

**Daniele Nunes Ferreira**

**Sobrecarga crônica de sal na dieta:  
mecanismos de desenvolvimento de hipertrofia  
ventricular esquerda em ratos Wistar machos**

**SÃO PAULO  
2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Daniele Nunes Ferreira**

**Sobrecarga crônica de sal na dieta:  
mecanismos de desenvolvimento de hipertrofia  
ventricular esquerda em ratos Wistar machos**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo,  
para obtenção do título de Doutor em  
Ciências

Área de concentração: Nefrologia  
Orientador: Prof. Dr. Joel Claudio Heimann

**SÃO PAULO**  
**2009**

## **Normalização adotada**

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo, Serviço de Biblioteca e Documentação: 2004.

*Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.*

**À minha querida família,**

Sempre presente nos momentos alegres e difíceis da minha vida, e que

sempre estive disposta a fazer qualquer sacrifício por mim.

Obrigada pelo amor, incentivo e principalmente pela paciência.

## AGRADECIMENTOS

Ao *Dr. Joel C. Heimann*, professor exemplar. Sua disponibilidade e suas palavras de incentivo foram fundamentais para a realização desta tese. Obrigada por todos estes anos que estive ao meu lado sempre me apoiando em todos os momentos.

*Dra. Luzia Naoko Shinohara Furukawa* pelos seus ensinamentos, pela ajuda na realização dos experimentos e pela sua amizade.

A grande amiga *Ivone Braga de Oliveira* pela alegria e motivação que trouxe ao nosso laboratório, pela ajuda imprescindível na realização dos experimentos e principalmente pela amizade sincera. Vou sentir saudades!

*Dra. Dulce E. Casarini* pelas dosagens de angiotensina.

*Dra. Claudia Yrigoyen e Dr. Kaleizu T. Rosa* pela avaliação ecocardiográfica.

*Dra. Miriam Sterman Dolnikoff* pelo apoio profissional e pessoal.

A amiga *Dra. Michella Soares Coelho Araújo* obrigada pelos ensinamentos, pelos conselhos, por toda a disposição em ajudar e principalmente pelo incentivo e amizade.

À *Isis Akemi Katayama* pela sua constante disposição em ajudar e amizade. Poder contar com você foi muito bom!

À *Débora Rothstein Ramos*, pela companhia no almoço e pelo convívio de todos os dias no laboratório.

À *Dra. Karen L. Lopes* por ter padronizado a técnica de Western blot no laboratório. Obrigada pela sua amizade e também pelas brincadeiras.

A todos os amigos do Laboratório de Hipertensão Experimental, *Dr. Armando, Edson, Flavia, Karin, Neuziane*, e aos alunos que passaram por este laboratório *Heloisa e Dr. Nauilo pelo apoio e amizade*.

Às amigas *Dra. Giuliana Patriarca e Dra. Sandra Márcia Leandro* pelo incentivo, ensinamentos, conselhos e principalmente pelo carinho e amizade de vocês.

À minha melhor amiga *Rita de Cássia Cavaglieri* por me apresentar ao laboratório. Obrigada pelos nove anos de convivência, pelas conversas e desabafos. Vou sentir saudades!

À amiga *Cleonice*, exemplo de humildade e caráter. Obrigada pela disposição em esclarecer minhas dúvidas.

A todos do Laboratório da *Dra. Irene Noronha* e em especial ao *Wagner* pela amizade e por toda ajuda estatística e de informática. Obrigada também aos alunos que passaram por este laboratório *Tati, Arianni, Camile, Camila, e Becker*.

À *Dra. Vanda Jorgett*, exemplo de ser humano. Obrigada pelo incentivo e pelas palavras de carinho. Obrigada também a todos do seu laboratório pela constante disposição em ajudar e pela amizade.

À *Luciana Faria* pela amizade e pela preparação das lâminas para histologia.

À *Daniele Canali*, obrigada por confiar em mim para contribuir no seu projeto de pesquisa e também pela sua amizade.

Ao *Walter Campestre* pelos cuidados com os animais e principalmente pela amizade.

A *Janice G. Pião* e ao *Sr. Newton* pelos cuidados com as vidrarias.

Às amigas *Neide* e *Denise* pela ajuda constante em toda a burocracia durante o doutorado.

A *todos do LIM 16* que de alguma forma direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A *todos da minha família*, por todo amor, apoio, preocupações e orações.

Aos *ratinhos* porque sem eles a ciência não existiria.

À *Faculdade de Medicina*, em especial ao *Dr. Roberto Zatz* e *Dr. Rui Toledo Barros* por me aceitarem no programa de Pós-graduação da Nefrologia.

À *Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP*, pelo apoio financeiro e concessão da bolsa.

**Agradeço, acima de tudo, a Deus por estar sempre presente na minha vida e por ter me dado uma família maravilhosa e muitos amigos para me ajudar a superar todos os obstáculos desta caminhada.**



# SUMÁRIO

*Lista de figuras*

*Lista de tabelas*

*Lista de abreviaturas*

*Resumo*

*Abstract*

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>10</b>
<b>3.</b>	<b>MÉTODOS</b>	<b>11</b>
3.1	Animais e dietas	11
3.2	Protocolo experimental	12
3.3	Efeito dos fármacos	12
3.3.1	Cloridrato de hidralazina	13
3.3.2	Losartan	13
3.4	Evolução ponderal	14
3.5	Medida da pressão arterial caudal	14
3.6	Avaliação do consumo de ração, ingestão hídrica e coleta de urina para dosagem de sódio urinário	15
3.7	Hematócrito	16
3.8	Determinações bioquímicas	16
3.8.1	Dosagem da atividade de renina plasmática e aldosterona plasmática	16
3.9	Coleta de tecidos	17
3.10	Ecocardiograma	17

3.11	Medida da massa ventricular esquerda, diâmetro transverso do cardiomiócito e grau de fibrose miocárdica	18
3.11.1	Preparação do tecido cardíaco para análises histológicas	18
3.11.1.1	Processo de parafinização do tecido cardíaco	18
3.11.1.2	Processo de gelatinização de lâminas	19
3.11.1.3	Desparafinização para coloração histológica	20
3.11.1.4	Ácido Periódico de Schiff (PAS)	20
3.11.1.5	Tricrômio de Masson	21
3.12	Avaliação da ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada do receptor AT <sub>1</sub> e AT <sub>2</sub>	23
3.13	Avaliação da expressão gênica do SRA, TGF- $\beta$ e colágeno III	24
3.13.1	Extração de RNA total do ventrículo esquerdo e direito	24
3.13.2	Reação de transcriptase reversa (RT)	25
3.13.3	Reação de polimerase em cadeia (PCR)	26
3.14	Western blot	28
3.15	Análise dos resultados	29
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>30</b>
4.1	Evolução ponderal	30
4.2	Avaliação do consumo de ração, ingestão hídrica, volume urinário	31
4.3	Pressão arterial caudal e frequência cardíaca	31
4.4	Avaliação do sódio plasmático, da excreção urinária de sódio urinário e hematócrito	32

4.5	Atividade de renina plasmática e aldosterona sérica	33
4.6	Ecocardiograma	33
4.7	Massa cardíaca, ventricular esquerda e ventricular direita	34
4.8	Diâmetro transverso do miócito e fibrose intersticial do ventrículo esquerdo e direito	34
4.9	Expressão gênica do angiotensinogênio, renina, ECA, AT <sub>1</sub> e AT <sub>2</sub> no ventrículo esquerdo e direito	35
4.10	Expressão protéica do angiotensinogênio, renina, ECA, receptor AT <sub>1</sub> e AT <sub>2</sub> ,	36
4.11	Expressão protéica do colágeno I, III e TGF- $\beta$ no ventrículo esquerdo e direito	36
4.12	Avaliação da ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada do receptor AT <sub>1</sub> e AT <sub>2</sub> no ventrículo esquerdo e direito	37
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>80</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>88</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>89</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>99</b>

## LISTA DE FIGURAS

01	Esquema de hipertrofia excêntrica e concêntrica	4
02	Protocolo experimental	14
03	Evolução Ponderal	38
04	Consumo de ração	38
05	Ingestão hídrica e volume urinário	39
06	Sódio plasmático e excreção urinária de sódio	40
07	Potássio plasmático	41
08	Hematócrito	41
09	Pressão arterial caudal e frequência cardíaca	42
10	Atividade de renina plasmática	43
11	Aldosterona sérica	43
12	Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole e septo interventricular na diástole	44
13	Avaliação ecocardiográfica	45
14	Massa cardíaca, massa ventricular esquerda e massa ventricular direita corrigido pelo peso corpóreo	46
15	Diâmetro transverso do miócito do ventrículo esquerdo e direito	47
16	Fibrose intersticial do ventrículo esquerdo e direito	48
17	Medida do diâmetro transverso do miócito e fibrose intersticial do ventrículo esquerdo	49
18	Medida do diâmetro transverso do miócito e fibrose intersticial do ventrículo direito	50

19	Expressão gênica do receptor AT <sub>1</sub> no ventrículo esquerdo e direito	51
20	Expressão gênica do receptor AT <sub>2</sub> no ventrículo esquerdo e direito	52
21	Expressão gênica do angiotensinogênio no ventrículo esquerdo e direito	53
22	Expressão gênica da renina no ventrículo esquerdo e direito	54
23	Expressão gênica da ECA no ventrículo esquerdo e direito	55
24	Expressão protéica do angiotensinogênio no ventrículo esquerdo e direito	56
25	Expressão protéica da renina no ventrículo esquerdo e direito	57
26	Expressão protéica da ECA no ventrículo esquerdo e direito	58
27	Expressão protéica do receptor AT <sub>1</sub> no ventrículo esquerdo e direito	59
28	Expressão protéica do receptor AT <sub>2</sub> no ventrículo esquerdo e direito	60
29	Expressão protéica do colágeno I no ventrículo esquerdo e direito	61
30	Expressão protéica do colágeno III no ventrículo esquerdo e direito	62
31	Expressão protéica do TGF-β no ventrículo esquerdo e direito	63
32	Avaliação da ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada do receptor AT <sub>1</sub>	64
33	Avaliação da ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada do receptor AT <sub>2</sub>	65
34	Figura representativa da atividade do receptor AT <sub>1</sub> e AT <sub>2</sub> no ventrículo esquerdo	66
35	Figura representativa da atividade do receptor AT <sub>1</sub> e AT <sub>2</sub> no ventrículo direito	67
36	Conteúdo de Angiotensina II (pmol/g) no ventrículo esquerdo e direito	68

## LISTA DE TABELAS

- 01 Peso corpóreo, consumo de ração, ingestão hídrica, volume 69  
urinário, pressão arterial caudal (PAC), frequência cardíaca  
(FC), sódio urinário, sódio e potássio plasmático e hematócrito  
na 18<sup>a</sup> semana de idade
- 02 Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE), parede 70  
posterior do ventrículo esquerdo na diástole (PPVEDIA) septo  
interventricular na diástole (SIVDIA), massa cardíaca total  
(MCT), ventricular esquerda (MVE) e direita (MVD)
- 03 Atividade de renina plasmática (ARP), aldosterona sérica, 71  
angiotensina II no ventrículo esquerdo (All-VE) e direito (All-  
VD) avaliados na 18<sup>a</sup> semana de idade
- 04 Diâmetro transverso do miócito do ventrículo esquerdo 72  
(DTMVE) e direito (DTMVD), fibrose intersticial do ventrículo  
esquerdo (FIVE) e direito (FIVD) dos animais
- 05 Expressão gênica do angiotensinogênio, renina, ECA, AT<sub>1</sub> e 73  
AT<sub>2</sub> no ventrículo esquerdo
- 06 Expressão gênica do angiotensinogênio, renina, ECA, AT<sub>1</sub> e 74  
AT<sub>2</sub> no ventrículo direito
- 07 Expressão protéica do angiotensinogênio, enzima conversora 75  
de angiotensina, renina, receptor AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> no ventrículo  
esquerdo avaliado na 18<sup>a</sup> semana de idade.
- 08 Expressão protéica do angiotensinogênio, enzima conversora 76  
de angiotensina, renina, receptor AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> no ventrículo direito

avaliado na 18ª semana de idade.

- 09 Avaliação da ligação do anticorpo que reconhece a 77  
conformação ativada do receptor AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> no ventrículo  
esquerdo e direito
- 10 Expressão gênica do colágeno III e TGF-β no ventrículo 78  
esquerdo e direito avaliados na 18ª semana de idade.
- 11 Expressão proteica do colágeno I, colágeno III e TGF-β no 79  
ventrículo esquerdo e direito avaliados na 18ª semana de  
idade.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

All: Angiotensina II

AGTO: Angiotensinogênio

AT<sub>1</sub>: Receptor de angiotensina II do tipo 1

AT<sub>2</sub>: Receptor de angiotensina II do tipo 2

ARP: Atividade da renina plasmática

BR: Brasil

BSA: Bovine Serum Albumin

bpm: Batimentos por minuto

cDNA: DNA complementar

DE: Alemanha

DDVE: Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

DNAase: Enzima que degrada DNA

dNTP: 2'-Deoxinucleotídeo 5'-trifosfato

DTM: Diâmetro transverso do miócito

ECA: Enzima conversora de angiotensina I

ECA<sub>2</sub>: Enzima conversora de angiotensina 2

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

EUA: Estados Unidos da America

FGF-2: Fibroblast growth factor – 2

FI: Fibrose intersticial

FM-USP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HR1: Dieta hipersódica 4%

HR2: Dieta hipersódica 8%

HZ: Hidralazina

JP: Japão

LOS: Losartan

MAPKs: *p38 mitogen-activated protein kinase*

MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de Magnésio

mRNA: Ácido ribonucléico mensageiro



NaCl: Cloreto de sódio  
NR: Dieta normossódica  
PAC: Pressão arterial caudal  
PBS: Phosphate buffered saline  
PPVEDIA: Parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole  
RNA: Ácido ribonucléico  
RNAase: Enzima que degrada RNA  
RT-PCR: Transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase  
SIVDIA: Septo interventricular na diástole  
SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis  
SRA: Sistema renina angiotensina  
TGF- $\beta$ : Transforming growth factor beta  
VE: Ventrículo esquerdo  
VD: Ventrículo direito  
UA: Unidade arbitrária  
UK: Reino Unido

Ferreira DN. *Sobrecarga crônica de sal na dieta: mecanismos de desenvolvimento de hipertrofia ventricular esquerda em ratos Wistar machos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

O aumento da pressão arterial não é a única consequência da sobrecarga de sal na dieta. Independente dos efeitos hemodinâmicos, o excesso de sal pode induzir alterações estruturais no miocárdio. A avaliação dos mecanismos destas alterações foi o objetivo do presente estudo. Para tanto, ratos Wistar machos foram alimentados com dieta: normossódica (NR: 1,3% de NaCl), hipersódica 1 (HR1: 4%) e hipersódica 2 (HR2: 8%) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade. O grupo HR2 foi dividido em HR2, HR2+Hidralazina (HZ: 15mg/ kg/ dia) e HR2+Losartan (LOS: 20mg/ kg/ dia). As drogas foram administradas a partir da 7<sup>a</sup> semana de idade. Foram avaliados pressão arterial caudal (Pac), atividade de renina plasmática (ARP), aldosterona sérica, ecocardiograma, massa ventricular esquerda (MVE) e direita (MVD), medida do diâmetro transverso do miócito (DTM), fibrose intersticial (FI), expressão protéica do receptor de angiotensina II do tipo I (AT<sub>1</sub>) e tipo 2 (AT<sub>2</sub>), dosagem de angiotensina II (All) e ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada dos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> no ventrículo esquerdo (VE) e direito (VD). A Pac foi maior no grupo HR1 e HR2 comparado com o grupo NR. A Pac do grupo HR2+HZ e HR2+LOS não diferiu do grupo NR. ARP e ALDO foram menores nos grupos HR1, HR2, HR2+HZ e HR2+LOS. A espessura do septo interventricular na diástole e da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole foram maiores nos grupos HR1, HR2, HR2+HZ e HR2+LOS comparado com o grupo NR. A MVE e MVD foram maiores nos grupos HR2, HR2+HZ e HR2+LOS comparado com o grupo NR. O DTM do VE foi maior nos grupos HR1, HR2, HR2+HZ comparado com o grupo NR e HR2+LOS. DTM do VD foi maior no grupo HR2 e HR2+HZ comparado com o grupo NR, HR1 e HR2+LOS. A FI no VE e VD foi maior nos grupos HR1, HR2 e HR2+LOS comparado com o grupo NR e HR2+HZ. A expressão da proteína do receptor AT<sub>1</sub> no VE e VD foi maior nos animais do grupo HR2 e HR2+HZ quando comparado com o grupo NR, HR1 e HR2+LOS. A expressão da proteína do receptor AT<sub>2</sub> não foi alterada pelo alto consumo de sal, mas foi menor no grupo HR2+LOS. A ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada do receptor AT<sub>1</sub> no VE e VD foi menor nos grupos HR1, HR2, HR2+HZ e HR2+LOS comparado com o grupo NR. A ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada do receptor AT<sub>2</sub> não foi alterada no VE e VD dos grupos HR1, HR2 e HR2+LOS. No entanto, a ligação do anticorpo no receptor AT<sub>2</sub> foi menor no VE e VD no grupo HR2+LOS. O conteúdo de All foi maior em ambos os ventrículos nos grupos HR1, HR2, HR2+HZ e HR2+LOS. O elevado consumo de sal induz hipertrofia e fibrose miocárdica independente do efeito sobre a pressão arterial. A hipertrofia do cardiomiócito e a FI induzida pelo sal ocorre por mecanismos diferentes. Algumas evidências deste estudo sugerem a internalização do receptor AT<sub>1</sub> induzido pelo sal provavelmente devido à ligação da All.

**Descritores:** 1.Miócitos cardíacos 2.Fibrose 3.Sistema renina-angiotensina 4.Consumo de sal 5.Ratos Wistar

Ferreira DN. *High salt intake: mechanisms of left ventricular hypertrophy development in male Wistar rats* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009.

Increased blood pressure is not the only consequence of salt overload. Independently from the hemodynamic effect, salt excess may induce structural alterations in the myocardium. The aim of the present study was to evaluate the mechanisms of the myocardium structural alteration in response to high salt intake. Male Wistar rats were fed normal (NR: 1.3% NaCl), high 1 (HR1 4%) or high 2 (HR2 8%) salt diet since weaning until 18<sup>th</sup> week of age. HR2 group was divided in HR2, HR2+hydralazine (HZ: 15mg/ kg/ dia) and HR2+losartan (LOS: 20mg/ kg/ dia). Drugs were administered since the 7<sup>th</sup> week of age. Tail-cuff blood pressure (Tc-BP), plasma renin activity (PRA), serum aldosterone (ALDO), echocardiography, left (LV) and right (RV) ventricular mass, cardiomyocyte transverse diameter (CTD), interstitial fibrosis (IF), protein expression of AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors, angiotensin II content (All), binding of the conformational specific anti-AT<sub>1</sub> and anti-AT<sub>2</sub> antibody in both ventricles were determined in the LV and RV. Tc-BP was higher in the HR1 and HR2 groups when compared to NR. Tc-BP on HR2+HZ and HR2+LOS did not differ from NR. PRA and ALDO were lower in the HR1, HR2, HR2+HZ and HR2+LOS when compared to NR. Interventricular septal and left ventricular posterior wall thicknesses were higher on HR1, HR2, HR2+HZ and HR2+LOS compared to NR. LV and RV mass was higher in the HR2, HR2+HZ and HR2+LOS when compared to NR. CTD in the LV was higher on HR1, HR2 and HR2+HZ groups than on NR and HR2+LOS groups. CTD in the RV was higher in the HR2 and HR2+HZ when compared to NR, HR1 and HR2+LOS groups. IF was higher in the LV and RV in HR1, HR2 and HR2+LOS groups than in NR and HR2+HZ groups. AT<sub>1</sub> protein expression was higher in the HR2 and HR2+HZ compared to NR, HR1 and HR2+LOS groups. High salt intake did not increase AT<sub>2</sub> protein expression in the HR1, HR2 and HR2+HZ groups. However, losartan induced a decrease in AT<sub>2</sub> protein expression. In response to high salt intake, the binding of an AT<sub>1</sub> conformational specific antibody was lower in both ventricles. Binding of the conformational specific anti-AT<sub>2</sub> antibody in both ventricles did not change in response to HR1 and HR2. However, binding of the conformational specific anti-AT<sub>2</sub> antibody was lower in both ventricles in the HR2+LOS group. All was higher in both ventricles in the HR1, HR2, HR2+HZ and HR2+LOS groups. Myocardial structural alterations in response to high salt intake are independent of the effect on blood pressure. Salt induced cardiomyocyte hypertrophy and interstitial fibrosis are due to different mechanisms. Some evidences from the present study are in favor of salt induced AT<sub>1</sub> receptor internalization probably due to All binding.

**Keywords:** 1.Cardiac myocytes 2.Fibrosis 3.Renin-angiotensin system 4.Salt intake 5.Rats Wistar

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Informações Gerais

Existem estudos indicativos de que a ingestão de cloreto de sódio era extremamente baixa há cerca de 4,5 milhões de anos, quando os hominídeos sobreviviam com pequenas quantidades de sal naturalmente presentes nos alimentos. Devido a este baixo consumo de sal fornecido pela dieta os humanos foram geneticamente programados a uma dieta com baixo conteúdo de sal (Denton, 1997).

A adição do sal aos alimentos começou cerca de 5000 anos atrás. Segundo alguns relatos, isto ocorreu devido à propriedade do sal em preservar os alimentos. Com a invenção do congelador e da geladeira o sal não foi mais necessário para preservar os alimentos. No entanto, com o crescente aumento de alimentos industrializados, o elevado consumo de sal é mantido até hoje (Cirillo et al., 1994; MacGregor & Wardener, 1998). A consequência é que o elevado consumo de sal na dieta causa aumento da pressão arterial e, portanto, o aumento do risco de doenças cardiovasculares (Pearson e Wolzak, 1982).

Evidências de que o consumo elevado de sal está relacionado com o aumento da pressão arterial tem sido observado há muitos anos. Um estudo epidemiológico mostrou que populações indígenas que consomem uma dieta com conteúdo de sal muito baixo têm pressão arterial normal (Denton, 1997), enquanto que tribos nômades do Irã, que consomem cerca de 180 mmol de cloreto de sódio por dia têm prevalência elevada de hipertensão arterial (Page et al. 1981). Em outros estudos, realizados em diferentes

animais de experimentação, foi observado que o consumo elevado de sal é acompanhado pelo aumento progressivo da pressão arterial (Stamler, 1997). Denton et al. estudou chimpanzés que consumiam uma dieta habitual de frutas e vegetais. Depois de um ano de observação sem mudanças na dieta e condições sociais, o sódio foi adicionado em quantidades crescentes de 5, 10 e 15g de sódio por dia durante vinte meses. Após este período, os chimpanzés apresentaram um aumento progressivo da pressão arterial e quando foi interrompida a adição de sal na dieta, a pressão arterial retornou aos valores basais observados no início do estudo (Denton, 1997).

Esta associação do sal com a pressão arterial também é comprovada com a observação de que modestas reduções na ingestão de sal são eficazes para reduzir a pressão arterial em pacientes hipertensos (Whelton et al., 1998). Em indivíduos normotensos a pressão arterial aumenta com a maior ingestão de sal e diminui quando a ingestão de sal é reduzida (Luft et al., 1979).

São numerosas as evidências que dão suporte a uma associação entre ingestão elevada de sal e aumento da pressão arterial. No entanto, o aumento da pressão arterial não é a única consequência da sobrecarga de sal na dieta (Ahn et al., 2004; Matsui et al., 2008). Além dos efeitos hemodinâmicos, o excesso de sal pode estar relacionado com alterações estruturais no miocárdio, como a hipertrofia cardíaca, independente de seus efeitos sobre a pressão arterial. Como a hipertrofia cardíaca constitui um indicador de grande relevância de risco de morbidade e mortalidade cardiovascular, os mecanismos fisiopatológicos da hipertrofia cardíaca induzida pelo excessivo consumo de sal merecem especial atenção.

## 1.2. Hipertrofia cardíaca

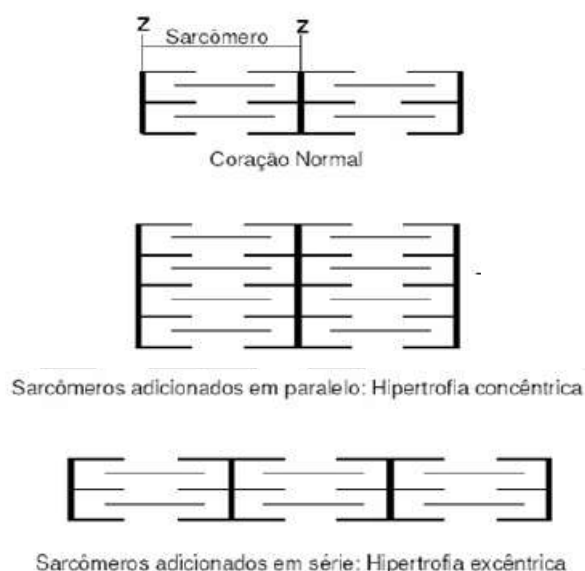
A hipertrofia cardíaca é um conjunto de alterações moleculares, celulares e intersticiais cardíacas, manifestadas como modificações de tamanho, massa, geometria e função do coração.

Macroscopicamente, a hipertrofia ventricular esquerda pode ser de dois tipos: excêntrica ou concêntrica. A hipertrofia excêntrica é causada por um estímulo de sobrecarga de volume. Neste tipo de hipertrofia, ocorre um aumento da massa ventricular esquerda decorrente de um aumento da espessura da parede concomitantemente com um aumento do diâmetro da cavidade do ventrículo esquerdo. Já na hipertrofia concêntrica, secundária a sobrecarga de pressão, ocorre um aumento da massa ventricular esquerda devido a um aumento da espessura da parede. Neste tipo de hipertrofia é observada uma redução do diâmetro da cavidade do ventrículo esquerdo (Grossman et al., 1975).

O crescimento dos cardiomiócitos pode ocorrer pela adição de sarcômeros em série (sobrecarga de volume) ou em paralelo (sobrecarga de pressão), permitindo que a célula aumente em comprimento ou em largura, levando à hipertrofia excêntrica ou concêntrica, respectivamente (Russell et al., 2000) – figura 1.

Durante o crescimento do cardiomiócito ocorre uma modificação na expressão das proteínas contráteis que assumem características do período de desenvolvimento cardíaco fetal ou perinatal, sendo por isto denominado “reprogramação fetal”. Portanto, um reaparecimento de miosina de cadeia pesada do tipo beta ( $\beta$ -MCP) é observado durante o desenvolvimento da

hipertrofia cardíaca e tem como objetivo adequar a velocidade e a força de contração do ventrículo (Izumo et al., 1988).



**Figura 1.** Esquema de hipertrofia excêntrica (sobrecarga de volume) e concêntrica (sobrecarga de pressão).

Outra característica que pode ser observada na hipertrofia cardíaca patológica é o aumento da deposição da matriz extracelular decorrente principalmente de um aumento na formação de colágeno I e III, sintetizado pelos fibroblastos. O colágeno tipo I é o mais rígido de todos os colágenos, sendo o principal responsável pela rigidez da câmara cardíaca (Amiel e Nimni 1993; Norton et al., 1997; Hein e Schaper 2001). Já o colágeno tipo III possui um papel importante na manutenção do alinhamento dos cardiomiócitos. Portanto, um aumento na deposição destas fibras colágenas provoca deficiência no processo de relaxamento do miocárdio, levando ao aparecimento da insuficiência diastólica (Díez et al., 2005).

Dentre os fatores de crescimento que induzem a hipertrofia e a fibrose cardíaca destacam-se os FGF-2 (*fibroblast growth factor – 2*) e TGF- $\beta$ 1 (*transforming growth factor beta*). Estas moléculas agem de maneira autócrina e parácrina propagando a hipertrofia e intensificando o processo de injúria tecidual (Sadoshima e Izumo, 1997).

O FGF-2 é capaz de induzir diretamente a hipertrofia, como verificado em experimento “*in vivo*” através da infusão desta molécula em ratos (Schultz et al., 1999). Já o TGF- $\beta$ 1 é importante como indutor de fibrose cardíaca. Este fator de crescimento tem propriedades fibrogênicas, ou seja, atua induzindo a síntese e inibindo a degradação dos componentes da matriz extracelular (Lijnen et al., 2000). Além disso, a síntese do TGF- $\beta$ 1 pode ser induzida por outras moléculas, como por exemplo, a angiotensina II (Gray et al., 1998).

### **1.3. Associação entre o elevado consumo de sal na dieta e a hipertrofia cardíaca**

Du Cailar et al. (1992) investigaram a associação entre excreção de sódio urinário e massa ventricular esquerda em uma amostra de 91 hipertensos e 50 normotensos. Em ambos os grupos, a excreção de sódio urinário em 24 horas correlacionou-se positivamente com a massa ventricular, sugerindo um efeito cardioprotetor do sódio tanto em normotensos quanto em hipertensos. Por outro lado, um estudo realizado em 45 voluntários normotensos não mostrou correlação entre a excreção de sódio urinário em 24 horas e a massa ventricular esquerda. Estes resultados sugerem que o sódio pode exercer ação hipertrofica no coração somente na



vigência ou em sujeitos predispostos ao desenvolvimento da hipertensão arterial (Shmieder e Langenfeld, 1995). Da mesma forma, outro estudo realizado por Dhingra et al. (2004) em homens e mulheres normotensas não mostrou correlação entre a massa ventricular esquerda e a excreção urinária de sódio em 24 horas. Com base nos estudos citados, a associação entre consumo de sal e hipertrofia cardíaca é assunto que necessita de estudos adicionais para sua melhor compreensão.

Lal et al. (2003) verificaram que ratos Wistar desenvolveram hipertrofia ventricular esquerda sem incremento na pressão arterial após quatro semanas de consumo de dieta com elevado teor de sal. Neste mesmo estudo o consumo de sal por tempo prolongado induziu fibrose intersticial e perivascular não apenas no ventrículo esquerdo hipertrofiado, mas também no ventrículo direito não hipertrofiado. Este estudo é consistente com os de Yu et al. (1998) e Takeda et al. (2000) que constataram fibrose intersticial e perivascular no ventrículo esquerdo de ratos Wistar-Kyoto após sobrecarga de sal por oito semanas, respectivamente, na ração e na água de beber. Estes estudos sugerem que a sobrecarga de sal pode aumentar a produção de alguns fatores no ventrículo, tais como fator transformador de crescimento TGF- $\beta$  (Yu et al., 1998) e aldosterona (Takeda et al., 2000), que podem induzir a resposta fibrótica.

Os mecanismos responsáveis pela hipertrofia cardíaca decorrente do elevado consumo de sal ainda são indefinidos. Uma possível explicação é o efeito do sal sobre o SRA. Nestes modelos experimentais de sobrecarga de sal na dieta não foi detectado aumento da atividade de renina plasmática,

sugerindo que o sistema renina-angiotensina circulante pode não estar envolvido no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca (Lal et al., 2003; Yu et al., 1998, Takeda et al., 2000). Entretanto, existem evidências de que todos os componentes do sistema renina-angiotensina (angiotensinogênio, renina, enzima conversora de angiotensina e receptores de angiotensina II) necessários para a biossíntese e ação da angiotensina II estão presentes no coração (Baker et al., 1992; Lindpainter e Ganten, 1991; Dzau, 1987) e que ocorre formação deste peptídeo no tecido cardíaco (Re, 2003; De Mello et al., 2000). Estes componentes estão distribuídos em cardiomiócitos, fibroblastos e em endotélio e músculo liso vascular de artérias e veias coronárias (Dostal e Baker, 1999).

Angiotensina II, principal efector do SRA, é conhecida por sua ação vasoconstritora, mas lhe foi atribuída outras funções. Atualmente é considerada uma citocina pró-inflamatória que estimula a liberação de outras citocinas (Gray et al., 1998), aumenta a geração de espécies reativas de oxigênio (Chen et al., 2006) e estimula a proliferação celular (Schorb et al., 1993). Um conjunto de evidências sugere que a angiotensina II agindo via receptor  $AT_1$  é um potente estimulador de hipertrofia ventricular esquerda (Yamazaki et al., 1996), aumentando a produção de uma variedade de proteínas que estão relacionadas com a hipertrofia cardíaca (Miyata e Haneda, 1994). A hipertrofia estimulada por angiotensina II via receptor  $AT_1$  também tem sido observada em cultura de miócitos de ratos neonatais, onde a angiotensina II induz a expressão de genes (c-fos, c-jun, c-myc) e aumento da expressão de fatores de crescimento, tais como TGF- $\beta$  (Sadoshima e Izumo, 1993).

A angiotensina II também pode se ligar e ativar outro receptor conhecido como AT<sub>2</sub>. Os efeitos desencadeados por este receptor ainda é motivo de controvérsia. Alguns estudos acreditam que este receptor possui propriedades anti-proliferativas e, portanto, opostos aquele observado pelo receptor AT<sub>1</sub> (Xu et al., 2002). Por outro lado, evidências da literatura sugerem que a estimulação do receptor AT<sub>2</sub> tem efeitos fibróticos e hipertróficos (D'Amore et al., 2005; Senbonmatsu et al., 2000).

Além da via clássica do SRA, foram descritas no tecido cardíaco vias alternativas para a síntese de angiotensina II. Um importante componente desta via alternativa é uma enzima denominada quimase, capaz de clivar a angiotensina I em angiotensina II. Esta enzima é encontrada no interstício do miocárdio ventricular e a sua localização está provavelmente relacionada à presença local de mastócitos (Urata et al., 1990; Urata et al., 1993). Outro componente conhecido desta via alternativa do SRA e que tem recebido muita atenção é a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA<sub>2</sub>). No coração a ECA<sub>2</sub> cliva a angiotensina I gerando o peptídeo angiotensina 1-9, que pode posteriormente ser convertido em angiotensina 1-7. Por outro lado, a ECA<sub>2</sub> pode também clivar diretamente a angiotensina II para gerar angiotensina 1-7. Numerosos estudos têm verificado que a angiotensina 1-7, através da sua ligação com o receptor Mas, têm efeitos anti-proliferativos e cardioprotetores, ou seja, contrários àqueles observados pela angiotensina II ao se ligar ao receptor AT<sub>1</sub>. Um possível mecanismo para este efeito antagônico da angiotensina 1-7 seria a inibição da atividade de proteínas da família MAPKs (*p38 mitogen-activated protein kinase*) envolvidas na hipertrofia de cardiomiócitos (Raizada e Ferreira 2007).

