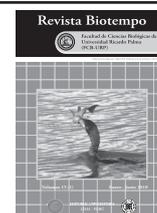




Biotempo (Lima)



ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

BIOMODEL OF ARTERIAL HYPERTENSION IN WISTAR RATS ADMINISTERED WITH SALINE SOLUTION TO 10%

BIOMODELO DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL EN RATAS WISTAR ADMINISTRADAS CON SOLUCIÓN SALINA AL 10 %

Ramón Romero Borges¹; Arianna Valido Díaz²; Tania Bernal Llerena²; Rigoberto Fimia Duarte³
& José Iannacone^{4,5}

¹ Unidad de Toxicología Experimental Villa Clara. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara. Cuba. Correo electrónico: ramonrb@infomed.sld.cu

² Unidad de Toxicología Experimental Villa Clara. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara. Cuba. Correo electrónico: ariannavdz@infomed.sld.cu / taniallb@infomed.sld.cu

³ Facultad de Tecnología de la Salud. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara. Cuba. Correo electrónico: rigobertofd@infomed.sld.cu

⁴ Laboratorio de Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma (URP). Lima, Perú.

⁵ Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal (LEBA). Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV). Lima, Perú.

E-mail: joseiannacone@gmail.com

ABSTRACT

It is well-known that systemic arterial hypertension is one of the pathologies more prevalent in developed and developing societies. The use of experimental animal models has provided valuable information on many aspects of arterial hypertension including its etiology, physiopathology, complications and treatment. Because the etiology of arterial hypertension is heterogeneous, many of the experimental models with animals have been developed to imitate the different facets of human arterial hypertension. In the past, most studies in experimental hypertension were performed on dogs; currently, in addition to the rat, chosen as the preferred animal species, other species, such as mice and rabbits, are also used in research protocols. In the Experimental Toxicology Unit, there are numerous animal biomodels, but there is no biomodel of arterial hypertension, so its creation would be of vital importance so that new natural products and therapies can be tried to combat this disease that affects the world. Therefore, the objective of our project was to describe the existing biomodels of arterial hypertension in Wistar rats with the purpose of testing natural products with hypotension effects. There was an increase in body weight of rats administered 10% saline compared to control rats. Blood pressure values at the second week showed significant differences with respect to the control group. At the end

of the third week, mean blood pressure in the administered group was SBP (systolic blood pressure) -152.0 mmHg and DBP (diastolic blood pressure) -110.0 mmHg, indicating hypertensive rats.

Keywords: biomodel – fisiopatología – hipertensión – investigación – rats

RESUMEN

Es conocido que la Hipertensión arterial sistémica es una de las patologías más prevalentes en las sociedades desarrolladas y en vías de desarrollo. La utilización de modelos animales experimentales ha proporcionado valiosa información sobre muchos aspectos de la hipertensión arterial, incluyendo su etiología, fisiopatología, complicaciones y tratamiento. Debido a que la etiología de la Hipertensión arterial es heterogénea, muchos de los modelos experimentales con animales se han desarrollado para imitar las diferentes facetas de la hipertensión arterial humana. En el pasado, la mayoría de los estudios en la HTA (Hipertensión arterial) experimental se llevaron a cabo sobre perros; actualmente, además de la rata, elegida como la especie animal preferida, otras especies, como el ratón y el conejo, también son utilizadas en los protocolos de investigación. En la Unidad de Toxicología Experimental, existen numerosos biomodelos animales, pero no se cuenta con un biomodelo de hipertensión arterial, por lo que la creación del mismo sería de vital importancia pues a través del mismo se puede probar nuevos productos naturales y terapias para combatir esta enfermedad que tanto afecta el mundo. Por lo tanto, el objetivo fue describir un biomodelo de hipertensión arterial existentes en ratas Wistar con el fin de probar productos naturales con efecto hipotensor. Existió un aumento del peso corporal en las ratas administradas con solución salina al 10%, con respecto a las ratas control. Los valores de presión arterial a la segunda semana presentando diferencias significativas con respecto al grupo control. Al finalizar la tercera semana cifras de la presión arterial promedio en el grupo administrado fue de PAS 8 (presión arterial sistólica) -152,0 mmHg y PAD (presión arterial diastólica) - 110,0 mmHg, siendo estas ratas Hipertensas.

