FERNANDA BUENO FUSCO

**Losartana e hidralazina previnem o acúmulo arterial de
lípidos induzido pela restrição alimentar crônica de sódio em
animais hipertensos e hiperlipidêmicos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Endocrinologia

Orientador: Dr. Sergio Catanozi

São Paulo

2015

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Lípidos (LIM 10) da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia em colaboração com o Laboratório de Hipertensão Experimental da Disciplina de Fisiopatologia Renal (LIM 16), Laboratório de Matriz Extracelular da Disciplina de Reumatologia (LIM 17) e Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Apoio financeiro FAPESP - 2011/16164-7 (Bolsa de Mestrado) e 2013/11084-0 (Projeto regular)

Projeto aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq # 341/10)

Dedico...

Aos meus pais, Fábio e Vera, e aos meus irmãos, Carina e César (i.m.) por, cada um a sua maneira, me apoiarem para realização do meu mestrado e de todos os meus sonhos e objetivos.

À família Lim 10, por serem muito mais do que orientadores, professores e colegas de bancada.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Sergio Catanozi, por ter sido mais do que o meu orientador de mestrado, mas também um orientador de vida, sempre amigo, às vezes até um pai, com seu carinho, preocupação e conselhos. Sempre disposto a me ajudar e tirar dúvidas, sempre dedicado em me ensinar sobre os lípides, sobre as atividades do laboratório, sobre todos os cuidados com os animais, desde a criação no biotério, até as cirurgias mais minuciosas, sempre com respeito à vida dos animais, e mais do que isso, me ensinando a ser pesquisadora. É uma honra tê-lo como orientador e tê-lo como exemplo, e uma honra ser sua primeira aluna de mestrado.

À Dra. Edna Nakandakare, por ser chefe em todos os momentos, mas também ir além, sendo como uma mãe e nos acolhendo, compreendendo e aconselhando sempre que preciso. Humilde, trata a todos de igual para igual. Generosa, sempre arruma um tempo para atender a todos e ajudar no que for preciso. E ainda consegue colocar ordem na família Lim 10 com doçura, bom senso, bom humor e maestria.

À Dra. Marisa Passarelli, a alegria e jovialidade em pessoa. Um grande exemplo como profissional e ser humano, possui um conhecimento e uma didática invejável, e melhor ainda, divide todo seu conhecimento e experiência com todos, com o maior prazer. Uma honra poder aprender todos os dias com ela, pessoa que admiro e tenho muito carinho. Além disso, ela me permitiu conhecer seu maior tesouro, a Mel, que se tornou uma das minhas “melhores-amiguinhas”!

Ao Dr. Eder Quintão, pela humildade em compartilhar toda a sabedoria do grande mestre que ele é... Sabedoria em lípides, em cultura geral... Sabedoria de vida! Cuida e se preocupa com cada um do laboratório como pai e como avô, não só na vida acadêmica, mas no nosso bem estar como um todo. Uma honra poder conviver e aprender com ele!

Aos Doutores, que hoje estão traçando seus caminhos de sucesso merecido, mas que quando entrei ainda eram pós-graduandos, me receberam muito bem e me ensinaram muito a dar os primeiros passos no laboratório, e, como todos da família Lim 10, são pessoas incríveis e exemplos para nos espelharmos: Gabi Castilho, Rapha Souza, Dé Rocco, Rô Marcondes, Cá Canteiro e Rê Bombo.

Aos pós-graduandos que estão entrando agora, e são ótimas pessoas, quesito essencial para fazer parte da família Lim 10: Ana Paula Lembo, Fiama, Vanessa e Guilherme. À Bruninha, Maria Olívia, Mila, Joílsa, Alessandra e Eliton que passaram pelo laboratório mas seguiram seus caminhos. Em especial, a Simoninha Batista e A Ju Tirone, inteligentes e dedicadas na pesquisa, prestativas com todos. Amigas além do laboratório, carinhosas e divertidas, se preocupam e sabem ouvir e aconselhar, amigas que sei que posso sempre contar!

Ao Di Gomes, a alegria do laboratório! Meu companheiro de mestrado e de todas as horas. Entramos praticamente juntos, fizemos todos os experimentos praticamente juntos. Amigos além do laboratório, passou comigo todos os meus perrengues, me apoiando, incentivando, aconselhando, me resgatando e não me deixando cair um só minuto!