Conforme exposto nesta introdução, várias são as evidências de que o excesso de sal na dieta é um importante determinante de hipertrofia cardíaca, e esta propriedade do sal parece ser independente de seus efeitos sobre a pressão arterial. No entanto, os mecanismos associados com as mudanças estruturais do miocárdio, induzido pelo consumo excessivo de sal é um tema pouco estudado.

## **2. OBJETIVOS**

Diante dos indícios de que o consumo elevado de sal na dieta induz hipertrofia cardíaca, os objetivos deste estudo foram:

1. Verificar se a hipertrofia cardíaca, em resposta ao consumo elevado de sal na dieta, é decorrente do crescimento hipertrófico do cardiomiócito e/ ou aumento do tecido conjuntivo intersticial.
2. Avaliar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca induzido pela sobrecarga crônica de sal na dieta.
3. Verificar se o efeito trófico do sal sobre o miocárdio é independente do aumento da pressão arterial.

### 3. MÉTODOS

Os experimentos realizados neste projeto de pesquisa estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal e foram previamente aprovados pela Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa – CAPPesq - do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, FM-USP (Protocolo n° 147/05).

#### 3.1. Animais e dietas

Para a realização do presente estudo, foram utilizados ratos Wistar machos recém-desmamados (3 semanas de idade) provenientes do Biotério Central da FM-USP.

Ao chegarem ao biotério deste laboratório os ratos passaram por um período de adaptação de 3 dias. Após este período os animais foram divididos em 5 grupos (Figura 2) de acordo com a dieta (Harlan Tekad; Wisconsin, EUA) e tratamento farmacológico:

**Dieta normossódica (NR, n=14):** 1,27% de NaCl + 25% de proteínas

**Dieta hipersódica 1 (HR1, n=16):** 4% de NaCl + 25% de proteínas

**Dieta hipersódica 2 (HR2, n=15):** 7,94% de NaCl + 25% de proteínas

**Dieta hipersódica 2 + cloridrato de hidralazina (HR2+HZ, n=15)**

**Dieta hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=15)**

Os grupos de animais foram acondicionados em gaiolas de plástico (40x33cm) com 4 animais por gaiola e mantidos em ambiente a 25° C, com ciclos claro-escuro fixos de 12/12 horas.

O fornecimento de ração e de água potável foi *ad libitum* durante o período deste estudo.

### **3.2. Protocolo experimental**

O peso corporal dos animais foi avaliado semanalmente da 3<sup>a</sup> até a 18<sup>a</sup> semana de vida. Na 6<sup>a</sup> semana de idade foi realizada a primeira medida da pressão arterial caudal e a partir da 7<sup>a</sup> semana, a pressão arterial foi medida quinzenalmente até a 18<sup>a</sup> semana. Após este período, os ratos foram transferidos para gaiola metabólica e durante três dias consecutivos foram avaliados o consumo de ração, ingestão hídrica e coleta de urina para dosagem de sódio. Ao final, estes animais foram eutanasiados para coleta de sangue e tecidos e as seguintes variáveis foram analisadas: hematócrito, atividade de renina plasmática, aldosterona sérica, medida da massa ventricular esquerda e direita, diâmetro transverso do cardiomiócito, grau de fibrose miocárdica e expressão gênica e protéica do colágeno I e III, TGF- $\beta$  e dos componentes do SRA.

### **3.3. Efeito dos fármacos**

Com 7 semanas de idade os ratos alimentados com dieta HR2 foram subdivididos em grupos de acordo com o tratamento farmacológico administrado: HR2+HZ ou HR2+LOS.

### **3.3.1. Cloridrato de hidralazina**

Este medicamento foi utilizado no intuito de dissociar o efeito direto do sal do aumento da pressão arterial no grupo HR2. O cloridrato de hidralazina produz vasodilatação periférica em razão de sua ação direta sobre as paredes dos vasos sanguíneos, reduzindo desta forma, a pressão arterial elevada. Esta medicação foi administrada na concentração de 15 mg/kg/dia na água de beber no grupo de ratos HR2+HZ a partir da 7<sup>a</sup> semana de idade até 18<sup>a</sup> semana, quando eles foram sacrificados.

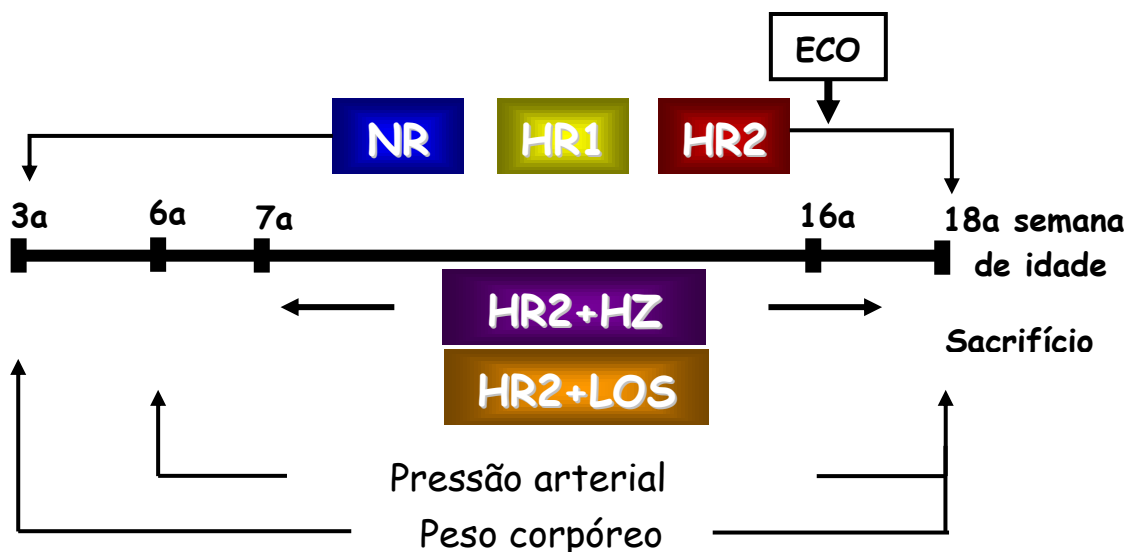
OBS.: Apesar de seguir as doses preconizadas na literatura para o uso da hidralazina em ratos (Grimm et al., 1998), foi necessário o ajuste desta dose. Inicialmente, em um grupo piloto, a hidralazina foi administrada na concentração de 20 mg/kg/dia no grupo HR2+HZ, o qual apresentou uma queda acentuada da pressão arterial. E logo nos primeiros dias, para continuar o tratamento, a concentração foi reduzida para 15 mg/kg/dia com o objetivo de igualar a pressão do grupo HR2+HZ ao grupo NR (Controle).

### **3.3.2 Losartan**

O objetivo deste protocolo foi avaliar se o tratamento com losartan previne a hipertrofia cardíaca induzida pela sobrecarga de sal.

O losartan é um antagonista do receptor AT<sub>1</sub>. Esta medicação foi administrada na concentração de 20 mg/kg/dia na água de beber no grupo de ratos HR2+LOS a partir da 7<sup>a</sup> semana de idade até 18<sup>a</sup> semana.





**Figura 2.** Representação esquemática dos grupos normossódico, hipersódico 1, hipersódico 2, hipersódico 2 + hidralazina e hipersódico 2 + losartan.

### 3.4. Evolução ponderal

Os ratos foram pesados semanalmente a partir do dia em que chegaram ao biotério com 3 semanas de idade até 18 semanas de idade.

### 3.5. Pressão arterial caudal

A pressão arterial caudal (PAC) foi medida pelo método oscilométrico e os valores obtidos correspondem à pressão arterial sistólica. Para tal medida, os ratos foram colocados em sala apropriada no período da manhã. A pressão caudal foi medida por meio de um equipamento acoplado a um transdutor de pressão (RTBP 2000 - Kent Scientific Corporation; Connecticut, EUA), o qual fornece um sinal analógico. Este sinal analógico foi digitalizado e registrado por um sistema computadorizado de aquisição e análise dos dados utilizando o programa DASyLab 7.0 (DASyTec, National Instruments Company; New Hampshire, EUA). A primeira aferição da PAC de

cada animal foi realizada na 6ª semana de idade. A partir da 7ª até a 18ª semana de idade a PAc foi verificada quinzenalmente (Anexo 1).

As medidas foram realizadas com os animais acordados e foram consideradas apenas aquelas obtidas em condição de ausência de movimentação do animal.

### **3.6. Avaliação do consumo de ração, ingestão hídrica e coleta de urina para dosagem de sódio urinário**

Cada animal com 18 semanas de idade, previamente pesados, foi transferido da gaiola de plástico para gaiola metabólica de policarbonato (modelo 650-0100, Nalgene Brand Products; New York, EUA). Foi oferecida uma quantidade conhecida de dieta NR, HR1 ou HR2 (50 g/dia/gaiola) e água (100 mL/dia/gaiola). Durante três dias e no mesmo horário, foi pesado o que sobrava da ração fornecida, quantificado a ingestão hídrica e o volume urinário. A amostra de urina dos animais coletada foi armazenada em freezer -20°C para dosagem da concentração de sódio (Anexo 2).

Para a dosagem de sódio urinário as amostras foram coletas após um período de um dia de adaptação dos animais na gaiola metabólica. Foram coletadas amostras de urina de 24 horas de todos os grupos de dieta.

O sódio urinário foi determinado utilizando o espectrofotômetro de chama (modelo FC 280, CELM; São Paulo, BR).

### **3.7. Hematócrito**

O hematócrito foi avaliado na 18ª semana de vida. Para isto, foi utilizado um tubo capilar de micro-hematócrito heparinizado. Este tubo foi preenchido com sangue por capilaridade. Após isto, uma das extremidades do capilar foi selada com massa de modelar. O capilar foi colocado na centrífuga de micro-hematócrito e centrifugado por 15 minutos a 5000 g. Em seguida foi realizada a leitura dos hematócritos.

### **3.8. Determinações bioquímicas**

#### **3.8.1. Atividade de renina plasmática e aldosterona sérica**

Na 18ª semana de idade os animais foram eutanasiados por guilhotina e o sangue foi coletado para dosagem da atividade de renina plasmática e aldosterona sérica.

A atividade de renina plasmática foi determinada pelo método de radioimunoensaio utilizando o *kit* comercial GammaCoat [<sup>125</sup>] da marca DiaSorin (Minnesota, EUA).

A aldosterona foi determinada pelo método de radioimunoensaio utilizando o *kit* comercial DSL-8600 da marca Diagnostic Systems Laboratories Inc. (Texas, EUA).

### **3.9. Coleta de tecidos**

Ao completarem 18 semanas de vida, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico, aplicada por via intraperitoneal, (Cristália; São Paulo, BR) e o coração foi perfundido pelo ventrículo esquerdo ordenadamente pelas seguintes soluções: solução fisiológica (para retirada de células sanguíneas dos vasos do coração), cloreto de potássio 14 mM (para induzir a despolarização concomitante das fibras cardíacas), solução fisiológica (para retirada do cloreto de potássio) e Dubosq-Brasil (para a fixação do tecido). Após a perfusão, o coração foi retirado e os ventrículos foram pesados, seccionados em corte transversal e incluídos em parafina para análise histológica.

Para realização do Western blot e RT-PCR os animais foram eutanasiados por guilhotina. Após isto, cada animal foi colocado sobre o gelo para a retirada dos ventrículos, o qual foi colocado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado em *freezer* -70°C.

### **3.10. Ecocardiograma**

O ecocardiograma foi realizado na 16<sup>a</sup> semana de idade. Para a realização do exame os animais foram anestesiados com 50 mg/kg de cetamina (Ketamin, Cristália; São Paulo, BR) associado com 5 mg/kg de xilazina (Rompun, Bayer; São Paulo, BR), aplicada por via intraperitoneal, para tricotomia da face anterior do tórax.

Os animais foram colocados em decúbito lateral e um transdutor multifrequencial de 10 a 14 MHz foi posicionado no tórax do animal. As imagens foram obtidas em modo-M, gravadas em uma fita de vídeo e

posteriormente analisadas por um único observador que desconhecia o grupo de origem do animal.

O estudo ecocardiográfico em repouso constou de:

1. Medida da espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole (PPVEDIA),
2. Medida da espessura do septo interventricular na diástole (SIVDIA)
3. Medida do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE).

### **3.11. Medida da massa ventricular esquerda, diâmetro transverso do cardiomiócito e grau de fibrose miocárdica**

#### **3.11.1. Preparação do tecido cardíaco para análises histológicas**

##### **3.11.1.1. Processo de parafinização do tecido cardíaco**

Para realização do processo de parafinização, o coração foi retirado da solução de formol 10% e tampão fosfato e foi colocado em caixeta perfurada e identificada, para inclusão do tecido. Este processo de inclusão foi realizado pelo processador automático de tecido “histokinette” (Jung-Histokinette 2000 Leica; Nussloch, DE) por um período de 14 horas, descrito a seguir.

O processo de inclusão iniciou pela desidratação, com álcoois em concentrações progressivas [álcool 50% (1 vez), álcool 70% (1 vez), álcool 96% (2 vezes), álcool absoluto (2 vezes)], seguida da diafanização [álcool absoluto + xilol (v/v)] e xilol (3 vezes) Em seguida, os tecidos foram imersos em parafina fundida a 60°C. O material parafinado foi incluído em blocos e após solidificação, permaneceu em temperatura ambiente.

Antes de ser cortado, o tecido cardíaco incluso nos blocos de parafina permaneceu por 30 minutos a -20°C. Os blocos foram cortados em micrótomo (Reichert Yung Supercut 2065 Leica; Nussloch, DE) com navalhas descartáveis com espessura de 3 a 4 µm e aderidos em lâminas previamente revestidas por gelatina a 2% (Sigma Chemical Co; Missouri, EUA). As lâminas com os cortes permaneceram na estufa (Fabbe-Primar; São Paulo, BR) a 60°C por 2 horas e em seguida foram armazenadas em temperatura de 4°C.

#### **3.11.1.2. Processo de gelatinização de lâminas**

Para o preparo da gelatina, que serve de revestimento para as lâminas, foram adicionadas 2,5 g de gelatina purificada tipo A em 500 mL de água destilada a 50°C e misturadas até dissolução. Quando esta solução atingiu 30°C foi adicionado 0,25 g de sulfato de potássio crômico (Sigma Chemical Co; Missouri, EUA) e foi filtrando em papel filtro grosso. O resfriamento foi em temperatura ambiente.

As lâminas previamente lavadas em solução de álcool/éter (1:1) foram mergulhadas por alguns segundos na solução de gelatina, em seguida permaneceram no suporte inclinado sobre um papel toalha permitindo a retirada de excesso da solução de gelatina. Posteriormente foram acondicionadas em caixas à temperatura de 4°C.

### **3.11.1.3. Desparafinização para coloração histológica**

Para a realização das colorações histológicas, as lâminas passaram por um processo de desparafinização, ou seja, permaneceram 9 minutos em xilol por 2 vezes. Em seguida, as lâminas foram desidratadas, por meio de banho de etanol puro (2 vezes) (Merck; Darmstadt, DE), etanol 96% e etanol 70%. Para finalizar este processo, as lâminas foram imersas em água destilada e processadas para as colorações histológicas.

### **3.11.1.4. Coloração com ácido Periódico de Schiff (PAS)**

Após o processo de desparafinização, diafanização e hidratação, as lâminas foram lavadas em água destilada e permaneceram no ácido periódico 1% durante 10 minutos. Após isto, as lâminas foram lavadas em água destilada. As lâminas foram coradas pelo reativo de Schiff durante 45 minutos, em ambiente escuro e lavadas em água corrente durante 10 a 15 minutos. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris (preparada no laboratório) por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e montadas com lamínulas com o meio permanente, Permount.

Para o preparo do reagente de Schiff, foi adicionado 1 g de fuccina diamante em 200 mL de água destilada fervente. Quando a temperatura atingiu 50°C, esta solução foi filtrada em papel de filtro fino e foram acrescentados 30 mL de ácido clorídrico. Após atingir a temperatura ambiente, foram adicionadas 9 g de metabissulfito de sódio anidro à solução que ficou em ambiente escuro durante 48 horas. Após este período, a solução adquiriu coloração amarelo-palha. Foi então adicionada 1 g de carvão ativo de Norita

e logo foi filtrada com bomba a vácuo, para a solução adquirir assim, uma cor transparente.

A hematoxilina de Harris foi preparada dissolvendo-se em 1000 mL de água destilada fervente, 100 g de sulfato dodecahidrato (alúmen) de alumíneo e amônio. Em paralelo, foram dissolvidas 5 g de hematoxilina em álcool quente. Logo em seguida, estas duas soluções foram misturadas e fervidas rapidamente adicionando-se 2,5 g de óxido de mercúrio vermelho até atingir a cor púrpura-escuro. Para finalizar, este corante foi filtrado.

As lâminas coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) foram utilizadas para medir o diâmetro transversal dos miócitos. Após a coloração, as lâminas foram analisadas utilizando-se um microscópio (Nikon Corporation; Tokyo, JP) acoplado a um monitor de vídeo com uma régua transparente milimetrada sobre a tela, onde um milímetro de régua equivale a sete nanômetros de tecido. Foram analisadas aproximadamente 40 fibras, sempre na altura do núcleo. Esta medida foi realizada sob o aumento de 400X e em campos aleatórios.

#### **3.11.1.5. Coloração com tricrômio de Masson**

Após o processo de desparafinização, diafanização e hidratação, as lâminas foram imersas em uma solução de hematoxilina de Harris durante 5 minutos. Em seguida, foram lavadas rapidamente em água corrente, permanecendo no escarlate de Briebrich (corante) durante 5 minutos e novamente lavadas em água corrente. Em seguida, as lâminas foram submersas com o diferenciador de Masson (preparado no laboratório) durante 5 minutos, seguido de uma solução de anilina a 5%, durante 5



minutos e, posteriormente, lavadas em água corrente. O próximo passo foi a lavagem das lâminas em água acética a 1% para fixação da anilina seguida da desidratação, diafanização e foram montadas em meio permanente Permout.

Para preparar o diferenciador de Masson, foram adicionadas 5 g do ácido fosfomolibdico a 5 g do ácido fosfotúngstico em 200 mL de água destilada misturando-se em um agitador magnético. Depois de pronta, a solução foi filtrada em papel filtro com 6 µm de espessura.

A solução de anilina foi preparada dissolvendo-se 3 g de azul de anilina em 100 mL de água destilada acrescentando-se 2 mL de ácido acético glacial. Este corante foi misturado em agitador magnético por alguns minutos e depois filtrado.

A coloração de tricrômio Masson foi utilizada para analisar o grau de fibrose no interstício cardíaco, sendo determinada pela técnica de contagem de pontos. Esta técnica consiste em um sistema de microscópio (Nikon Corporation; Tokyo, JP) acoplado a um monitor de vídeo cuja imagem é preenchida por 160 pontos uniformemente distribuídos. Foram contados os pontos que correspondem à área ocupada pela fibrose. Todo o ventrículo esquerdo foi analisado sob um aumento de 200X. Os resultados foram apresentados em porcentagem de área ocupada pela fibrose.

### **3.12. Avaliação da ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada dos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> no ventrículo esquerdo e direito**

Após a estufa atingir a temperatura de 60°C, as lâminas ficaram incubadas por 30 minutos. Ao término do tempo, sem deixar esfriar, as lâminas foram incubadas três vezes no xilol durante nove minutos cada, duas vezes no álcool absoluto durante cinco minutos, duas vezes no álcool 96% durante três minutos e sendo lavada em água destilada por três vezes, obedecendo à ordem descrita acima. Em seguida as lâminas foram incubadas com solução de bloqueio (BSA 1% + sacarose 5% diluído em solução tampão PBS), por 3 horas. O BSA foi utilizado para bloquear as ligações inespecíficas e a sacarose para manter a conformação do receptor. Após este procedimento, os cortes foram incubados com anticorpo policlonal com conformação específica anti-AT<sub>1</sub> e anti-AT<sub>2</sub>, conjugado com flourófilos DY-682 (vermelho, AT<sub>1</sub>) e DY-800 (verde, AT<sub>2</sub>) (Proteimax, Biotecnologia Ltda; Cotia, BR), na diluição de 1:4000 por 1 hora em câmara úmida e escura. Após esse período os cortes foram lavados três vezes com solução tampão PBS durante vinte minutos cada. Em seguida as lâminas foram secadas e fotografadas utilizando Odyssey software.

As quantificações dos cortes foram feitas através do programa Odyssey Infrared Imaging System (Li-cor- Biosciences; Nebraska, EUA). Os resultados foram analisados comparando a média da intensidade dos cortes obtidas entre os diferentes grupos de dieta e tratamento estudados.

### **3.13. Avaliação da expressão gênica do SRA, TGF- $\beta$ e colágeno III**

#### **3.13.1. Extração de RNA total do ventrículo esquerdo e direito**

Foi realizada a extração de RNA total de 4 a 10 amostras por vez para evitar erros durante a manipulação do material e a degradação do RNA durante o descongelamento das amostras. Os tecidos armazenados em *freezer* – 70°C foram pesados (balança AL200; Marte, BR) e colocados em tubo de ensaio de plástico estéril. Foi acrescentado 2 mL de Trizol para cada 100 mg de tecido e homogeneizados em aparelho Ultra-Turrax (T-25, IKA Works Inc.; North Carolina, EUA).

Foi transferido 1 mL da amostra homogeneizada para um tubo de 2,0 mL, livre de RNase e DNase, e foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Este homogenato foi centrifugado a 12.000x g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo *Eppendorff* e foram adicionados 200  $\mu$ L de clorofórmio para separação da amostra em fase orgânica e inorgânica. Esta solução foi agitada no vórtex e incubada à temperatura ambiente por 2 minutos e a seguir foi centrifugada por 15 minutos, 4°C a 12.000x g. A fase incolor da solução foi transferida para outro tubo ao qual foram acrescentados 500  $\mu$ L álcool isopropílico. A mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada por 10 minutos, a 4°C a 12.000x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado por inversão do tubo e o *pellet* formado no fundo do tubo foi lavado com 1 mL de etanol 75% gelado. Novamente o material foi centrifugado (12.000x g, 5 min, 4°C) e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi ressuspenso com 100  $\mu$ L de água DEPC

(dietilpirocarbonato) e esta solução foi incubada em banho seco a 65°C por 10 minutos. As amostras foram armazenadas em freezer -70 °C.

A quantificação do RNA foi realizada através de leituras a 260 nm e 280 nm em espectrofotômetro (Hitachi, model U-1100; Tokyo, JP). Para isso, tubo livre de RNase e DNase com 5 µL de amostra e 995 µL de água Milli-Q autoclavada foi incubado em banho seco a 65°C por 10 minutos. Uma unidade de densidade óptica, lida com comprimento de onda de 260 nm, equivale a 40 µg/mL de RNA total.

Para o cálculo da pureza do RNA, a leitura a 260 nm, que detecta RNA, foi dividida pela leitura a 280 nm, que detecta proteína. Foram considerados apenas as amostras cujo valor estava entre 1,8 a 2,2 (aceitável). Eletroforese em gel de agarose a 1% foi feita para verificar visualmente a integridade das bandas 28S e 18S do RNA.

### **3.13.2. Reação de transcriptase reversa (RT)**

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi feita através da reação de transcriptase reversa utilizando-se a enzima transcriptase reversa ImProm II (Promega). O protocolo para a síntese de cDNA foi dividido em três fases; sendo a primeira a fase de desnaturação, onde 1 µg de RNA total foi colocado em tubo livre de RNase e DNase e foi adicionado a este 1 µL de oligo deoxirribonucleotídeo T(dT) a 150 ng/mL, após isto foi então completado o volume com 4 µL de água DEPC. Os tubos foram colocados em termociclador (PTC-200, Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Inc.; Pennsylvania, EUA) e incubados a 70°C por 5 minutos.

Para a segunda fase, chamada fase de anelamento, foi preparado um volume de uma solução (“mix”) em função do número de amostras. Esta solução é constituída por 4  $\mu\text{L}$  tampão de reação 5X + 1  $\mu\text{L}$  dNTP mix (10 mM) + 2,4  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (25 mM) + 6,6  $\mu\text{L}$  água Milli-Q autoclavada e 1  $\mu\text{L}$  Improm II. Para cada amostra foi adicionado 15  $\mu\text{L}$  desta solução. Após a adição da solução, as amostras foram levadas ao termociclador utilizando um programa de 25°C por 5 minutos e depois 60 minutos a 42°C. Na última fase ocorreu a inativação da transcriptase reversa por aquecimento a 70°C por 15 minutos. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

### **3.13.3. Reação de polimerase em cadeia (PCR)**

Uma alíquota de 1  $\mu\text{l}$  de cDNA foi transferido para tubo livre de RNase e DNase onde foi feita a reação de PCR. Foi preparado uma solução de reação contendo, para cada tubo, 2,5  $\mu\text{L}$  tampão PCR 10X + 0,75  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (50 mM) + 0,5  $\mu\text{L}$  dNTP (10 mM) + 3  $\mu\text{L}$  “primer” de amplificação I (5  $\mu\text{Mol}$ ) + 3  $\mu\text{L}$  “primer” de amplificação II (5  $\mu\text{Mol}$ ) + 0,4  $\mu\text{L}$  de Taq polimerase + 2,5  $\mu\text{L}$  DMSO + 11,35  $\mu\text{L}$  água Milli-Q. A solução foi homogeneizada em vórtex e para cada tubo contendo amostra de cDNA foi adicionado 24  $\mu\text{L}$  desta solução e levado ao termociclador. O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. As bandas foram semi-quantificadas usando um software de análise de imagem (Alpha Imager<sup>TM</sup> 1220 version 5.5; Alpha Innotech Corporation; California, EUA) e o resultado da expressão gênica foi determinada pela razão entre a intensidade densitométrica do gene de interesse e a intensidade densitométrica do gene  $\beta$ -actina.

A tabela a seguir mostra as quantidades de cDNA, temperatura de anelamento e número de ciclos que foram usados para fazer o PCR. É importante ressaltar que a temperatura de anelamento é dependente do gene (“primer”) usado e o número de ciclos do tipo de tecido em que é realizado o PCR.

<b>Gene</b>	<b>Quantidade de cDNA</b>	<b>Temperatura de anelamento</b>	<b>Número de ciclos</b>
<b>β-actina</b>	1 µL	57,8°C	35
<b>Colágeno III</b>	1 µL	60°C	40
<b>TGF-β</b>	1 µL	54,7°C	40
<b>AGTO</b>	1 µL	58,2°C	35
<b>Renina</b>	7 µL	58°C	40
<b>ECA</b>	2 µL	52,8°C	35
<b>AT<sub>1</sub></b>	1 µL	61,5°C	40
<b>AT<sub>2</sub></b>	7 µL	60°C	40

### 3.14. Western blot

Pela técnica de Western blot foi quantificado nas amostras de ventrículo esquerdo e direito de todos os grupos: a expressão protéica dos componentes do SRA (angiotensinogênio, ECA, renina, AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>), colágeno I, III e TGF- $\beta$ . Os anticorpos anti-colágeno I, anti-colágeno III, anti-TGF- $\beta$ , anti-ECA, anti-AT<sub>1</sub> e anti-AT<sub>2</sub> foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (California, EUA), os anticorpos anti-angiotensinogênio e anti-renina form adquiridos da Fitzgerald Industries International (Massachusetts, EUA) e anti- $\beta$ -actina da Dako (California, EUA).

No dia do experimento, as amostras de tecidos foram pesadas e depois homogeneizadas em tampão de extração protéica (100 mM KCl, 10 mM HEPES, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EDTA, 10% glicerol, 1 mM DTT, 10% SDS, 0,1 mL inibidor de proteinase [SIGMA; Missouri, EUA]). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Quantidades iguais de proteína para todas as amostras (100  $\mu$ g) foram misturadas a um tampão para SDS e aplicadas nos *slots* do gel SDS – PAGE (sódio dodecilsulfato poliacrilamida) 12% e submetidas à eletroforese em cuba para mini-gel (BIO-RAD; trans-blot SD semidry transfer cell; California, EUA). Após este processo, as amostras contidas no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose. No passo seguinte, as membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado a 5% misturados a TBS durante a noite. Após este procedimento, as membranas foram lavadas com TBST e posteriormente incubadas com anticorpos primários durante a noite. A seguir as membranas foram lavadas com TBST e incubadas com anticorpos secundários ligados a peroxidase (HRP) por 2

horas. Após isto, foi adicionado sobre as membranas o substrato quimioluminescente ECL (Amersham Biosciences; Buckinghamshire, UK) e então expostas ao filme de raio-X (Agfa, Argentina ou Amersham.Biosciences; Buckinghamshire, UK). As quantificações densitométricas das bandas foram feitas através do programa Scion image for Windows (Scion Corporation; Maryland, EUA). Os resultados da expressão protéica foram determinados pela razão entre a intensidade da banda de interesse e a intensidade da banda da  $\beta$ -actina.

### **3.15. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. As médias dos diversos grupos foram comparadas utilizando análise de variância de um fator (one-way ANOVA) com pós-teste de Newman-Keuls. Também foi utilizada a análise de variância de dois fatores (two way-ANOVA) para avaliação da evolução ponderal dos grupos estudados. Erro  $\alpha$  menor do que 5% foi estabelecido para aceitar diferenças como sendo significantes.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Evolução Ponderal

O peso corpóreo no desmame foi semelhante entre os quatro grupos de dieta estudados (NR=  $58,71 \pm 7,36$ , n= 14; HR1=  $48,81 \pm 4,03$ , n= 16; HR2=  $51,75 \pm 3,67$ , n= 15; HR2+HZ=  $52,44 \pm 3,37$ , n= 15; HR2+LOS=  $58,0 \pm 1,55$ g, n= 15). Este perfil no peso corporal foi mantido até os animais completarem 12 semanas de idade (NR=  $441,10 \pm 12,81$ , n= 14; HR1=  $442,80 \pm 10,93$ , n= 16; HR2=  $388,50 \pm 7,84$ , n= 15; HR2+HZ=  $378,10 \pm 11,50$ , n= 15; HR2+LOS=  $451,5 \pm 11,15$ g, n= 15). No entanto, a partir da 13ª semana de idade, o peso corpóreo dos animais do grupo HR2, que foram alimentados desde o desmame com dieta hipersódica 2, e do grupo HR2+HZ, que foram alimentados desde o desmame com dieta hipersódica 2 e que passaram a receber hidralazina a partir da 7ª semana de vida foi menor ( $p < 0,05$ ) quando comparado com os animais dos grupos NR, HR1 e HR2+LOS. O menor peso corpóreo, observado nos animais do grupo HR2 e HR2+HZ, foi mantido até a 18ª semana de idade. Da 3ª semana até a 18ª semana de idade não foi observada diferença de peso corpóreo entre os grupos HR2 e HR2+HZ. Estes resultados estão demonstrados na Tabela 1 e Figura 3.

## **4.2. Consumo de ração, ingestão hídrica e volume urinário**

Estas verificações foram realizadas durante três dias consecutivos na 18ª semana de idade dos ratos mantidos em gaiolas metabólicas individuais.

O consumo de ração observada durante os três dias consecutivos foi maior ( $p < 0,05$ ) nos animais dos grupos HR1, HR2, HR2+HZ e HR2+LOS quando comparado com os animais do grupo NR. Não houve diferença no consumo médio de ração entre os grupos HR1, HR2, HR2+HZ e HR2+LOS (Tabela 1 e Figura 4).

A ingestão hídrica e o volume urinário foram maiores ( $p < 0,05$ ) nos animais do grupo HR2, HR2+HZ e HR2+LOS quando comparado com os animais dos grupos NR e HR1. A ingestão hídrica e o volume urinário também foram maiores ( $p < 0,05$ ) nos animais dos grupos HR1 quando comparado ao grupo NR (Tabela 1 e Figuras 5A e 5B).

## **4.3. Pressão arterial caudal e frequência cardíaca**

Em um estudo anterior realizado pelo nosso laboratório, foi observado que os animais que receberam sobrecarga de sal na dieta, desde o desmame até 72ª semana de idade, apresentaram maior pressão arterial a partir da 7ª semana de vida (da Costa Lima et al., 1995). Com base neste estudo, no presente trabalho a primeira aferição da pressão arterial caudal, dos grupos NR, HR1, HR2, HR2+HZ e HR2+LOS foi realizada na 6ª semana de idade. A partir da 7ª semana de idade a aferição da pressão arterial caudal foi realizada quinzenalmente.

Como pode ser observada na Figura 9, a pressão arterial caudal, medida na 6ª semana de idade, não foi diferente ( $p > 0,05$ ) entre os cinco

grupos estudados (NR, HR1, HR2, HR2+HZ e HR2+LOS). A partir da 7<sup>a</sup> semana de idade a pressão arterial caudal foi maior ( $p < 0,05$ ) nos grupos HR2 e HR1 quando comparado com o grupo NR, HR2+HZ e HR2+LOS. A PAc também foi maior ( $p < 0,05$ ) nos animais do grupo HR2 quando comparado com os animais do grupo HR1 desde a 7<sup>a</sup> semana de idade, no entanto, na 18<sup>a</sup> semana de idade não foi observada diferença ( $p > 0,05$ ) entre os dois grupos. A PAc dos animais que receberam hidralazina ou losartan não diferiu ( $p > 0,05$ ) do grupo NR (Tabela 1 e Figura 9A).

A frequência cardíaca avaliada da 6<sup>a</sup> semana até a 18<sup>a</sup> semana de idade não foi diferente ( $p > 0,05$ ) entre os grupos NR, HR1, HR2, HR2+HZ e HR2+LOS (Tabela 1 e Figura 9B).

#### **4.4. Sódio e potássio plasmático, excreção urinária de sódio e hematócrito**

Tanto o sódio como o potássio plasmático não foi diferente ( $p > 0,05$ ) entre os grupos NR, HR1, HR2, HR2+HZ e HR2+LOS. No entanto, a excreção urinária de sódio de 24 horas foi maior ( $p < 0,05$ ) nos animais dos grupos HR2, HR2+HZ e HR2+LOS comparado àqueles dos grupos NR e HR1. A excreção urinária de sódio também foi maior ( $p < 0,05$ ) nos animais dos grupos HR1 comparado ao grupo NR (Tabela 1 e Figura 6A e 6B). Estes resultados confirmam os diferentes consumos de sal na dieta dos grupos estudados.

O hematócrito foi medido com o objetivo de verificar se houve interferência das dietas ou das drogas administradas sobre a volemia dos animais. Como pode ser observado na figura 8, não houve diferença

( $p > 0,05$ ) desta variável entre os grupos NR, HR1, HR2, HR2+HZ e HR2+LOS (Tabela 1 e Figura 8).

