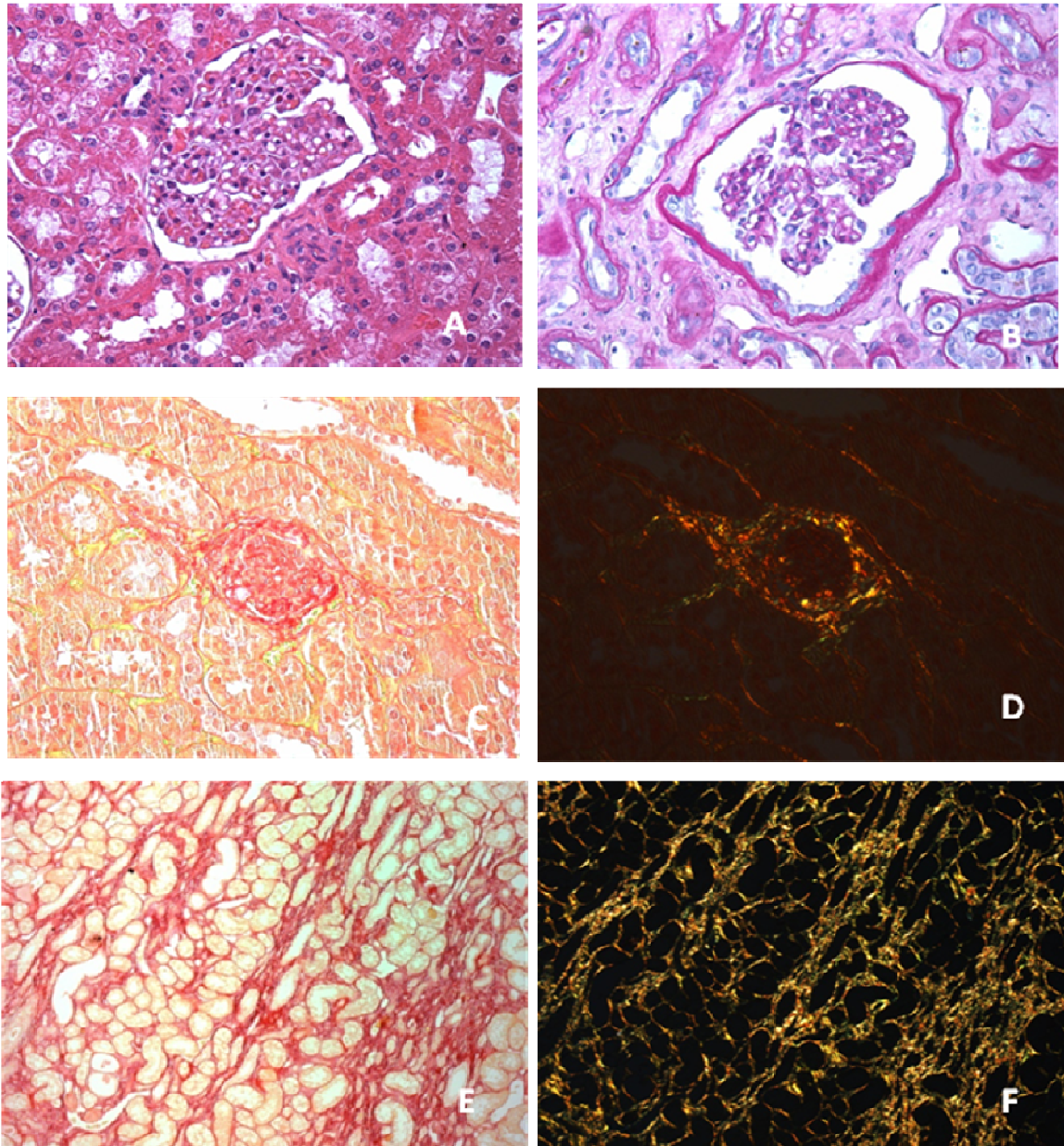


Figura 38. Fotomicrografias de rins de coelhos. Glomérulo normal (A) corado com HE (400x); glomérulo com espessamento de membrana basal (B) corado com PAS (400x); glomérulo fibrosado (C e D) corados com picrosirius (400x), sob luz polarizada (D); fibrose intersticial (E e F) corados com picrosirius (100x), sob luz polarizada (F).

Com relação à inflamação, houve diferença entre os três grupos (ANOVA  $p=0,047$ ). No grupo que fez uso do duplo bloqueio (G4) havia menor quantidade de macrófagos (2 EPM 1) comparados aos grupos que faziam uso de IECA (53 EPM 19) e BRA (35 EPM 11) (figura 39).

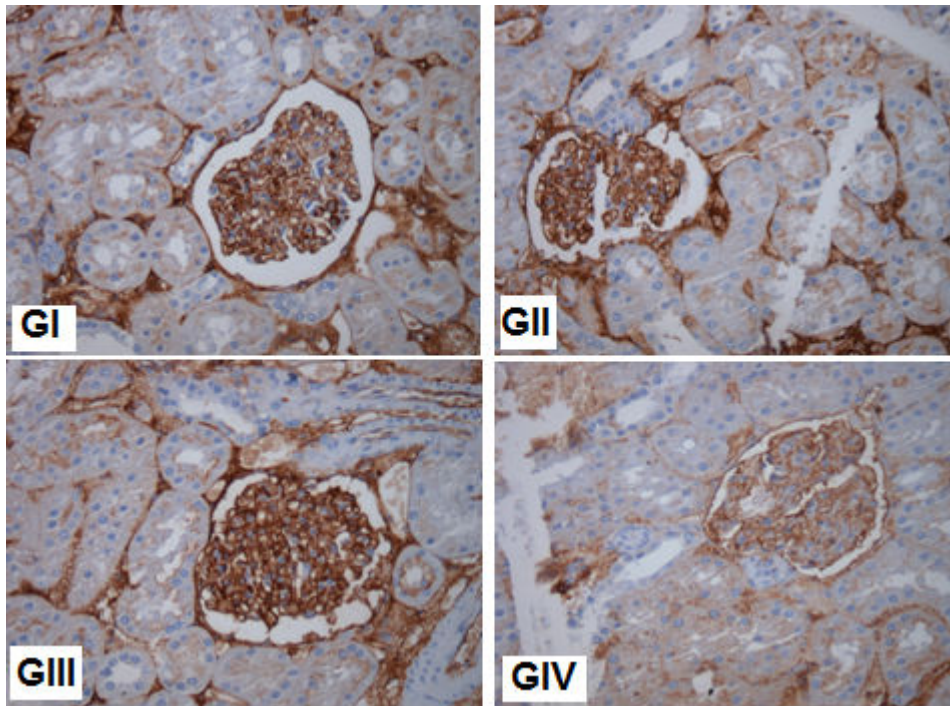


Figura 39. Fotomicrografias de rins de coelhos mostrando glomérulos renais corados com RAM-11 nos 4 grupos. Aumento: 400x.

#### 4.8.3. Fígado

Pela microscopia ótica foi possível observar esteatose, balonização, inflamação e fibrose, todas estas alterações foram qualificadas em graus de lesão de zero a três.

Com relação à esteatose, não houve diferença entre G1, G2 e G3 (tabela 12).

**Tabela 12. DISTRIBUIÇÃO DOS COELHOS DE ACORDO COM O GRAU DE ESTEATOSE HEPÁTICA**

Grau de Esteatose	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
	11	9	11	3
0 (%)	3 (27,3)	3 (33,3)	3 (27,3)	0 (0)
1 (%)	7 (63,6)	5 (55,5)	6 (54,5)	0 (0)
2 (%)	1 (9,1)	0 (0)	2 (18,2)	0 (0)
3 (%)	0 (0)	1 (11,2)	0 (0)	3 (100)

Teste exato de Fisher.  $p=0,634$

O grupo 3 apresentou maior quantidade de balonização grau 2 em relação aos grupo 1 e 2 (tabela 13).

**Tabela 13. DISTRIBUIÇÃO DOS COELHOS DE ACORDO COM O GRAU DE BALONIZAÇÃO**

Grau de Balonização	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
	11	9	11	3
0 (%)	1 (9,0)	1 (11,1)	0 (0)	3 (100)
1 (%)	3 (27,2)	1 (11,1)	2 (18,2)	0 (0)
2 (%)	4 (36,6)	3 (33,3)	7 (63,6)	0 (0)
3 (%)	3 (27,2)	4 (44,5)	2 (18,2)	0 (0)

Teste exato de Fisher.  $p=0,200$ .

Os grupos 2 e 3 apresentaram maior quantidade de inflamação graus 1 e 2 em relação ao grupo 1 (Tabela 14).

**Tabela 14. DISTRIBUIÇÃO DOS COELHOS DE ACORDO COM O GRAU DE INFLAMAÇÃO**

Grau de Inflamação	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
	11	9	11	3
0 (%)	9 (81,8)	2 (22,2)	1 (9,1)	2 (66,7)
1 (%)	2 (18,2)	6 (66,7)	8 (72,7)	1 (33,3)
2 (%)	0 (0)	1 (11,1)	2 (18,2)	0 (0)

Teste exato de Fisher.  $p=0,007$ .

Na análise patológica para verificar quantidade de fibrose, não houve diferença entre os grupos, tanto pelo grau de lesão (tabela 15) quanto pela área marcada com picosirius (figura 40).

**Tabela 15. DISTRIBUIÇÃO DOS COELHOS DE ACORDO COM O GRAU DE FIBROSE**

Grau de Fibrose	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
	11	9	11	3
0 (%)	3 (27,2)	0 (0)	2 (18,1)	2 (66,7)
1 (%)	4 (36,6)	5 (55,6)	3 (27,2)	1 (33,3)
2 (%)	2 (18,1)	4 (44,4)	2 (18,1)	0 (0)
3 (%)	2 (18,1)	0 (0)	4 (36,6)	0 (0)

Teste exato de Fisher.  $p=0,205$ .

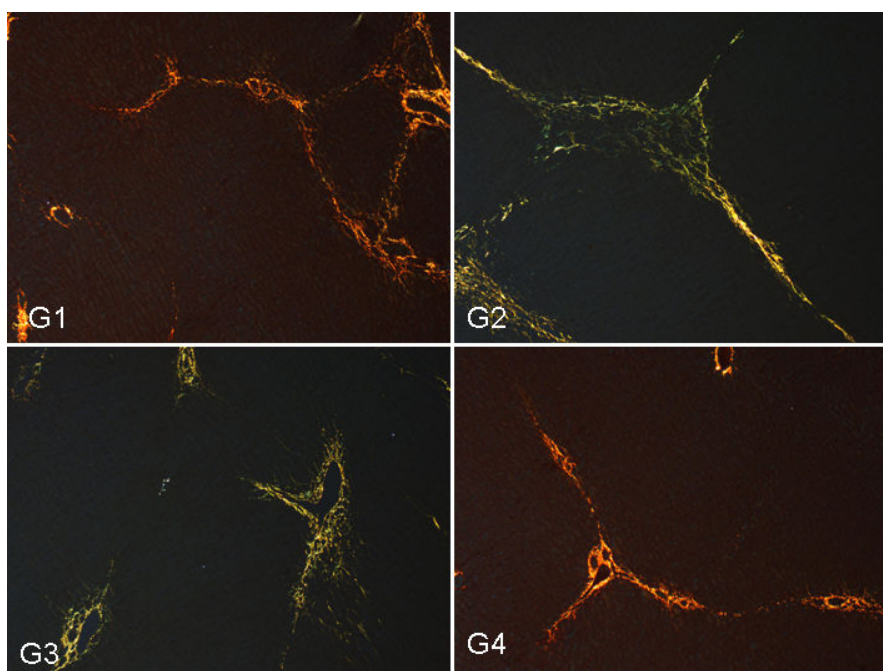


Figura 40. Fotomicrografia de fígado de coelhos corado com picosirius (400x) nos quatro grupos. O colágeno se visualiza em cor amarelada sob luz polarizada. ANOVA:  $G1=G2=G3$  ( $p= 0,093$ )

O fígado dos coelhos do modelo de indução de diabetes tipo 2 mostrou áreas de parênquima normal, entremeadas por áreas com balonização, esteatose microvesicular, infiltrado mononuclear, e áreas de substituição por colágeno e fibrose. A figura 41 mostra as anormalidades observadas no fígado dos coelhos diabéticos.