Palabras clave: biomodelo – fisiopatología – hipertensión – investigación – ratas

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se considera que una persona es hipertensa cuando tiene una presión arterial sistólica (PAS) igual o superior a 140 mmHg y una presión arterial diastólica (PAD) igual o superior a 90 mmHg. En 2003, la ESH (Sociedad Europea de Hipertensión) y la AHS (“American Heart Association”) establecieron la clasificación de los distintos grados de hipertensión (Abdelzaher *et al.*, 2010; Adinstruments, 2011). Dada la importancia de la hipertensión como FRCV (Factores de Riesgo Cardiovascular), estas Sociedades se reúnen periódicamente para revisar los valores óptimos de presión arterial y establecer los criterios de tratamiento, según estén presentes o no otros FRCV adicionales (Dornas & Silva, 2011; Arapa-Díaz, 2015).

Aunque la hipertensión esencial tiene un origen desconocido, puede ser atribuida a múltiples factores. A continuación, se describen algunas de las alteraciones orgánicas -remodelado vascular y disfunción endotelial- y posibles mecanismos implicados en su patogénesis, en particular el papel de la angiotensina II y estrés oxidativo (Izzo & Weir, 2011; Brunton *et al.*, 2012; James *et al.*, 2014).

Remodelado vascular: una de las características principales de la hipertensión esencial es el aumento de la resistencia periférica, que se ha descrito tanto en pacientes con HTA (Hipertensión arterial) como en modelos experimentales de hipertensión. Este incremento de la resistencia periférica es debido principalmente a un estrechamiento general de los vasos pequeños, lo que se conoce como remodelado vascular (Koga *et al.*, 1989; James *et al.*, 2014). Esta alteración no sólo perpetúa la HTA sino que se ha demostrado que participa en el desarrollo de ECV (enfermedades cerebrovasculares) (Longo *et al.*, 2012).

Disfunción endotelial: Es bien conocido que la HTA también se asocia con disfunción endotelial. Esta se caracteriza por una disminución en la relajación dependiente de endotelio por exceso de agentes vasoconstrictores o por disminución de vasodilatadores (Madariaga, 2001). A su vez, una deficiencia de factores dilatadores como el óxido nítrico (NO), el factor hiperpolarizante dependiente de endotelio (EDHF) y la prostaglandina (PGI), puede ser debida a una deficiencia en la síntesis o a un aumento en su degradación, jugando un papel relevante el estrés oxidativo. La disfunción endotelial y el estrés oxidativo no sólo son característicos de la HTA sino que también se asocian a otros FRCV incluyendo modificables y no modificables (Madariaga, 2001; Miyazaki, 2006).

Papel del sistema renina-angiotensina (SRA) y estrés oxidativo: diversos estudios han demostrado que alteraciones del SRA juegan un papel importante en la fisiopatología de la HTA, a través de la angiotensina II, la cual participa en los procesos de remodelado, fibrosis y disfunción endotelial (Izzo & Weir, 2011). Por un lado, la angiotensina II modifica la regulación del homeostasis hidrosalina a través de la liberación de aldosterona. Así mismo, este péptido produce contracción del músculo liso vascular y potencia la liberación de otros vasoconstrictores como la noradrenalina, la vasopresina y la endotelina. Además, la angiotensina II está implicada en alteraciones del balance oxidativo estimulando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en tejido vascular y cardíaco (Romayne *et al.*, 2008). A su vez, un exceso de ROS, que supere a la capacidad de eliminación por los sistemas de defensa antioxidante del organismo, conduce a una situación de desequilibrio - denominado estrés oxidativo- que produce oxidación excesiva de macromoléculas dañando estructuras cardiovasculares y alterando los procesos de crecimiento y muerte celular, producción de matriz extracelular y degradación de factores vasodilatadores (Singh *et al.*, 2008; Abdulla *et al.*, 2013).

Biomodelo de hipertensión DOCA-sal en ratas: este modelo volumen-dependiente utiliza el mineralocorticoide acetato de desoxicorticosterona (DOCA), asemejándose a la situación clínica de la aldosterona en exceso. El estado hipertensivo es producido por la realización de una nefrectomía unilateral seguida por la administración de DOCA, junto con el exceso de sal. Se ha sugerido que este modelo desempeña un papel en la patogénesis de la HTA, incluyendo la activación del sistema nervioso simpático, de la vasopresina, alteraciones en el centro de regulación de receptores de la angiotensina II, endotelina, y estrés oxidativo (Biancardi *et al.*, 2007).