#### **4.5. Atividade de renina plasmática e aldosterona sérica**

A atividade de renina plasmática e a concentração de aldosterona sérica, medida na 18ª semana de idade, foram menores ( $p < 0,05$ ) nos animais que receberam dieta HR1 e HR2 quando comparado com os animais que receberam a dieta NR. Da mesma forma, os animais que receberam a dieta HR2 desde o desmame e que passaram a receber hidralazina ou losartan a partir da 7ª semana de idade apresentaram menor ( $p < 0,05$ ) atividade de renina plasmática e aldosterona plasmática quando comparado com os animais que receberam dieta NR (Tabela 3 e Figuras 10 e 11).

#### **4.6. Ecocardiograma**

A espessura da PPVEDIA e do SIVDIA foi maior ( $P < 0,05$ ) nos animais do grupo HR1, HR2, HR2+HZ e HR2+LOS quando comparado com os animais do grupo NR. A espessura da PPVEDIA e do SIVDIA no grupo HR2 foi maior ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo HR1, HR2+HZ e HR2+LOS. Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) destas variáveis entre os grupos HR1, HR2+HZ e HR2+LOS. Além da maior espessura da PPVEDIA e SIVDIA, o ecocardiograma revelou um menor ( $p < 0,05$ ) DDVE nos animais do grupo HR2 quando comparado com os animais do grupo NR, HR1, HR2+HZ e HR2+LOS, sugerindo um remodelamento concêntrico nos animais deste grupo HR2 (Tabela 2 e Figuras 12A, 12B e 12C).

#### **4.7. Massa cardíaca, ventricular esquerda e ventricular direita**

Os resultados a seguir foram obtidos pela razão do peso cardíaco total ou dos ventrículos separados e o peso corporal do animal.

A massa cardíaca total, a massa ventricular esquerda e a massa ventricular direita foram maiores ( $p < 0,05$ ) nos animais dos grupos HR2, HR2+HZ e HR2+LOS quando comparado com os animais do grupo NR e HR1. A massa cardíaca total, massa ventricular esquerda e direita não foi diferente ( $p > 0,05$ ) entre os animais do grupo HR1 e do grupo NR (Tabela 2 e Figura 14).

#### **4.8. Diâmetro transverso do miócito e fibrose intersticial do ventrículo esquerdo e direito**

Além do estudo ecocardiográfico e medida da massa ventricular esquerda e direita, foi realizada a análise histológica com o intuito de verificar se a alteração morfológica induzida pela dieta hipersódica é decorrente de aumento no diâmetro transverso do miócito e/ ou fibrose intersticial do ventrículo esquerdo e direito.

Como pode ser observado na Figura 15A, o diâmetro transverso do miócito (DTM) do ventrículo esquerdo foi maior ( $p < 0,05$ ) nos animais do grupo HR1, HR2 e HR2+HZ quando comparado com os animais do grupo NR e HR2+LOS (Tabela 4).

O DTM do ventrículo direito também foi maior ( $p < 0,05$ ) nos animais do grupo HR2 e HR2+HZ comparado com os animais do grupo NR, HR1 e HR2+LOS. Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) do DTM do ventrículo direito entre os animais do grupo NR, HR1 e HR2+LOS (Tabela 4 e Figura 15B).

A fibrose intersticial do ventrículo esquerdo e direito foi maior ( $p < 0,05$ ) nos animais do grupo HR1, HR2 e HR2+LOS em comparação aqueles do grupo NR e HR2+HZ. Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre os animais do grupo NR e HR2+HZ (Tabela 4 e Figuras 16A e 16B).

Como pode ser observado nas Figuras 17 e 18, apesar do losartan prevenir o aumento do diâmetro transversal do miócito, o losartan não foi eficaz em prevenir a fibrose intersticial neste modelo de sobrecarga de sal.

As figuras 17 e 18 ilustram exemplos representativos do diâmetro transversal do miócito e da fibrose intersticial do ventrículo esquerdo e direito.

#### **4.9. Expressão gênica do angiotensinogênio, renina, ECA, AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>**

A expressão gênica do angiotensinogênio, da renina, ECA, do receptor AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> no ventrículo esquerdo e direito foram avaliados na 18ª semana de idade dos animais do grupo NR, HR1, HR2, HR2+HZ e HR2+LOS (ANEXO 3-8).

Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) na expressão gênica do angiotensinogênio, da renina e da ECA no ventrículo esquerdo e direito dos animais dos cinco grupos estudados (Tabelas 5 e 6 e Figuras 21, 22 e 23). A expressão gênica do receptor AT<sub>1</sub> foi maior ( $p < 0,05$ ) no ventrículo esquerdo dos animais do grupo HR1, HR2, HR2+HZ e HR2+LOS quando comparado com os animais do grupo NR (Figura 19). A expressão gênica do receptor AT<sub>2</sub> foi maior ( $p < 0,05$ ) no ventrículo esquerdo dos animais do grupo HR2, HR2+HZ e HR2+LOS quando comparado com os animais do grupo NR (Figura 20).

Não houve diferença ( $p>0,05$ ) estatística nos genes angiotensinogênio, renina, ECA, AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> no ventrículo direito dos animais do grupo NR, HR1, HR2, HR2+HZ e HR2+LOS.

#### **4.10. Expressão protéica do angiotensinogênio, renina, ECA, AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>**

A expressão protéica do angiotensinogênio, da renina e do receptor AT<sub>1</sub> no ventrículo esquerdo e direito foram avaliados na 18<sup>a</sup> semana de idade dos animais do grupo NR, HR1, HR2, HR2+HZ e HR2+LOS (ANEXO 9-13).

Não houve diferença ( $p>0,05$ ) na expressão protéica do angiotensinogênio, ECA e da renina no ventrículo esquerdo e direito dos animais dos cinco grupos estudados (Tabelas 7 e 8 e Figuras 24, 25 e 26). A expressão protéica do receptor AT<sub>1</sub> foi maior ( $p<0,05$ ) no ventrículo esquerdo e direito dos animais do grupo HR2 e HR2+HZ quando comparado com os animais do grupo NR, HR1 e HR2+LOS (Figura 27). Não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre os animais do grupo HR1, HR2+LOS e NR.

A expressão protéica do receptor AT<sub>2</sub> foi menor ( $p<0,05$ ) no grupo HR2+LOS quando comparado com os outros grupos. Não houve diferença ( $p>0,05$ ) estatística entre os grupos NR, HR1, HR2 e HR2+HZ (Figura 28).

#### **4.11. Expressão protéica do colágeno I, III e TGF- $\beta$**

A expressão protéica do colágeno I no ventrículo esquerdo e direito foi maior ( $p<0,05$ ) nos animais do grupo HR1, HR2 e HR2+LOS quando comparado aos animais do grupo NR, HR2+HZ. No entanto, a expressão protéica do colágeno III foi maior ( $p<0,05$ ) apenas no ventrículo esquerdo

dos animais do grupo HR1, HR2 e HR2+LOS quando comparado com os animais do grupo NR. Estes resultados são consistentes com a fibrose intersticial observada por meio da análise histológica. Não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre os animais do grupo NR e HR2+HZ (Tabela 11 e Figuras 29 e 30).

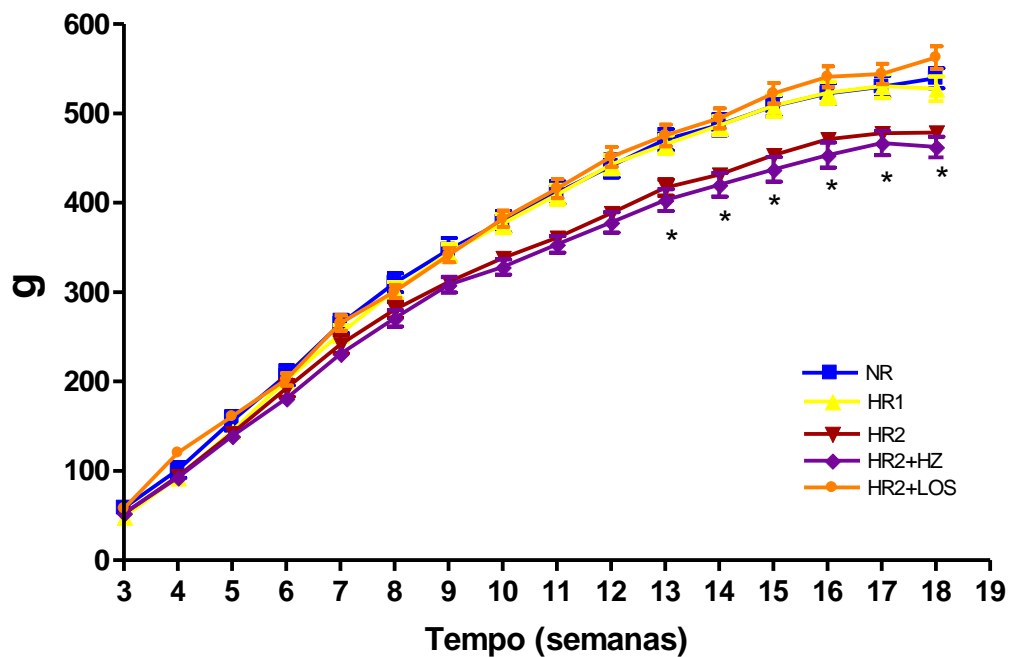
A expressão protéica do TGF- $\beta$  não foi diferente ( $p>0,05$ ) no ventrículo esquerdo e direito entre os animais do grupo NR, HR1, HR2, HR2+HZ e HR2+LOS (Figura 31).

#### **4.12. Avaliação da ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada do receptor AT<sub>1</sub> no ventrículo esquerdo e direito**

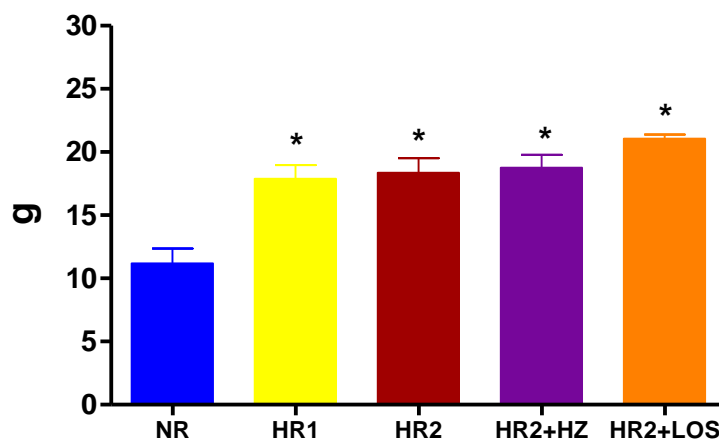
A ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada do receptor AT<sub>1</sub> no ventrículo esquerdo e direito foi menor ( $p<0,05$ ) nos grupos HR1, HR2, HR2+HZ e HR2+LOS quando comparado com o grupo NR. A ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada do receptor AT<sub>1</sub> foi ainda menor ( $p<0,05$ ) no ventrículo esquerdo e direito dos animais que receberam dieta hipersódica 2 e losartan quando comparado com os animais dos outros grupos (Tabela 9 e Figura 32).

A ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada do receptor AT<sub>2</sub> não foi alterada no ventrículo esquerdo e direito dos grupos HR1 e HR2. No entanto, a ligação do anticorpo no receptor AT<sub>2</sub> foi menor ( $p<0,05$ ) no ventrículo esquerdo dos grupos HR2+HZ e HR2+LOS quando comparado com os outros grupos. No ventrículo direito, a ligação do anticorpo no receptor AT<sub>2</sub> foi menor ( $p<0,05$ ) apenas no grupo HR2+LOS quando comparado com os demais grupos (Tabela 9 e Figura 33).

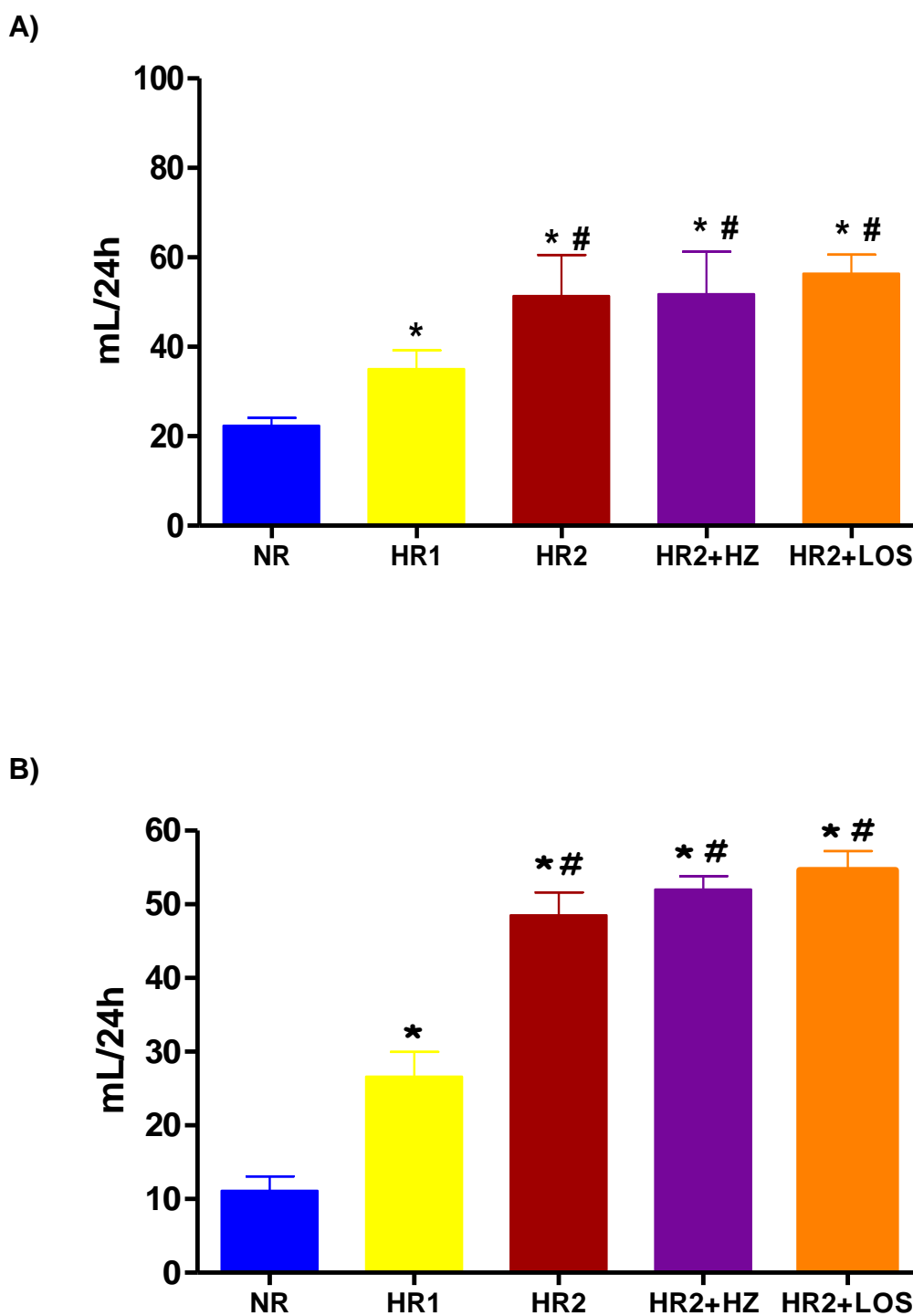




**Figura 3.** Evolução ponderal (g) de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NR, n=14), hipersódica 1 (HR1, n=16), hipersódica 2 (HR2, n=15), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=15) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=15) desde o desmame até a 18ª semana de idade. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  vs. NR, HR1 e HR2+LOS.

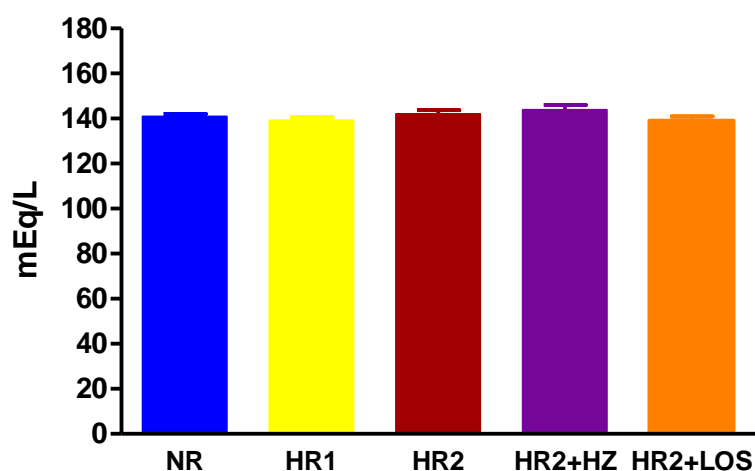


**Figura 4.** Consumo de ração (g) de animais alimentados com dieta normossódica (NR, n=14), hipersódica 1 (HR1, n=16), hipersódica 2 (HR2, n=15), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=15) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=15), desde o desmame até a 18ª semana de idade. Variável medida na 18ª semana de idade. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  vs. NR.

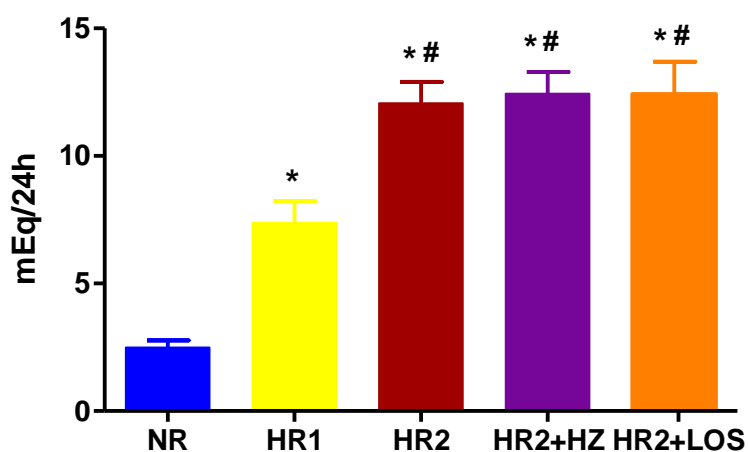


**Figura 5. A)** Ingestão hídrica (mL/24h) e **B)** volume urinário (mL/24h) de animais alimentados com dieta normossódica (NR, n=14), hipersódica 1 (HR1, n=16), hipersódica 2 (HR2, n=15), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=15) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=15) desde o desmame até a 18ª semana de idade. Variável medida na 18ª semana de idade. Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média. \*p<0,05 vs. NR, #p< 0,05 vs, HR1.

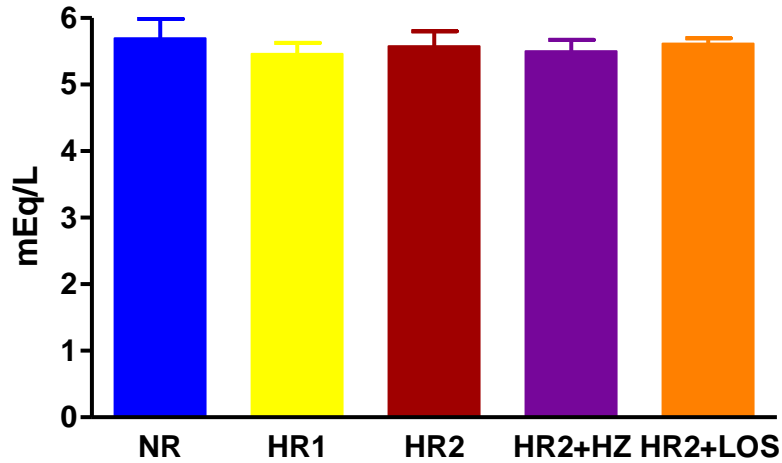
A)



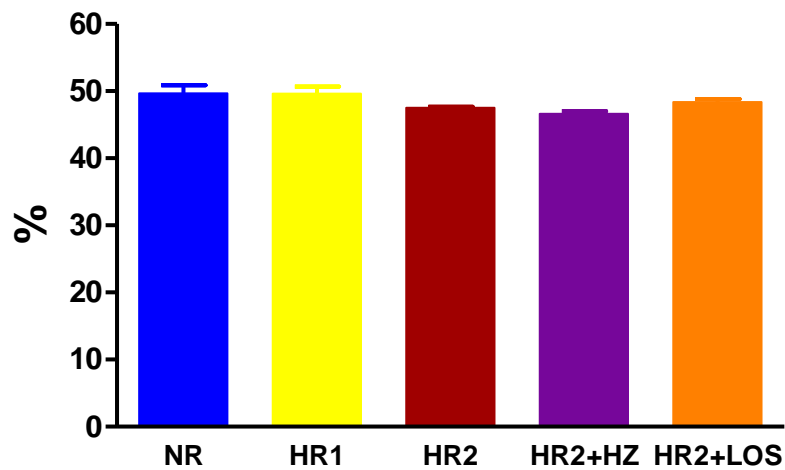
B)



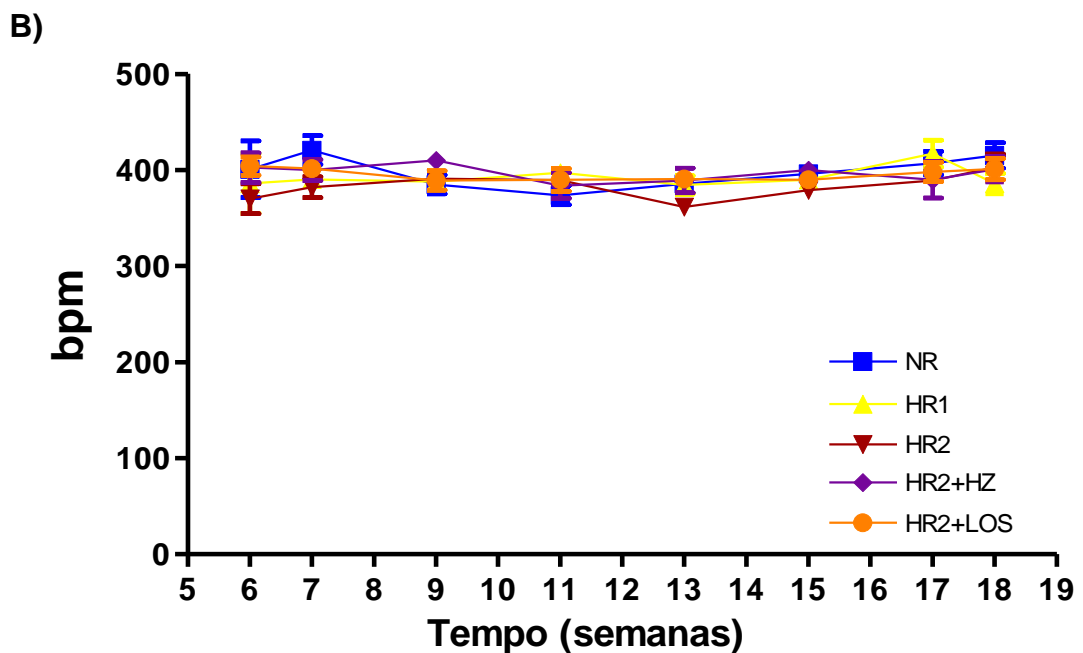
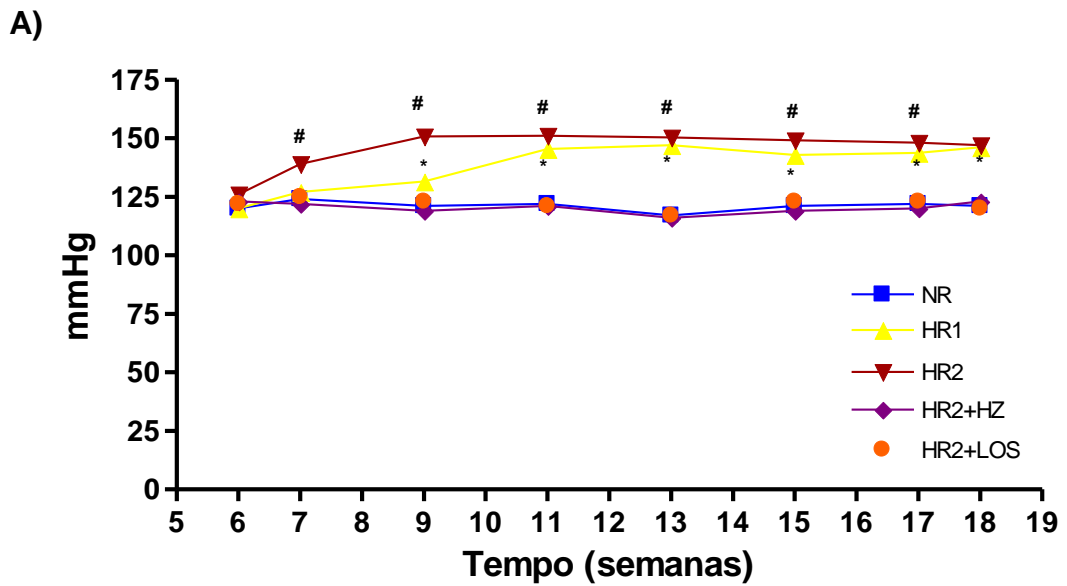
**Figura 6. A)** Sódio plasmático (mEq/L) e **B)** excreção urinária de sódio (mEq/24h) de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NR, n=6), hipersódica 1 (HR1, n=7), hipersódica 2 (HR2, n=7), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=7) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=7) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade. Variável medida na 18<sup>a</sup> semana de idade. Os valores obtidos estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*p<0.05 vs. NR, #p<0.05 vs. HR1.



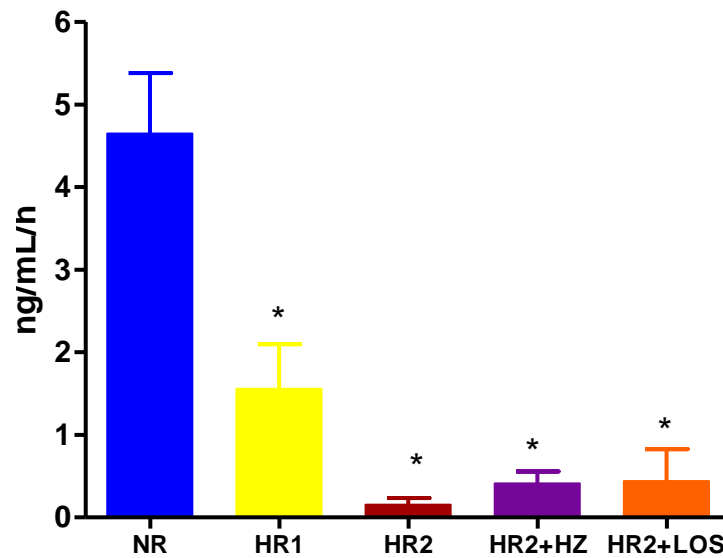
**Figura 7.** Potássio plasmático (mEq/L) de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NR, n=5), hipersódica 1 (HR1, n=5), hipersódica 2 (HR2, n=5), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=5) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=5) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade. Variável medida na 18<sup>a</sup> semana de idade. Os valores obtidos estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.



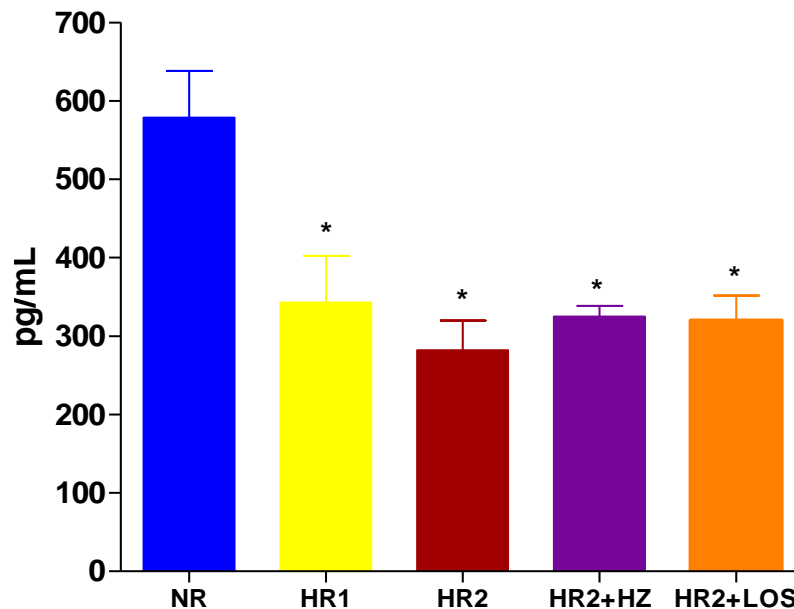
**Figura 8.** Hematócrito (%) de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NR, n=6), hipersódica 1 (HR1, n=7), hipersódica 2 (HR2, n=7), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=7) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=7) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade. Variável medida na 18<sup>a</sup> semana de idade. Os valores obtidos estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.



**Figura 9. A)** Pressão arterial caudal (mmHg) e **B)** frequência cardíaca (bpm) de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NR, n=14), hipersódica 1 (HR1, n=16), hipersódica 2 (HR2, n=15), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=15) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=15) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade. Variável medida quinzenalmente da 6<sup>a</sup> até a 18<sup>a</sup> semana de idade. Os valores obtidos estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  vs. NR, HR2+HZ e HR2+LOS; # $p < 0,05$  vs. NR, HR1, HR2+HZ e HR2+LOS.

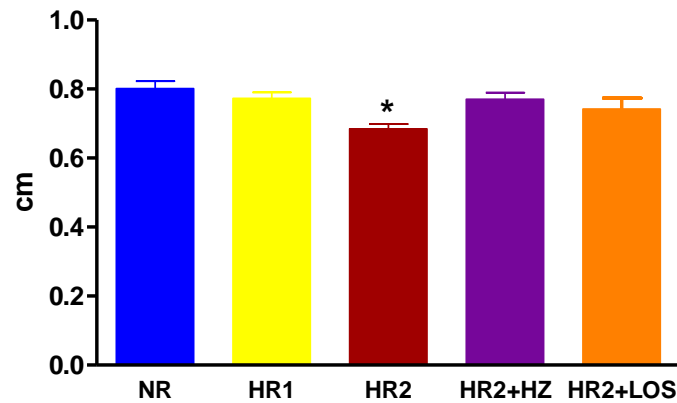


**Figura 10.** Atividade de renina plasmática (ng/mL/h) de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NR, n=8), hipersódica 1 (HR1, n=8), hipersódica 2 (HR2, n=8), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=8) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=7) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade. Variável medida na 18<sup>a</sup> semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. \*p<0.05 vs. NR.

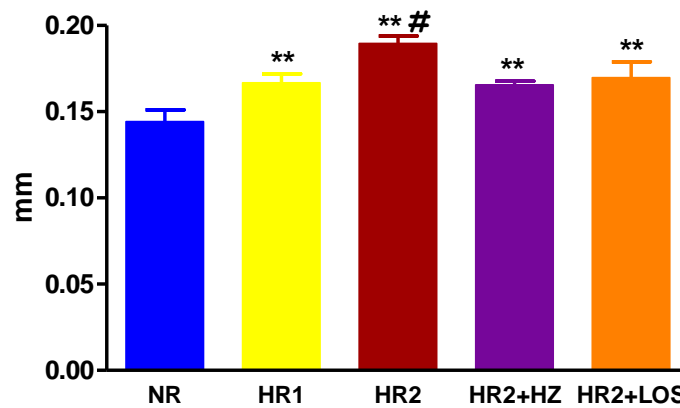


**Figura 11.** Aldosterona plasmática (pg/mL) de ratos Wistar submetidos à dieta normossódica (NR, n=8), hipersódica 1 (HR1, n=8), hipersódica 2 (HR2, n=8), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=8) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=7) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade. Variável medida na 18<sup>a</sup> semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. \*p<0.05 vs. NR.