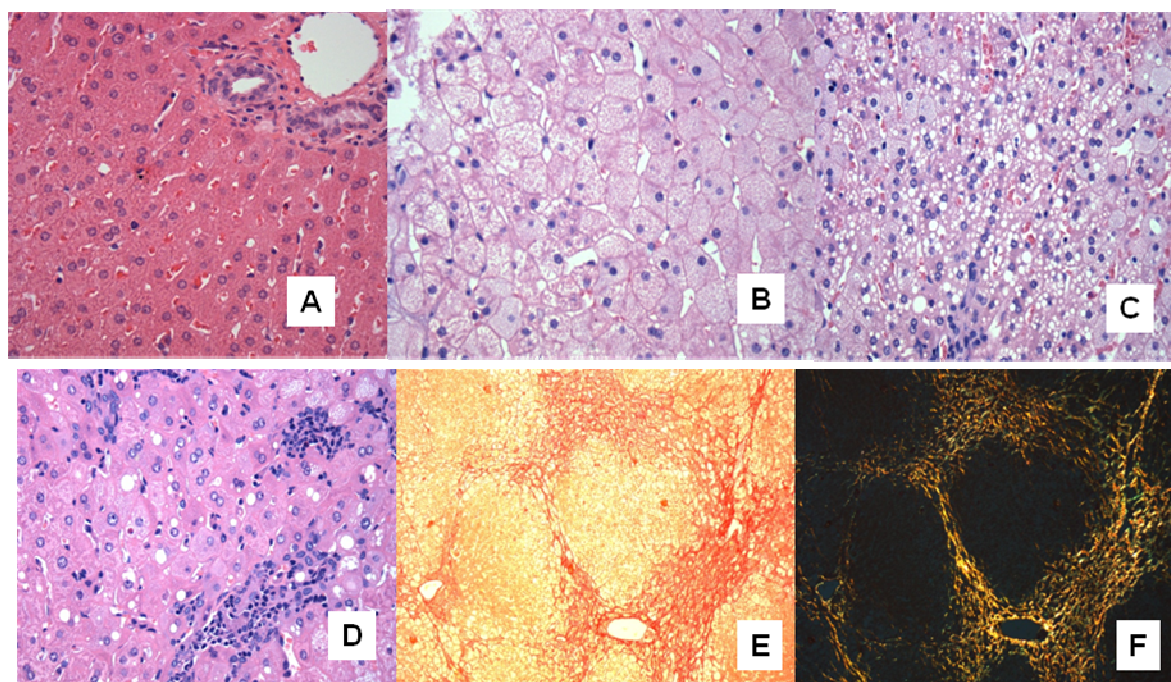


Figura 41. Fotomicrografia de fígado de coelhos: A, B, C e D – coloração HE; E e F – coloração com Picrosirius; F sob luz polarizada (400x). Observa-se parênquima normal (A), com balonização (B), esteatose microvesicular (C), foco inflamatório mononuclear (D) e proliferação de colágeno e fibrose (D e E).

#### 4.8.4. Pâncreas

Na análise patológica para verificar a área das ilhotas e número de células  $\beta$  pancreáticas (figura 42), a marcação para insulina (figura 43) e receptor AT1 (figura 44), não mostrou diferenças entre os grupos (tabela 16).

**Tabela 16. DISTRIBUIÇÃO DOS COELHOS DE ACORDO COM ANÁLISE PATOLÓGICA DO PÂNCREAS**

Variável	Grupos			
	G1	G2	G3	G4
	11	9	11	3
Intensidade Integrada Insulina (EPM)	47805490 (1419001)	44004222 (4866343)	55993092 (63509120)	52157973 (12456613)
Intensidade Integrada AT1R (EPM)	30030396 (3269382)	19950416 (3886015)	28906360 (3984885)	20784759 (5721253)
Área de Ilhotas (EPM)	9001 (730)	8219 (970)	8798 (784)	8145 (112)
Nº de Células $\beta$ (EPM)	88 (3)	90,900 (12)	93 (9)	86,300 (4,90)

Intensidade integrada Insulina: ANOVA  $p=0,606$

Intensidade Integrada AT1R: ANOVA  $p=0,196$

Área de Ilhotas: ANOVA  $p=0,906$

Número de Células  $\beta$ : ANOVA  $p=0,972$

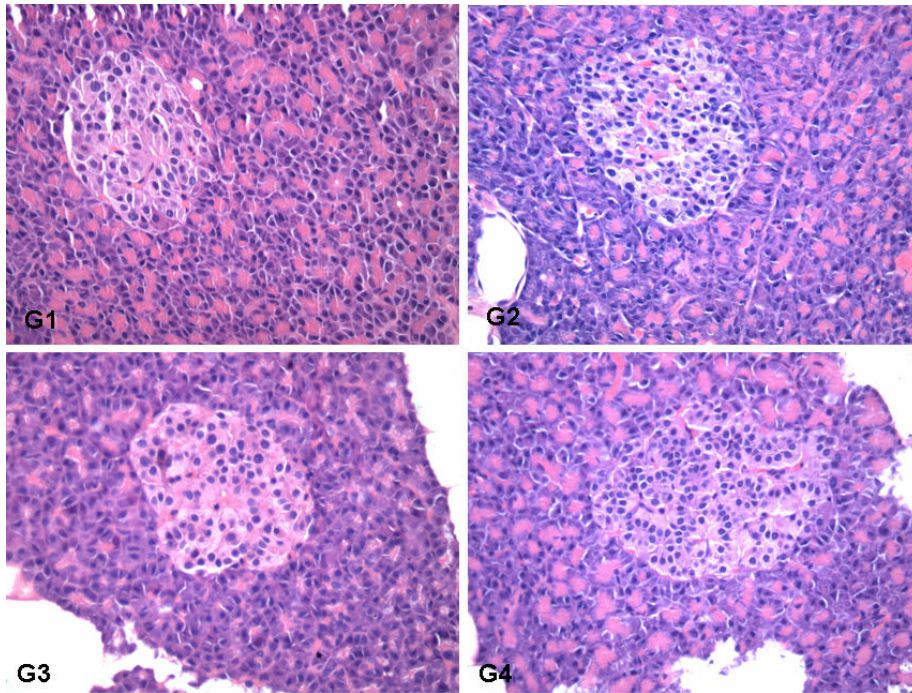


Figura 42. Fotomicrografia de pâncreas (400x) corado com HE nos quatro grupos.

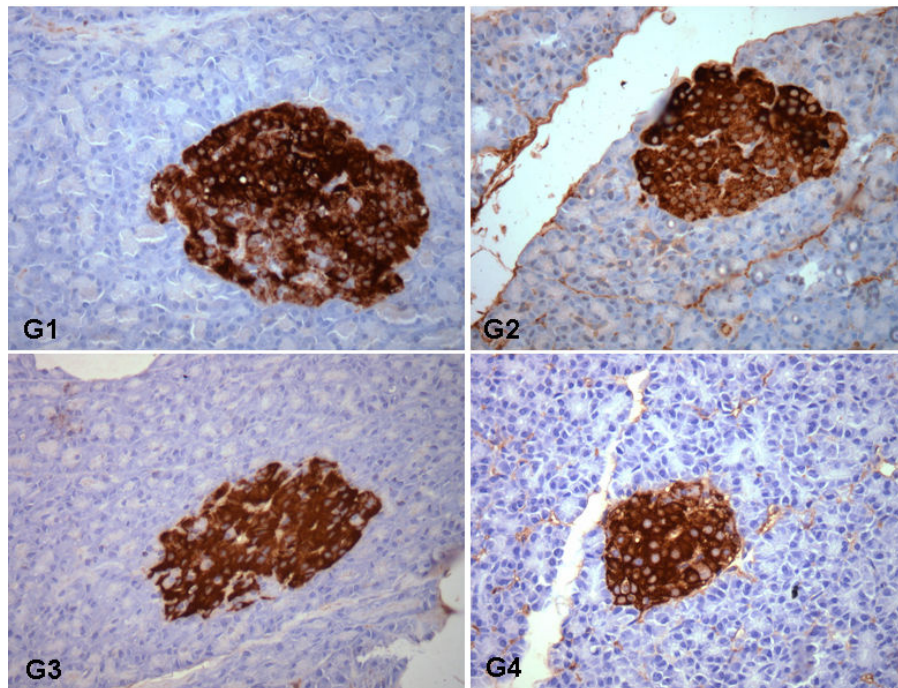


Figura 43. Fotomicrografia, imunohistoquímica de pâncreas para insulina (400x) nos quatro grupos.



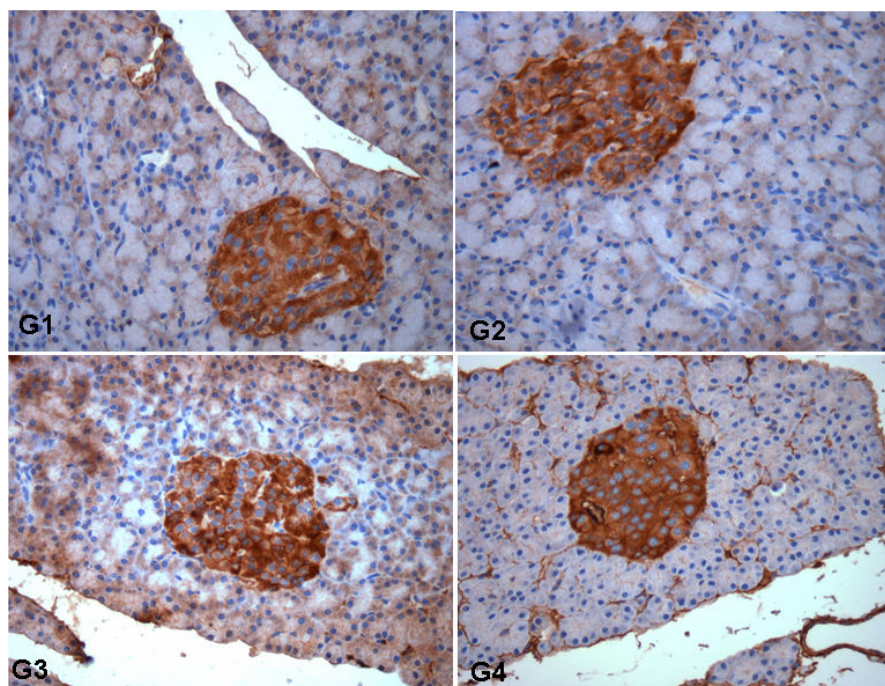


Figura 44. Fotomicrografia, imunohistoquímica de pâncreas para AT1R (400x) nos quatro grupos.