Por lo tanto, el objetivo de nuestro trabajo fue describir los biomodelos de hipertensión arterial existentes en ratas Wistar con el fin de probar productos naturales con efecto hipotensor.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Toxicología Experimental (UTEX), un centro de Ciencia y Técnica adscripta a la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Cuba.

Para dicho estudio se utilizaron un total de 20 ratas de la especie *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, línea Wistar. Las mismas fueron traídas desde el Centro Nacional de

Producción de Animales de Laboratorio CENPALAB, con un peso promedio de ± 250 g. Las mismas fueron puestas en cuarentena por 7 días y posteriormente trasladadas a los cubículos de experimentación con un régimen de temperatura de $\pm 23^{\circ}\text{C}$ y con condiciones de iluminación 12:12. El consumo de alimentos consistió en pienso para ratas EAO1004, suministrada por el CENPALAB. El acceso al agua fue *ad libitum*, y consumo de 20 g de pienso diarios.

Métodos de identificación

Los animales se identificaron individualmente mediante el método de ponche en la oreja. Las cajas se identificaron mediante tarjetas que contuvieron la siguiente información: número del Protocolo, número de la caja, grupo de tratamiento, número del animal, sexo, especie y línea. Una vez identificados los animales se conformaron dos grupos experimentales quedando de la siguiente manera:

Grupo I (Control): este grupo tuvo 10 animales los cuales no se sometieron a ninguna administración, se mantuvo en condiciones antes descritas.

Grupo II: este grupo tuvo 10 animales los cuales se administró solución salina al 10 % con una dosificación de 2 ml vía oral por animal por 15 días.

Procedimiento para la correcta administración oral

Ponga el animal en posición de vertical. Con la otra mano, la sonda o la cánula unida a la jeringuilla con la sustancia a administrar, es introducida lateralmente en la boca hasta localizar la entrada al esófago y deslizada suavemente por la pared de este hasta el esfínter gástrico. Asegúrese de que la sonda esté bien introducida por la vía oral para evitar una broncoaspiración. La intubación gástrica adecuada permite que el animal pueda vocalizar y el recorrido de la cánula se siente suave. Después de la intubación, descargue una pequeña cantidad de la sustancia y observe si aparecen burbujas de líquido por los orificios nasales. De no ocurrir alteraciones, descargue el resto del contenido de la jeringuilla. Retire cuidadosamente la sonda o aguja para no lastimar el esófago.

Medición de la presión arterial

La presión arterial en las ratas se midió a ambos grupos al día 0, 7 y 15 de la investigación. El equipo utilizado fue un CODA™ Monitor (Noninvasive Blood Pressure for Mice and Rats) emka Technologies.

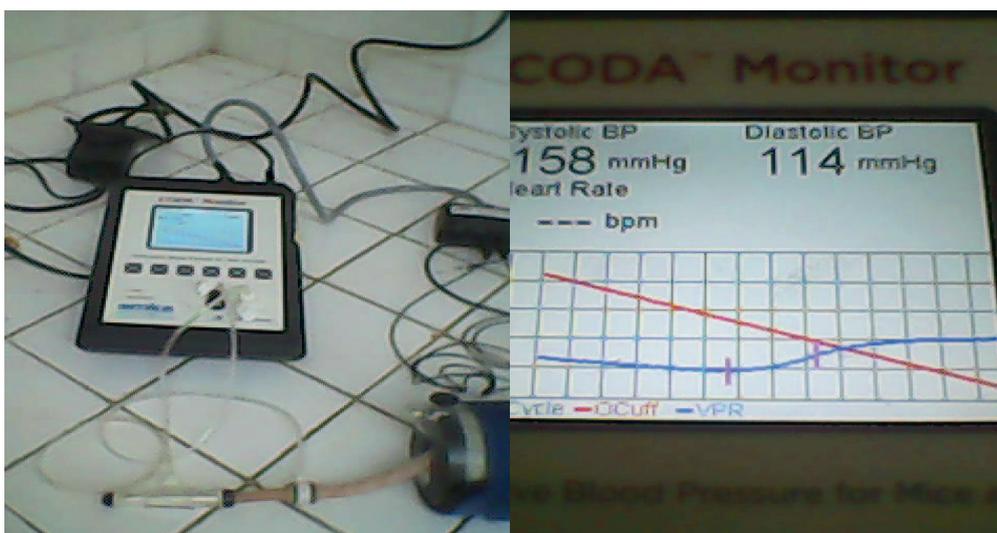


Figura 1. Equipo de medición de presión utilizado en el estudio.