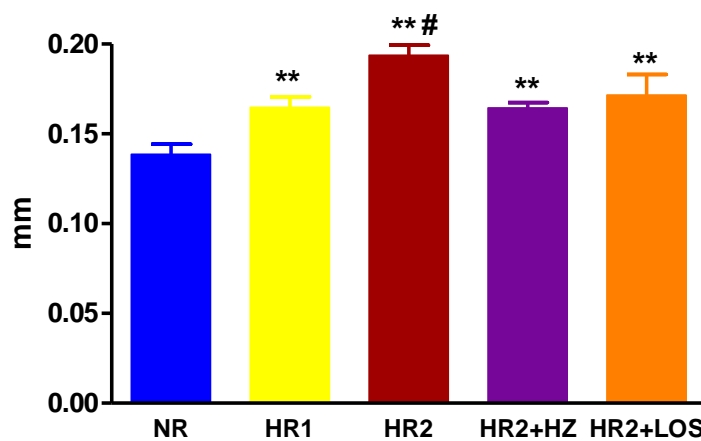
A)



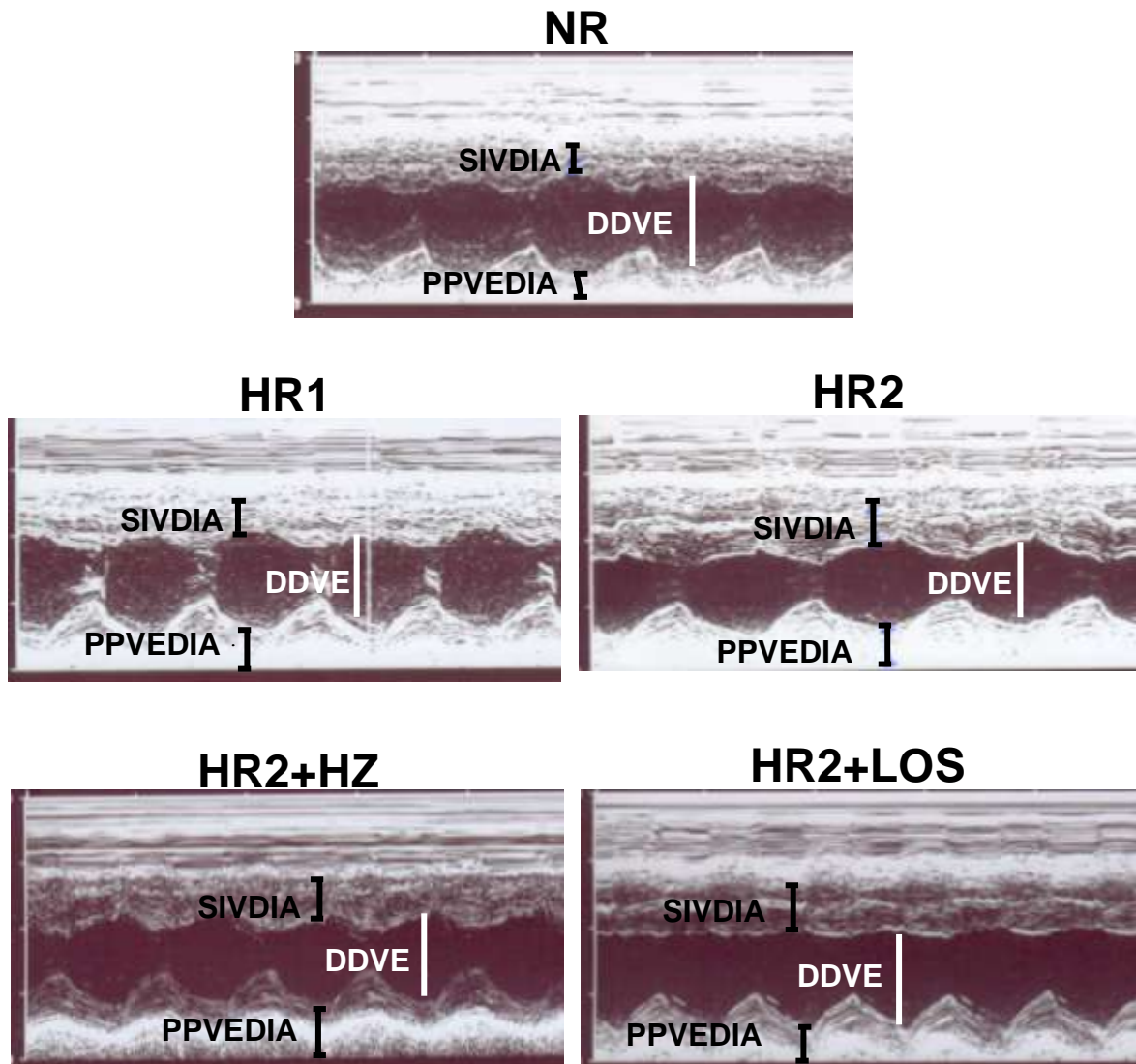
B)



C)

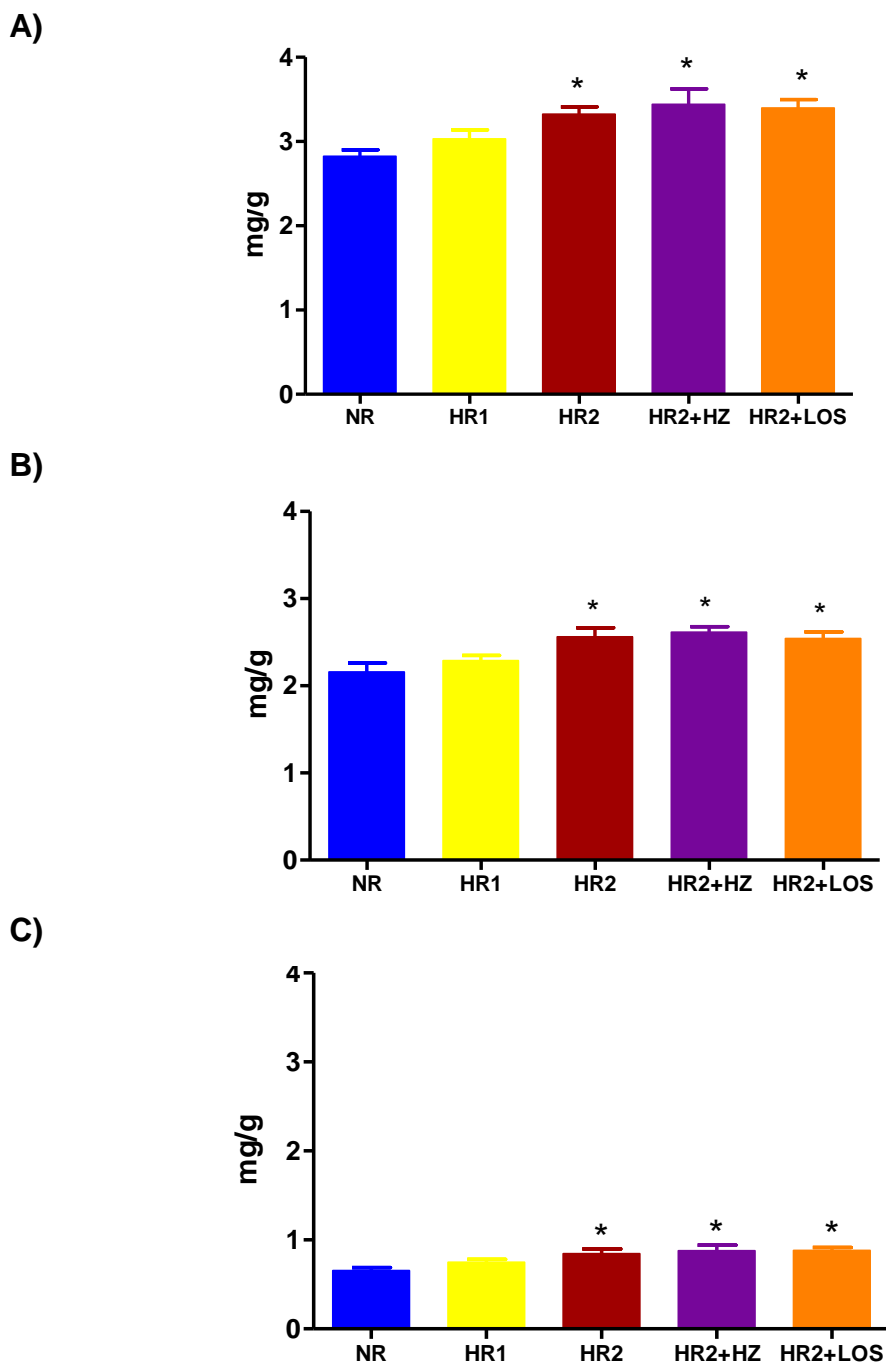


**Figura 12.** **A)** Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (cm) **B)** Parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole (mm) e **C)** Septo interventricular na diástole (mm) de ratos Wistar submetidos à dieta normossódica (NR, n=6), hipersódica 1 (HR1, n=8), hipersódica 2 (HR2, n=7), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=7) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=7) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade. Variável medida por meio do estudo ecocardiográfico na 16<sup>a</sup> semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média. \*p<0,05 vs. NR, HR1, HR2+HZ e HR2+LOS; \*\*p<0,05 vs. NR e #p<0,05 vs. HR1, HR2+HZ e HR+LOS.



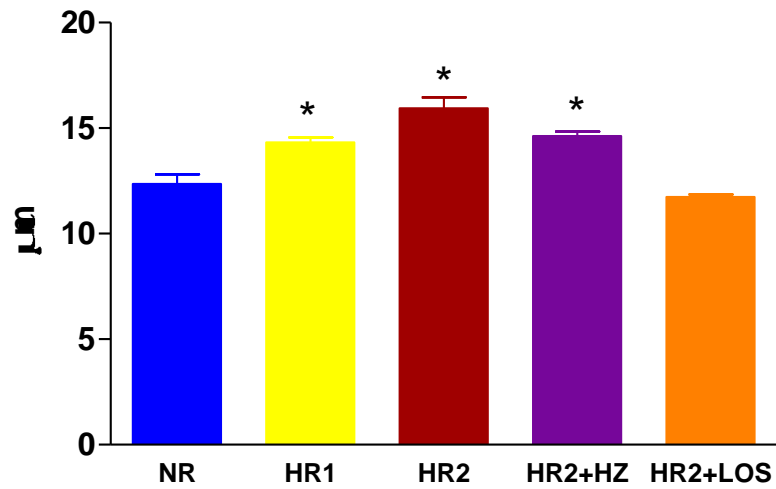
**Figura 13.** Ecocardiograma de ratos submetidos à dieta normossódica (NR, n=6), hipersódica 1 (HR1, n=8), hipersódica 2 (HR2, n=7), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=7) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=7) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade.



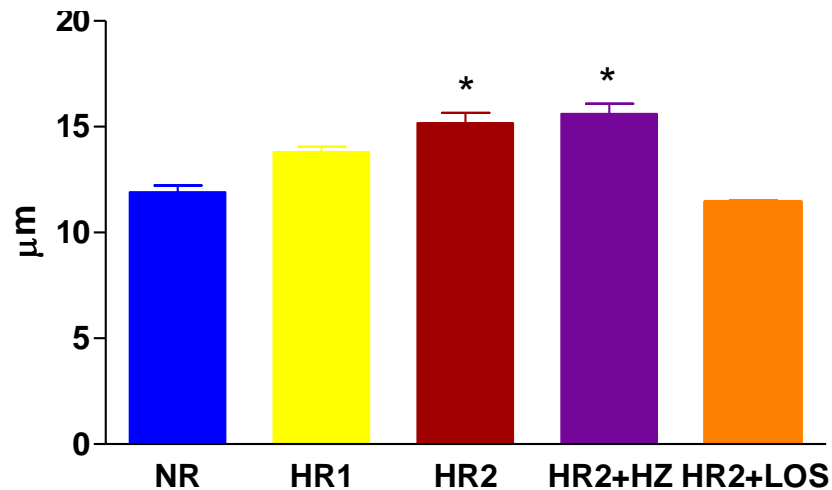


**Figura 14. A)** Massa cardíaca total **B)** Massa ventricular esquerda e **C)** Massa ventricular direita corrigida pelo peso corpóreo (mg/g) de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NR, n=6), hipersódica 1 (HR1, n=8), hipersódica 2 (HR2, n=7), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=7) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=7) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade. Variável medida na 18<sup>a</sup> semana de idade. Os valores obtidos estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  vs. NR.

A)

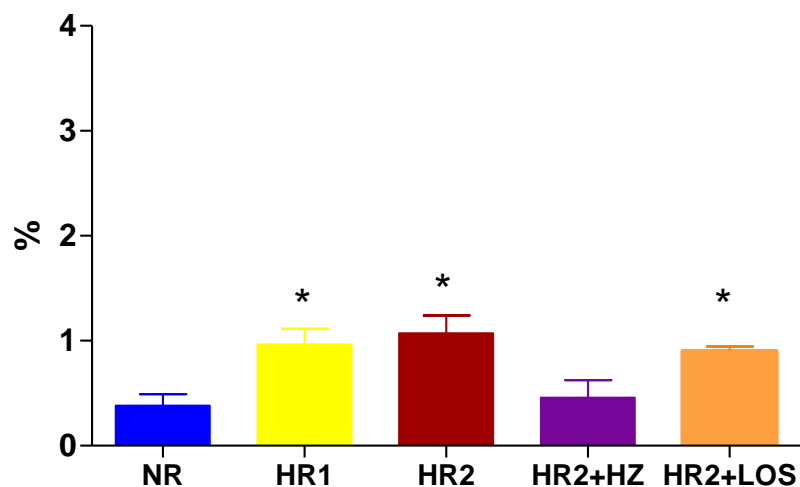


B)

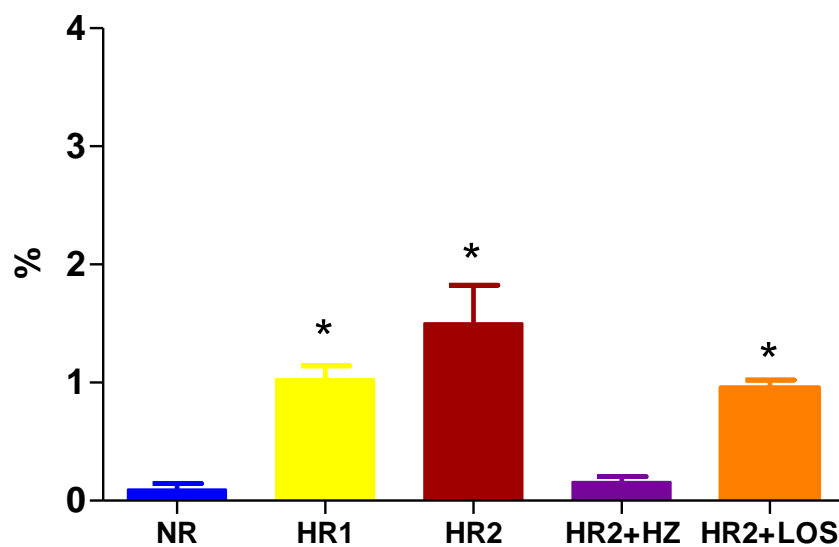


**Figura 15. A)** Diâmetro transverso do miócito ( $\mu\text{m}$ ) do ventrículo esquerdo e **B)** ventrículo direito de ratos Wistar submetidos à dieta normossódica (NR,  $n=6$ ), hipersódica 1 (HR1,  $n=8$ ), hipersódica 2 (HR2,  $n=7$ ) hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ,  $n=7$ ) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS,  $n=7$ ) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p<0,05$  vs. NR e HR2+LOS.

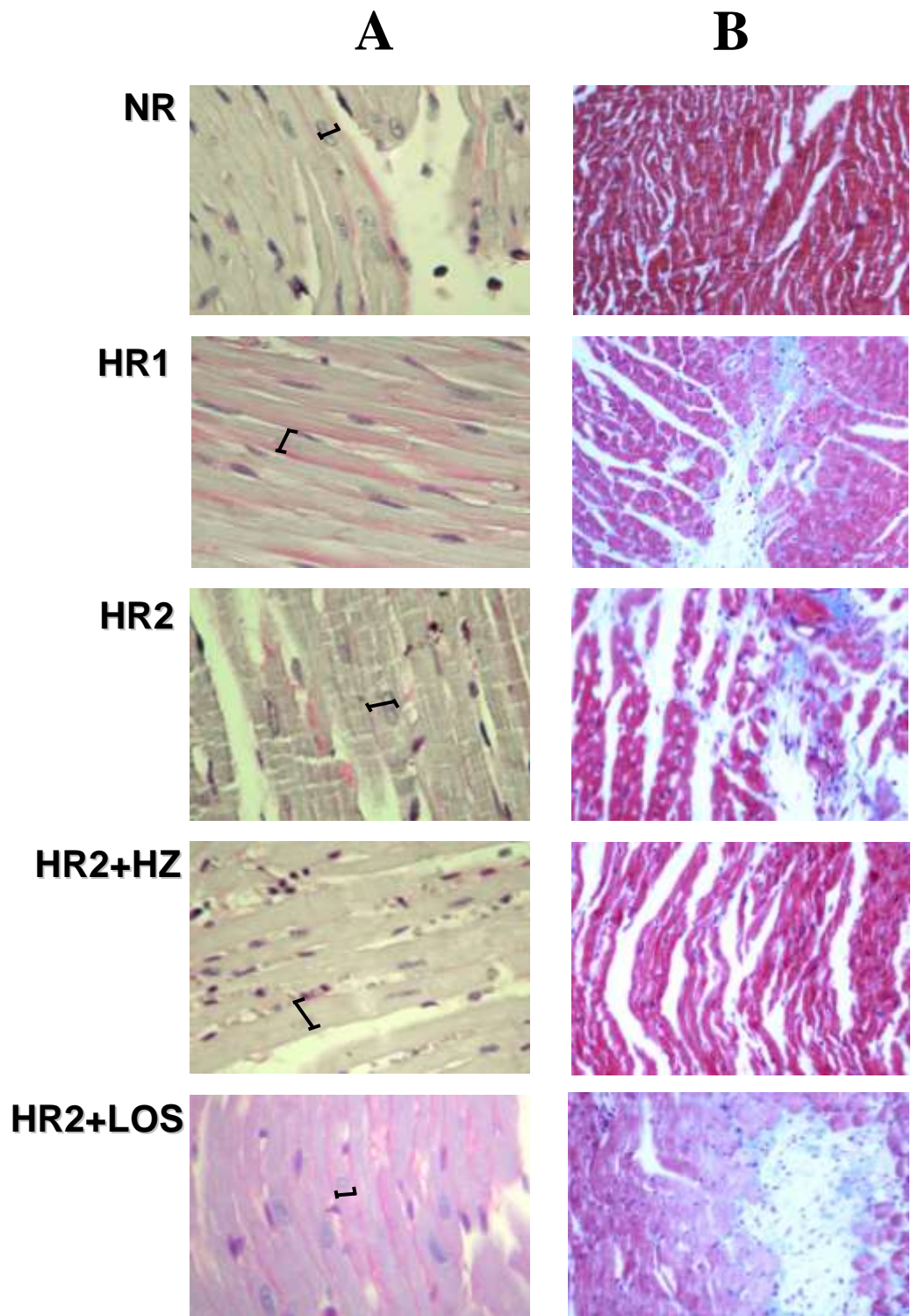
A)



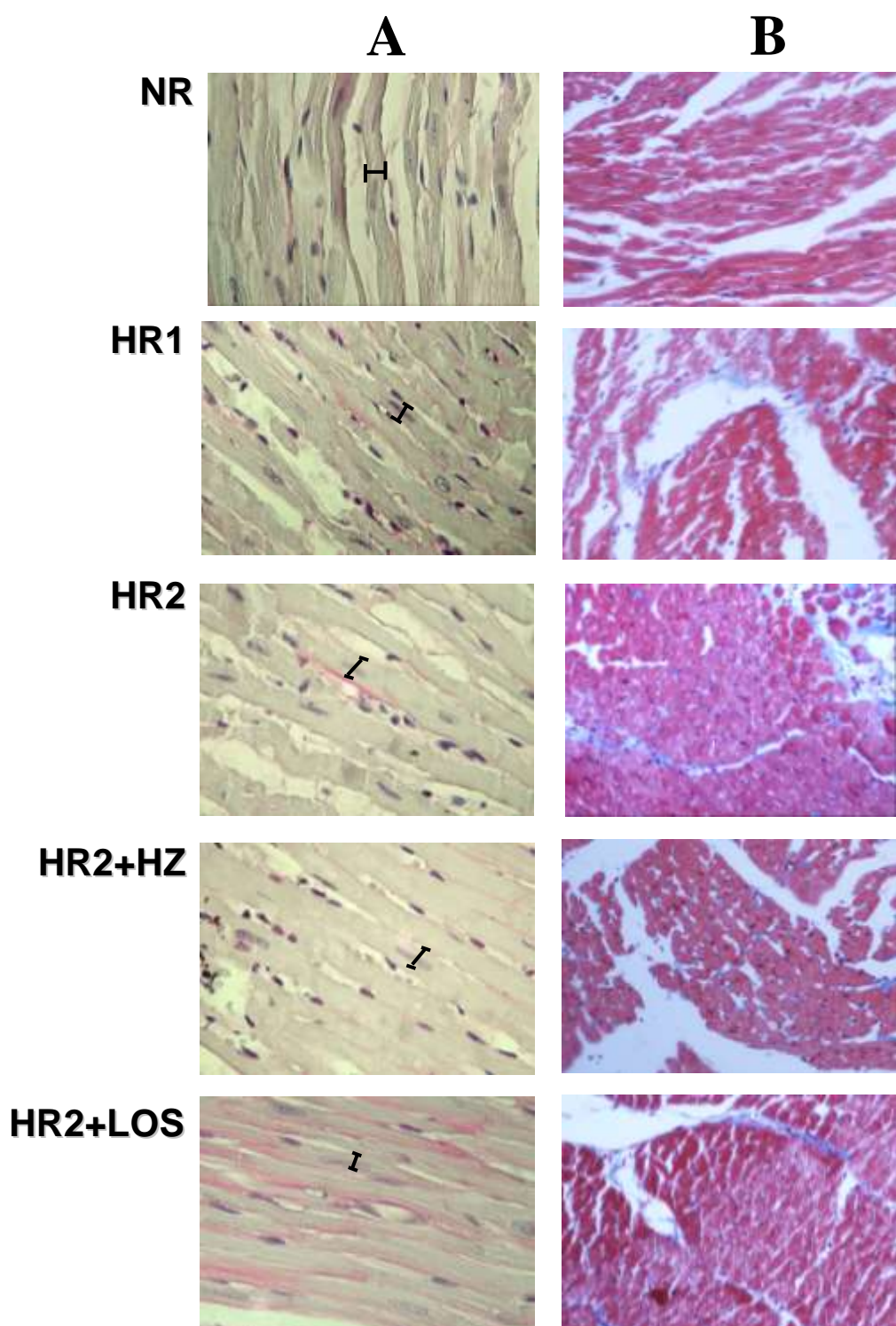
B)



**Figura 16. A)** Fibrose intersticial (%) do ventrículo esquerdo e **B)** ventrículo direito de ratos Wistar submetidos à dieta normossódica (NR, n=6), hipersódica 1 (HR1, n=8), hipersódica 2 (HR2, n=7), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=7) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=7) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade. Variável medida na 18<sup>a</sup> semana de idade.\*p<0,05 vs. NR e HR2+HZ.

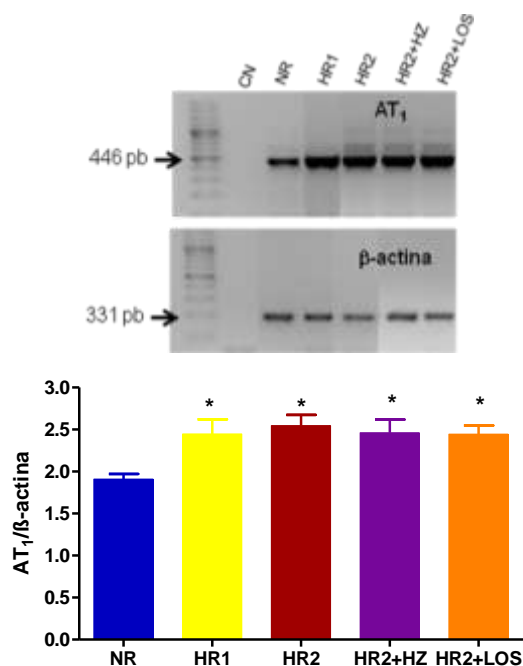


**Figura 17. A)** Diâmetro transverso do miócito ( $\mu\text{m}$ ) e **B)** fibrose Intersticial (%) do ventrículo esquerdo de ratos Wistar submetidos à dieta normossódica (NR, n=6), hipersódica 1 (HR1, n=8), hipersódica 2 (HR2, n=7), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=7) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=7) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade.

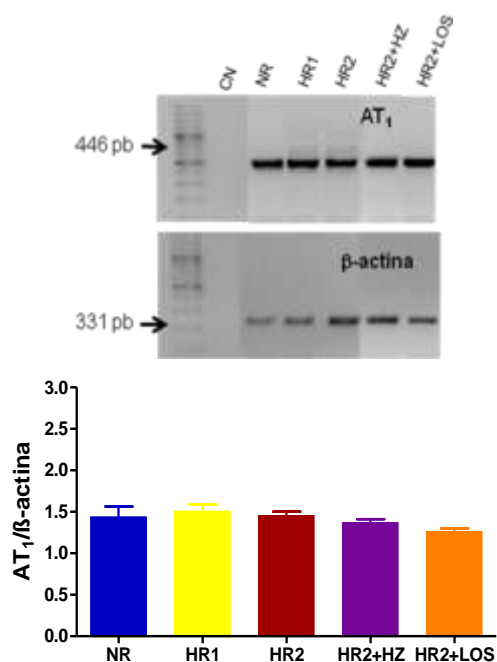


**Figura 18. A)** Diâmetro transverso do miócito e **B)** fibrose Intersticial (%) do ventrículo direito de ratos Wistar submetidos à dieta normossódica (NR, n=6), hipersódica 1 (HR1, n=8), hipersódica 2 (HR2, n=7), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=7) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS=7) desde o desmame até a 18ª semana de idade.

A)

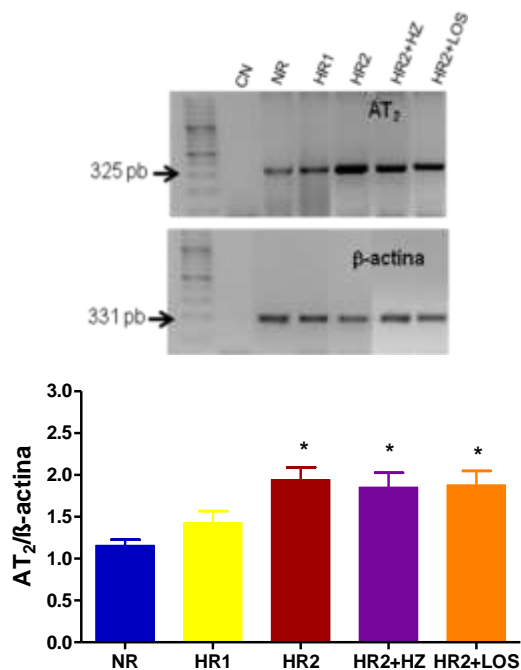


B)

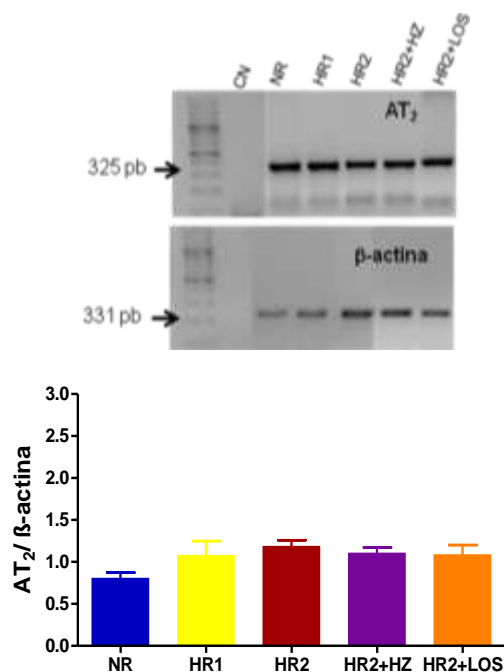


**Figura 19. A)** Expressão gênica (unidade arbitrária - UA) do AT<sub>1</sub> no ventrículo esquerdo e **B)** ventrículo direito de ratos Wistar submetidos à dieta normossódica (NR, n=5-8), hipersódica 1 (HR1, n=6-8), hipersódica 2 (HR2, n=6-8), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=5-8) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=7) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade. CN=Controle negativo. Variável avaliada na 18<sup>a</sup> semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média. \*p<0,05 vs. NR.

A)



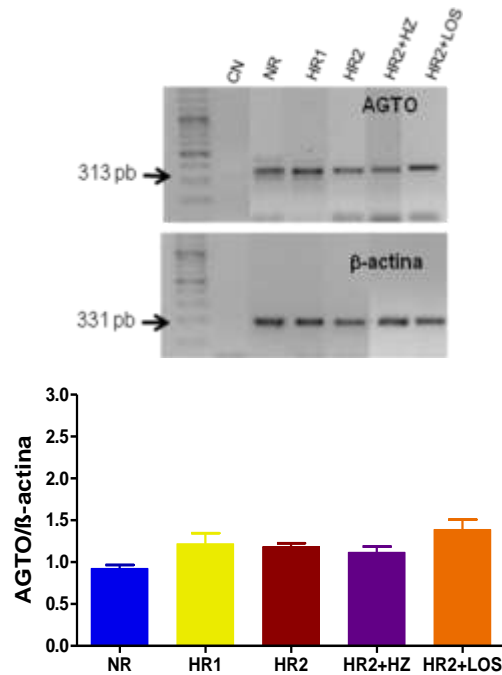
B)



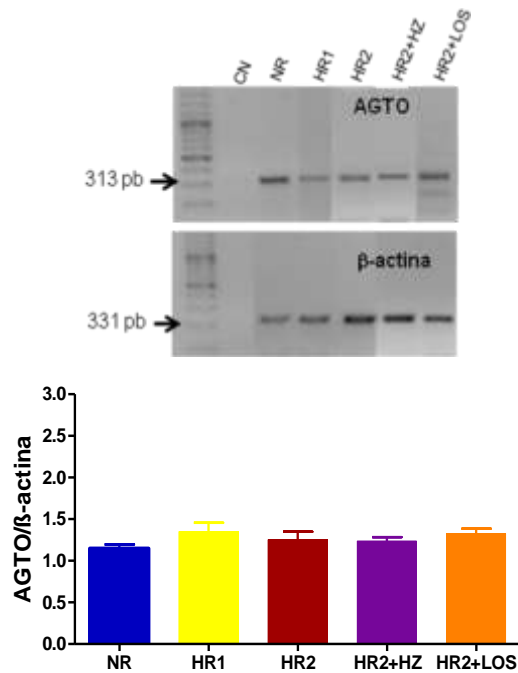
**Figura 20. A)** Expressão gênica (unidade arbitrária - UA) do AT<sub>2</sub> no ventrículo esquerdo e **B)** ventrículo direito de ratos Wistar submetidos à dieta normossódica (NR, n=5-6), hipersódica 1 (HR1, n=4-8), hipersódica 2 (HR2, n=6), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=6-7) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=7) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade. CN=Controle negativo. Variável avaliada na 18<sup>a</sup> semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média. \*p<0,05 vs. NR e HR1.



A)



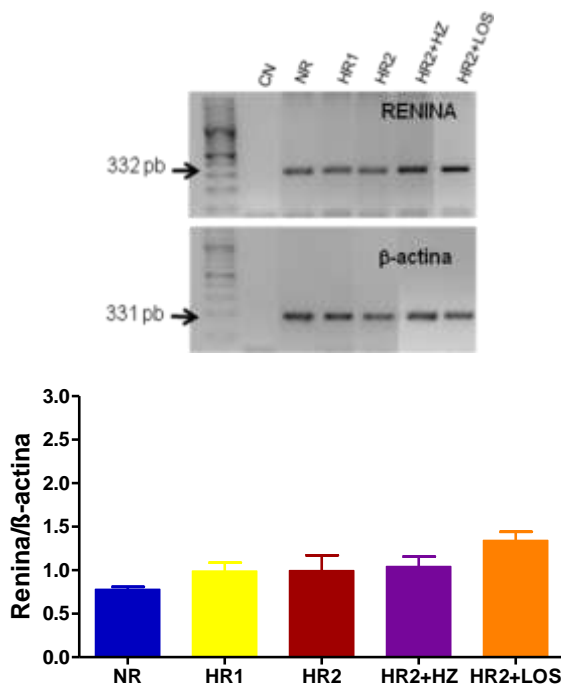
B)



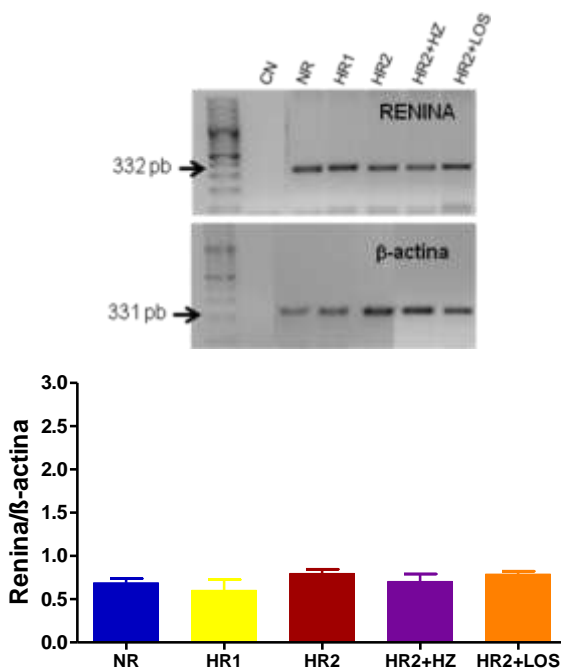
**Figura 21. A)** Expressão gênica (unidade arbitrária - UA) do angiotensinogênio no ventrículo esquerdo e **B)** ventrículo direito de ratos Wistar submetidos à dieta normossódica (NR, n=5-8), hipersódica 1 (HR1, n=5-8), hipersódica 2 (HR2, n=6-8), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=5-8) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=7) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade. CN=Controle negativo. Variável avaliada na 18<sup>a</sup> semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.