#### 4.8.5. Retinas

Histopatologia das retinas corada por HE e PAS não evidenciou alterações substanciais.

### 4.9. Retinopatia diabética

O estudo dos animais diabéticos revelou manifestações clínicas precoces de retinopatia incluindo pontos hiperfluorescentes consistentes com microaneurismas.

Os microaneurismas foram notados a partir do 3º mês da indução pela dieta, e observados antes da elevação da glicemia, que só ocorreu no 6º mês. Houve progressão no número e grau dos microaneurismas no sexto mês.

São também apresentados dados de coelhos normais, para comparação. Nestes, observou-se no período basal a presença de pequeno número de microaneurismas classificados em grau I, sem progressão ao longo do tempo, enquanto naqueles com diabetes (G1) os microaneurismas foram classificados em grau III na semana 12 e progrediram para grau IV na semana 24.

No modelo de indução de diabetes observa-se fotografia de fundo de olho (figura 45 A) e angiofluoresceinografia (figura 45 B-C) mostrando microaneurismas (flechas).

O número de microaneurismas (EPM) no período basal foi 10,0 (1,0), grau 1,0 (0,2). Após 3 meses da indução do diabetes por dieta observou-se aumento do número de microaneurismas [32,0 (1,8), ( $p < 0,0001$ )] e do grau de microaneurismas [2,0 (0,2),  $p = 0,012$ ]. No 6º mês houve progressão do número de microaneurismas [51,0 (1,4), ( $p < 0,0001$ )], e tendência a maior grau [3,0 (0,2),  $p = 0,093$ ] (figura 46 A-B).

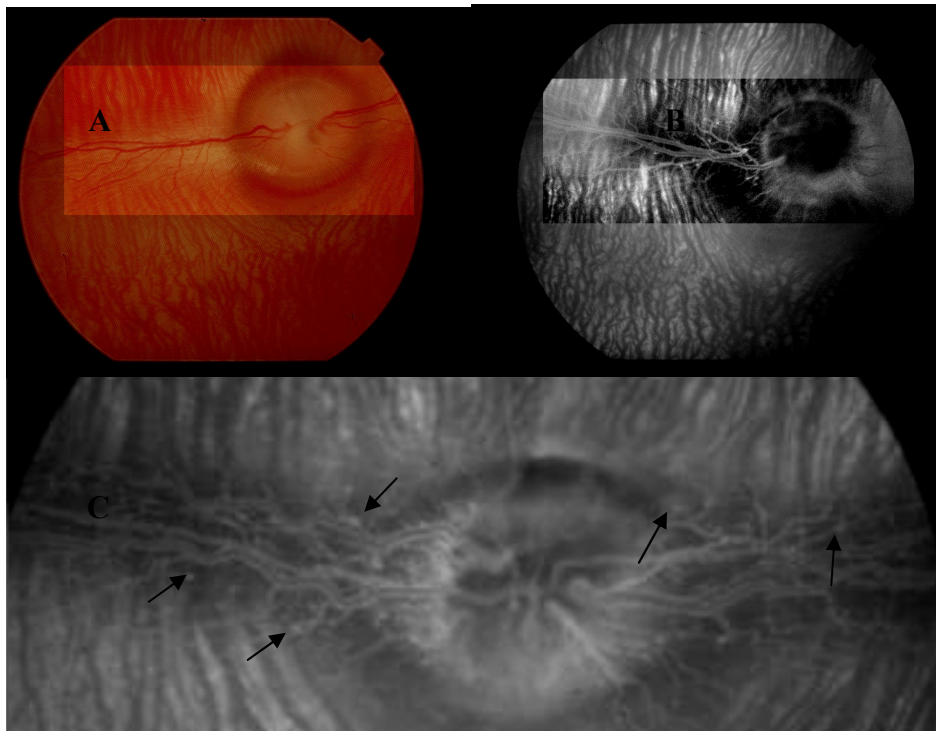


Figura 45. Retinografia (A) e angiofluoresceinografia (B) mostrando a presença de pontos hiperfluorescentes compatíveis com microaneurismas. Em (C) detalhe de microaneurismas (setas).

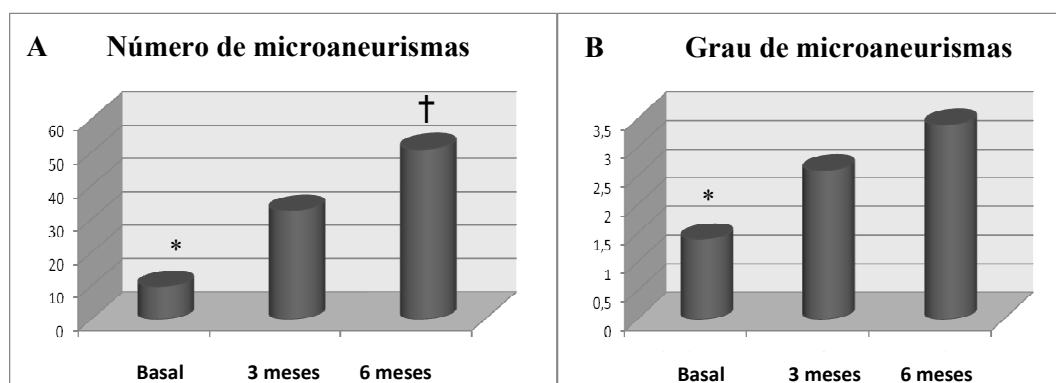


Figura 46. Número (A) e grau (B) de microaneurismas no modelo de diabetes (G1) no período basal, com 3 e 6 meses.  $p < 0,05$ , ANOVA-Tukey. \*3 e 6 meses > basal; †6 meses > 3 meses.

Observamos ainda atenuação dessas lesões quando simultaneamente à indução do diabetes, os animais foram tratados com fármacos que bloqueiam o sistema renina angiotensina (Grupos 2 e 3, sendo de maior magnitude quando se utilizou a terapia combinada com IECA e antagonista do receptor AT1 da angiotensina II, Grupo 4) (Tabela 17, Figuras 47, detalhe em 48, Figura 49, detalhe em Figura 50 e Figura 51 A-B). Os animais tratados apresentaram retinopatia em grau II no 3º mês e progrediram para grau III no 6º mês. O G4 apresentou menor número e grau de microaneurismas quando comparado aos demais grupos.

Fotografias de fundo de olho e angiofluoresceinografias representativas dos animais do estudo são apresentadas para todos os grupos de animais e para animais normais.

**Tabela 17. DISTRIBUIÇÃO DOS COELHOS DE ACORDO COM O NÚMERO E O GRAU DE MICROANEURISMAS NO SEXTO MÊS**

Variável	Grupos				
	Normais	G1	G2	G3	G4
	5	5	3	3	3
Número de microaneurismas (EPM)	9,8 (1,0)	51,0 (1,4)	31,0 (4,0)	39,3 (1,5)	23,7 (3,0)
Grau de microaneurismas (EPM)	1,4 (0,2)	3,4 (0,2)	2,6 (0,3)	3,0 (0,1)	2,0 (0,1)

ANOVA-Tukey.

Número de microaneurismas:  $p < 0,0001$ : G1 > Normal, G2 e G4 ( $p = 0,009$ ); G1 > G3 ( $p < 0,0001$ ); Normal < G1, G2 e G3 ( $p = 0,002$ ); Normal < G4 ( $p = 0,002$ ); G3 > G4 ( $p = 0,002$ ).  
 Grau de microaneurismas:  $p < 0,0001$ : Normal < G1 ( $p = 0,017$ ); Normal < G2 e G3 ( $p = 0,003$ ); G1 > G4 ( $p = 0,008$ )

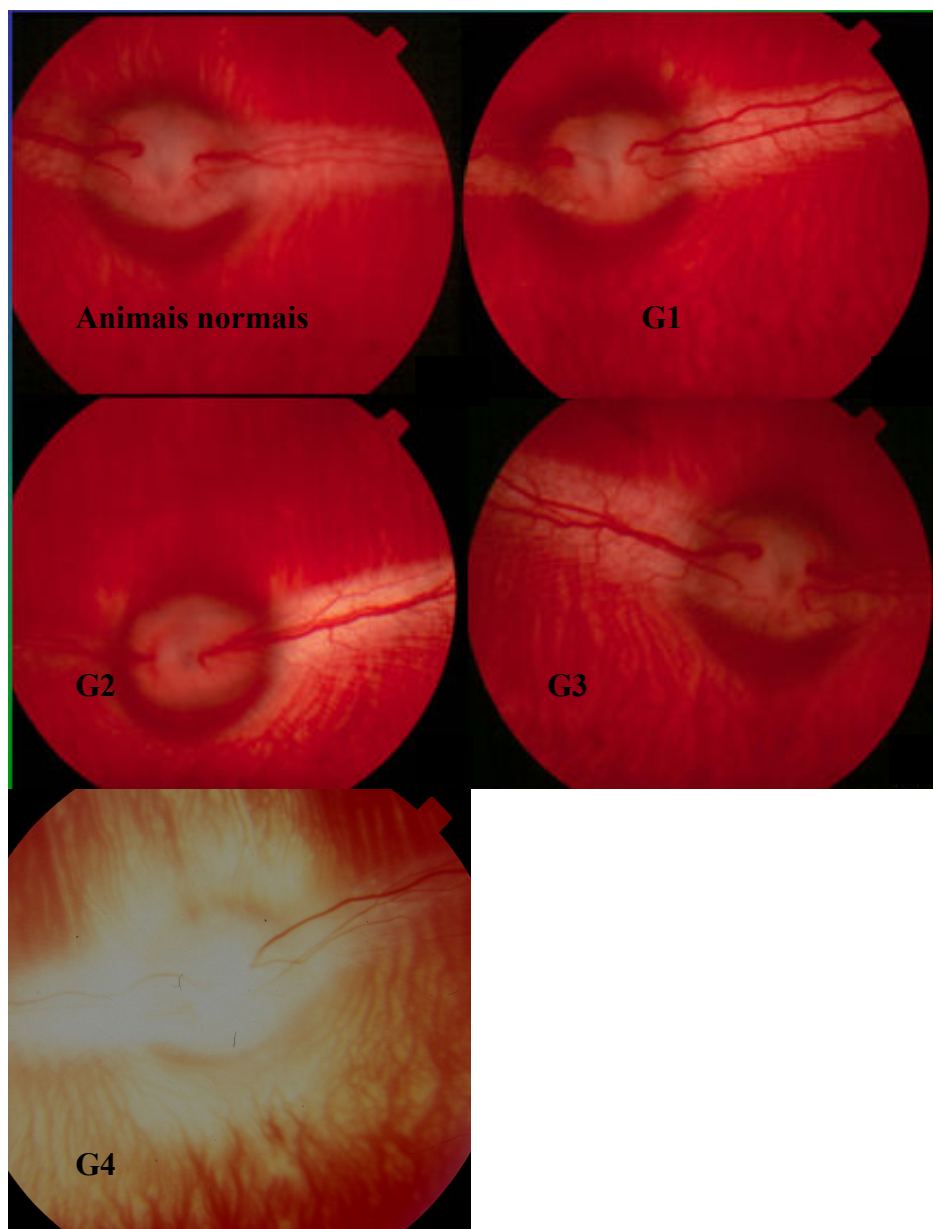


Figura 47. Fotografias de fundo de olho representativas dos animais do estudo mostrando o disco óptico. Animais normais; G1, coelhos com diabetes tipo 2 induzido por dieta; G2, coelhos diabéticos tratados com olmesartana; G3, coelhos diabéticos tratados com quinapril e G4, coelhos diabéticos tratados com a associação de olmesartana e quinapril, no 6º mês.