Las ratas se consideraron hipertensas cuando presentaron cifras de PAS de 140 con 100 mmHg durante dos días consecutivos.

Aspectos éticos y de bioseguridad

Todos los experimentos fueron ejecutados cumpliendo los requisitos descritos en el Manual de Bioseguridad de la UTEX (Unidad de Toxicología) (Madariaga, 2001), que implican la correcta manipulación de las muestras y desechos biológicos, el uso de los implementos de seguridad para el investigador, así como la ejecución de las pruebas en lugares idóneos, que garanticen no solo la calidad de la investigación, sino también la protección del personal y del medio ambiente. Se observó el cumplimiento de los principios éticos en la experimentación animal, referente a mantener el bienestar de los animales durante el ensayo y aplicar los métodos aceptados para la ejecución de las técnicas que implique abordaje invasivo del animal. Al concluir la experiencia se procedió al sacrificio por métodos aceptados que no causen dolor y sufrimiento al animal (dislocación cervical).

Los datos obtenidos fueron tabulados en el programa Excel 2013 y procesados por el paquete estadístico SPSS para Windows Versión 21.0. Se determinó la media y desviación estándar para cada grupo experimental. Después de comprobar la normalidad en la distribución de las variables se aplicó ANOVA de una vía para comprobar diferencias entre los grupos experimentales

y seguidamente un test de Dunnet. Las variables que no siguieron la distribución normal se compararon aplicando los test de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney con un intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se evidencia en la tabla 1 las ratas que fueron sometidas a la administración de cloruro de sodio al 10 % tuvieron un peso algo mayor que las ratas de los otros grupos. Estos resultados concuerdan con los de otros investigadores que también comprobaron que la administración de solución salina al 8% en ratas Wistar adultas aceleraba la ingestión de agua y alimentos aumentando así la ganancia de peso corporal en estos animales (Greenberg, 2008; Reinhold *et al.*, 2009; Meneses *et al.*, 2011; Condezo-Hoyos *et al.*, 2012).

Tabla 1. Comportamiento del peso durante la duración del estudio.

Etapa	Grupo Control	Grupo Solución Salina
Día 0	255±3,12	265,2 ±5,15
Día 7	265±3,24	290±4,85*
Día 15	265±4,15	310±5,21*

*Peso corporal de grupos control y con solución salina 10%; *p<0,05 comparado con control.

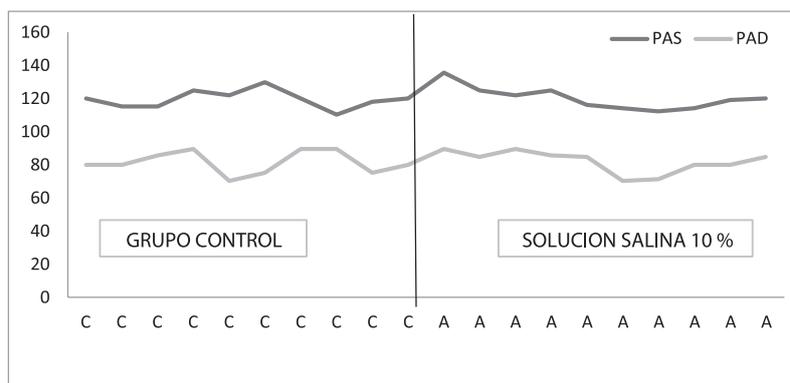


Figura 2. Presión arterial tomada antes de comenzar el estudio (día 0). PAS = presión arterial sistólica. PAD = presión arterial diastólica.

En la figura 2 se muestran los valores promedio de la PAS al iniciar el estudio en cada uno de los grupos, los cuales no presentaron diferencias significativas entre sí.