A)

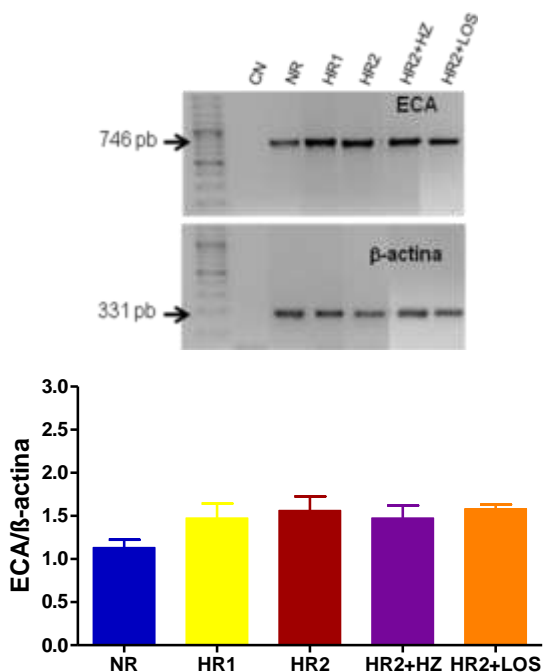


B)

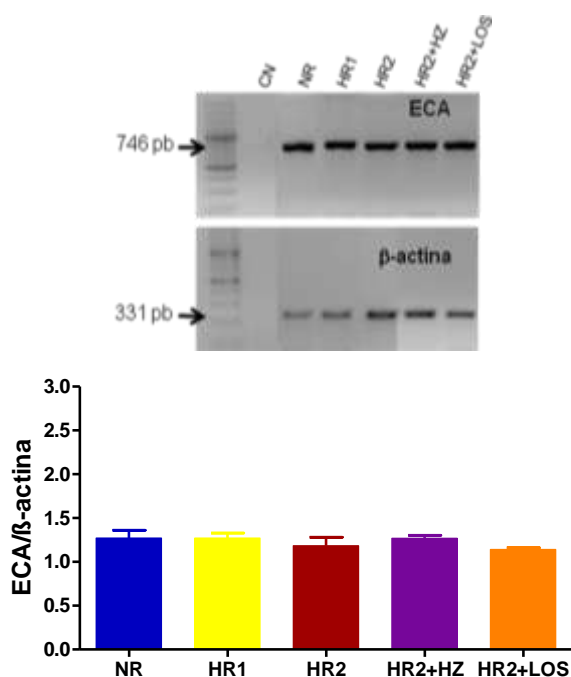


**Figura 22. A)** Expressão gênica (unidade arbitrária - UA) da renina no ventrículo esquerdo e **B)** ventrículo direito de ratos Wistar submetidos à dieta normossódica (NR, n=5-8), hipersódica 1 (HR1, n=6-8), hipersódica 2 (HR2, n=6-8), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=5-8) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=7) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade. CN=Controle negativo. Variável avaliada na 18<sup>a</sup> semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

A)

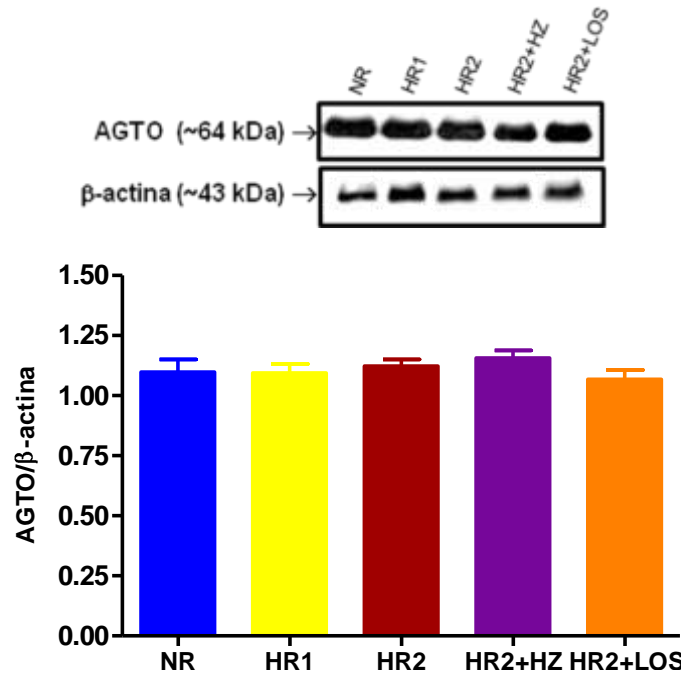


B)

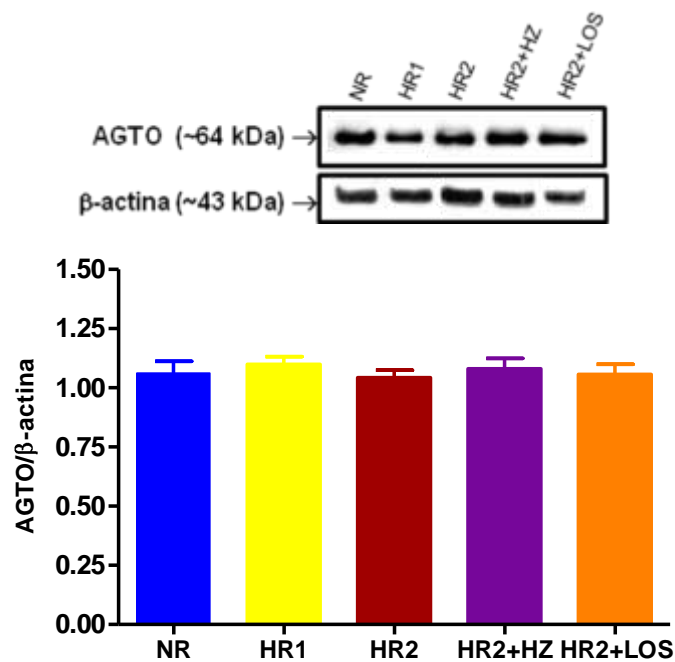


**Figura 23. A)** Expressão gênica (unidade arbitrária - UA) da enzima conversora de angiotensina (ECA) no ventrículo esquerdo e **B)** ventrículo direito de ratos Wistar submetidos à dieta normossódica (NR, n=5-8), hipersódica 1 (HR1, n=6-8), hipersódica 2 (HR2, n=6-8), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=5) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=7) desde o desmame até a 18ª semana de idade. CN=Controle negativo. Variável avaliada na 18ª semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

A)

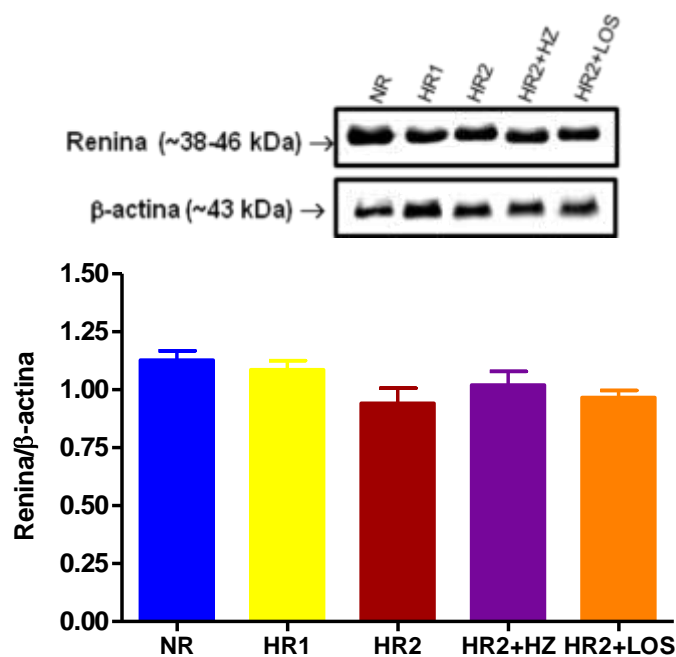


B)

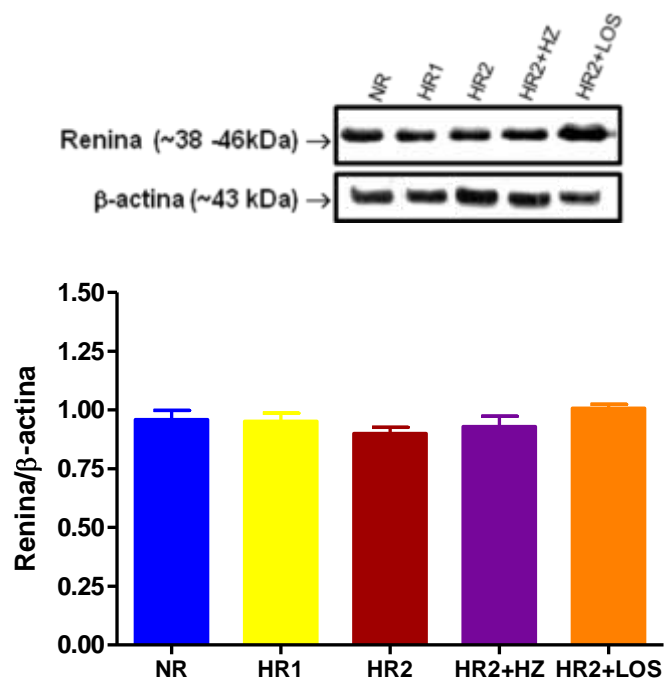


**Figura 24.** A) Expressão protéica (unidade arbitrária - UA) do angiotensinogênio (AGTO) no ventrículo esquerdo e B) ventrículo direito de ratos Wistar submetidos à dieta normossódica (NR, n=6-7), hipersódica 1 (HR1, n=7-8), hipersódica 2 (HR2, n=7-8), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=7-8) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=5-7) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade. Variável avaliada na 18<sup>a</sup> semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

A)

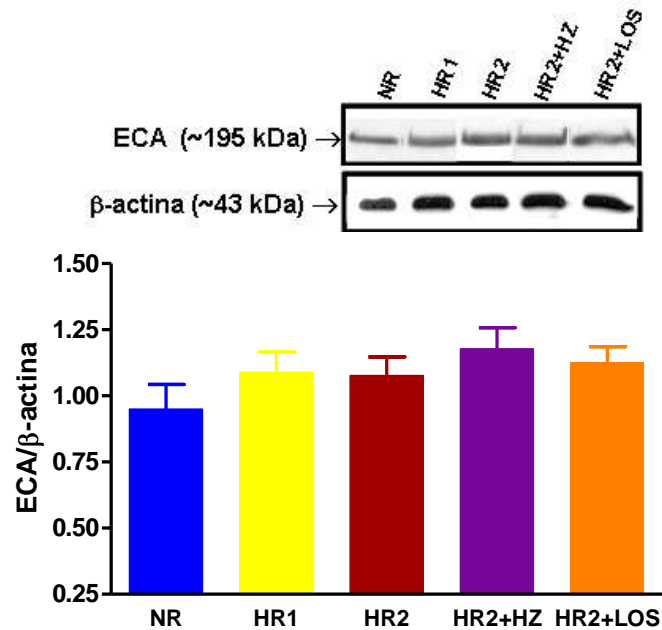


B)

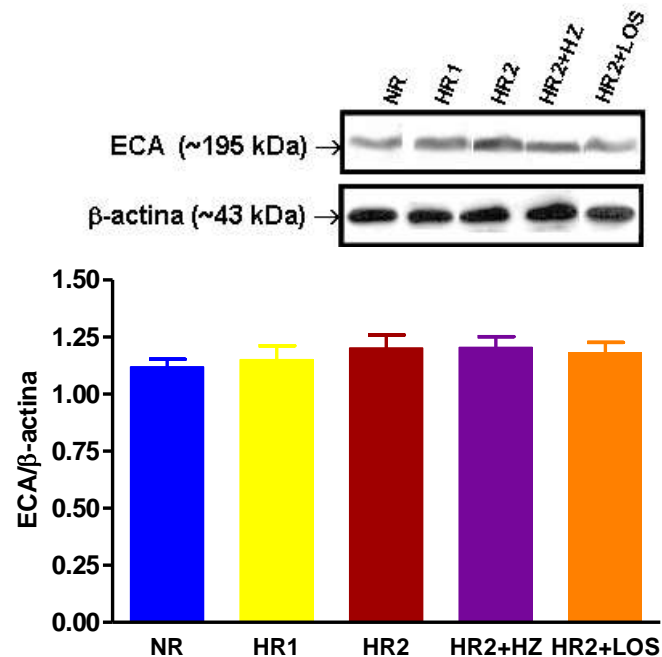


**Figura 25. A)** Expressão protéica (unidade arbitrária - UA) da renina no ventrículo esquerdo e **B)** ventrículo direito de ratos Wistar submetidos à dieta normossódica (NR, n=6-8), hipersódica 1 (HR1, n=6-8), hipersódica 2 (HR2, n=7-8), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=7-8) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=7) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade. Variável avaliada na 18<sup>a</sup> semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

A)

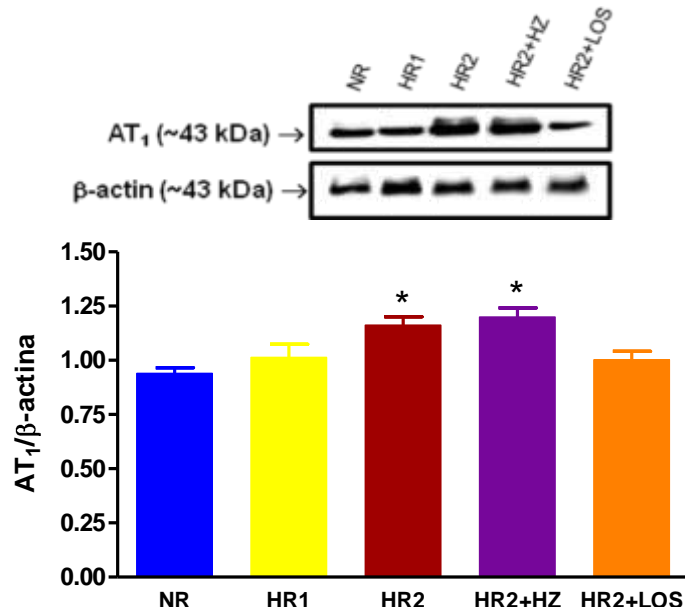


B)

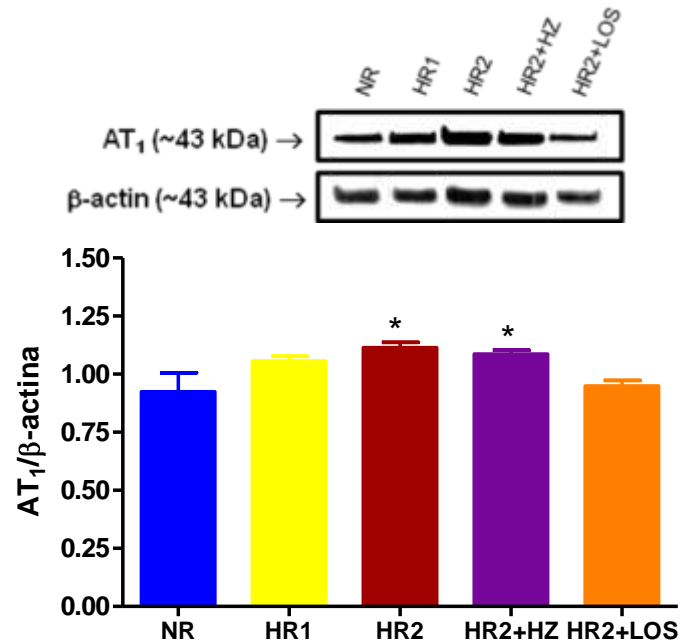


**Figura 26. A)** Expressão protéica (unidade arbitrária - UA) da enzima conversora de angiotensina (ECA) no ventrículo esquerdo e **B)** ventrículo direito de ratos Wistar submetidos à dieta normossódica (NR, n=6-8), hipersódica 1 (HR1, n=6-8), hipersódica 2 (HR2, n=6-8), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=6-8) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=7) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade. Variável avaliada na 18<sup>a</sup> semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

A)

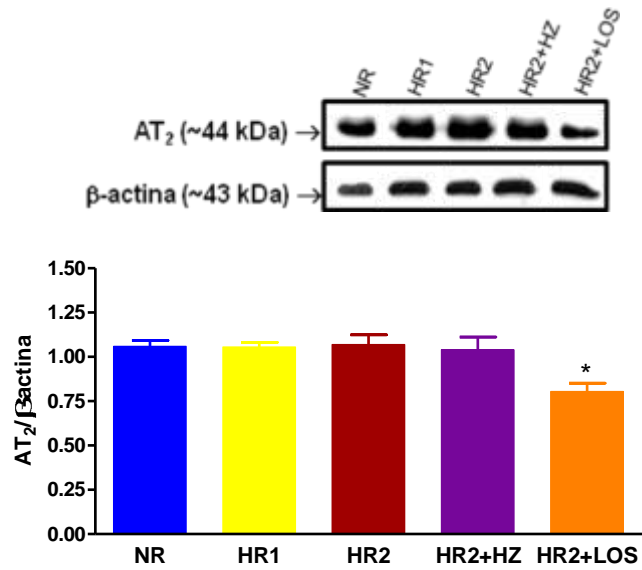


B)

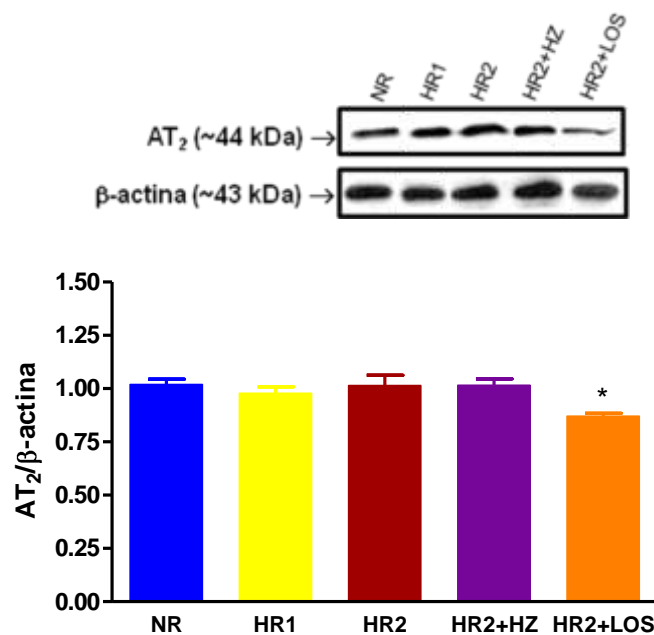


**Figura 27. A)** Expressão protéica (unidade arbitrária - UA) do receptor AT<sub>1</sub> no ventrículo esquerdo e **B)** ventrículo direito de ratos Wistar submetidos à dieta normossódica (NR, n=5-7), hipersódica 1 (HR1, n=6-7), hipersódica 2 (HR2, n=6-8), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=6-8) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=6-7) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade. Variável avaliada na 18<sup>a</sup> semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média. \*p<0,05 vs. NR, HR1 e HR2+LOS.

A)

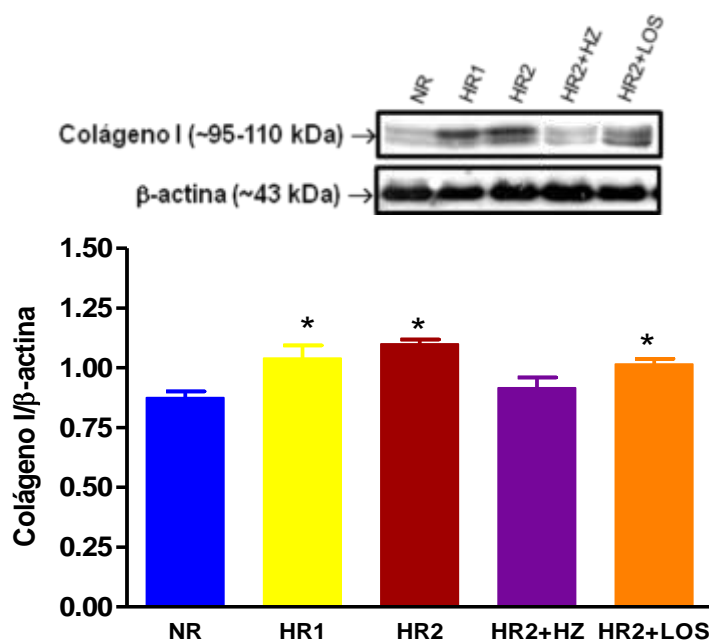


B)

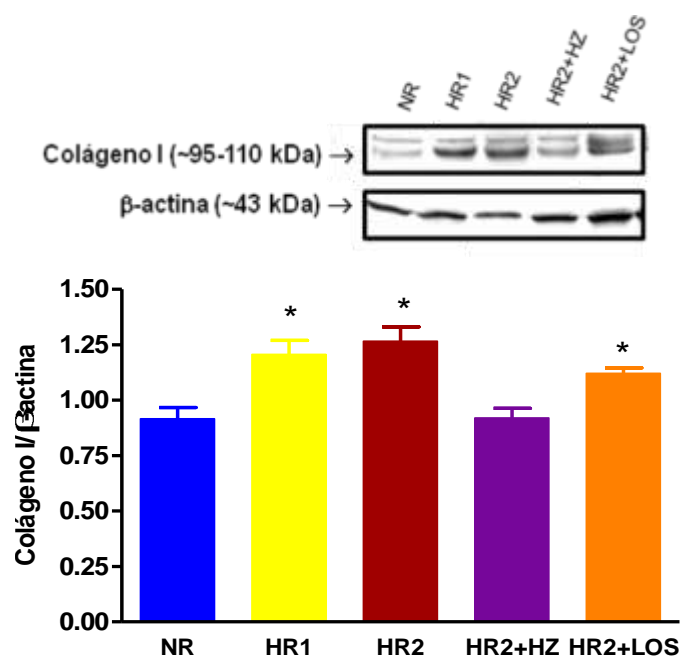


**Figura 28. A)** Expressão protéica (unidade arbitrária - UA) do receptor AT<sub>2</sub> no ventrículo esquerdo e **B)** ventrículo direito de ratos Wistar submetidos à dieta normossódica (NR, n=6-7), hipersódica 1 (HR1, n=5-6), hipersódica 2 (HR2, n=5-8), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=5-8) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=5-7) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade. Variável avaliada na 18<sup>a</sup> semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média. \*p<0,05 vs. NR, HR1, HR2 e HR2+HZ.

A)



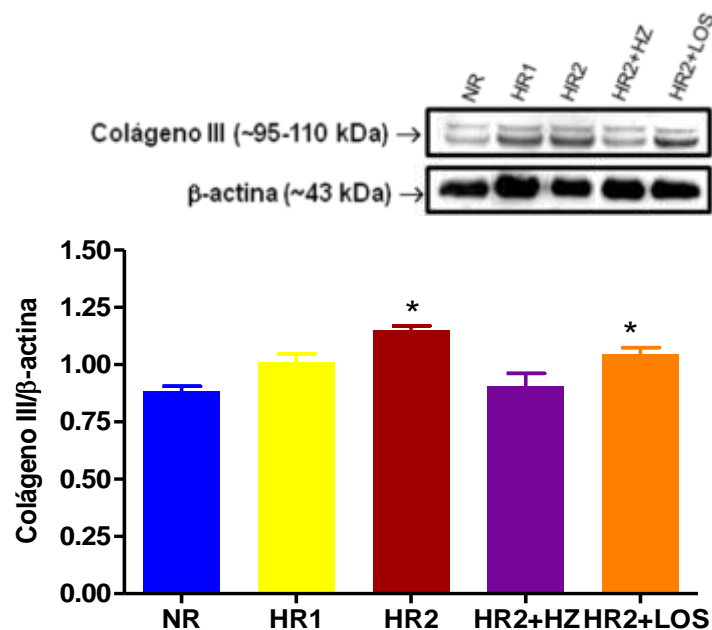
B)



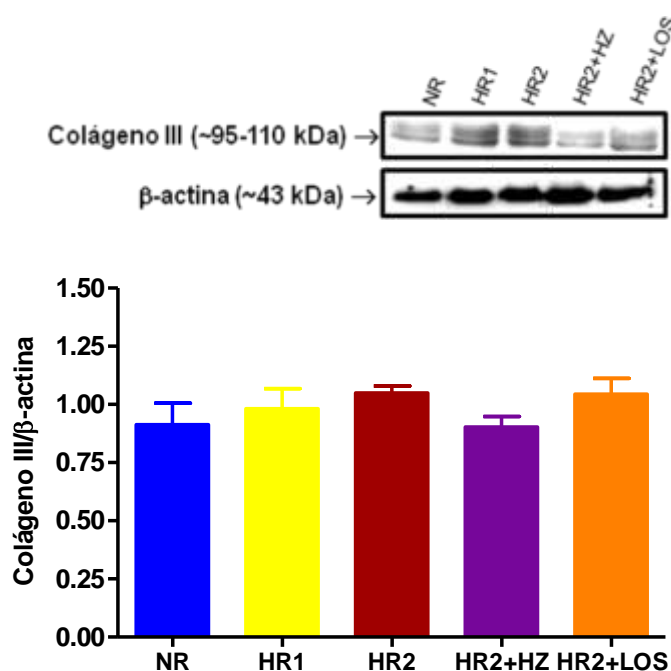
**Figura 29. A)** Expressão protéica (unidade arbitrária - UA) do colágeno I no ventrículo esquerdo e **B)** ventrículo direito de ratos Wistar submetidos à dieta normossódica (NR, n=5-7), hipersódica 1 (HR1, n=5-7), hipersódica 2 (HR2, n=5-7), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=5-7) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=5-7) desde o desmame até a 18ª semana de idade. Variável avaliada na 18ª semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média. \*p<0,05 vs. NR e HR2+HZ.



A)

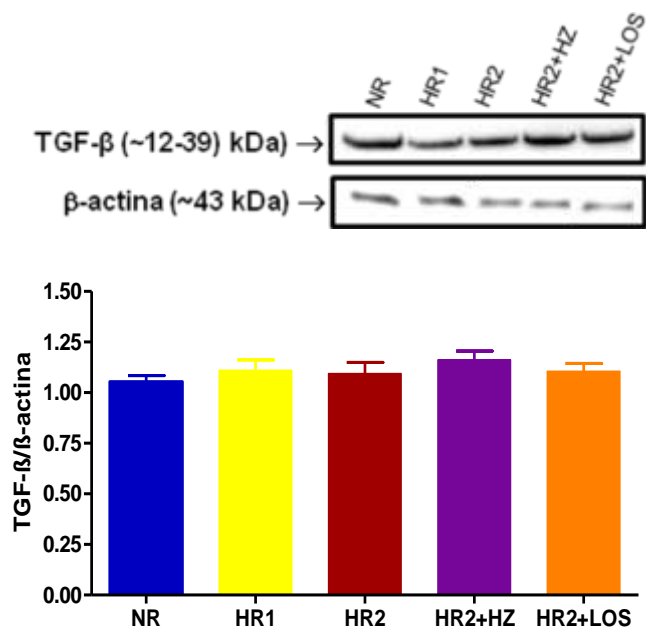
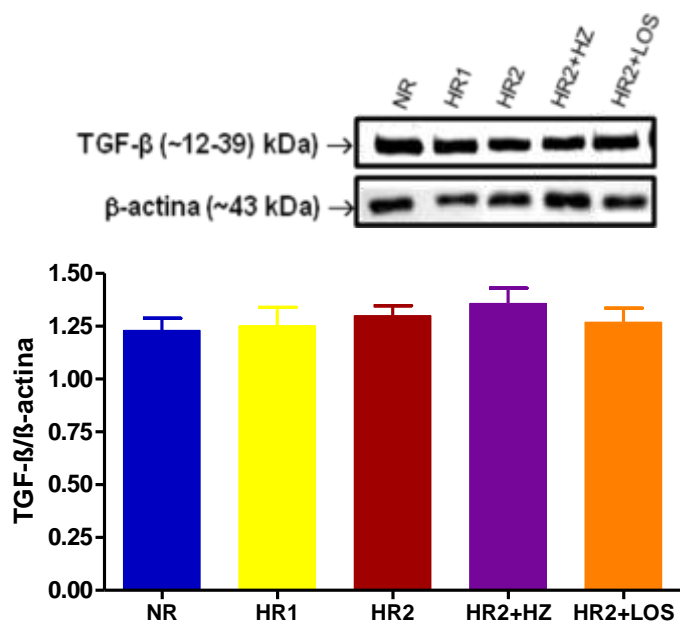


B)



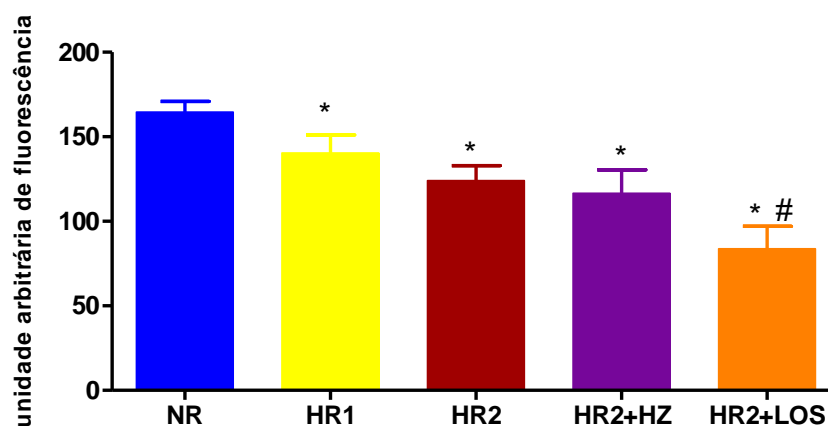
**Figura 30. A)** Expressão protéica (unidade arbitrária - UA) do colágeno III no ventrículo esquerdo e **B)** ventrículo direito de ratos Wistar submetidos à dieta normossódica (NR, n=5-7), hipersódica 1 (HR1, n=5-7), hipersódica 2 (HR2, n=5-7), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=5-7) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=5-7) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade. Variável avaliada na 18<sup>a</sup> semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p$ <0,05 vs. NR e HR2+HZ.

A)

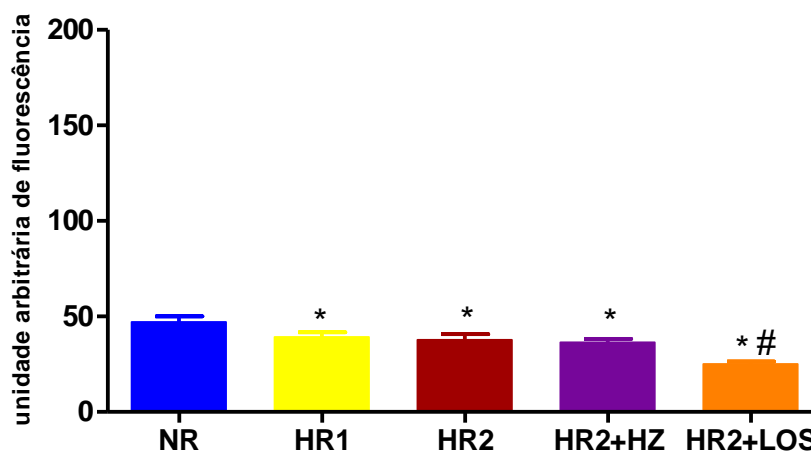


**Figura 31. A)** Expressão protéica (unidade arbitrária - UA) do TGF-β no ventrículo esquerdo e **B)** ventrículo direito de ratos Wistar submetidos à dieta normossódica (NR, n=5-7), hipersódica 1 (HR1, n=5-7), hipersódica 2 (HR2, n=5-7), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=5-7) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=5-7) desde o desmame até a 18ª semana de idade. Variável avaliada na 18ª semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média.

A)

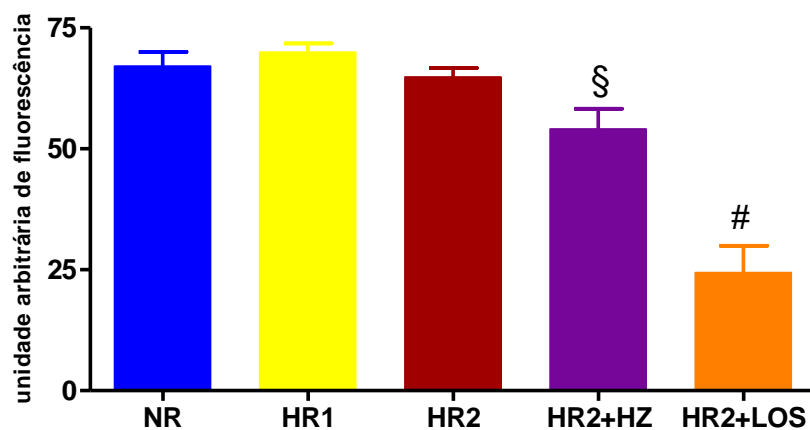


B)

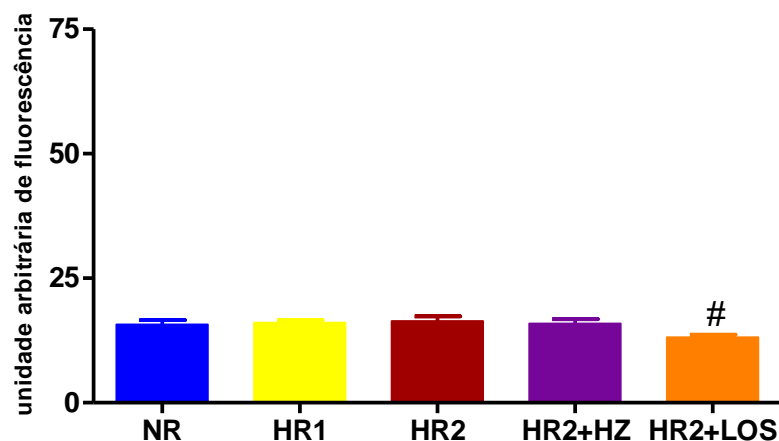


**Figura 32. A)** Avaliação da ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada do receptor  $AT_1$  (unidade arbitrária de fluorescência) no ventrículo esquerdo e **B)** ventrículo direito de ratos Wistar submetidos à dieta normossódica (NR, n=6), hipersódica 1 (HR1, n=7), hipersódica 2 (HR2, n=6), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=6) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=6) desde o desmame até a 18ª semana de idade. Variável avaliada na 18ª semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. \*p<0,05 vs. NR; #p<0,05 vs. NR, HR1, HR2 e HR2+HZ.

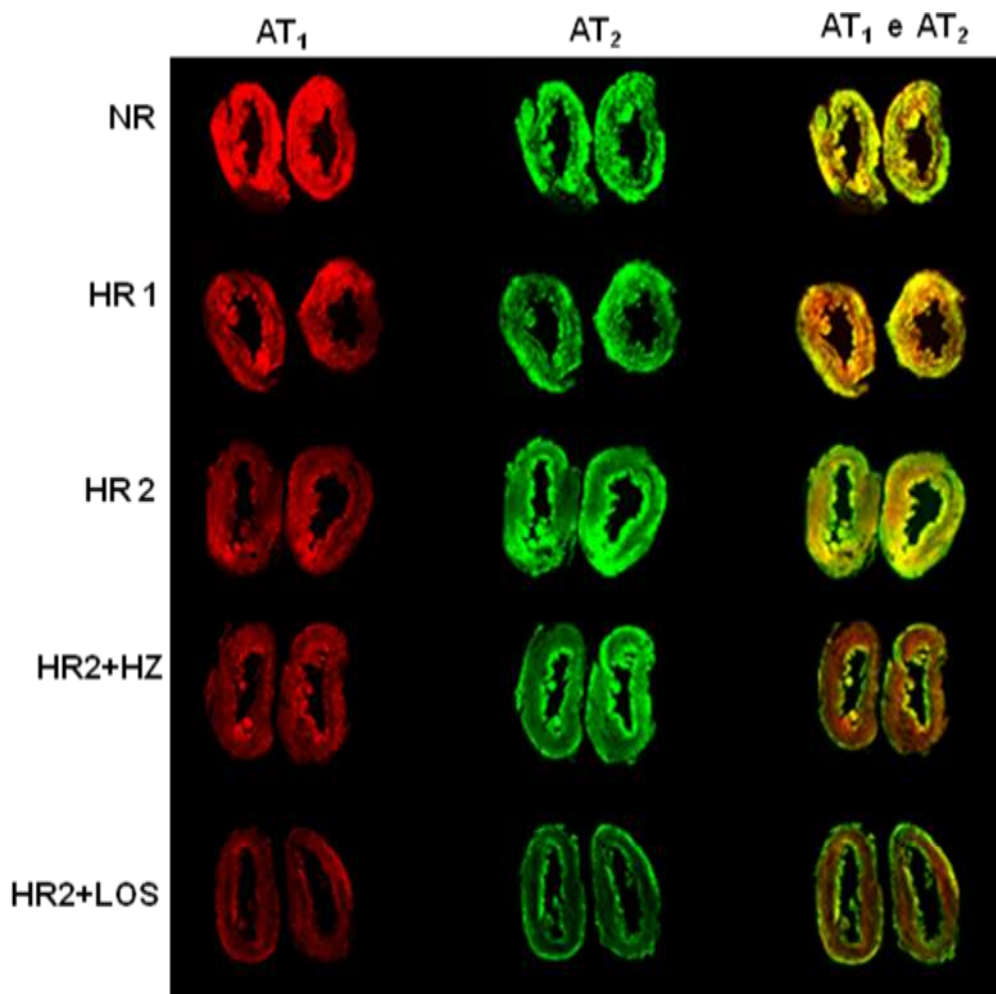
A)



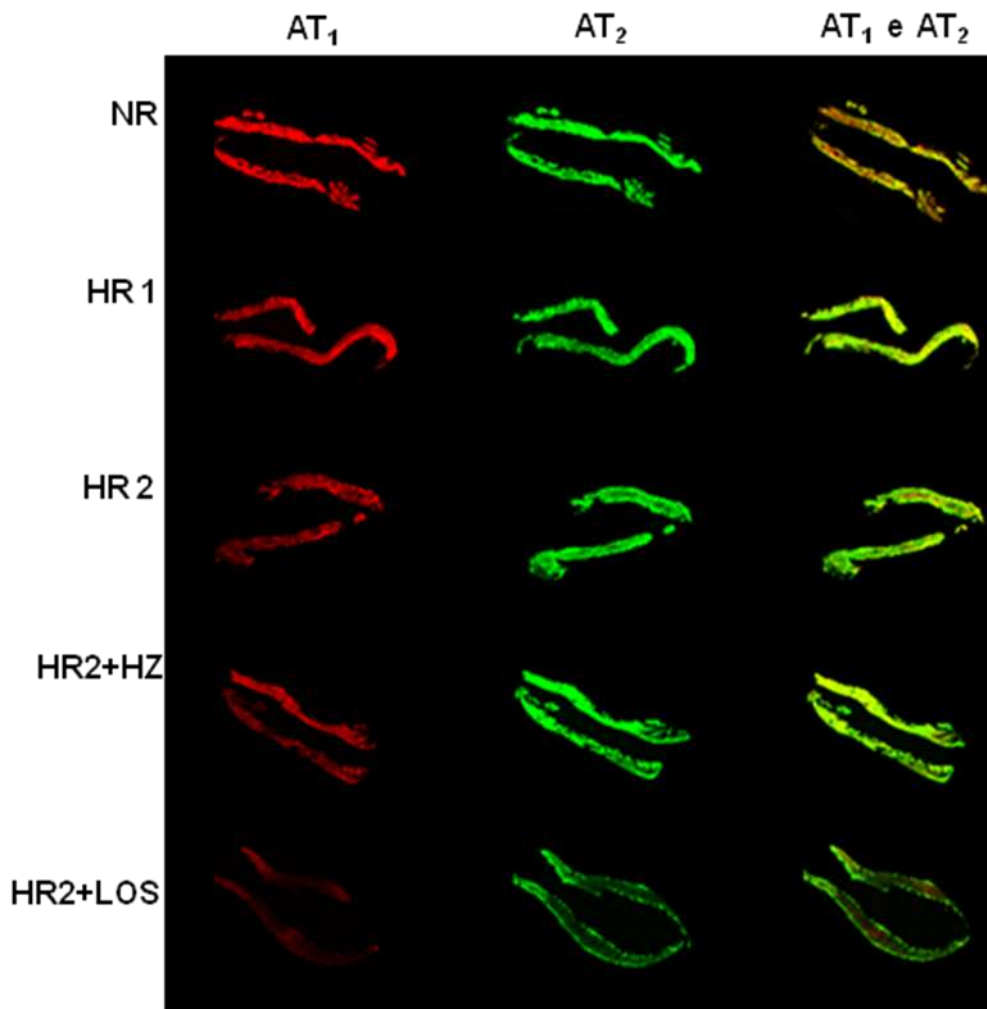
B)



**Figura 33.** A) Avaliação da ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada do receptor  $AT_2$  (unidade arbitrária de fluorescência) no ventrículo esquerdo e B) ventrículo direito de ratos Wistar submetidos à dieta normossódica (NR, n=6), hipersódica 1 (HR1, n=7), hipersódica 2 (HR2, n=6), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=6) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=6) desde o desmame até a 18ª semana de idade. Variável avaliada na 18ª semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. § $p < 0,05$  vs. NR, HR1 e HR2; # $p < 0,05$  vs. NR, HR1, HR2 e HR2+HZ.