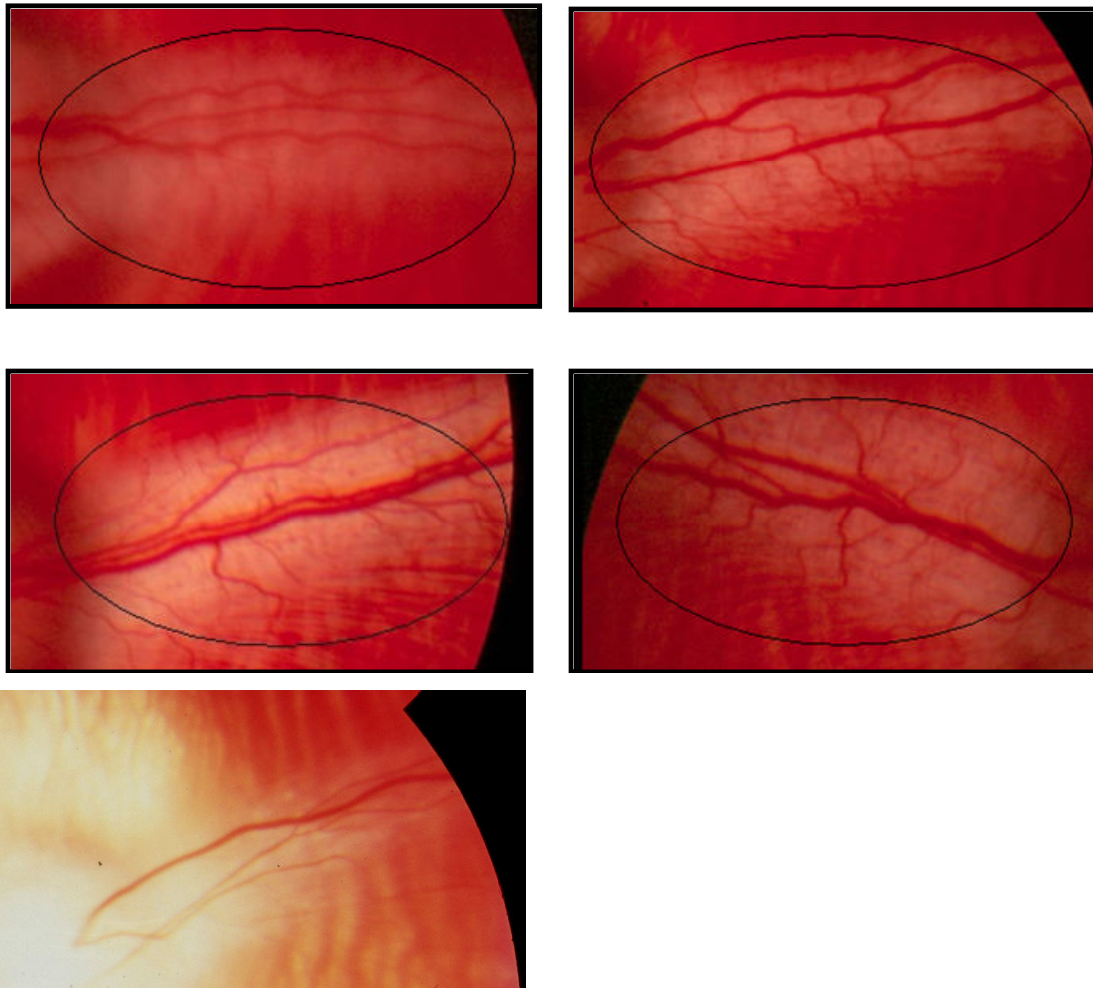


Figura 48. Detalhe de fotografias de fundo de olho mostrando micro-aneurismas. Animais normais; G1, coelhos com diabetes tipo 2 induzido por dieta; G2, coelhos diabéticos tratados com olmesartana; G3, coelhos diabéticos tratados com quinapril e G4, coelhos tratados com a associação de olmesartana e quinapril, no 6º mês.

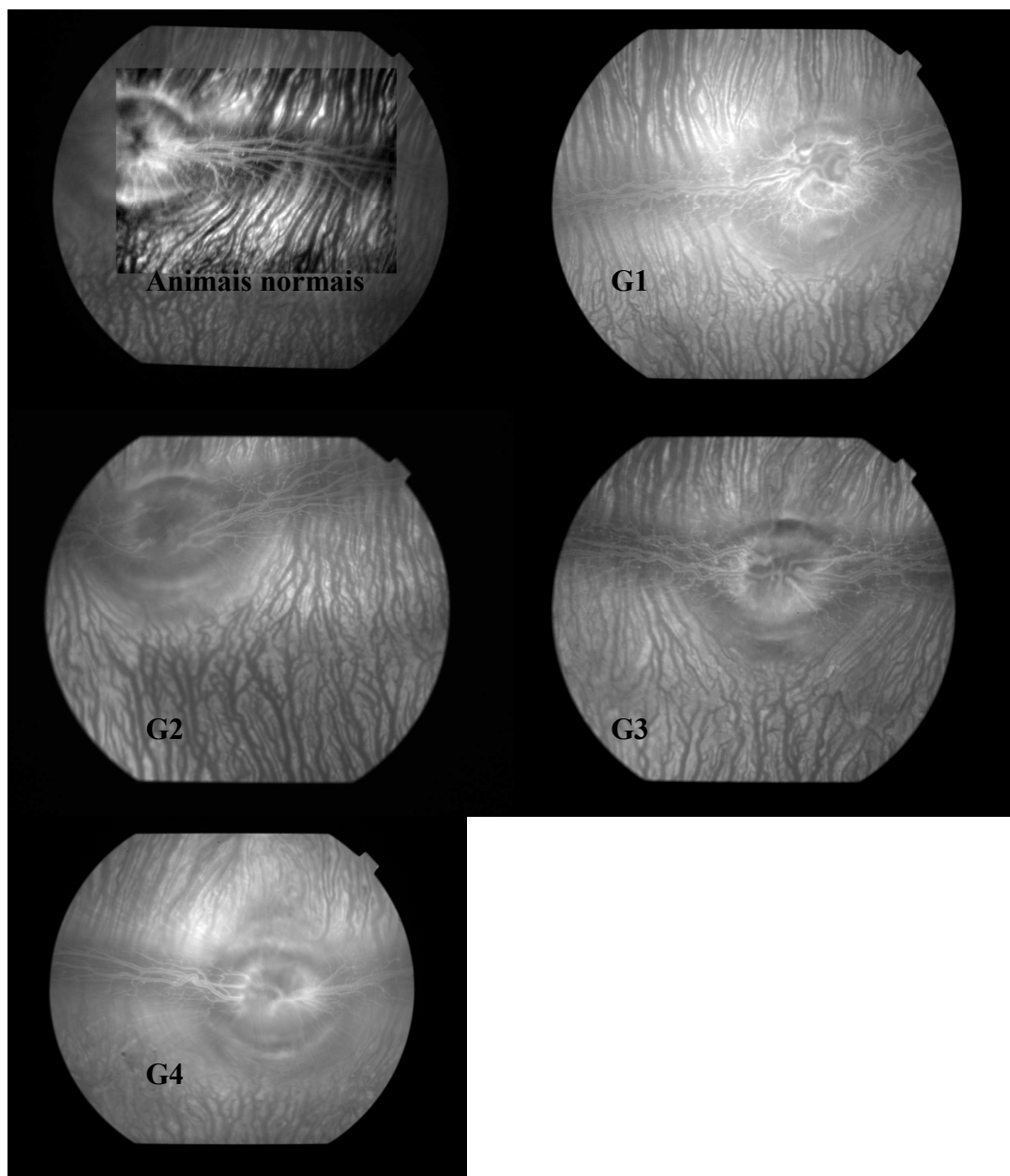


Figura 49. Angiofluoresceinografias representativas dos animais do estudo. Animais normais; G1, coelhos com diabetes tipo 2 induzido por dieta; G2, coelhos diabéticos tratados com olmesartana; G3, coelhos diabéticos tratados com quinapril e G4, coelhos tratados com a associação de olmesartana e quinapril, no 6<sup>o</sup> mês.

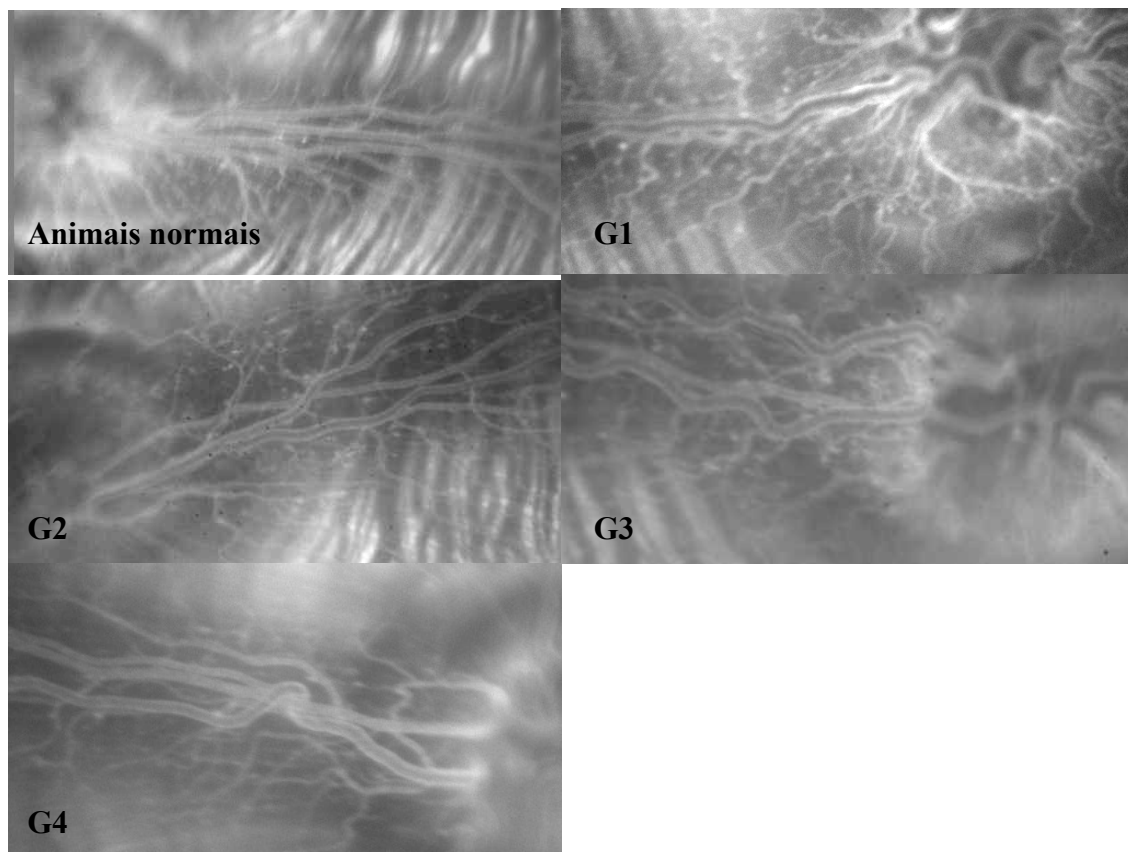


Figura 50. Detalhe de angiofluoresceinografias representativas dos animais do estudo. Animais normais; G1, coelhos com diabetes tipo 2 induzido por dieta; G2, coelhos diabéticos tratados com olmesartana; G3, coelhos diabéticos tratados com quinapril e G4, coelhos tratados com a associação de olmesartana e quinapril, no 6º mês.