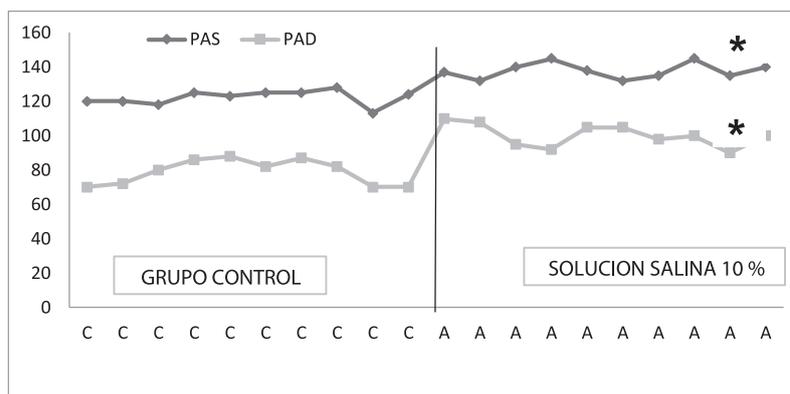


Figura 3. Presión arterial tomada a los 7 días de administración de solución salina al 10 %. * $p < 0,05$ respecto al control. PAS = presión arterial sistólica. PAD = presión arterial diastólica.

En la figura 3 se muestran los valores promedio de la PAS a la inicial el estudio en cada uno de los grupos, presentando diferencias significativas con respecto al grupo control (* $p < 0,05$ respecto al control). Estos resultados coinciden con los planteados en investigaciones realizadas España (Kampus *et al.*, 2011; Bareño, 2015).

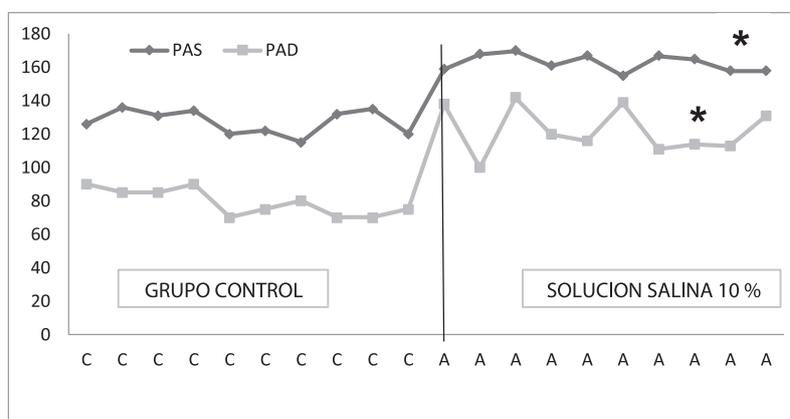


Figura 4. Presión arterial tomada a los 15 días de administración de solución salina al 10 %. * $p < 0,05$ respecto al control. PAS = presión arterial sistólica. PAD = presión arterial diastólica.

Los animales experimentales al inicio del estudio presentaron valores de presión arterial sistólica en promedio de $120,0 \pm 6,55$ mmHg y para la tercera semana cifras de la presión arterial $152,0 \pm 4,12$ mmHg, obteniendo un promedio por grupo después de la distribución de: $150,0 \pm 9,13$ mmHg en los que se les administraba la solución salina al 10 % y de $125,0 \pm 7,15$ mmHg para el grupo control (Figura 4). Se ha sugerido que este modelo desempeña un papel en la patogénesis de la HTA, incluyendo la activación del sistema nervioso simpático, de la vasopresina, alteraciones en el centro de regulación de receptores de la angiotensina II, endotelina, y estrés oxidativo (Carrón *et al.*, 2010; Mancía *et al.*, 2013; Majumder & Wu, 2014; Leong *et al.*, 2015).