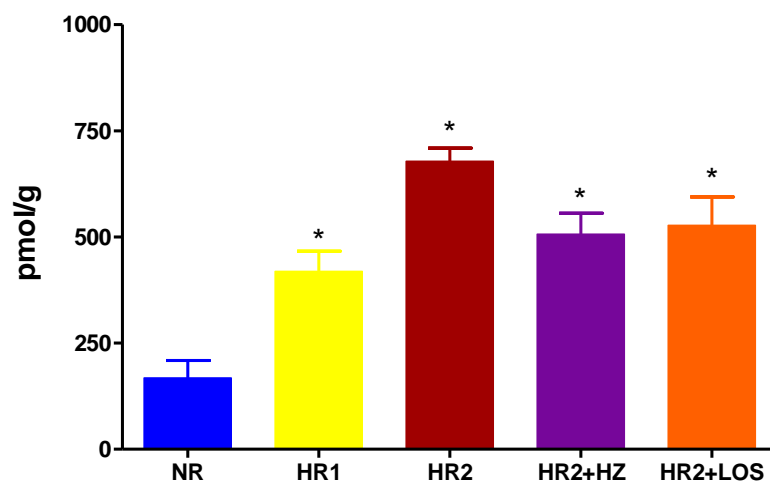


**Figura 34.** Avaliação da ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada do receptor AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> (unidade arbitrária de fluorescência) no ventrículo esquerdo de ratos Wistar submetidos à dieta normossódica (NR, n=6), hipersódica 1 (HR1, n=7), hipersódica 2 (HR2, n=6), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=6) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS=6) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média.

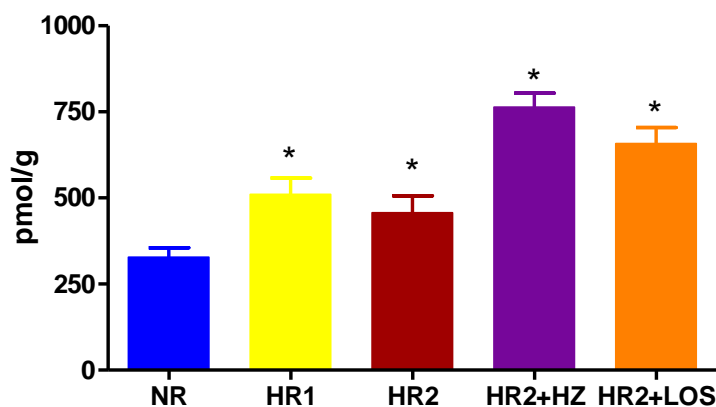


**Figura 35.** Avaliação da ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada do receptor  $AT_1$  e  $AT_2$  (unidade arbitrária de fluorescência) no ventrículo direito de ratos Wistar submetidos à dieta normossódica (NR, n=6), hipersódica 1 (HR1, n=7), hipersódica 2 (HR2, n=6), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=6) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS=6) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

A)



B)



**Figura 36. A)** Angiotensina II (pmol/g) no ventrículo esquerdo e **B)** ventrículo direito de ratos Wistar submetidos à dieta normossódica (NR, n=6), hipersódica 1 (HR1, n=6), hipersódica 2 (HR2, n=5), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ, n=6) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS, n=6) desde o desmame até a 18ª semana de idade. Variável avaliada na 18ª semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  vs. NR.

**Tabela 1.** Peso corpóreo, consumo de ração, ingestão hídrica, volume urinário, pressão arterial caudal (PAC), frequência cardíaca (FC), sódio urinário, sódio plasmático, potássio plasmático e hematócrito dos animais alimentados com dieta normossódica (NR), hipersódica 1 (HR1), hipersódica 2 (HR2), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ) e hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS). Variáveis analisadas na 18<sup>a</sup> semana de idade.

	NR	<i>n</i>	HR1	<i>n</i>	HR2	<i>n</i>	HR2+HZ	<i>n</i>	HR2+LOS	<i>n</i>
Peso corpóreo (g)	539.4±11.3	(14)	527.7±13.8	(16)	478.5±8.1 <sup>a</sup>	(15)	462.5±11.5 <sup>a</sup>	(15)	562.6±12.6	(15)
Consumo de ração (g)	11.2±1.1	(14)	17.9±1.1 <sup>b</sup>	(16)	18.3±1.2 <sup>b,c</sup>	(15)	18.8±1,0 <sup>b,c</sup>	(15)	21.0±0.3 <sup>b,c</sup>	(15)
Ingestão hídrica (mL)	22.3±1.7	(14)	35.0±4.2 <sup>b</sup>	(16)	51.3±9.1 <sup>b,c</sup>	(15)	51.7±9.5 <sup>b,c</sup>	(15)	56.4±4.3 <sup>b,c</sup>	(15)
Volume urinário (mL/24h)	11.1±1.9	(14)	26.6±3.3 <sup>b</sup>	(16)	48.5±3.1 <sup>b,c</sup>	(15)	52.0±1.8 <sup>b,c</sup>	(15)	54.6±2.6 <sup>b,c</sup>	(15)
PAC (mmHg)	121.0±1.7	(14)	146.2±2.6 <sup>d</sup>	(16)	147.0±0.7 <sup>d</sup>	(15)	123.0±1.3	(15)	120,0±1.7	(15)
FC (b.p.m)	415.2±13.2	(14)	385.9±10.6	(16)	402.5±14.0	(15)	400.6±13.2	(15)	401,0±11.1	(15)
Sódio urinário (mEq/24h)	2.5±0.2	(6)	7.4±0.8 <sup>b</sup>	(7)	12.1±0.84 <sup>b,c</sup>	(7)	12.4±0.8 <sup>b,c</sup>	(7)	12.4±1.2 <sup>b,c</sup>	(7)
Sódio plasmático (mEq/L)	140.9±1.3	(6)	139.3±1.2	(7)	142.1±1.0	(7)	142.3±1.7	(7)	139.1±1.8	(7)
Potássio plasmático	5.7±0.3	(5)	5.4±0.2	(5)	5.6±0.2	(5)	5.5±0.2	(5)	5.6±0.1	(5)
Hematócrito (%)	49.7±1.2	(6)	49.6±1.0	(7)	47.5±0.2	(7)	46.6±0.4	(7)	48.4±0.5	(7)

Os resultados obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média.

<sup>a</sup>*p* < 0.05 vs. NR, HR1, and HR2+LOS.

<sup>b</sup>*p* < 0.05 vs. NR.

<sup>c</sup>*p* < 0.05 vs. HR1.

<sup>d</sup>*p* < 0.05 vs. NR, HR2+HZ, and HR2+LOS



**Tabela 2.** Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE), parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole (PPVEDIA) septo interventricular na diástole (SIVDIA), massa cardíaca total (MCT), ventricular esquerda (MVE) e direita (MVD) corrigido pelo peso corpóreo dos animais alimentados com dieta normossódica (NR), hipersódica 1 (HR1), hipersódica 2 (HR2), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ) e hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS) desde o desmame até 18<sup>a</sup> semana de idade.

	NR	<i>n</i>	HR1	<i>n</i>	HR2	<i>n</i>	HR2+HZ	<i>n</i>	HR2+LOS	<i>n</i>
DDVE (cm)	0.801±0.02	(6)	0.772±0.02 <sup>a</sup>	(8)	0.684±0.01 <sup>a,b</sup>	(7)	0.770±0.02 <sup>a</sup>	(7)	0.741±0.03 <sup>a</sup>	(7)
PPVEDIA (mm)	0.144±0.01	(6)	0.166±0.01 <sup>a</sup>	(8)	0.189±0.01 <sup>a,b</sup>	(7)	0.165±0.01 <sup>a</sup>	(7)	0.169±0.01 <sup>a</sup>	(7)
SIVDIA (mm)	0.138±0.01	(6)	0.164±0.01 <sup>a</sup>	(8)	0.193±0.01 <sup>a,b</sup>	(7)	0.164±0.01 <sup>a</sup>	(7)	0.171±0.01 <sup>a</sup>	(7)
MCT (mg/g)	2.826±0.07	(6)	3.032±0.10	(8)	3.324±0.08 <sup>a</sup>	(7)	3.440±0.18 <sup>a</sup>	(7)	3.398±0.10 <sup>a</sup>	(7)
MVE (mg/g)	2.158±0.10	(6)	2.288±0.06	(8)	2.563±0.10 <sup>a</sup>	(7)	2.614±0.06 <sup>a</sup>	(7)	2.542±0.07 <sup>a</sup>	(7)
MVD (mg/g)	0.656±0.03	(6)	0.749±0.03	(8)	0.845±0.05 <sup>a</sup>	(7)	0.878±0.06 <sup>a</sup>	(7)	0.880±0.03 <sup>a</sup>	(7)

Os resultados obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média.

<sup>a</sup>p<0.05 vs. NR.

<sup>b</sup>p<0.05 vs. HR1, HR2+HZ, and HR2+LOS.

**Tabela 3.** Atividade de renina plasmática (ARP), aldosterona sérica, angiotensina II no ventrículo esquerdo (All-VE) e direito (All-VD) dos animais alimentados com dieta normossódica (NR), hipersódica 1 (HR1), hipersódica 2 (HR2), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ) e hipersódica 2+ losartan (HR2+LOS). Variáveis analisadas na 18<sup>a</sup> semana de idade.

	NR	<i>n</i>	HR1	<i>n</i>	HR2	<i>n</i>	HR2+HZ	<i>n</i>	HR2+LOS	<i>n</i>
ARP (ng/mL/h)	4.6±0.7	(8)	1.5±0.5 <sup>a</sup>	(8)	0.2±0.08 <sup>a</sup>	(8)	0.4±0.1 <sup>a</sup>	(8)	0.4±0.4 <sup>a</sup>	(7)
Aldosterona sérica (pg/mL)	578.6±59.4	(7)	342.7±59.6 <sup>a</sup>	(7)	282.1±37.8 <sup>a</sup>	(7)	325.0±13.4 <sup>a</sup>	(7)	319.7±31.8 <sup>a</sup>	(7)
All –VE (pmol/g)	167.7±41.4	(6)	419.0±47.3 <sup>a</sup>	(6)	678.1±31.2 <sup>a</sup>	(5)	506.5±49.6 <sup>a</sup>	(6)	527.4±66.8 <sup>a</sup>	(6)
All-VD (pmol/g)	327.6±28.0	(6)	510.4±47.2 <sup>a</sup>	(6)	457.5±48.9 <sup>a</sup>	(5)	764.0±40.7 <sup>a</sup>	(6)	658.2±46.1 <sup>a</sup>	(6)

Os resultados obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média.

<sup>a</sup>*p*<0.05 vs. NR.

**Tabela 4.** Diâmetro transverso do miócito do ventrículo esquerdo (DTMVE) e direito (DTMVD), fibrose intersticial do ventrículo esquerdo (FIVE) e direito (FIVD) dos animais alimentados com dieta normossódica (NR), hipersódica 1 (HR1), hipersódica 2 (HR2), hipersódica 2 + hidralazina (HR2+HZ) e hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS) desde o desmame até 18ª semana de idade.

	NR	<i>n</i>	HR1	<i>n</i>	HR2	<i>n</i>	HR2+HZ	<i>n</i>	HR2+LOS	<i>n</i>
DTMVE (µm)	12,80±0,56	(6)	14,60±0,26 <sup>a</sup>	(8)	16,21±0,71 <sup>a</sup>	(7)	14,92±0,25 <sup>a</sup>	(7)	11,75±0,11	(7)
DTMVD (µm)	11,89±0,30	(6)	12,89±0,46	(8)	15,17±0,48 <sup>a,b</sup>	(7)	15,60±0,48 <sup>a,b</sup>	(7)	11,48±0,10	(7)
FIVE (%)	0,38±0,10	(6)	0,97±0,14 <sup>c</sup>	(8)	1,07±0,17 <sup>c</sup>	(7)	0,45±0,16	(7)	0,90±0,04 <sup>c</sup>	(7)
FIVD (%)	0,10±0,05	(6)	1,02±0,11 <sup>c</sup>	(8)	1,50±0,32 <sup>c</sup>	(7)	0,15±0,04	(7)	0,95±0,06 <sup>c</sup>	(7)

Os valores obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média.

<sup>a</sup>p<0,05 vs. NR e HR2+LOS

<sup>b</sup>p<0,05 vs. HR1.

<sup>c</sup>p<0,05 vs. NR e HR2+HZ

**Tabela 5.** Expressão gênica (unidade arbitrária - UA) do angiotensinogênio, renina, enzima conversora de angiotensina (ECA), receptor AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> no ventrículo esquerdo dos animais alimentados com dieta normossódica (NR), hipersódica 1 (HR1), hipersódica 2 (HR2), hipersódica 2 + hidralizina (HR2+HZ) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS). Variáveis analisadas na 18<sup>a</sup> semana de idade.

	NR	<i>n</i>	HR1	<i>n</i>	HR2	<i>n</i>	HR2+HZ	<i>n</i>	HR2+LOS	<i>n</i>
AGTO (UA)	0,923±0,04	(8)	1,219±0,13	(8)	1,184±0,04	(8)	1,116±0,06	(8)	1,388±0,11	(7)
Renina (UA)	0,781±0,02	(8)	0,990±0,09	(8)	0,997±0,17	(8)	1,044±0,11	(8)	1,344±0,09	(7)
ECA (UA)	1,135±0,08	(8)	1,476±0,16	(8)	1,564±0,16	(7)	1,476±0,14	(8)	1,585±0,04	(7)
AT <sub>1</sub> (UA)	1,910±0,06	(8)	2,446±0,17 <sup>a</sup>	(8)	2,547±0,12 <sup>a</sup>	(8)	2,462±0,15 <sup>a</sup>	(8)	2,445±0,10 <sup>a</sup>	(7)
AT <sub>2</sub> (UA)	1,159±0,06	(6)	1,430±0,13	(8)	1,945±0,14 <sup>a,b</sup>	(6)	1,855±0,17 <sup>a,b</sup>	(7)	1,881±0,16 <sup>a,b</sup>	(7)

Os valores obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média.

<sup>a</sup>p<0,05 vs. NR.

<sup>b</sup>p<0,05 vs. HR1.

**Tabela 6.** Expressão gênica (unidade arbitrária - UA) do angiotensinogênio, renina, enzima conversora de angiotensina (ECA), receptor AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> no ventrículo direito dos animais alimentados com dieta normossódica (NR), hipersódica 1 (HR1), hipersódica 2 (HR2), hipersódica 2 + hidralizina (HR2+HZ) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS). Variáveis analisadas na 18<sup>a</sup> semana de idade.

	NR	<i>n</i>	HR1	<i>n</i>	HR2	<i>n</i>	HR2+HZ	<i>n</i>	HR2+LOS	<i>n</i>
AGTO (UA)	1,148±0,04	(5)	1,348±0,10	(5)	1,251±0,09	(6)	1,236±0,04	(5)	1,325±0,06	(7)
Renina (UA)	0,689±0,04	(5)	0,602±0,12	(6)	0,797±0,04	(6)	0,704±0,08	(5)	0,789±0,03	(7)
ECA (UA)	1,271±0,08	(5)	1,272±0,05	(6)	1,183±0,09	(6)	1,270±0,03	(5)	1,141±0,01	(7)
AT <sub>1</sub> (UA)	1,439±0,12	(5)	1,510±0,07	(6)	1,453±0,04	(6)	1,370±0,04	(5)	1,299±0,04	(7)
AT <sub>2</sub> (UA)	0,803±0,06	(5)	1,075±0,17	(4)	1,183±0,07	(6)	1,105±0,06	(6)	1,083±0,11	(7)

Os valores obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média.

**Tabela 7.** Expressão protéica (unidade arbitrária - UA) do angiotensinogênio, renina, enzima conversora de angiotensina (ECA), receptor AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> no ventrículo esquerdo dos animais alimentados com dieta normossódica (NR), hipersódica 1 (HR1), hipersódica 2 (HR2), hipersódica 2 + hidralizina (HR2+HZ) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS). Variáveis analisadas na 18<sup>a</sup> semana de idade.

	NR	<i>n</i>	HR1	<i>n</i>	HR2	<i>n</i>	HR2+HZ	<i>n</i>	HR2+LOS	<i>n</i>
AGTO (UA)	1,098±0,05	(7)	1,094±0,03	(8)	1,123±0,02	(8)	1,157±0,03	(8)	1,069±0,03	(7)
Renina (UA)	1,128±0,04	(8)	1,087±0,03	(8)	0,941±0,06	(8)	1,021±0,059	(8)	0,967±0,02	(7)
ECA (UA)	0,949±0,09	(8)	1,089±0,07	(8)	1,077±0,07	(8)	1,178±0,08	(8)	1,128±0,05	(7)
AT <sub>1</sub> (UA)	1,059±0,03	(7)	1,056±0,02	(7)	1,069±0,05 <sup>a</sup>	(8)	1,040±0,07 <sup>a</sup>	(8)	0,804±0,04	(7)
AT <sub>2</sub> (UA)	0,875±0,02	(7)	1,041±0,05	(6)	1,100±0,01	(8)	0,916±0,04	(8)	1,016±0,02 <sup>b</sup>	(7)

Os valores obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média.

<sup>a</sup>p<0,05 vs. NR, HR1 e HR2+LOS.

<sup>b</sup>p<0,05 vs. NR, HR1, HR2 e HR2+HZ.

**Tabela 8.** Expressão protéica (unidade arbitrária - UA) do angiotensinogênio, renina, enzima conversora de angiotensina (ECA), receptor AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> no ventrículo direito dos animais alimentados com dieta normossódica (NR), hipersódica 1 (HR1), hipersódica 2 (HR2), hipersódica 2 + hidralizina (HR2+HZ) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS). Variáveis analisadas na 18<sup>a</sup> semana de idade.

	NR	<i>n</i>	HR1	<i>n</i>	HR2	<i>n</i>	HR2+HZ	<i>n</i>	HR2+LOS	<i>n</i>
AGTO (UA)	1,062±0,04	(6)	1,099±0,03	(7)	1,043±0,03	(7)	1,081±0,04	(7)	1,057±0,04	(7)
Renina (UA)	0,959±0,03	(6)	0,952±0,03	(6)	0,900±0,02	(7)	0,929±0,04	(7)	1,007±0,01	(7)
ECA (UA)	1,120±0,03	(6)	1,151±0,06	(6)	1,202±0,05	(6)	1,204±0,04	(6)	1,183±0,04	(7)
AT <sub>1</sub> (UA)	0,924±0,08	(5)	1,056±0,01	(6)	1,115±0,02 <sup>a</sup>	(6)	1,087±0,01 <sup>a</sup>	(6)	0,949±0,02	(6)
AT <sub>2</sub> (UA)	1,019±0,02	(6)	0,995±0,03	(5)	1,014±0,04	(5)	1,016±0,02	(5)	0,871±0,013 <sup>b</sup>	(5)

Os valores obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média.

<sup>a</sup>p<0,05 vs. NR, HR1 e HR2+LOS.

<sup>b</sup>p<0,05 vs. NR, HR1, HR2 e HR2+HZ.

**Tabela 9.** Avaliação da ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada do receptor AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> (unidade arbitrária de fluorescência) no ventrículo esquerdo e direito dos animais alimentados com dieta normossódica, hipersódica 1, hipersódica 2, hipersódica 2 + hidralizina (HR2+HZ) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS). Variáveis analisadas na 18<sup>a</sup> semana de idade.

	<b>NR</b>	<b>n</b>	<b>HR1</b>	<b>n</b>	<b>HR2</b>	<b>n</b>	<b>HR2+HZ</b>	<b>n</b>	<b>HR2+LOS</b>	<b>n</b>
<b>AT<sub>1</sub> VE</b>	164,6±6,38	(6)	140,5±10,65 <sup>a</sup>	(7)	124,0±8,84 <sup>a</sup>	(6)	116,6±13,85 <sup>a</sup>	(6)	83,70±13,34 <sup>a,b</sup>	(6)
<b>AT<sub>2</sub> VE</b>	67,08±2,92	(6)	69,94±1,84	(7)	64,87±1,83	(6)	54,09±4,17 <sup>c</sup>	(6)	24,38±5,59 <sup>a,b</sup>	(6)
<b>AT<sub>1</sub> VD</b>	47,13±2,87	(6)	39,24±2,49 <sup>a</sup>	(7)	37,67±3,15 <sup>a</sup>	(6)	36,36±1,86 <sup>a</sup>	(6)	25,10±1,38 <sup>a,b</sup>	(6)
<b>AT<sub>2</sub> VD</b>	15,69±0,92	(6)	16,12±0,44	(7)	16,43±0,90	(6)	15,93±0,87	(6)	13,13±0,52 <sup>a,b</sup>	(6)

Os valores obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média.

<sup>a</sup>p<0,05 vs. NR.

<sup>b</sup>p<0,05 vs. HR1, HR2 e HR2+HZ.

<sup>c</sup>p<0,05 vs. NR, HR1 e HR2.



**Tabela 10.** Expressão gênica (unidade arbitrária - UA) do colágeno III e TGF- $\beta$  no ventrículo esquerdo e direito dos animais alimentados com dieta normossódica (NR), hipersódica 1 (HR1), hipersódica 2 (HR2), hipersódica 2 + hidralizina (HR2+HZ) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS). Variáveis analisadas na 18<sup>a</sup> semana de idade.

	NR	<i>n</i>	HR1	<i>n</i>	HR2	<i>n</i>	HR2+HZ	<i>n</i>	HR2+LOS	<i>n</i>
Colágeno III –VE (UA)	1,121±0,04	(8)	1,319±0,05 <sup>a</sup>	(8)	1,384±0,04 <sup>a</sup>	(7)	1,244±0,05	(8)	1,354±0,05 <sup>a</sup>	(7)
TGF- $\beta$ -VE (UA)	1,455±0,06	(8)	1,381±0,15	(8)	1,511±0,10	(7)	1,533±0,06	(8)	1,644±0,05	(7)
Colágeno III –VD (UA)	1,169±0,07	(6)	1,127±0,09	(6)	1,116±0,08	(6)	1,094±0,07	(6)	1,135±0,03	(7)
TGF- $\beta$ -VD-VD (UA)	1,116±0,06	(6)	1,014±0,09	(6)	1,037±0,03	(5)	0,964±0,03	(6)	1,103±0,02	(7)

Os valores obtidos estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

<sup>a</sup> $p < 0,05$  vs. NR e HR2+HZ.

**Tabela 11.** Expressão protéica (unidade arbitrária - UA) colágeno I, III e TGF- $\beta$  no ventrículo esquerdo e direito dos animais alimentados com dieta normossódica (NR), hipersódica 1 (HR1), hipersódica 2 (HR2), hipersódica 2 + hidralizina (HR2+HZ) ou hipersódica 2 + losartan (HR2+LOS). Variáveis analisadas na 18<sup>a</sup> semana de idade.

	NR	<i>n</i>	HR1	<i>n</i>	HR2	<i>n</i>	HR2+HZ	<i>n</i>	HR2+LOS	<i>n</i>
Colágeno I –VE (UA)	0,876±0,05	(7)	1,041±0,05 <sup>a</sup>	(7)	1,100±0,02 <sup>a</sup>	(7)	0,916±0,04	(6)	1,016±0,02 <sup>a</sup>	(7)
Colágeno III –VE (UA)	0,915±0,05	(6)	1,207±0,06 <sup>a</sup>	(7)	1,266±0,06 <sup>a</sup>	(7)	0,920±0,04	(7)	1,122±0,02 <sup>a</sup>	(7)
TGF- $\beta$ -VE (UA)	1,214±0,06	(6)	1,252±0,08	(6)	1,299±0,047	(5)	1,357±0,07	(5)	1,268±0,06	(5)
Colágeno I-VD (UA)	0,915±0,05	(5)	1,207±0,06 <sup>a</sup>	(7)	1,266±0,06 <sup>a</sup>	(6)	0,920±1,12	(6)	1,122±0,02 <sup>a</sup>	(7)
Colágeno III –VD (UA)	0,913±0,09	(5)	0,981±0,08	(5)	1,049±0,03	(5)	0,902±0,04	(5)	1,045±0,06	(5)
TGF- $\beta$ -VD-VD (UA)	1,054±0,03	(5)	1,110±0,05	(5)	1,095±0,05	(5)	1,162±0,04	(5)	1,105±0,03	(5)

Os valores obtidos estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média.

<sup>a</sup>p<0,05 vs. NR e HR2+HZ.

## 5. DISCUSSÃO

Numerosos estudos têm enfatizado a propriedade do sal em elevar a pressão arterial (PA) (Beauchamp e Engelman, 1991; He e Whelton, 2002). Este aumento da PA, decorrente do consumo elevado de sal na dieta, é um fator importante no desenvolvimento da HC e está associado a maior morbimortalidade cardiovascular (Schmieder e Langenfeld, 1995; Du Cailar et al., 1992). A hipótese de que o efeito da sobrecarga de sal na dieta poderia levar ao desenvolvimento da HC independente do aumento da PA, foi o objeto de avaliação deste estudo.

No presente estudo, o aumento da pressão arterial e da massa ventricular esquerda e direita foi observado em ratos Wistar alimentados com dieta hipersódica desde o desmame. Os animais alimentados com dieta HR2, desde o desmame e que receberam hidralazina ou losartam a partir da 7ª semana de idade, apresentaram maior massa ventricular esquerda e direita na vigência de pressão arterial normal, sugerindo que o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca ocorre de forma independente do aumento da pressão arterial. Além disso, o aumento da massa ventricular direita induzido pela dieta hipersódica é também um indicativo que esta alteração é independente do aumento da pressão arterial, já que o ventrículo direito não é submetido à sobrecarga de pressão. Os resultados de espessura do septo interventricular e da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole avaliados pelo ecocardiograma estão de acordo com a maior massa cardíaca observada em ratos alimentados com dieta

hipersódica. Em concordância com os achados do presente trabalho, Yuan e Leenen (1991) demonstraram um aumento da massa ventricular esquerda em ratos Wistar submetidos à dieta HR2 da quarta a oitava semana sem elevação da pressão arterial.

Em estudo anterior deste Laboratório (da Costa Lima et al., 1995), no mesmo modelo experimental, a massa ventricular esquerda foi maior nos animais submetidos à dieta HR2 (8% de NaCl) somente com 48 e 72, mas não com 12 semanas de idade, comparada com o grupo alimentado com dieta hipossódica. Há que se ressaltar que estes autores não avaliaram grupos de animais alimentados com dieta NR e HR1. No presente trabalho as alterações estruturais do ventrículo esquerdo em resposta a modificações no consumo de sal foram avaliadas nos animais com 16 a 18 semanas de idade através da medida de massa, do ecocardiograma e da análise histológica.

No presente estudo, a maior massa ventricular, induzida pelo consumo elevado de sal na dieta, foi acompanhada pela hipertrofia do cardiomiócito e fibrose intersticial nos animais do grupo HR2. Surpreendentemente, o tratamento com losartan preveniu a hipertrofia do cardiomiócito, mas não a fibrose intersticial do ventrículo esquerdo e direito dos animais alimentados com dieta hipersódica. Este resultado sugere que o receptor  $AT_1$  pode não ser um pré-requisito para a formação de fibrose cardíaca induzida pelo sal. Além disso, a elevação da pressão arterial também pode não ser necessária para a formação de fibrose, já que os animais deste grupo tiveram pressão arterial semelhante àqueles do grupo

NR. Em concordância com estes resultados, um estudo realizado por Maitland et al. observou que o bloqueador do receptor AT<sub>1</sub> foi eficaz em diminuir a pressão arterial e a fibrose intersticial em um modelo de inibição do óxido nítrico sintase. No entanto, em ratos Dahl sensíveis ao sal alimentados com dieta hipersódica 8%, o bloqueador do receptor AT<sub>1</sub> apesar de diminuir a pressão arterial, não preveniu a fibrose intersticial.

Uma hipótese para explicar a fibrose intersticial observada no ventrículo esquerdo e direito dos animais alimentados com dieta HR2 e tratados com losartam seria o efeito pró-fibrótico da aldosterona. Muitos estudos têm verificado uma associação entre fibrose cardíaca com aldosterona (Sun et al., 2002; Yoshida et al., 2005). O mecanismo pelo qual a aldosterona induz a fibrose intersticial não está totalmente esclarecido. Muitos estudos indicam que a inflamação e a geração de radicais livres pode ser um importante precursor para a formação de fibrose intersticial no miocárdio induzido pela aldosterona. Em um estudo realizado por Sun et al. (2002) mostrou que a infusão de aldosterona leva ao stress oxidativo e inflamação no miocárdio de ratos. Posteriormente estes autores verificaram que a inibição da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) preveniu a inflamação e o remodelamento cardíaco. Em outro estudo realizado por Yoshida et al. (2005) mostrou que a aldosterona induziu a inflamação cardíaca cujo foi prevenido pela N-acetilcisteína. Isto sugere que o stress oxidativo e a inflamação podem mediar os efeitos adversos da aldosterona no miocárdio.

O oposto foi observado nos animais alimentados com dieta hipersódica e tratados com hidralazina. No presente trabalho, a hidralazina preveniu a fibrose induzida pelo sal, mas não a hipertrofia do cardiomiócito. Uma possível explicação é que além da propriedade vasodilatadora, a hidralazina possui algumas propriedades antiinflamatórias. Em um trabalho realizado por Rodrigues et al. foi observado que ratos SHR e Wistar, que receberam hidralazina por 15 dias na dose de 14 mg/kg/dia, apresentaram uma redução na migração de leucócitos em células endoteliais venosas. Esta redução na migração de leucócitos foi acompanhada por uma redução na expressão de ICAM-1 em ratos SHR e de P-selectina em ratos Wistar. Estes resultados sugerem que a hidralazina reduz a migração de leucócitos por mecanismos diferentes entre as duas espécies de ratos. Além disso, este estudo sugere que o efeito anti-migratório da hidralazina ocorre independente da sua habilidade em reduzir a pressão arterial, já que estes autores observaram que uma baixa dose de hidralazina (3.5 mg/kg/dia) foi eficaz em reduzir a migração de leucócitos mesmo sem diminuir a pressão arterial em ratos SHR. Portanto, a hidralazina parece reduzir a pressão arterial e a migração de leucócitos por diferentes mecanismos.

Com o intuito de tentar elucidar os possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento de hipertrofia do cardiomiócito e fibrose intersticial causada pelo sal, o presente estudo avaliou o efeito crônico desta dieta sobre o SRA circulante e tecidual. Neste estudo, a sobrecarga de sal na dieta causou uma diminuição da atividade de renina plasmática e da aldosterona sérica nos animais dos grupos HR1, HR2, HR2+HZ e HR2+LOS

comparado com os animais do grupo NR. Estes resultados sugerem que o SRA circulante pode não estar envolvido no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. Várias evidências sugerem que uma regulação SRA tecidual pode ocorrer independente do SRA circulante (Baker et al., 1992; De Mello et al., 2000) No presente trabalho, os animais do grupo HR2 e HR2+HZ apresentaram maior conteúdo de angiotensina II, expressão gênica e protéica do receptor AT<sub>1</sub>, enquanto que, os animais do grupo HR2+LOS apresentaram maior conteúdo de angiotensina II e expressssão gênica, mas não expressão protéica do receptor AT<sub>1</sub>. Estes resultados permitem especular que a ação da angiotensina II, via receptor AT<sub>1</sub>, seja a principal responsável pelo desenvolvimento da hipertrofia do cardiomiócito observado neste modelo de sobrecarga de sal na dieta. No entanto, é importante ressaltar que a presença tecidual de outros fatores, como a aldosterona, também podem contribuir para o desenvolvimento da hipertrofia do cardiomiócito, como observado em um estudo anterior, *in vitro*, em que a aldosterona induziu a hipertrofia do cardiomiócito associado ao aumento do Na<sup>+</sup> intracelular e expressão protéica do trocador Na<sup>+</sup>- H<sup>+</sup> (NHE) (Karmazyn et al., 2003).