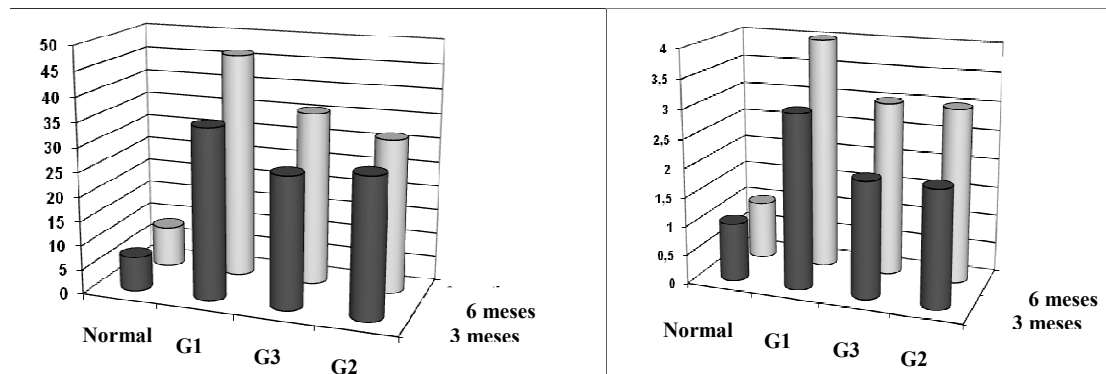


Figura 51. Número (A) e grau (B) de micro-aneurismas de retina nos animais do estudo. Animais normais; G1, coelhos com diabetes tipo 2 induzido por dieta; G2, coelhos diabéticos tratados com olmesartana; G3, coelhos diabéticos tratados com quinapril, no 3º e 6º meses.

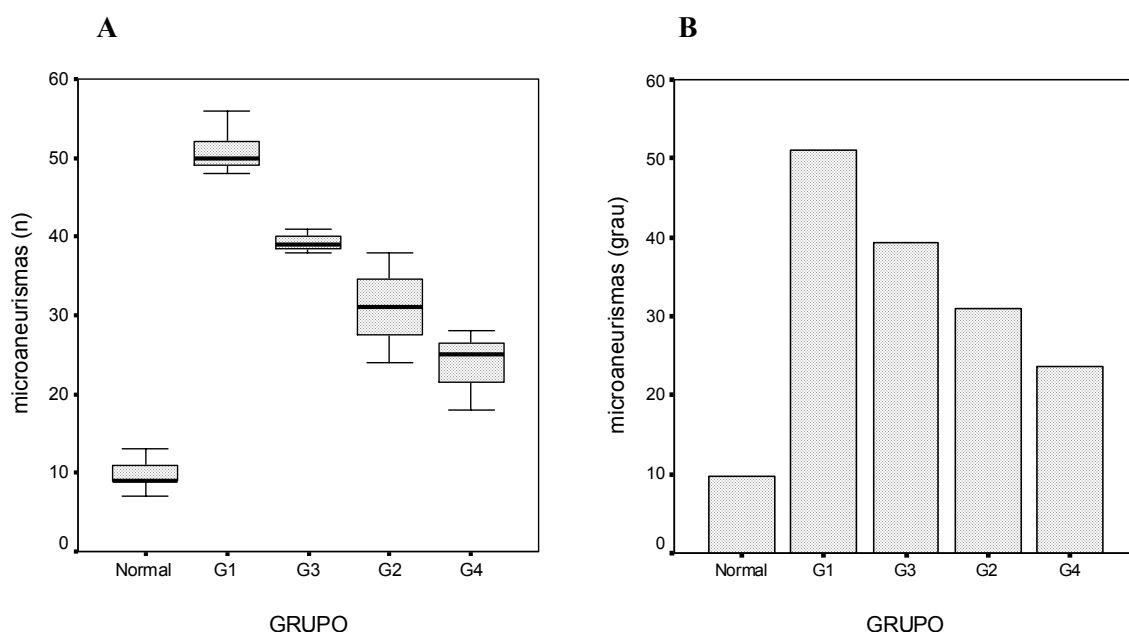


Figura 52. Número (A) e grau (B) de micro-aneurismas de retina nos animais do estudo. Animais normais; G1, coelhos com diabetes tipo 2 induzido por dieta; G2, coelhos diabéticos tratados com olmesartana; G3, coelhos diabéticos tratados com quinapril; G4, coelhos diabéticos tratados com olmesartana e quinapril no 6º mês  $p < 0.05$ ; ANOVA-Tukey. Número de microaneurismas:  $p < 0,0001$ , G1 > Normal, G2 e G4;  $p = 0,009$ , G1 > G3;  $p < 0,0001$ , Normal < G1, G2 e G3,  $p = 0,002$ , Normal < G4;  $p = 0,002$ , G3 > G4. Grau de microaneurismas:  $p < 0,0001$ , Normal < G1,  $p = 0,017$ , Normal < G2,  $p = 0,003$ , Normal < G3;  $p = 0,008$ , G1 > G4.



### 5.1. O modelo de diabetes tipo 2 e hipercolesterolemia induzidos por dieta

Na literatura existem muitos trabalhos que estudam diabetes *mellitus* e hipercolesterolemia em modelos experimentais<sup>(45, 70-72)</sup>. De fato, dados encontrados na literatura descrevendo modelos de diabetes restringem-se ao diabetes tipo 1 induzido por aloxana, uma vez que o coelho não o desenvolve após administração de estreptozotocina. Dessa forma, modelos animais em coelhos são escassos e pouco explorados, especialmente no que tange às lesões em órgãos-alvo.

O coelho foi escolhido para este trabalho por ser um animal de pequeno porte, de fácil manipulação, que desenvolve placas ateroscleróticas através da alimentação. Segundo Yin e cols.<sup>(65)</sup> é possível desenvolver diabetes *mellitus* tipo 2 apenas com dieta, sem intervenção química ou invasiva, sendo este o único relato encontrado na literatura descrevendo modelo de diabetes tipo 2 induzido desta forma. Esses autores relataram alterações na glicemia, no estresse oxidativo e mostraram o desenvolvimento de placas ateroscleróticas após um período semelhante de seguimento.

Em nosso estudo, analisou-se nos coelhos Nova Zelândia, a indução de diabetes *mellitus* tipo 2 humanóide por meio de uma dieta gordurosa e rica em açúcar, assim como no trabalho realizado por Yin e cols.<sup>(65)</sup>, entretanto, além de banha e sacarose, foi adicionado o colesterol à dieta para acelerar a formação de placas ateroscleróticas e promover uma condição pró-inflamatória<sup>(73)</sup>.

Neste nosso modelo experimental foi possível avaliar que, após três meses de indução, os animais ganharam peso, desenvolveram dislipidemia e no sexto mês apresentaram elevação subsequente da glicemia compatível com modelo de diabetes tipo 2. De forma interessante, ao lado das alterações da glicemia observamos elevação de triglicérides e redução do HDL-C, consistentes com uma dislipidemia aterogênica. Os níveis de colesterol total e LDL-C mantiveram-se elevados pela dieta e promoveram o desenvolvimento de placas ateroscleróticas em aortas, as quais foram mais pronunciadas na região do arco aórtico.

O estudo, entretanto, focou a importância dos parâmetros glucometabólicos e em possíveis alterações histomorfológicas em órgãos-alvo.

Os valores de glicemia apresentaram incremento gradual, atingindo valores compatíveis com diabetes *mellitus* por volta do sexto mês. Critérios mais rigorosos de valores glicêmicos têm sido sugeridos neste modelo experimental, acima dos valores hoje sugeridos pela OMS em humanos<sup>(7)</sup>. De forma a inferirmos a média de glicemia das últimas semanas em nosso modelo, utilizamos a frutossamina glicada, sendo observado incremento a partir do terceiro mês. Em outro modelo experimental de indução de diabetes em coelhos, os valores de frutossamina aumentaram já no quarto dia após administração de aloxana<sup>(74)</sup>. A hemoglobina glicada não foi determinada, pois utiliza apenas padrões humanos.

Além da glicemia em jejum, os valores de frutossamina foram escolhidos para avaliar as condições glicêmicas deste modelo experimental por estarem relacionados ao controle glicêmico de duas a três semanas, período menor que a hemoglobina glicada que é de aproximadamente dois a quatro meses<sup>(75)</sup>. A dosagem de frutossamina é um método confiável e seus níveis séricos sofrem pouca influência metabólica, excetuando-se casos de alterações protéicas séricas<sup>(76)</sup>.

Para estudar as alterações em células beta pancreáticas, um dos parâmetros utilizados foi a insulina, entretanto seus níveis não se alteraram durante o estudo, o que contradiz o estudo de Yin<sup>(65)</sup>, que verificou aumento expressivo dos níveis de insulina já no terceiro mês de dieta rica em gordura e açúcar, atingindo um *plateau*.

Apesar dos níveis de insulina não terem se alterado, o índice de HOMA-IR mostrou aumento deste marcador de resistência à insulina no sexto mês de indução, e o HOMA  $\beta$  progressiva deficiência de secreção de insulina. Estes dados reforçam positivamente o desenvolvimento de um modelo experimental que alia resistência à insulina ao déficit de secreção, evoluindo para o diabetes *mellitus* tipo 2. De fato, vários autores consideram que mesmo no diabetes tipo 2, coexistem resistência e déficit de secreção<sup>(77, 78)</sup>. Quando a hiperglicemia de jejum é manifesta, mesmo com discreto grau de intolerância à glicose já existe disfunção de células- $\beta$ . Por outro lado, quando a glicose em jejum é normal, a intolerância à glicose associa-se à síndrome de resistência à insulina.