Existió un aumento del peso corporal en las ratas administradas con solución salina al 10 %, con respecto a las ratas control. Los valores de presión arterial a la segunda semana presentando diferencias significativas con respecto al grupo control. Al finalizar la tercera semana cifras de la presión arterial promedio en el grupo administrado fue de PAS-152,0 mmHg y PAD- 110,0 mmHg, siendo estas ratas Hipertensas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelzaher, E.; Abdel-Reheem O.I.; Abdel-Halim H. M., Abd-Elhameed, A. & Kamal, D. 2010. Effect of angiotensin converting enzyme inhibitors, peroxisome proliferators activated receptor- and agonists, and statins on a rat model of hypertension. *Bulletin of Alexandria Faculty of Medicine*, 46: 231-245.
- Abdulla, M.H.; Sattar, M.A.; Abdullah, N.A. & Johns, E.J. 2013. The effect of high-fructose intake on the vasopressor response to angiotensin II and adrenergic agonists in Sprague-Dawley rats. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26: 727-732.
- Adinstruments. 2011. *Técnica para medición de la presión arterial por método no invasivo en ratas*. Consultado en septiembre, 2016 a partir de www.adinstruments.com/products/software/chart.php.
- Arapa-Díaz, J.C. 2015. *Efecto hipotensor del extracto metanólico de la piel de papa "lomo negro" Solanum tuberosum L. (Solanaceae, nativa del Perú) por inhibición de la enzima convertidora de angiotensina en ratas con hipertensión experimental y normotensas: un estudio por métodos invasivo in vivo e in vitro*. Tesis de la Facultad de Medicina, UNSA.
- Bareño, L. 2015. *Estudio de la actividad antihipertensiva de Passiflora quadrangularis L en ratas con hipertensión inducida por déficit de óxido nítrico*. (Tesis de maestría) Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Biancardi, V.C.; Bergamaschi, C.T.; Lopes, O.U. & Campos, R.R. 2007. Sympathetic activation in rats with L-NAME-induced hypertension. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40:401-408.
- Brunton, L.L.; Chabner, B.A. & Knollmann, B.C. 2012. *Las bases farmacológicas de la Terapéutica de Goodman & Gilman-12*. AMGH Ed.
- Carrón, R.; Sanz, E.; Puebla, P.; Martín, M.; San Roman, L. & Guerrero, M. 2010. Mechanisms of relaxation induced by flavonoid ayanin in isolated aorta rings from Wistar rats. *Revista Colombia Médica*, 41: 10-16.
- Condezo-Hoyos, L.; Arribas, S.M.; Abderrahim, F.; Somoza, B.; Gil-Ortega, M.; Díaz-Gil, J.J.; Conde, M.V.; Cristina, S.; González, M.C. 2012. Liver growth factor treatment reverses vascular and plasmatic oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, 30: 1185-1194.
- Dornas, W.C. & Silva, M.E. 2011. Animal models for the study of arterial hypertension. *Journal of Biosciences*, 36:731-737.
- Greenberg, B. 2008. An ACE in the Hole: Alternative Pathways of the Renin Angiotensin System and Their Potential Role in Cardiac Remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*, 52: 755-757.
- Izzo, Jr J.L. & Weir, M.R. 2011. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *The Journal of Clinical Hypertension*, 13: 667-675.
- James, P.A.; Oparil, S.; Carter, B.L.; Cushman, W.C.; Dennison-Himmelfarb, C.; Handler, J.;