Maior expressão gênica do receptor AT<sub>2</sub> foi observada no ventrículo esquerdo dos animais de todos os grupos alimentados com dieta hipersódica, enquanto que, a expressão protéica deste receptor não foi alterada pela sobrecarga de sal na dieta nos grupos HR1, HR2 e HR2+HZ. Nos animais do grupo HR2+LOS, assim como o receptor AT<sub>1</sub>, foi observada uma menor expressão protéica do receptor AT<sub>2</sub> em ambos os ventrículos.

Estes resultados sugerem que o losartan possivelmente teve um efeito pós-transcricional sobre o receptor AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>.

Anticorpos conformação específica são substâncias que se ligam a receptores acoplados à proteína G nas membranas das células e que reconhecem a forma ativada deste receptor. No presente estudo a ligação do anticorpo conformação específica anti-AT<sub>1</sub> estava diminuído em ambos os ventrículos dos animais do grupo HR1, HR2 e HR2+HZ. Uma possível explicação para este achado é a internalização deste receptor, já que um conteúdo aumentado de angiotensina II foi observado no ventrículo esquerdo e direito dos animais dos grupos HR1, HR2 e HR2+HZ. No grupo losartan, a ligação do anticorpo anti-AT<sub>1</sub> foi ainda menor do que em outros grupos alimentados com elevado conteúdo de sal na dieta. Isto pode ser explicado pela menor expressão protéica do receptor AT<sub>1</sub> e o efeito do bloqueio desta droga sobre este receptor.

A menor ligação do anticorpo anti-AT<sub>2</sub> no grupo losartan em ambos os ventrículos pode ser devido à menor expressão protéica deste receptor no ventrículo esquerdo e direito deste grupo de animais.

O sódio é importante para a regulação do volume dos fluidos extracelulares, no entanto, seu excesso pode aumentar a retenção de líquidos e conseqüentemente a uma expansão da volemia (Pearson e Wolzak 1982). No presente trabalho, o sódio plasmático e o hematócrito não foram diferentes entre os cinco grupos estudados. Desta forma, estes resultados permitem conjecturar que a hipertrofia miocárdica, observada neste estudo, não é decorrente de uma expansão volêmica.



No presente estudo, o peso corpóreo dos animais que foram alimentados com dieta HR2 desde o desmame e dos animais que foram alimentados com dieta HR2 e que receberam hidralazina a partir da 7<sup>a</sup> semana de idade foi menor quando comparado com o grupo NR e HR1. Não foi observada diferença de peso corpóreo entre os animais dos grupos HR2 e HR2+HZ. Estes resultados sugerem que a hidralazina não foi a responsável pelo o menor peso corpóreo nos animais deste grupo. Apesar dos animais do grupo HR2 e HR2+HZ apresentarem menor peso corpóreo, estes animais consumiram maior quantidade de ração comparado com os animais do grupo NR. É importante ressaltar que não foi observada diferença de peso corpóreo no desmame entre os grupos estudados (período em que os animais ainda não haviam recebido as diferentes dietas), sugerindo que os resultados de peso corpóreo na idade adulta foram influenciados pelo maior consumo de sal na dieta por longo período. Corroborando com estes resultados, um estudo anterior deste Laboratório (Coelho et al., 2006), no mesmo modelo experimental, observou que animais alimentados com dieta HR2 apesar de consumirem maior quantidade de ração apresentaram menor peso corpóreo quando comparado com o grupo de animais submetidos à dieta hipossódica e normossódica. O estudo destes autores sugere uma alteração no gasto energético destes animais, já que ratos alimentados com dieta pobre em sal apresentaram menor gasto energético e o inverso foi demonstrado nos ratos alimentados com dieta rica em sal. Um achado interessante no presente trabalho é que os animais que foram alimentados com dieta HR2 desde o desmame e que receberam

losartan a partir da 7<sup>a</sup> semana de idade, apresentaram peso corpóreo semelhante àqueles do grupo NR. Portanto, o losartan parece prevenir o efeito de menor ganho de peso induzido pela dieta HR2.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo nos permitem concluir que a hipertrofia do cardiomiócito e a fibrose intersticial ocorrem por mecanismos diferentes. Assim, um possível mecanismo para hipertrofia do cardiomiócito é via receptor  $AT_1$ , uma vez que os animais do grupo HR2 e HR2+HZ apresentaram maior diâmetro transversal do cardiomiócito associado à maior expressão protéica do receptor  $AT_1$ . Já o inverso parece ocorrer com a fibrose cardíaca, como verificado no grupo HR2+LOS que apresentou fibrose intersticial apesar de não haver maior expressão protéica do receptor  $AT_1$ . Estes resultados sugerem ainda, que os mecanismos de hipertrofia do cardiomiócito e de fibrose intersticial são independentes de fatores hemodinâmicos.

## 7. REFERÊNCIAS (\*)

Ahn J, Varagic J, Slama M, Susic D, Frohlich ED. Cardiac structural and functional responses to salt loading in SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004; 287:H767-72.

Amiel D, Nimni ME. The collagen in normal ligaments. *Iowa Orthop J*, 1993; 13:49-55.

Baker KM, Booz GW, Dostal DE. Cardiac actions of angiotensin II. Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Ann Rev Physiol*, 1992; 54:227-41.

Beauchamp GK, Engelman K. High salt intake. Sensory and behavioral factors. *Hypertension*, 1991; 17:I-176-81.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976; 72:248-54.

Chen J, Mehta JL. Angiotensin II-mediated oxidative stress and procollagen-1 expression in cardiac fibroblasts: blockade by pravastatin and pioglitazone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2006; 291:H1738-45.

Cirillo M, Capasso G, Di Leo VA, De Santo NG. A history of salt. *Am J Nephrol*. 1994; 14:426-31.

Coelho MS, Passadore MD, Gasparetti AL, Bibancos T, Prada PO, Furukawa LL, Furukawa LN, Fukui RT, Casarini DE, Saad MJ, Luz J, Chiavegatto S, Dolnikoff MS, Heimann JC. High- or low-salt diet from weaning to adulthood: effect on body weight, food intake and energy balance in rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2006; 16:148-55

da Costa Lima NK. Sobrecarga salina crônica em ratos Wistar eleva a pressão arterial e aumenta o metabolismo de glicose, sem modificar a sensibilidade à insulina. [Tese]. São Paulo, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1995.

D'Amore A, Black MJ, Thomas WG. The angiotensin II type 2 receptor causes constitutive growth of cardiomyocytes and does not antagonize angiotensin II type 1 receptor-mediated hypertrophy. *Hypertension*, 2005; 46:1347-54.

de Mello WC, Danser AH. Angiotensin II and the heart. On the intracrine renin-angiotensin system. *Hypertension*, 2000; 35:1183-88.

Denton D. Can hypertension be prevented? *J Hum Hypertens*. 1997; 11:563-9.

- Dhingra R, et al. Cross-sectional relations of urinary sodium excretion to cardiac structure and hypertrophy. *Am J Hypertens*, 2004; 17:891-96.
- Díez J, Laviades C. Monitoring fibrillar collagen turnover in hypertensive heart disease. *Cardiovasc Res*, 1997; 35:202-5.
- Dostal DE, Baker KM. The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circ Res*, 1999; 85:643-50.
- Du Cailar G, Ribstein J, Daures JP, Mimran A. Sodium and left ventricular mass in untreated hypertensive and normotensive subjects. *Am J Physiol*, 1992; 263:H177-81.
- Dzau VJ. Implications of local angiotensin production in cardiovascular physiology and pharmacology. *Am J Cardiol*, 1987; 59:59A- 65A.
- Gray MO, Long CS, Kalinyak JE, Li HT, Karliner JS. Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovasc Res*, 1998; 40: 352-63.
- Grimm D, Kromer EP, Bocker W, Bruckschlegel G, Holmer SR, Riegger GA, Schunkert H. Regulation of extracellular matrix protein in pressure-overload cardiac hypertrophy: effects of angiotensin converting enzyme inhibition. *J Hypertens*, 1998, 16:1345-55.

- Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest*, 1975; 56:56-64
- He J, Whelton PK. Salt intake, hypertension and risk of cardiovascular disease: an important public health challenge. *Int J Epidemiol*, 2002; 31:327-31.
- Hein S, Schaper J. The extracellular matrix in normal and diseased myocardium. *J Nucl Cardiol*, 2001; 8:188-96. Review.
- Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988; 85:339-43.
- Karmazyn M, Liu Q, Gan XT, Brix BJ, Fliegel L. Aldosterone increases NHE-1 expression and induces NHE-1-dependent hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *Hypertension*, 2003; 42:1171-6.
- Lal A, Veinot JP, Leenen FH. Prevention of high salt diet-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by spironolactone. *Am J Hypertens*, 2003; 16:319-23.

Lindpainter K, Ganten D. The cardiac renin-angiotensin system: an appraisal of present experimental and clinical evidence. *Circ Rev*, 1991; 68:905-21.

Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta 1. *Mol Genet Metab*, 2000; 71:418-35.

Luft FC, Rankin LI, Bloch R, Weyman AE, Willis LR, Murray RH, Grim CE, Weinberger MH. Cardiovascular and humoral responses to extremes of sodium intake in normal black and white men. *Circulation*. 1979; 60:697-706

Macgregor GA and Wardener HE. Salt, diet and health. *Ed. Cambridge University*, 1998; Pgs. 227

Maitland K, Bridges L, Davis WP, Loscalzo J, Pointer MA. Different effects of angiotensin receptor blockade on end-organ damage in salt-dependent and salt-independent hypertension. *Circulation*, 2006; 114:905-11.

Matsui H, Ando K, Kawarazaki H, Nagae A, Fujita M, Shimosawa T, Nagase M, Fujita T. Salt excess causes left ventricular diastolic dysfunction in rats with metabolic disorder. *Hypertension*. 2008; 52:287-94.



Miyata S e Haneda T. Hypertrophic growth of cultura neonatal rat heart cells mediated by type 1 angiotensin II receptor. *Am J Physiol*, 1994; 266:H2443-51.

Norton GR, Tsotetsi J, Trifunovic B, Hartford C, Candy GP, Woodiwiss AJ. Myocardial stiffness is attributed to alterations in cross-linked collagen rather than total collagen or phenotypes in spontaneously hypertensive rats. *Circulation*, 1997; 96:1991-8.

Page LB, Vandever DE, Nader K, Lubin NK, Page JR. Blood pressure of Qash'qai pastoral nomads in Iran in relation to culture, diet, and body form. *Am J Clin Nutr*, 1981; 34:527-38

Pearson AM, Wolzak AM. Salt-its use in animal products- a human health dilemma. *J Anim Sci*, 1982; 54:1263-78

Raizada MK, Ferreira AJ. ACE2: a new target for cardiovascular disease therapeutics. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007; 50:112-9. Review.

Re RN. Implications of intracrine hormone action for physiology and medicine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003; 284:H751-57.

Rodrigues SF, de Oliveira MA, dos Santos RA, Soares AG, de Cássia Tostes R, Carvalho MH, Fortes ZB. Hydralazine reduces leukocyte migration

through different mechanisms in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Eur J Pharmacol*, 2008; 589:206-14.

Russell B, Motlagh D, Ashley WW. Form follows function: how muscle shape is regulated by work. *J Appl Physiol*, 2000; 88:1127-32. Review

Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol*, 1997; 59:551-71. Review.

Sadoshima JI, Izumo S. Signal transduction pathways of angiotensin II-induced c-fos gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Circ Res*, 1993; 73: 424-38.

Schmieder RE, Langenfeld MRW. Salt and left ventricular hypertrophy: what are the links? *J Hum Hypertens*, 1995; 9:909-16.

Schorb W, Booz GW, Dostal DE, Conrad KM, Chang KC, Baker KM. Angiotensin II is mitogenic in neonatal rat cardiac fibroblasts. *Circ Res*, 1993; 72:1245-54.

Schultz JE, Witt SA, Nieman ML, Reiser PJ, Engle SJ, Zhou M, Pawlowski SA, Lorenz JN, Kimball TR, Doetschman T. Fibroblast growth factor-2 mediates pressure-induced hypertrophic response. *J Clin Invest*, 1999; 104:709-19.

Senbonmatsu T, Ichihara S, Price E Jr, Gaffney FA, Inagami T. Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload. *J Clin Invest*, 2000;106:R25-9.

Stamler J. The INTERSALT Study: background, methods, findings, and implications. *Am J Clin Nutr*, 1997; 65:626S-642S.

Sun Y, Zhang J, Lu L, Chen SS, Quinn MT, Weber KT. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart: role of oxidative stress. *Am J Pathol*, 2002; 161:1773-81.

Takeda Y, Yoneda T, Demura M, Miyamori I, Mabuchi H. Sodium-induced cardiac aldosterone synthesis causes cardiac hypertrophy. *Endocrinology*, 2000; 141:1901-04.

Urata H, Kinoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem*, 1990; 265:22348-57.

Urata H, Boehm KD, Philip A, Kinoshita A, Gabrovsek J, Bumpus FM, Husain A. Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. *J Clin Invest*, 1993; 91:1269-81.

Xu J, Carretero OA, Liu YH, Shesely EG, Yang F, Kapke A, Yang XP. Role of AT<sub>2</sub> receptors in the cardioprotective effect of AT<sub>1</sub> antagonists in mice. *Hypertension*, 2002; 40:244-50.

Whelton PK, Appel LJ, Espeland MA, Applegate WB, Ettinger WH Jr, Kostis JB, Kumanyika S, Lacy CR, Johnson KC, Folmar S, Cutler JA. Sodium reduction and weight loss in the treatment of hypertension in older persons: a randomized controlled trial of nonpharmacologic interventions in the elderly (TONE). TONE Collaborative Research Group. *JAMA*, 1998; 279:839-46.

Yamazaki T, Komuro I, Shiojima I, Yazaki Y. The renin-angiotensin system and cardiac hypertrophy. *Heart*, 1996; 76:33-35.

Yoshida K, Kim-Mitsuyama S, Wake R, Izumiya Y, Izumi Y, Yukimura T, Ueda M, Yoshiyama M, Iwao H. Excess aldosterone under normal salt diet induces cardiac hypertrophy and infiltration via oxidative stress. *Hypertens Res*, 2005; 28:447-55.

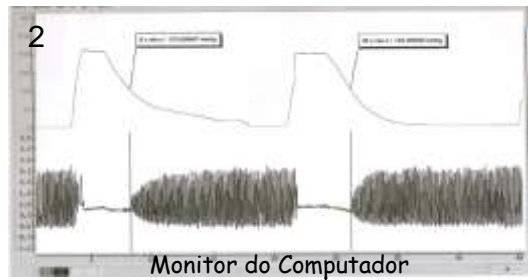
Yu HC, Burrell LM, Black MJ, Wu LL, Dilley RJ, Cooper ME, Johnston CI. Salt induces myocardial and renal fibrosis in normotensive and hypertensive rats. *Circulation*, 1998; 98:2621-8.

Yuan BX and Leenen FH. Dietary sodium intake and left ventricular hypertrophy in normotensive rats. *Am J Physiol*, 1991; 261:H1397-401.

## 8. ANEXOS

# PRESSÃO ARTERIAL CAUDAL

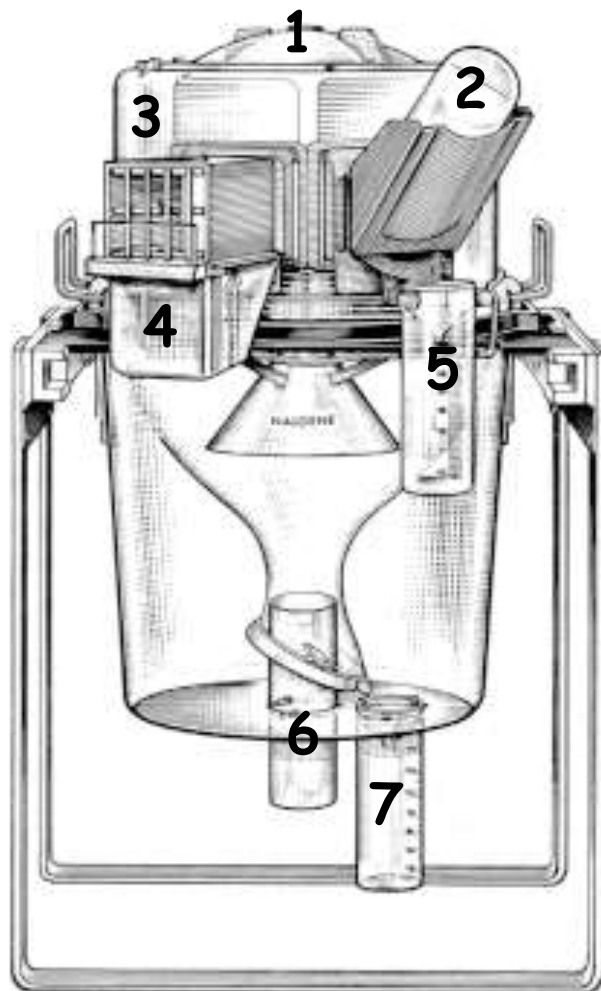
## Método osciloscópio



{ PA sistólica  
Frequência cardíaca



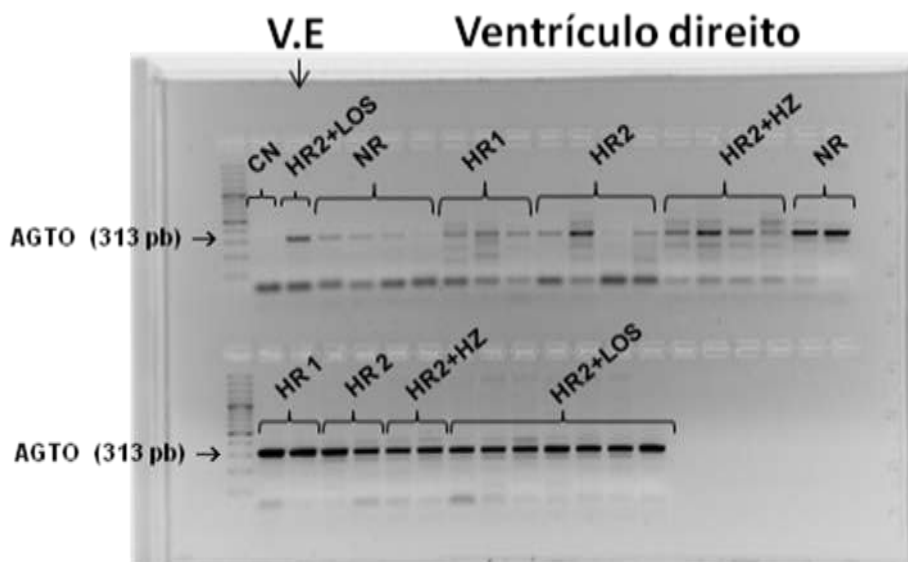
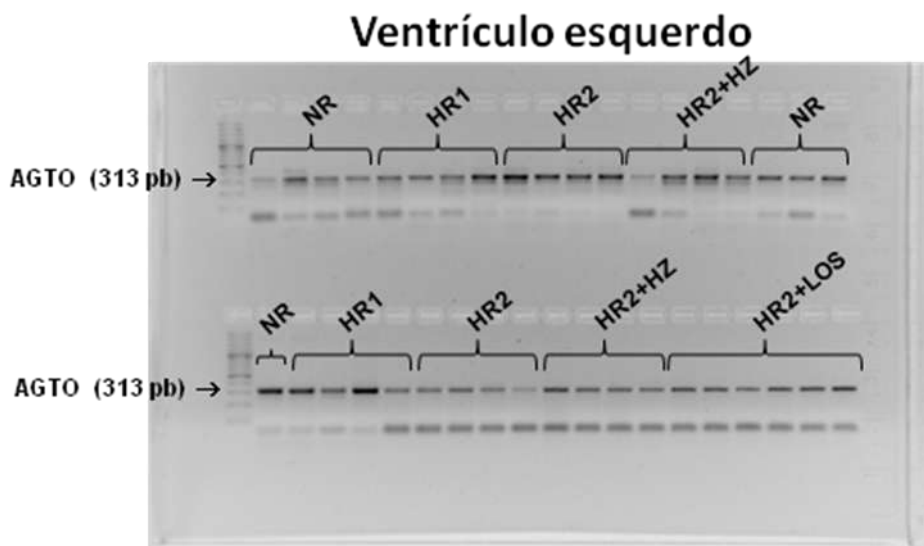
**Anexo 1:** Representação esquemática do aparelho utilizado para a medida de pressão arterial caudal.



**Legenda:**

1. Orifício para ventilação do ambiente
2. Recipiente para água
3. Área para acondicionamento do animal
4. Recipiente para armazenamento de ração
5. Coletor de água
6. Coletor de fezes
7. Coletor de urina

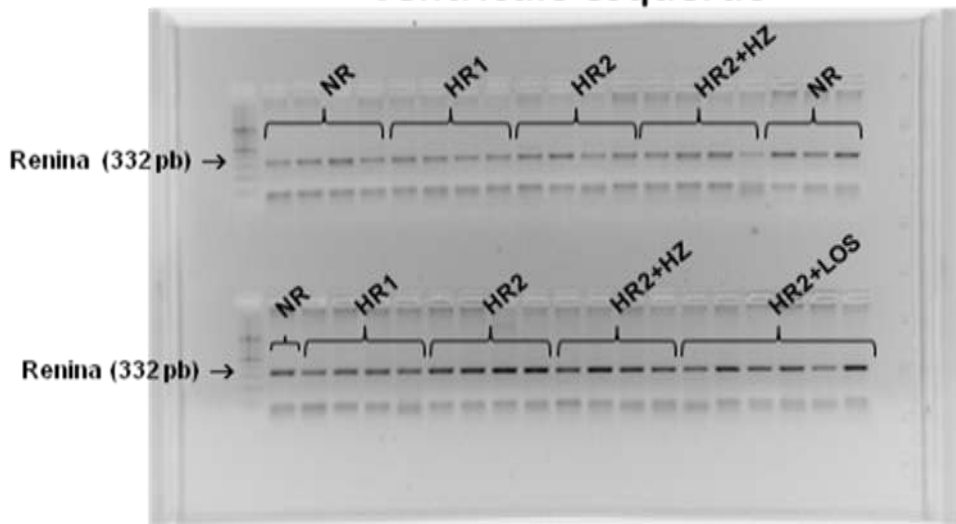
**Anexo 2:** Representação esquemática da gaiola metabólica utilizada para a avaliação do consumo de ração, ingestão hídrica, volume urinário e coleta de amostra urinária.



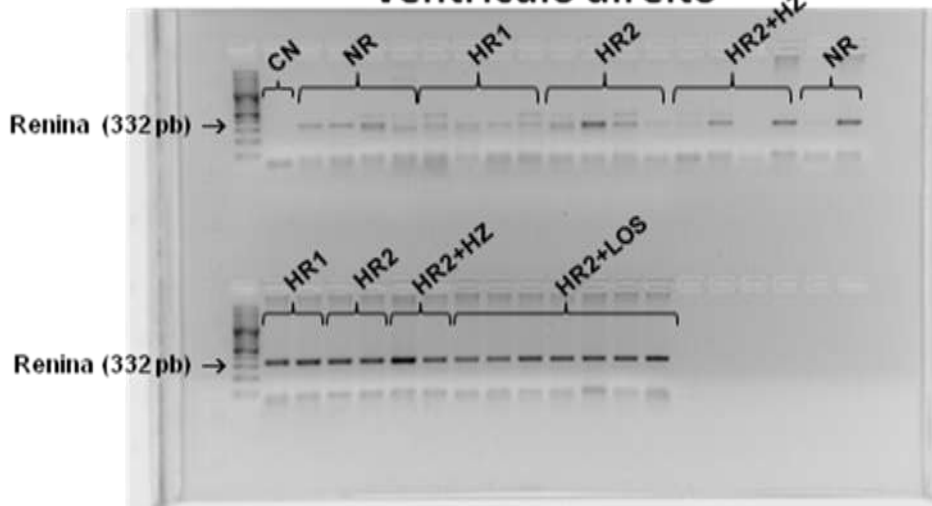
**Anexo 3.** RT-PCR do gene angiotensinogênio do A) ventrículo esquerdo e B) direito de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica hipersódica 1, hipersódica 2, hipersódica 2+hidralazina (HR2+HZ) ou hipersódica 2+losartan (HR2+LOS) desde o desmame até a 18ª semana de idade.



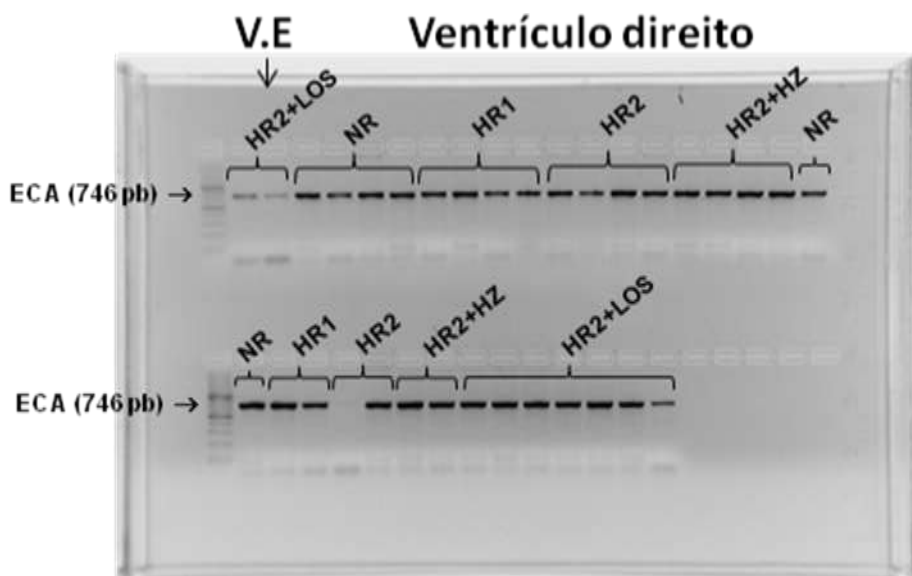
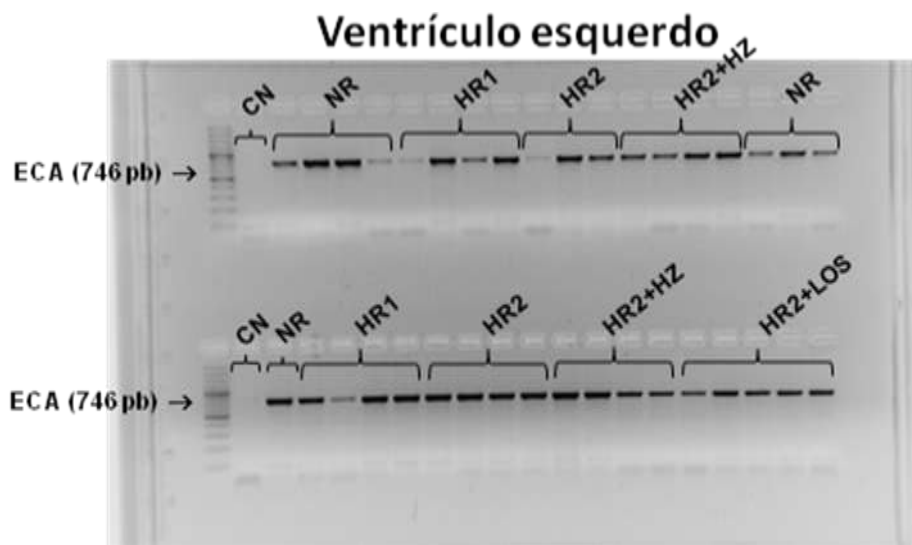
### Ventrículo esquerdo



### Ventrículo direito

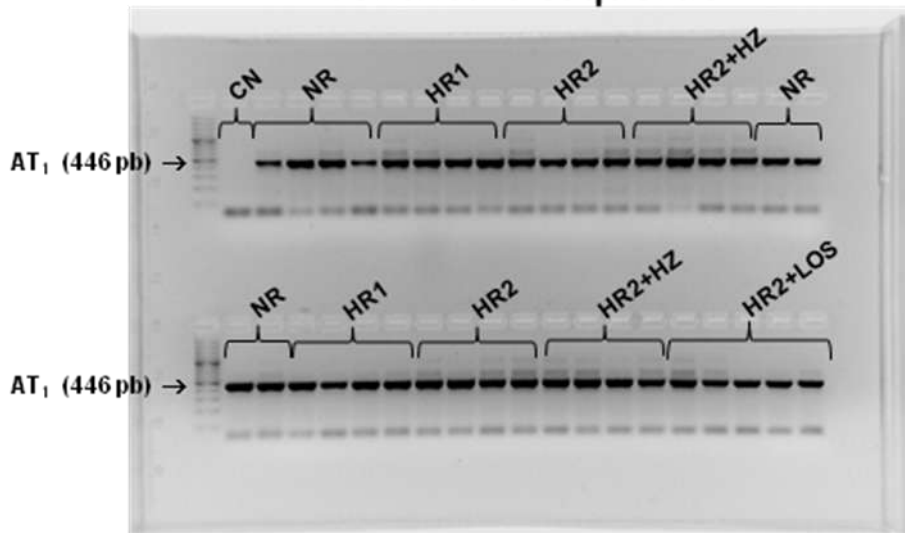


**Anexo 4.** RT-PCR do gene renina do A) ventrículo esquerdo e B) direito de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica, hipertônica 1, hipertônica 2, hipertônica 2+hidralazina (HR2+HZ) ou hipertônica 2+losartan (HR2+LOS) desde o desmame até a 18ª semana de idade.

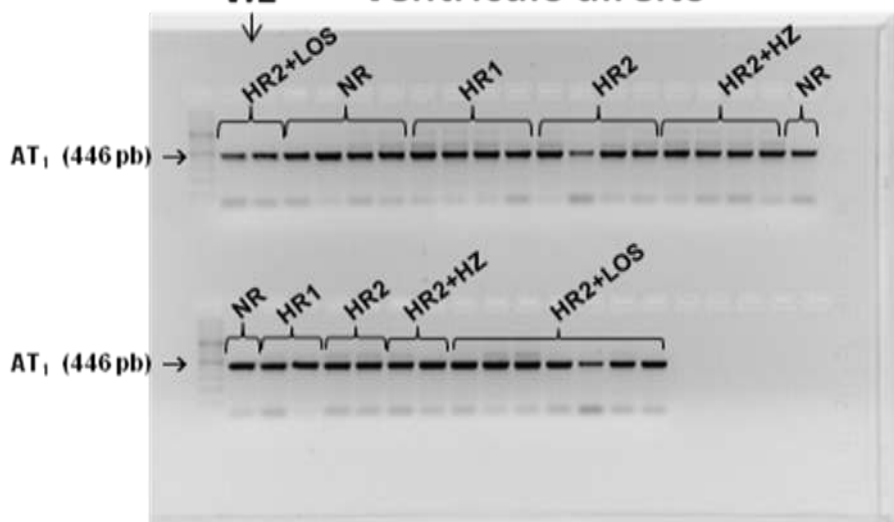


**Anexo 5.** RT-PCR do gene enzima conversora de angiotensina II (ECA) do A) ventrículo esquerdo e B) direito de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica hipersódica 1, hipersódica 2, hipersódica 2+hidralazina (HR2+HZ) ou hipersódica 2+losartan (HR2+LOS) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade.

### Ventrículo esquerdo

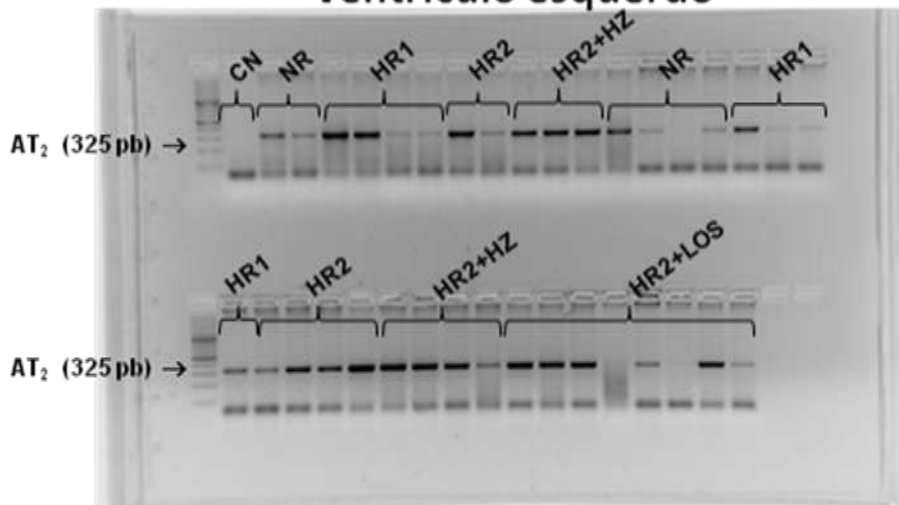


### V.E Ventrículo direito

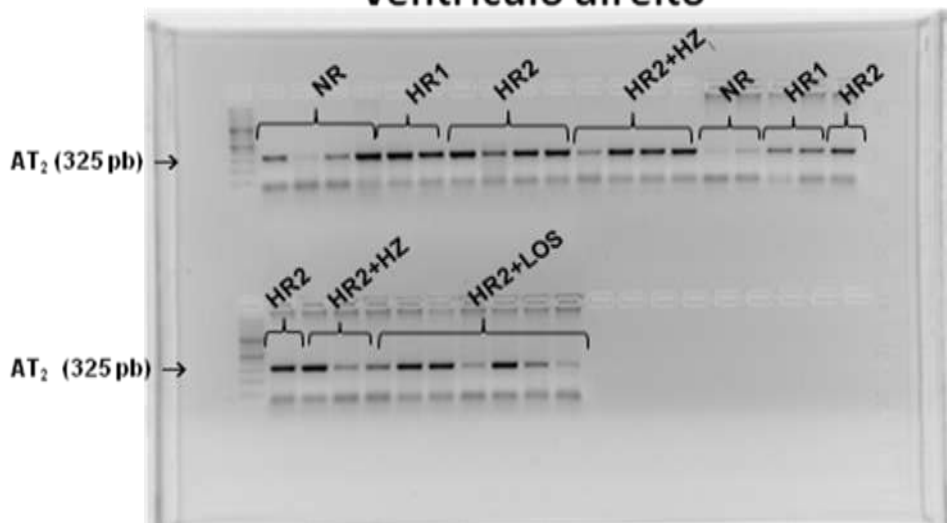


**Anexo 6.** RT-PCR do gene receptor  $AT_1$  do A) ventrículo esquerdo e B) direito de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica, hipersódica 1, hipersódica 2, hipersódica 2+hidralazina (HR2+HZ) ou hipersódica 2+losartan (HR2+LOS) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade.