As enzimas hepáticas AST e GGT não se alteraram durante o estudo, indicando que não houve lesão hepatocelular importante por estes parâmetros bioquímicos, a despeito das alterações histológicas hepáticas. Os níveis de ALT decaíram durante o protocolo, possivelmente associados à queda dos níveis de albumina, podendo indicar início de incapacidade funcional hepática com redução de síntese protéica<sup>(79)</sup>.

Com relação à função renal, foi observado aumento de creatinina no terceiro mês, que coincide com a elevação lipídica pela dieta, os valores de albumina e creatinina urinária estavam normais e não foi evidenciada microalbuminúria, indicando preservação da filtração glomerular, embora alterações inflamatórias fossem notadas.

Atividade da ECA e níveis de angiotensinas em coelhos ainda são experimentais e não existem valores de referência instituídos. Neste modelo de DM tipo 2 foram observadas consideráveis variações nestes parâmetros sem um claro efeito do modelo experimental.

Em nosso modelo de indução de DM por dieta, os rins se apresentaram preservados, com pequeno infiltrado inflamatório, em menor grau do que foi encontrado em prévios trabalhos realizados em coelhos com diabetes tipo I induzido por aloxana (45, 80).

Segundo Birkner *et al.*<sup>(81)</sup> a administração prolongada de dieta hipercolesterolêmica é capaz de alterar estruturas de hepatócitos e levar a formação de esteatose, o que ocorreu em nosso modelo de DM tipo 2. Hudacko e cols<sup>(82)</sup>, em estudo de necrópsias, recentemente identificaram a esteatofibrose, como uma das manifestações de microangiopatia diabética em humanos. Em nosso modelo observamos diversos graus de comprometimento hepático, desde balonização esteatose microvesicular, focos inflamatórios e fibrose, assemelhando-se ao que foi descrito para o diabetes humano.

Evidenciou-se que após essa dieta houve o desenvolvimento de retinopatia diabética pré-proliferativa, precocemente induzida por dieta, o que não havia sido relatado em literatura em lagomorfos. Em outra publicação<sup>(69)</sup> foram testados os efeitos dos polissacárides da *Siraitia grosvenorii* nos níveis glicêmicos, de lípidos e na pressão arterial, mas sem menção a uma investigação mais aprofundada de lesões em órgãos-alvo e/ou dados laboratoriais mais abrangentes.

Observou-se que alterações iniciais na retina ocorreram antes mesmo da elevação da glicemia, havendo progressão da retinopatia com 6 meses, quando os animais apresentaram franca hiperglicemia. Como não havia descrição de dados de animais normais e mesmo de animais com hipercolesterolemia, nosso grupo realizou retinografia e angiofluoresceinografia em alguns animais normais no período basal do protocolo, mas também durante o seguimento de 6 meses, para verificar se esses também apresentariam algum grau de comprometimento microvascular. Foram testados, portanto, animais com dieta normal, dieta hipercolesterolêmica a 0,5% e a

0,1%. De fato, nesses animais havia pequeno número de microaneurismas, classificados como grau I (<10). Na evolução houve manutenção desses achados, enquanto nos animais com indução de diabetes houve progressão atingindo grau IV no 6º mês. A figura 53 (A e B) mostra que a presença de microaneurismas é semelhante à encontrada nos animais normais, sem dieta hiperglicemiante e hipercolesterolêmica.

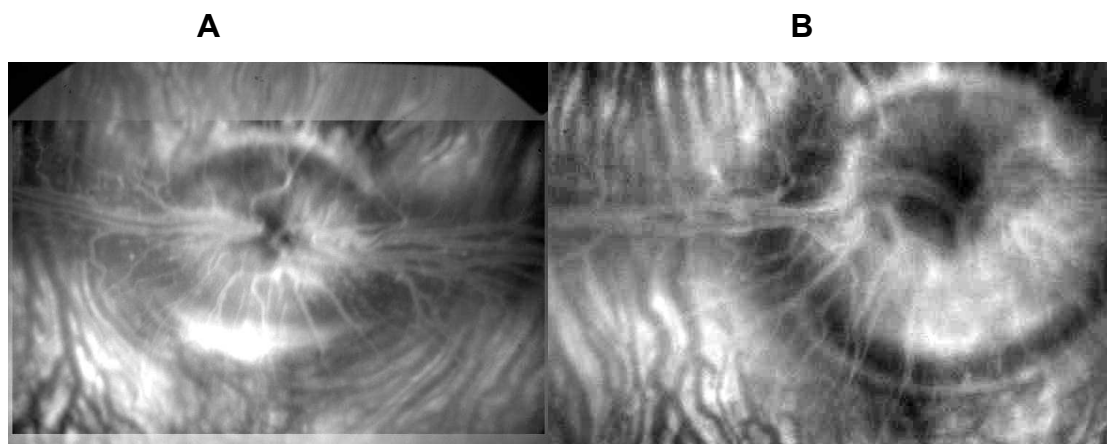


Figura 53. Angiofluoresceinografias de coelhos normais (A) e hipercolesterolêmicos (B), mostrando microaneurismas em pequeno número.

## 5.2. Efeitos do bloqueio do sistema renina-angiotensina

Vários ensaios clínicos, como o HOPE<sup>(83)</sup>, LIFE<sup>(51)</sup>, EUROPA<sup>(84)</sup>, PROGRESS<sup>(85)</sup>, RENAAL<sup>(86)</sup>, MARVAL<sup>(87)</sup>, IDNT<sup>(86)</sup>, mostraram evidências sobre o uso de inibidores da ECA e de BRA na proteção de órgãos-alvo em pacientes de alto risco cardiovascular. De fato, estes estudos demonstram que estas drogas reduzem complicações micro e macrovasculares associadas ao diabetes<sup>(88-91)</sup>.

Em razão destes efeitos que vão além da diminuição pressórica, foram utilizados o quinapril 30mg/kg (IECA) e/ou a olmesartana 5mg/kg (BRA) para avaliar seus efeitos em órgãos-alvo, sendo administrados durante todo o protocolo do estudo, associados à dieta, mas antes dos animais apresentarem a condição de hiperglicemia e hipercolesterolemia.

Nos animais tratados, assim como no modelo, após três meses de indução, houve ganho de peso, dislipidemia e no sexto mês os animais apresentaram elevação subsequente da glicemia compatível com modelo de diabetes tipo 2. Entretanto, os animais recebendo apenas a dieta apresentaram níveis de glicêmicos mais elevados que os grupos em tratamento, sugerindo proteção pelo bloqueio do SRA. Já os valores

de frutamina elevaram-se progressivamente nos quatro grupos, sem diferenças, mostrando que não houve melhor controle glicêmico dos grupos em tratamento comparados ao modelo.

Em todos os grupos houve elevação de triglicérides e redução do HDL-C. Os níveis de colesterol total e LDL-C mantiveram-se elevados pela dieta e promoveram o desenvolvimento de placas ateroscleróticas em aortas, as quais foram mais pronunciadas na região do arco aórtico. O tratamento pelo bloqueio do SRA não modificou esses parâmetros.

Os níveis de insulina e o HOMA-IR não foram diferentes entre os grupos tratados, bem como durante o estudo. Entretanto, o HOMA- $\beta$  mostrou progressiva redução, sugerindo deficiência de função de células beta pancreáticas. Este é um dos achados de maior interesse, uma vez que foi obtido apenas pela dieta, e não por fármacos tóxicos às células beta pancreáticas.

Em modelos de base genética, onde ocorre uma rápida e progressiva substituição das ilhotas pancreáticas por tecido fibroso, foi mostrada atenuação das alterações morfo-funcionais pelo bloqueio com IECA e BRA. É possível que a ativação do SRA seja menos evidente em nosso modelo, não permitindo uma resposta tão exuberante como em modelos genéticos<sup>(43)</sup>.

Assim como no modelo, em todos os grupos as enzimas hepáticas AST e GGT não se alteraram durante o estudo, enquanto os níveis de albumina e ALT declinaram durante o protocolo, mas estavam dentro dos parâmetros normais.

Com relação à função renal, os três grupos também apresentaram a creatinina sérica elevada no terceiro mês; os valores de albumina e creatinina urinária estavam normais, não evidenciando microalbuminúria em nenhum grupo, indicando que a filtração glomerular se apresentava preservada.

Os níveis de atividade da ECA não se alteraram durante o estudo, mas de acordo com o esperado o G3 que fazia uso de IECA apresentou níveis de atividade enzimática menores a partir do terceiro mês. Os valores de angiotensina I, II e 1-7 não foram diferentes entre os grupos. Os níveis de Ang I permaneceram estáveis durante o estudo, mas os níveis de Angiotensina II e 1-7 foram mais elevados no mês 6.

Strawn e cols analisaram aortas de macacos com dieta aterogênica e demonstraram que após 6 semanas, os animais que usavam losartana (BRA) embora tivessem níveis lipídicos comparáveis ao grupo placebo, apresentavam redução de atividade e adesão de monócitos, além de menor área de placa aterosclerótica em

artérias coronárias<sup>(92)</sup>, outro estudo também verificou que o tratamento com candesartan foi associado com redução do conteúdo de colesterol em aorta torácica quando comparado ao placebo ou atenolol<sup>(93)</sup>. Em ensaio com coelhos Watanabe que foram tratados por 12 meses com trandolapril (IECA) foi demonstrado redução no desenvolvimento de placa aterosclerótica em aorta<sup>(94)</sup>. Em nosso modelo, houve formação de placa aterosclerótica localizada principalmente em arco aórtico, e de forma diferente dos estudos citados, o IECA e o BRA não foram capazes de atenuar a formação de placa, nem alterar sua composição bem como o infiltrado de macrófagos. Yin e cols<sup>(65)</sup> mostraram uma correlação positiva entre os valores de colesterol total ( $r=0,866$ ,  $p=0,003$ ), glicemia ( $r=0,900$ ,  $p=0,001$ ), e a área total de placa em aortas, já no modelo aqui apresentado, houve apenas correlação positiva com os níveis de colesterol total ( $r=0,681$ ,  $p=0,015$ ).

Em nosso modelo houve o desenvolvimento de esteato-hepatite, fibrose com desarranjo da arquitetura hepática. Os efeitos do duplo bloqueio do SRA modificaram a evolução da esteatose sem modificar a fibrose hepática. Os achados histopatológicos preliminares dos rins também sugerem processo inflamatório no modelo de diabetes, o que foi atenuado com o duplo bloqueio. O pâncreas foi preservado em sua capacidade de secreção de insulina, com base nos dados de imunohistoquímica, mas também apresentou expressão do receptor AT1 nas ilhotas, sugerindo que apesar da agressão pela ativação desse sistema, as alterações morfofuncionais das ilhotas possam ser mais tardias.

A inibição da atividade da ECA e o bloqueio do receptor AT1 atenuaram o número e o grau de microaneurismas presentes na retina desses animais. Tais aspectos revestem-se de grande importância para o estudo de mecanismos da retinopatia, e abrem novas possibilidades terapêuticas, uma vez que a cegueira em adultos é principalmente determinada por retinopatia diabética. Outro trabalho<sup>(95)</sup> mostrou que a dieta hipercolesterolêmica em coelhos induz rapidamente aumento da espessura da coróide e esclera, principalmente à custa de histiócitos e fibras colágenas.