- Lackland, D.T.; LeFevre, M.L.; MacKenzie, T.D.; Ogedegbe, O.; Smith Jr, S.C.; Svetkey, L.P.; Taler, S.J.; Townsend, R.R.; Wright Jr, J.T.; Narva, A.S. & Ortiz, E. 2014. Evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *Journal of the American Medical Association*, 311: 507-520.
- Kampus, P.; Serg, M.; Kals, J.; Zagura, M.; Muda, P.; Karu, K.; Zilmer, M. & Eha, J. 2011. Differential effects of nebivolol and metoprolol on central aortic pressure and left ventricular wall thickness. *Hypertension*, 57: 1122-1128.
- Koga, T.; Takata, Y.; Kobayashi, K.; Takishita, S.; Yamashita, Y. & Fujishima, M. 1989. Age and hypertension promote endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the rat. *Hypertension*, 14: 542-548.
- Leong, X.; Ng, C. & Jaarin, K. 2015. Animal models in cardiovascular research: hypertension and atherosclerosis. *BioMed Research International*, ID 528757, 1-11.
- Longo, D.L.; Ng, C.Y. & Jaarin, K. 2012. *Harrison Principios de Medicina Interna*. México. McGraw-Hill Interamericana Editores, S. A. de C.V. 18^{ava} ed.
- Madariaga, Y.G. 2001. *Manual de Calidad de la UTEX. Unidad de Garantía de la Calidad*. Unidad de Toxicología Experimental. ISCM-VC. 2001.
- Majumder, K. & Wu, J. 2014. Molecular targets of antihypertensive peptides: Understanding the mechanisms of action based on the pathophysiology of hypertension. *International Journal of Molecular Sciences*, 16: 256-283.
- Mancia, G.; Fagard, R.; Narkiewicz, K.; Redón, J.; Zanchetti, A.; Böhm, M.; Christiaens, T.; Cifkova, R.; De Backer, G.; Dominiczak, A.; Galderisi, M.; Grobbee, D.E.; Jaarsma, T.; Kirchhof, P.; Kjeldsen, S.E.; Laurent, S.; Manolis, A.J.; Nilsson, P.M.; Ruilope, L.M.; Schmieder, R.E.; Sirnes, P.A.; Sleight, P.; Viigimaa, M.; Waeber, B.; Zannad, F.; Redon, J.; Dominiczak, A.; Narkiewicz, K.; Peter M. Nilsson, P.M.; Burnier, M.; Viigimaa, M.; Ambrosioni, E.; Caulfield, M.; Coca, A.; Olsen, M.H.; Schmieder, R.E.; Tsioufis, C.; van de Borne, P.; Zamorano, J.L.; Achenbach, S.; Baumgartner, H.; Bax, J.J.; Bueno, H.; Dean, V.; Deaton, C.; Erol, C.; Fagard, R.; Ferrari, R.; Hasdai, D.; Hoes, A.W.; Kirchhof, P.; Knuuti, J.; Kolh, P.; Lancellotti, P.; Linhart, A.; Nihoyannopoulos, P.; Piepoli, M.F.; Ponikowski, P.; Sirnes, P.A.; Tamargo, J.L.; Tendera, M.; Torbicki, A.; Wijns, W.; Windecker, S.; Clement, D.L.; Coca, A.; Gillebert, T.C.; Tendera, M.; Agabiti, E.; Ambrosioni, E.R.; Anker, S.D.; Bauersachs, J.; Brguljan, J.; Caulfield, H.M.; De Buyzere, M.; De Geest, S.; Derumeaux, G.A.; Erdine, S.; Farsang, C.; Funck-Brentano, C.; Gerc, V.; Germano, G.; Gielen, S.; Haller, H.; Hoes, A.W.; Jordan, J.; Kahan, T.; Komajda, M.; Lovic, D.; Mahrholdt, H.; Hecht, M.; Jan Ostergren, O.J.; Parati, G.; Perk, J.; Polonia, J.; Popescu, B.A.; Reiner, Z.; Rydén, L.; Sirenko, Y.; Stanton, A.; Struijker-Boudier, H.; Tsioufis, C.; Philippe van de Borne, P.; Vlachopoulos, C.; Volpe, M. & Wood, D.A. 2013. Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Journal of Hypertension*, 31: 1281-1357.
- Meneses, A.; Perez-Garcia, G.; Ponce-Lopez, T.; Tellez, R.; Gallegos-Cari, A. & Castillo, C. 2011. Spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model for ADHD: a short overview. *Reviews in the neurosciences*, 22: 365-371.
- Miyazaki, M.; Takai, S.; Jin, D. & Muramatsu, M. 2006. Pathological roles of angiotensin II produced by mast cell chymase and the effects of chymase inhibition in animal models. *Pharmacology & Therapeutics*, 112:668-676.
- Reinhold, S.W.; Uihlein, D.C.; Böger, C.A.; Kloiber, S.; Frölich, K.; Bergler, T.; Banas, B.; Schweda, F. & Krämer, B.K. 2009. Renin, Endothelial NO synthase and endothelin gene expression in the 2Kidney-1clip Goldblatt model of long-term renovascular hypertension. *European Journal of Medical Research*, 14: 520-525.

Romayne, L.; Stas, S.; Lastra, G.; Manrique, C. & Sowers, J. 2008. Hypertension in obesity. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 37: 647–662.

in diabetic rats is correlated with cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress, and cardiac fibrosis. *Diabetes*, 57: 3297–3306.

Singh, V.P.; Le, B., Khode, R., Baker, K.M. & Kumar, R. 2008. Intracellular angiotensin II production

Received June 6, 2018.
Accepted June 30, 2018.