### Ventrículo esquerdo

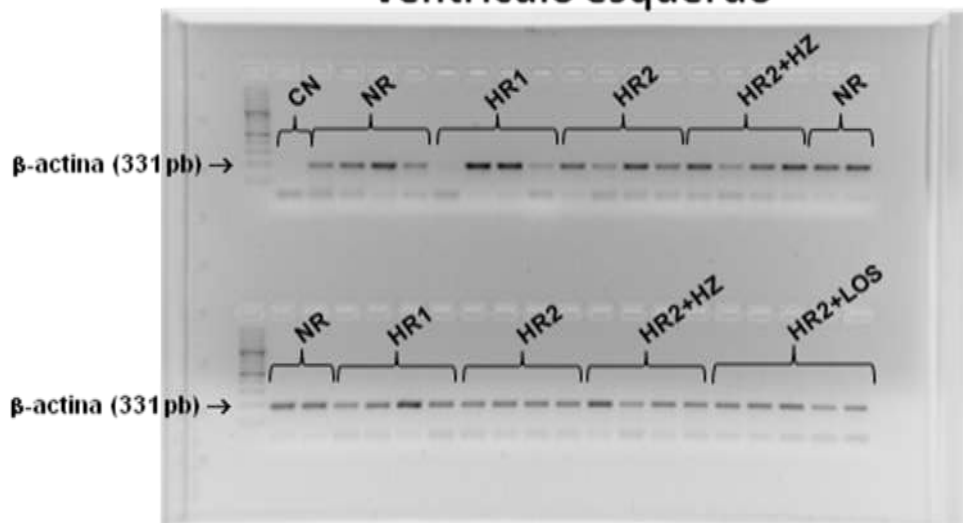


### Ventrículo direito

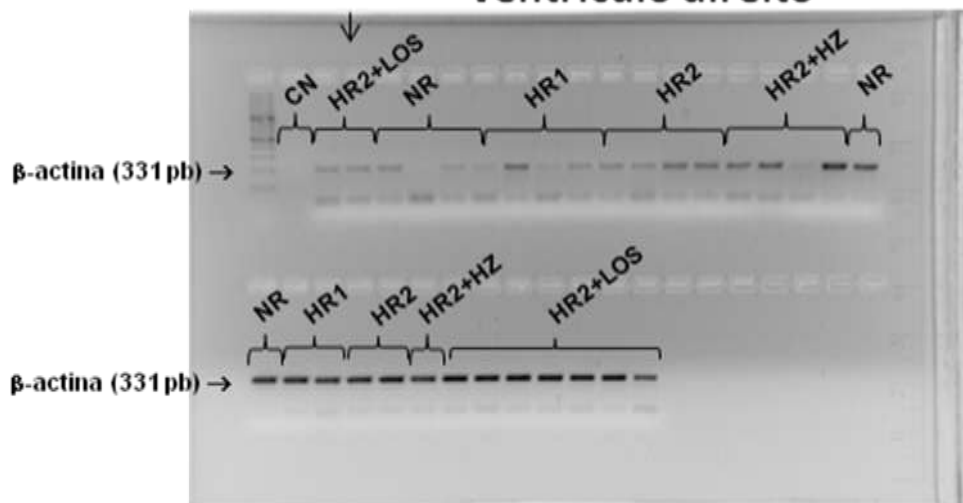


**Anexo 7.** RT-PCR do gene receptor  $AT_2$  do A) ventrículo esquerdo e B) direito de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica, hipersódica 1, hipersódica 2, hipersódica 2+hidralazina (HR2+HZ) ou hipersódica 2+losartan (HR2+LOS) desde o desmame até a 18ª semana de idade.

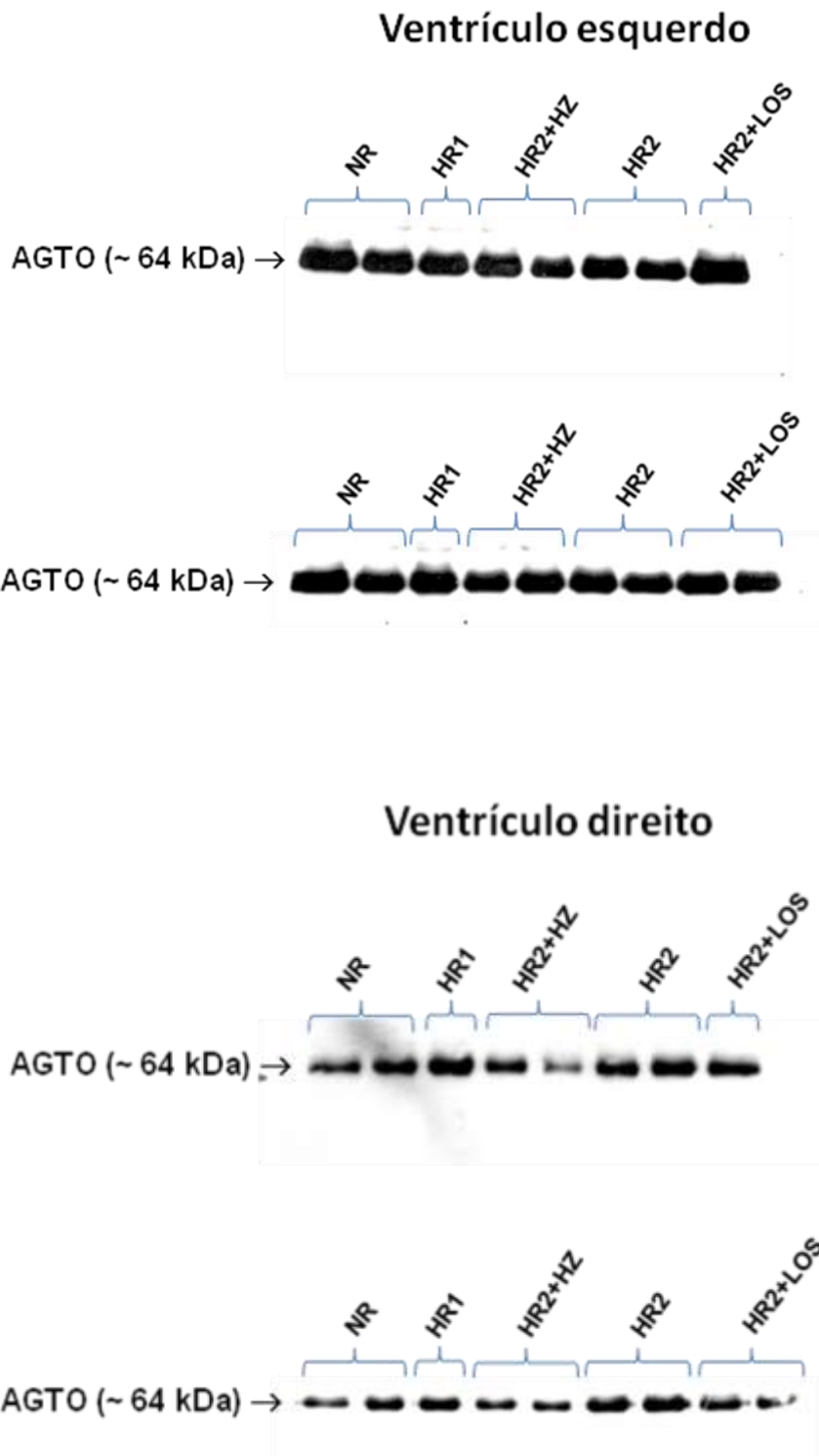
### Ventrículo esquerdo



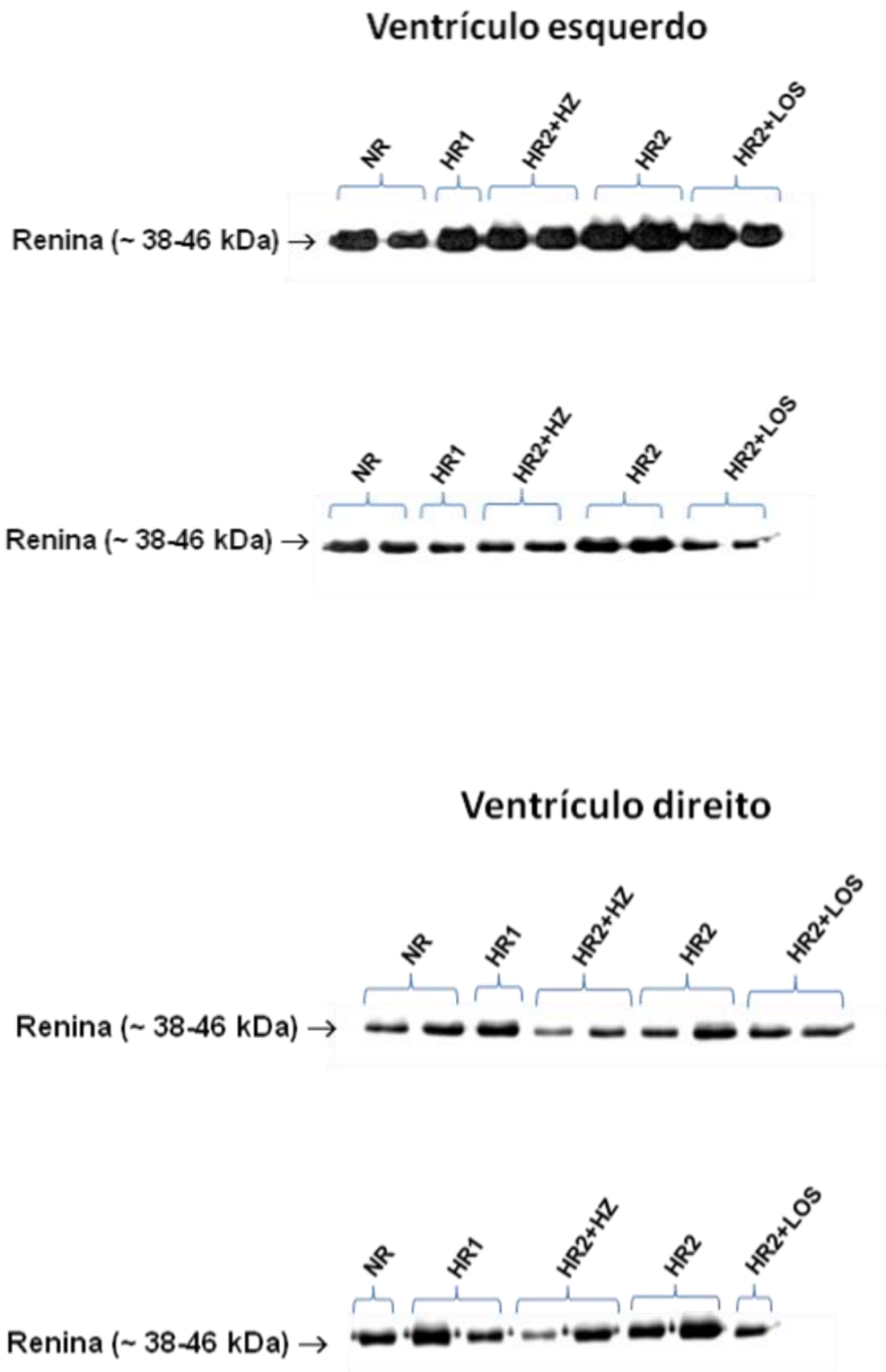
### V.E Ventrículo direito



**Anexo 8.** RT-PCR do gene  $\beta$ -actina do A) ventrículo esquerdo e B) direito de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica, hipertônica 1, hipertônica 2, hipertônica 2+hidralazina (HR2+HZ) ou hipertônica 2+losartan (HR2+LOS) desde o desmame até a 18ª semana de idade.

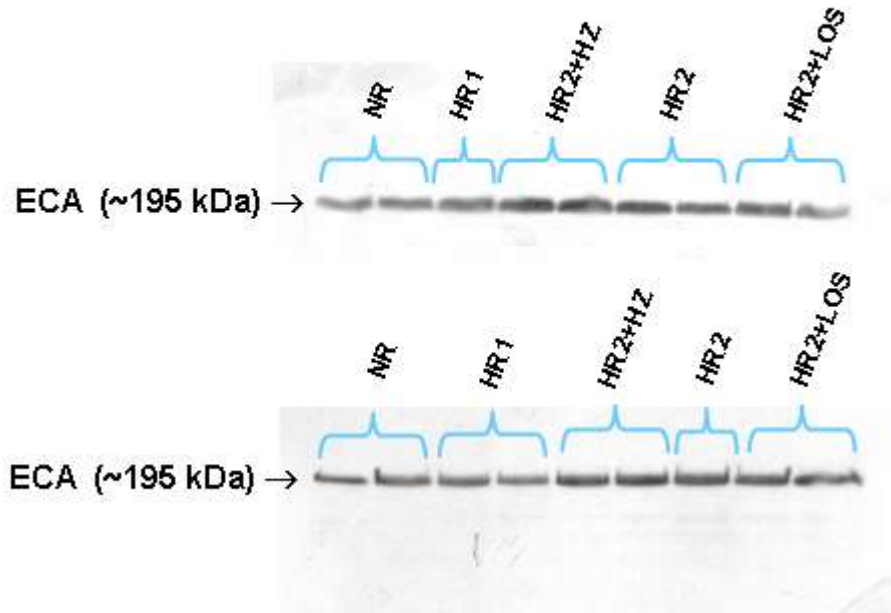


**Anexo 9.** Western blot da proteína angiotensinogênio do A) ventrículo esquerdo e B) direito de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica hipersódica 1, hipersódica 2, hipersódica 2+hidralazina (HR2+HZ) ou hipersódica 2+losartan (HR2+LOS) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade.

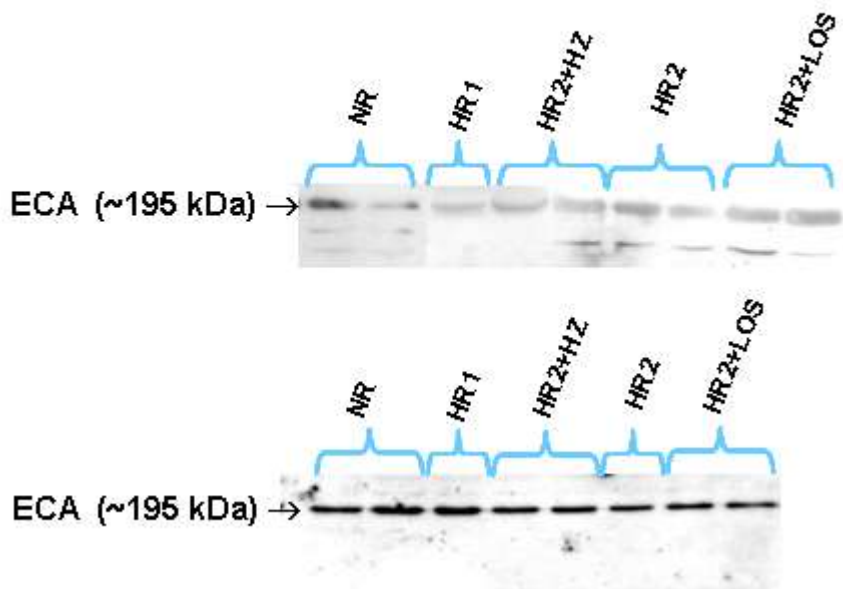


**Anexo 10.** Western blot da proteína renina do A) ventrículo esquerdo e B) direito de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica hipersódica 1, hipersódica 2, hipersódica 2+hidralazina (HR2+HZ) ou hipersódica 2+losartan (HR2+LOS) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade.

## Ventrículo esquerdo

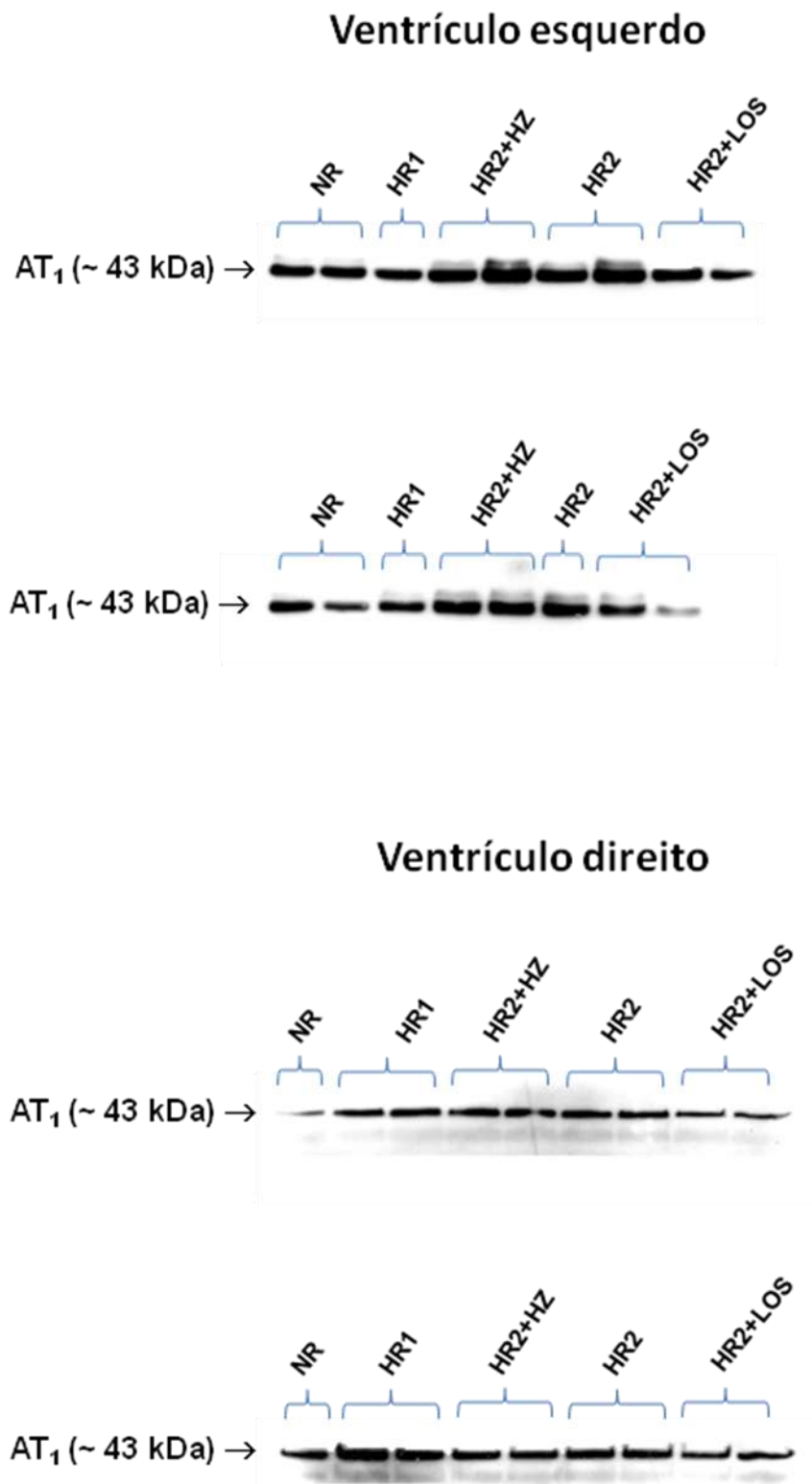


## Ventrículo direito



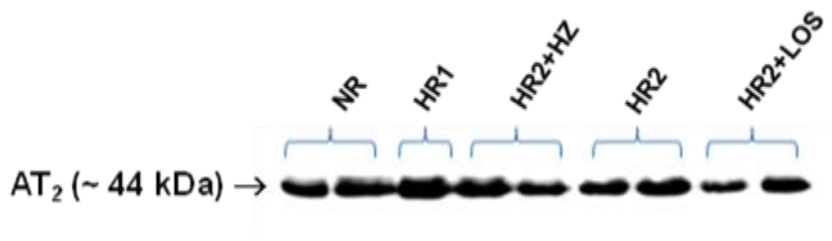
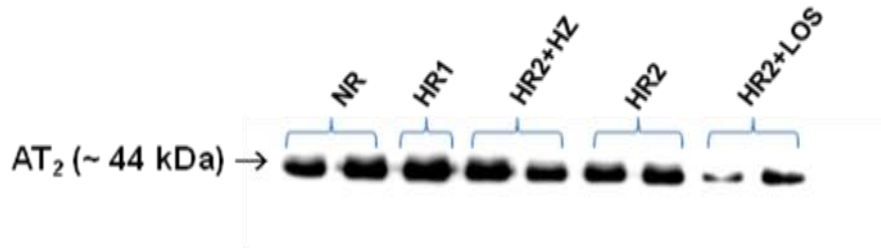
**Anexo 11.** Western blot da proteína enzima conversora de angiotensina do A) ventrículo esquerdo e B) direito de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica, hipersódica 1, hipersódica 2, hipersódica 2+hidralazina (HR2+HZ) ou hipersódica 2+losartan (HR2+LOS) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade.



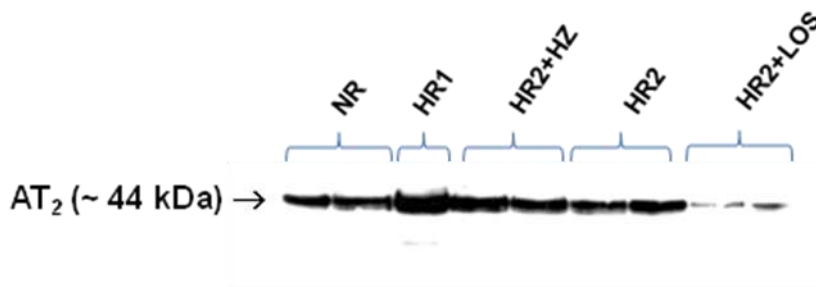
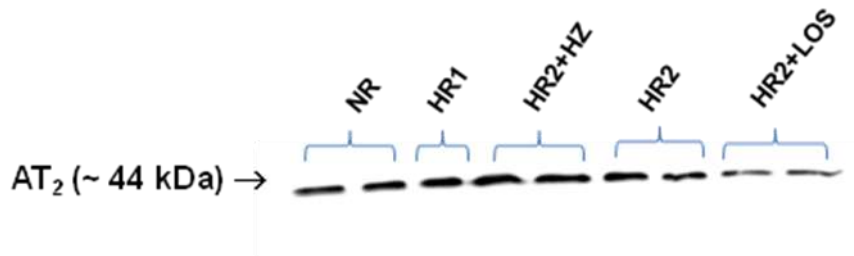


**Anexo 12.** Western blot da proteína do receptor  $AT_1$  do A) ventrículo esquerdo e B) direito de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica hipersódica 1, hipersódica 2, hipersódica 2+hidralazina (HR2+HZ) ou hipersódica 2+losartan (HR2+LOS) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade.

### Ventrículo esquerdo

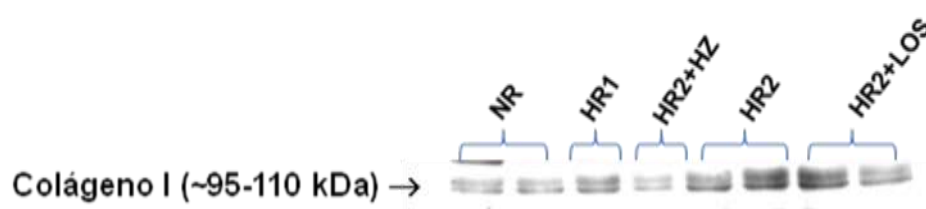
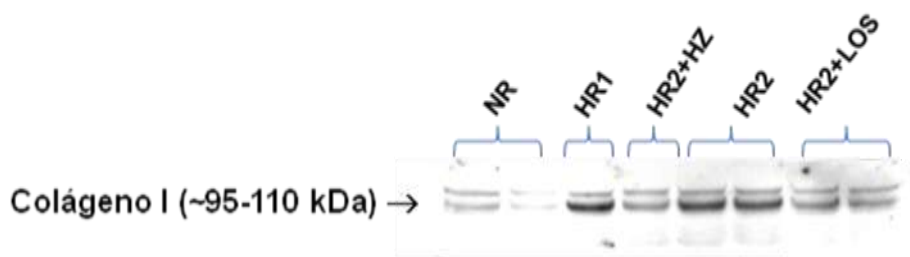


### Ventrículo direito

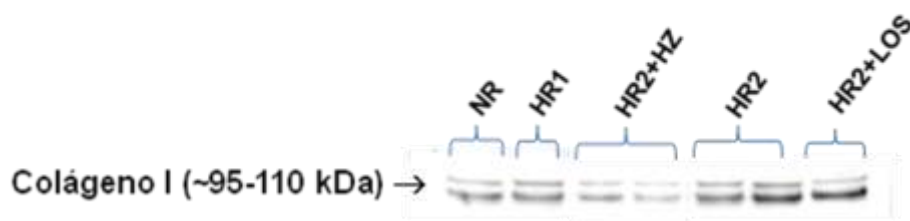
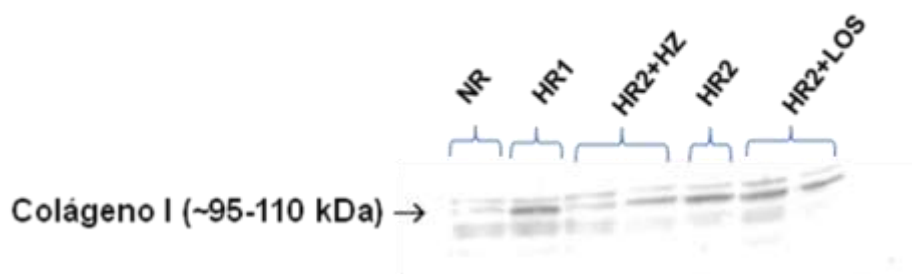


**Anexo 13.** Western blot da proteína do receptor AT<sub>2</sub> do A) ventrículo esquerdo e B) direito de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica, hipersódica 1, hipersódica 2, hipersódica 2+hidralazina (HR2+HZ) ou hipersódica 2+losartan (HR2+LOS) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade.

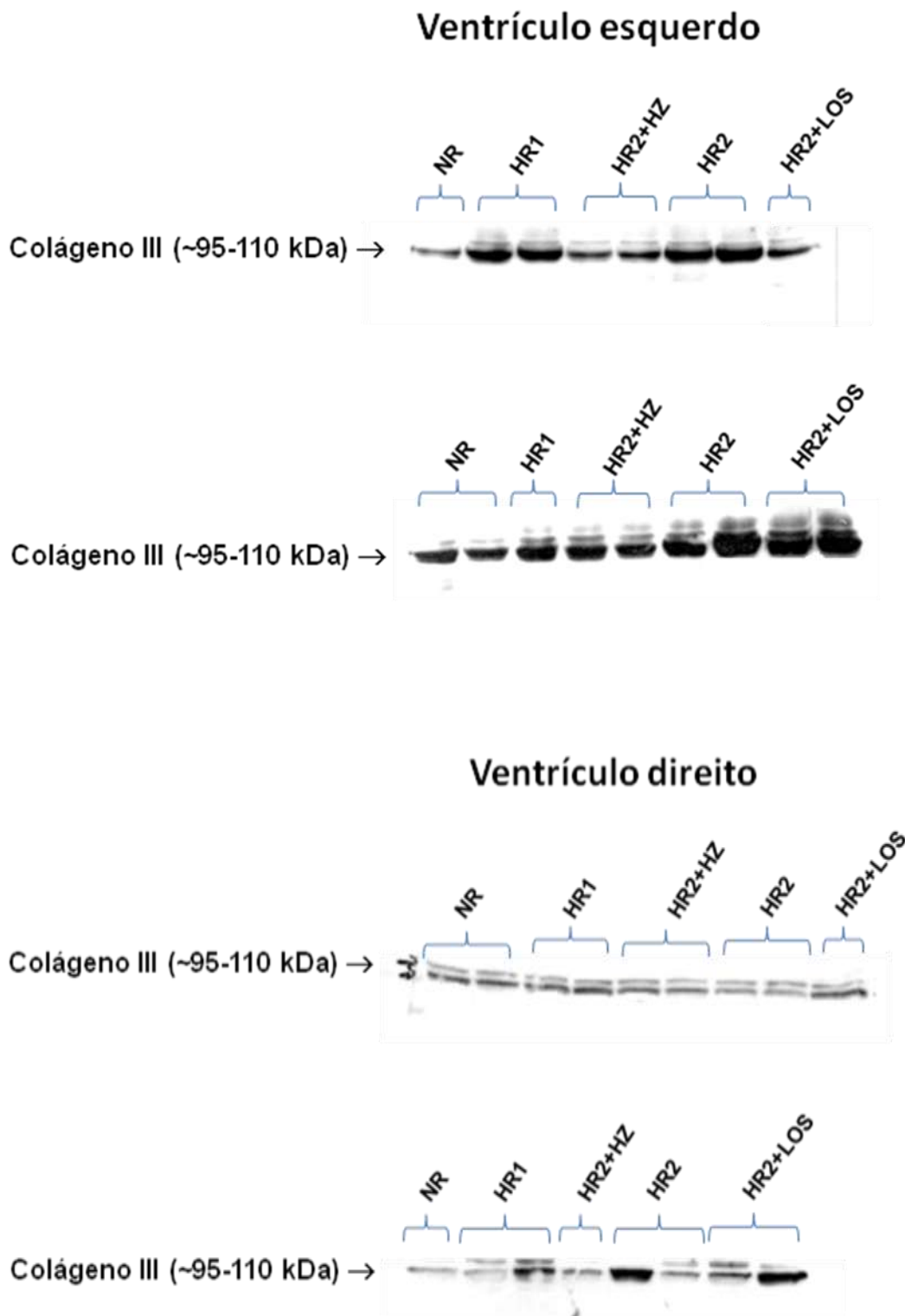
### Ventrículo esquerdo



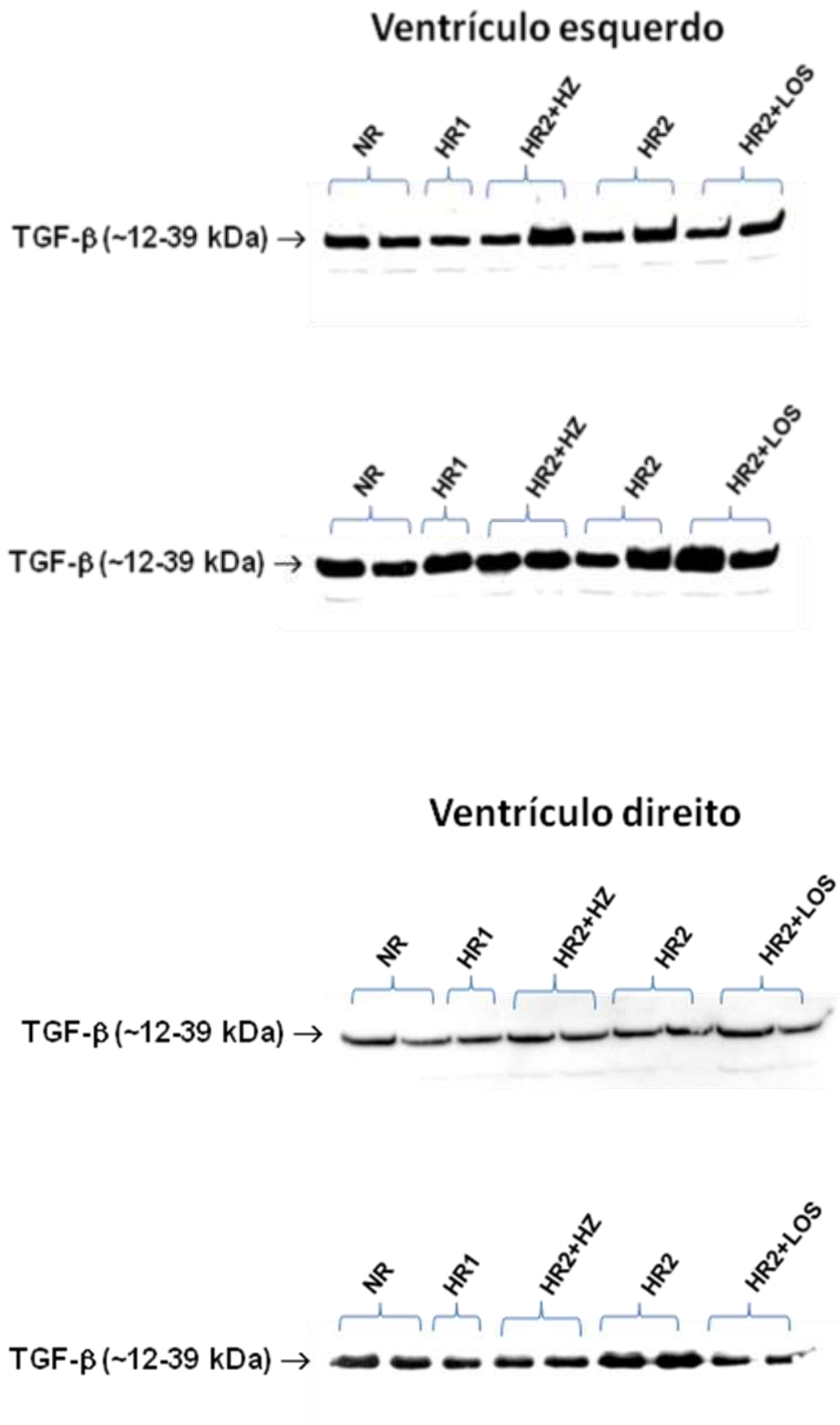
### Ventrículo direito



**Anexo 14** Western blot da proteína colágeno I do A) ventrículo esquerdo e B) direito de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica hipersódica 1, hipersódica 2, hipersódica 2+hidralazina (HR2+HZ) ou hipersódica 2+losartan (HR2+LOS) desde o desmame até a 18ª semana de idade.



**Anexo 15.** Western blot da proteína colágeno III do A) ventrículo esquerdo e B) direito de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica hipersódica 1, hipersódica 2, hipersódica 2+hidralazina (HR2+HZ) ou hipersódica 2+losartan (HR2+LOS) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade.



**Anexo 16.** Western blot da proteína TGF- $\beta$  do A) ventrículo esquerdo e B) direito de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica hipersódica 1, hipersódica 2, hipersódica 2+hidralazina (HR2+HZ) ou hipersódica 2+losartan (HR2+LOS) desde o desmame até a 18<sup>a</sup> semana de idade.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)