A descrição de diabetes mellitus com alterações metabólicas e lesões em órgãos-alvo em coelhos é pouco descrita. Mir e cols.<sup>(96)</sup> apresentaram, no modelo de indução por aloxana, alterações inflamatórias e do estresse oxidativo como responsáveis pelos achados histopatológicos. Nosso modelo examina as alterações em órgãos-alvo no diabetes tipo 2, e vai além, descrevendo pela primeira vez, as

alterações retinianas nesse modelo experimental. Considerando que a principal causa de cegueira em adultos é decorrente de microangiopatia diabética, o modelo pode propiciar investigações de base fisiopatológica e terapêuticas que visem um melhor conhecimento e controle desta grave condição na população humana.

Os resultados parciais do bloqueio do sistema renina-angiotensina revelam a complexidade das alterações associadas ao diabetes, mostrando que o bloqueio de um único sistema, embora traga benefícios incontestes, sua magnitude pode variar de tecido a tecido, sugerindo uma abordagem mais ampla para melhor controle destas alterações. Observamos ainda que graus distintos de comprometimento de órgãos-alvo podem ocorrer, sugerindo que o tempo de exposição aos distúrbios glucometabólicos possa ser um fator relevante no aparecimento das lesões para certos órgãos. A retinopatia, caracterizada de maneira precoce, de certa forma se contrapõe ao antigo conceito da doença micro-vascular ser uma manifestação tardia do diabetes. Na realidade, nesse modelo, em todos os tecidos analisados, houve algum grau de comprometimento da membrana basal, infiltrado inflamatório, precedendo algumas alterações funcionais. Tais achados foram obtidos apenas por indução dietética e de maneira uniforme em todos os animais, o que reforça o conceito de que fatores ligados ao meio ambiente tenham uma grande participação na fisiopatologia do diabetes.

## 6. CONCLUSÕES

O modelo experimental de diabetes *mellitus* induzido por meio da dieta reproduziu alterações bioquímicas e histomorfológicas semelhantes às alterações observadas no diabetes *mellitus* tipo 2 em humanos. Desta forma, coelhos Nova Zelândia constituem um modelo conveniente para o estudo desta doença e de lesões macro e microvasculares, especialmente da retinopatia diabética e aterosclerose.

Foram evidenciadas algumas características de diabetes tipo 2, de base fisiopatológica mista, por déficit de secreção e resistência à insulina, associadas à dislipidemia aterogênica, com lesões micro e macrovasculares, como retinopatia, aterosclerose, alterações glomerulares, além de esteatose e fibrose hepática.

Este modelo torna-se ainda mais adequado, por ser de baixo custo, de curto prazo de indução e de fácil manuseio.

O bloqueio do sistema renina angiotensina, quer com inibidor da ECA ou antagonista do receptor AT1 atenuou o desenvolvimento da retinopatia diabética e mostrou discretas, porém significantes alterações em perfil glucometabólico.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004 May;27(5):1047-53.
2. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*. 1998 Sep;21(9):1414-31.
3. Cooper ME. Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy. *Lancet*. 1998 Jul 18;352(9123):213-9.
4. Turner RC, Cull CA, Frighi V, Holman RR. Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *JAMA*. 1999 Jun 2;281(21):2005-12.
5. Vora JP, Ibrahim HA, Bakris GL. Responding to the challenge of diabetic nephropathy: the historic evolution of detection, prevention and management. *J Hum Hypertens*. 2000 Oct-Nov;14(10-11):667-85.
6. SBD Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes 2007 [online]. 2007 [citado 14/11/2008]. Disponível em: [http://ww2.prefeitura.sp.gov.br/arquivos/secretarias/saude/programas/0007/Diretrizes\\_SBD\\_2007.pdf](http://ww2.prefeitura.sp.gov.br/arquivos/secretarias/saude/programas/0007/Diretrizes_SBD_2007.pdf).
7. Global Burden of Diabetes Mellitus in the Year 2000 [online]. 2000 [citado 15/08/2008]. Disponível em: [http://www.who.int/healthinfo/statistics/bod\\_diabetes.pdf](http://www.who.int/healthinfo/statistics/bod_diabetes.pdf).
8. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA*. 2002 Jan 16;287(3):356-9.
9. Harris MI, Flegal KM, Cowie CC, Eberhardt MS, Goldstein DE, Little RR, et al. Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Diabetes Care*. 1998 Apr;21(4):518-24.
10. Gress TW, Nieto FJ, Shahar E, Wofford MR, Brancati FL. Hypertension and antihypertensive therapy as risk factors for type 2 diabetes mellitus. Atherosclerosis Risk in Communities Study. *N Engl J Med*. 2000 Mar 30;342(13):905-12.

11. Liu L, Choudhury SR, Okayama A, Hayakawa T, Kita Y, Ueshima H. Changes in body mass index and its relationships to other cardiovascular risk factors among Japanese population: results from the 1980 and 1990 national cardiovascular surveys in Japan. *J Epidemiol.* 1999 Jun;9(3):163-74.
12. Scherer PE. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes.* 2006 Jun;55(6):1537-45.
13. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006 Jul;116(7):1793-801.
14. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005 May;115(5):1111-9.
15. Empana JP, Ducimetiere P, Arveiler D, Ferrieres J, Evans A, Ruidavets JB, et al. Are the Framingham and PROCAM coronary heart disease risk functions applicable to different European populations? The PRIME Study. *Eur Heart J.* 2003 Nov;24(21):1903-11.
16. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 2001 May 16;285(19):2486-97.
17. De Backer G, Ambrosioni E, Borch-Johnsen K, Brotons C, Cifkova R, Dallongeville J, et al. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Third Joint Task Force of European and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. *Eur Heart J.* 2003 Sep;24(17):1601-10.
18. Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FA, Bertolami MC, Afiune Neto A, Souza AD, et al. [IV Brazilian Guideline for Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology]. *Arq Bras Cardiol.* 2007 Apr;88 Suppl 1:2-19.
19. Standards of medical care in diabetes--2008. *Diabetes Care.* 2008 Jan;31 Suppl 1:S12-54.
20. Molitch ME, DeFronzo RA, Franz MJ, Keane WF, Mogensen CE, Parving HH, et al. Nephropathy in diabetes. *Diabetes Care.* 2004 Jan;27 Suppl 1:S79-83.
21. Guedes MF, Portes AJF, Junior ASC, Nunes JS, Oliveira RCC. Prevalência da retinopatia diabética em unidade do Programa de Saúde da Família. *Rev Bras Oftalmol.* 2009;68(2):90-5.
22. Harris MI. Undiagnosed NIDDM: clinical and public health issues. *Diabetes Care.* 1993 Apr;16(4):642-52.

23. Czech MP, Corvera S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem*. 1999 Jan 22;274(4):1865-8.
24. Saltiel AR, Pessin JE. Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol*. 2002 Feb;12(2):65-71.
25. Tatosyan AG, Mizenina OA. Kinases of the Src family: structure and functions. *Biochemistry (Mosc)*. 2000 Jan;65(1):49-58.
26. Iyer SN, Chappell MC, Averill DB, Diz DI, Ferrario CM. Vasodepressor actions of angiotensin-(1-7) unmasked during combined treatment with lisinopril and losartan. *Hypertension*. 1998 Feb;31(2):699-705.
27. Wilkinson-Berka JL, Gibbs NJ, Cooper ME, Skinner SL, Kelly DJ. Renoprotective and anti-hypertensive effects of combined valsartan and perindopril in progressive diabetic nephropathy in the transgenic (mRen-2)27 rat. *Nephrol Dial Transplant*. 2001 Jul;16(7):1343-9.
28. Boehm M, Nabel EG. Angiotensin-converting enzyme 2--a new cardiac regulator. *N Engl J Med*. 2002 Nov 28;347(22):1795-7.
29. Venema RC, Venema VJ, Eaton DC, Marrero MB. Angiotensin II-induced tyrosine phosphorylation of signal transducers and activators of transcription 1 is regulated by Janus-activated kinase 2 and Fyn kinases and mitogen-activated protein kinase phosphatase 1. *J Biol Chem*. 1998 Nov 13;273(46):30795-800.
30. Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ, Kahn CR. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 29;93(22):12490-5.
31. Fonseca FAH, Relvas WGM, Izar MCO. Effects of Renin-Angiotensin-Aldosterone System Blockade on Diabetic Patients. *Curr Enz Inhib*. 2005;1(3):239-52.
32. Ferroni P, Basili S, Falco A, Davi G. Inflammation, insulin resistance, and obesity. *Curr Atheroscler Rep*. 2004 Nov;6(6):424-31.
33. Mertens I, Ballaux D, Funahashi T, Matsuzawa Y, Van der Planken M, Verrijken A, et al. Inverse relationship between plasminogen activator inhibitor-I activity and adiponectin in overweight and obese women. Interrelationship with visceral adipose tissue, insulin resistance, HDL-chol and inflammation. *Thromb Haemost*. 2005 Dec;94(6):1190-5.
34. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000 Jul;106(2):171-6.
35. Zdychova J, Komers R. Emerging role of Akt kinase/protein kinase B signaling in pathophysiology of diabetes and its complications. *Physiol Res*. 2005;54(1):1-16.

36. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*. 2004 May;145(5):2273-82.
37. Andreozzi F, Laratta E, Sciacqua A, Perticone F, Sesti G. Angiotensin II impairs the insulin signaling pathway promoting production of nitric oxide by inducing phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser312 and Ser616 in human umbilical vein endothelial cells. *Circ Res*. 2004 May 14;94(9):1211-8.
38. Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*. 2006 Apr 18;113(15):1888-904.
39. Samuelsson AM, Bollano E, Mobini R, Larsson BM, Omerovic E, Fu M, et al. Hyperinsulinemia: effect on cardiac mass/function, angiotensin II receptor expression, and insulin signaling pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Aug;291(2):H787-96.
40. Banday AA, Siddiqui AH, Menezes MM, Hussain T. Insulin treatment enhances AT1 receptor function in OK cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Jun;288(6):F1213-9.
41. Golovchenko I, Goalstone ML, Watson P, Brownlee M, Draznin B. Hyperinsulinemia enhances transcriptional activity of nuclear factor-kappaB induced by angiotensin II, hyperglycemia, and advanced glycosylation end products in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2000 Oct 27;87(9):746-52.
42. Nickenig G, Roling J, Strehlow K, Schnabel P, Bohm M. Insulin induces upregulation of vascular AT1 receptor gene expression by posttranscriptional mechanisms. *Circulation*. 1998 Dec 1;98(22):2453-60.
43. Tikellis C, Wookey PJ, Candido R, Andrikopoulos S, Thomas MC, Cooper ME. Improved islet morphology after blockade of the renin-angiotensin system in the ZDF rat. *Diabetes*. 2004 Apr;53(4):989-97.
44. Chu KY, Lau T, Carlsson PO, Leung PS. Angiotensin II type 1 receptor blockade improves beta-cell function and glucose tolerance in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2006 Feb;55(2):367-74.
45. Pomaro D, Fonseca FAH, Ebihara F, Gomes TS, Helfenstein T, Pinto LESA, Casarini DE, Izar MCO, Franco MF, Ihara SSM. Quinapril promotes renal protection independently of glucose levels in hypercholesterolemic and diabetic rabbits. *Int J Atheroscler*. 2006;1(2):156-61.

46. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 2000 Sep;52(3):415-72.
47. Zulli A, Burrell LM, Widdop RE, Black MJ, Buxton BF, Hare DL. Immunolocalization of ACE2 and AT2 receptors in rabbit atherosclerotic plaques. *J Histochem Cytochem.* 2006 Feb;54(2):147-50.
48. Ferrario CM. Angiotensin-(1-7) and antihypertensive mechanisms. *J Nephrol.* 1998 Nov-Dec;11(6):278-83.
49. Yamada K, Iyer SN, Chappell MC, Ganten D, Ferrario CM. Converting enzyme determines plasma clearance of angiotensin-(1-7). *Hypertension.* 1998 Sep;32(3):496-502.
50. Ferrario CM, Strawn WB. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2006 Jul 1;98(1):121-8.
51. Dahlof B, Devereux RB, Kjeldsen SE, Julius S, Beevers G, de Faire U, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet.* 2002 Mar 23;359(9311):995-1003.
52. Lindholm LH, Ibsen H, Dahlof B, Devereux RB, Beevers G, de Faire U, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet.* 2002 Mar 23;359(9311):1004-10.
53. Lindholm LH, Persson M, Alaupovic P, Carlberg B, Svensson A, Samuelsson O. Metabolic outcome during 1 year in newly detected hypertensives: results of the Antihypertensive Treatment and Lipid Profile in a North of Sweden Efficacy Evaluation (ALPINE study). *J Hypertens.* 2003 Aug;21(8):1563-74.
54. Mizuno M, Sada T, Kato M, Koike H. Renoprotective effects of blockade of angiotensin II AT1 receptors in an animal model of type 2 diabetes. *Hypertens Res.* 2002 Mar;25(2):271-8.
55. Mann JF, Schmieder RE, McQueen M, Dyal L, Schumacher H, Pogue J, et al. Renal outcomes with telmisartan, ramipril, or both, in people at high vascular risk (the ONTARGET study): a multicentre, randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet.* 2008 Aug 16;372(9638):547-53.
56. Schuh JR, Blehm DJ, Friedrich GE, McMahon EG, Blaine EH. Differential effects of renin-angiotensin system blockade on atherogenesis in cholesterol-fed rabbits. *J Clin Invest.* 1993 Apr;91(4):1453-8.

57. Wojakowski W, Gminski J, Siemianowicz K, Goss M, Machalski M. The influence of angiotensin converting enzyme inhibitors on lipid peroxidation in sera and aorta of rabbits in diet-induced hypercholesterolemia. *Int J Mol Med*. 2000 Nov;6(5):591-4.
58. Campbell JH, Fennessy P, Campbell GR. Effect of perindopril on the development of atherosclerosis in the cholesterol-fed rabbit. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*. 1992;19:13-7.
59. Fennessy PA, Campbell JH, Campbell GR. Perindopril inhibits both the development of atherosclerosis in the cholesterol-fed rabbit and lipoprotein binding to smooth muscle cells in culture. *Atherosclerosis*. 1994 Mar;106(1):29-41.
60. Hickey H, Makdissi M, Hyland R, Wilks D, Dusting GJ. Perindopril treatment prevents the loss of endothelial nitric oxide function and development of neo-intima in rabbits. *J Mol Cell Cardiol*. 1996 Sep;28(9):1985-94.
61. Zhuo J, Casley D, Murone C, Mendelsohn FA. Acute and chronic in vivo inhibition of angiotensin-converting enzyme by perindopril in the endothelium and adventitia of large arteries and organs of the rabbit. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1997 Mar;29(3):297-310.
62. Li D, Sweeney G, Wang Q, Klip A. Participation of PI3K and atypical PKC in Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-pump stimulation by IGF-I in VSMC. *Am J Physiol*. 1999 Jun;276(6 Pt 2):H2109-16.
63. de las Heras N, Aragoncillo P, Maeso R, Vazquez-Perez S, Navarro-Cid J, DeGasparo M, et al. AT(1) receptor antagonism reduces endothelial dysfunction and intimal thickening in atherosclerotic rabbits. *Hypertension*. 1999 Oct;34(4 Pt 2):969-75.
64. Johnstone MT, Perez AS, Nasser I, Stewart R, Vaidya A, Al Ammary F, et al. Angiotensin receptor blockade with candesartan attenuates atherosclerosis, plaque disruption, and macrophage accumulation within the plaque in a rabbit model. *Circulation*. 2004 Oct 5;110(14):2060-5.
65. Yin W, Yuan Z, Wang Z, Yang B, Yang Y. A diet high in saturated fat and sucrose alters glucoregulation and induces aortic fatty streaks in New Zealand White rabbits. *Int J Exp Diabetes Res*. 2002 Jul-Sep;3(3):179-84.
66. Song Y, Manson JE, Tinker L, Howard BV, Kuller LH, Nathan L, et al. Insulin sensitivity and insulin secretion determined by homeostasis model assessment and risk of diabetes in a multiethnic cohort of women: the Women's Health Initiative Observational Study. *Diabetes Care*. 2007 Jul;30(7):1747-52.
67. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972 Jun;18(6):499-502.

68. Friedland J, Silverstein E. A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. *Am J Clin Pathol*. 1976 Aug;66(2):416-24.
69. Piquilloud Y, Reinharz A, Roth M. Studies on the angiotensin converting enzyme with different substrates. *Biochim Biophys Acta*. 1970 Apr 22;206(1):136-42.
70. Islam MS, Loots du T. Experimental rodent models of type 2 diabetes: a review. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2009 May;31(4):249-61.
71. Lasserre B, Navarro-Delmas C, Pham Huu Chanh A, Catala J, Hollande E. Modifications in the TXA(2) and PGI(2) plasma levels and some other biochemical parameters during the initiation and development of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) syndrome in the rabbit. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2000 May;62(5):285-91.
72. Movassat J, Saulnier C, Serradas P, Portha B. Impaired development of pancreatic beta-cell mass is a primary event during the progression to diabetes in the GK rat. *Diabetologia*. 1997 Aug;40(8):916-25.
73. Ronald JA, Chen JW, Chen Y, Hamilton AM, Rodriguez E, Reynolds F, et al. Enzyme-sensitive magnetic resonance imaging targeting myeloperoxidase identifies active inflammation in experimental rabbit atherosclerotic plaques. *Circulation*. 2009 Aug 18;120(7):592-9.
74. Resmi H, Pekcetin C, Guner G. Erythrocyte membrane and cytoskeletal protein glycation and oxidation in short-term diabetic rabbits. *Clin Exp Med*. 2001 Dec;1(4):187-93.
75. Baker JR, O'Connor JP, Metcalf PA, Lawson MR, Johnson RN. Clinical usefulness of estimation of serum fructosamine concentration as a screening test for diabetes mellitus. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1983 Sep 24;287(6396):863-7.
76. Baker JR, Johnson RN, Scott DJ. Serum fructosamine concentrations in patients with type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus during changes in management. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1984 May 19;288(6429):1484-6.
77. Abdul-Ghani MA, Jenkinson CP, Richardson DK, Tripathy D, DeFronzo RA. Insulin secretion and action in subjects with impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: results from the Veterans Administration Genetic Epidemiology Study. *Diabetes*. 2006 May;55(5):1430-5.
78. Abdul-Ghani MA, Matsuda M, Jani R, Jenkinson CP, Coletta DK, Kaku K, et al. The relationship between fasting hyperglycemia and insulin secretion in subjects with normal or impaired glucose tolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008 Aug;295(2):E401-6.

79. Doweiko JP, Nompleggi DJ. Role of albumin in human physiology and pathophysiology. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1991 Mar-Apr;15(2):207-11.
80. Winiarska K, Szymanski K, Gorniak P, Dudziak M, Bryla J. Hypoglycaemic, antioxidative and nephroprotective effects of taurine in alloxan diabetic rabbits. *Biochimie.* 2009 Feb;91(2):261-70.
81. Birkner E, Zalejska-Fiolka J, Kasperczyk A, Kasperczyk S, Grucka-Mamczar E, Stawiarska-Pieta B, et al. The influence of methionine, selenomethionine, and vitamin E on liver metabolic pathways and steatosis in high-cholesterol fed rabbits. *Biol Trace Elem Res.* 2007 Winter;120(1-3):179-94.
82. Hudacko RM, Sciancalepore JP, Fyfe BS. Diabetic microangiopathy in the liver: an autopsy study of incidence and association with other diabetic complications. *Am J Clin Pathol.* 2009 Oct;132(4):494-9.
83. Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *Lancet.* 2000 Jan 22;355(9200):253-9.
84. Fox KM. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPA study). *Lancet.* 2003 Sep 6;362(9386):782-8.
85. Randomised trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6,105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack. *Lancet.* 2001 Sep 29;358(9287):1033-41.
86. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med.* 2001 Sep 20;345(12):861-9.
87. Viberti G, Wheeldon NM. Microalbuminuria reduction with valsartan in patients with type 2 diabetes mellitus: a blood pressure-independent effect. *Circulation.* 2002 Aug 6;106(6):672-8.
88. Cooper ME, Johnston CI. Optimizing treatment of hypertension in patients with diabetes. *JAMA.* 2000 Jun 28;283(24):3177-9.
89. Jandeleit-Dahm K, Cooper ME. Hypertension and diabetes. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2002 Mar;11(2):221-8.
90. Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension.* 2001 Apr;37(4):1053-9.



91. Karalliedde J, Viberti G. Evidence for renoprotection by blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertension and diabetes. *J Hum Hypertens*. 2006 Apr;20(4):239-53.
92. Strawn WB, Chappell MC, Dean RH, Kivlighn S, Ferrario CM. Inhibition of early atherogenesis by losartan in monkeys with diet-induced hypercholesterolemia. *Circulation*. 2000 Apr 4;101(13):1586-93.
93. Papademetriou V, Mammillot P, Redman R, Notargiacomo A, Narayan P, Lakshman R. Prevention of atherosclerosis by specific AT1-receptor blockade with candesartan cilexetil. *JRAAS*. 2001;2(1):S77-S80.
94. Chobanian AV, Haudenschild CC, Nickerson C, Hope S. Trandolapril inhibits atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Hypertension*. 1992 Oct;20(4):473-7.
95. Torres RJ, Maia M, Noronha L, Farah ME, Luchini A, Brik D, et al. [Evaluation of choroid and sclera early alterations in hypercholesterolemic rabbits: histologic and histomorphometric study]. *Arq Bras Oftalmol*. 2009 Jan-Feb;72(1):68-74.
96. Mir SH, Darzi MM. Histopathological abnormalities of prolonged alloxan-induced diabetes mellitus in rabbits. *Int J Exp Pathol*. 2009 Feb;90(1):66-73.