À Tati Venâncio, a autenticidade em pessoa, e exatamente por isso é uma amiga tão amada por mim e por todos. Sempre fofa comigo, sincera em seus conselhos, me compreendendo e me reerguendo muitas vezes com as sábias palavras de sua alma forte e guerreira. Companheira de todas as horas e pra todas as conversas sobre os mais diversos assuntos.

À Paulinha Ramos, a mais brincalhona e amiga de todos, no alto da escala da fofura. Junto com o Di, me segurou e me resgatou todas as vezes em que quase caí, sempre me ouvindo, me compreendendo, me aconselhando, é a minha amiga especial!

À Karolzinha Santana, a alegria direto da Bahia! Pequeninha de tamanho, mas uma grande amiga de coração imenso e generoso, sempre disposta a ajudar a todos no que for preciso, mesmo quando está cheia de afazeres. A fofura em pessoa!

À Lis Mie, que irradia luz pelo sorriso e pelo olhar, e também está no alto escalão da fofura. Aproximamos-nos num momento difícil, e então ela se mostrou ainda mais especial, com suas orações e palavras de paz e conforto, resgatando a minha fé quando mais precisei. Amiga de coração infinitamente generoso, além de um exemplo de ser humano, de mãe e de profissional.

À inseparável dupla de nutris, Milessa Afonso ("Tchura") e Silvinha Lavrador. Personalidades opostas, e que se completam. Em comum, são alegres, estudiosas, inteligentes, dedicadas, amigas de todos, amigas especiais que tanto gosto e de coração generoso!

Aos Doutores Rodrigo Iborra, Adriana Saldiba e Lígia Okuda, que hoje são os mais experientes do laboratório, e são tão generosos em dividir todo o conhecimento e experiência, prático e teórico, com nós, com menos tempo de casa. Exemplos em dedicação e disciplina. O Rô com seu jeito divertido, a Dri com sua doçura, a Liginha com sei jeitinho mais reservado, receberam-me muito bem desde o início, e se tornaram ótimos amigos!

À Fabi Ferreira, Val Nunes e Keli Gomes, por sempre se disponibilizarem em nos ajudar em toda ou qualquer atividade do laboratório ou tirar toda e qualquer dúvida. Sempre prestativas, amigas e ótimas companhias.

À Clau Souza, pessoa fundamental para todos nós pós-graduandos, nos ajudando a resolver todos os problemas burocráticos que não saberíamos resolver sozinhos, a organizar todos os eventos do laboratório, sempre com bom humor e gentileza, além de ser uma companhia divertidíssima para qualquer momento.

À Paty Cazita, por ser sempre tão querida, por ter sempre um sorriso, um abraço amigo e palavras boas a oferecer!

À Dra. Ana Maria Lottenberg, por ser sempre gentil comigo e com todos, um grande exemplo como pessoa e como profissional.

À Jussara Rocha, a maior conhecedora de todas as técnicas e regras do laboratório. Sempre generosa, solidária e paciente em nos ensinar todos os detalhes e o porquê de todas as práticas de bancada, desde pipetar até as dosagens mais variadas. Com seu jeito sociável, sempre conseguia com os vizinhos de laboratório algo que precisávamos mas não tínhamos. Porém, a falta imensa que ela faz no nosso dia-a-dia vai além disso, faz falta a pessoa amiga, doce e companhia agradável que ela é.

À Rosibel e à Dona Ana, sempre dispostas a conversar, sempre nos trazendo alegria, sempre deixando tudo limpo e em ordem no nosso ambiente de trabalho. Pessoas as quais tenho um grande carinho!

À Cida e à Senaria, queridíssimas, sempre nos orientando e nos socorrendo nos assuntos burocráticos e dos prazos com a pós-graduação, mesmo quando nos últimos minutos.

Ao Antônio dos Santos, do Biotério da Reumatologia, que, junto com o Walter e o Waldeci, cuidam tão bem de todos os animais e toda a rotina do biotério, inclusive dos meus camundongos que participaram do meu estudo.

À Kelly Cristina Bispo, pela paciência e dedicação em dar o seu melhor no trabalhoso corte das aortas congeladas, e corá-las com *Oil Red*, participando e contribuindo com o nosso estudo desde a padronização, sempre com simpatia. E à Dra. Vera Capelozzi, chefe do Departamento de Patologia, por permitir nosso trabalho em seu departamento.

Ao Dr. Joel Heimann, por abrir as portas do seu laboratório para o nosso projeto, muito antes de eu estar nele. Sempre muito solícito e com muita simpatia, contribuiu, desde o início, com seu conhecimento e experiência. Por também ter participado da minha banca de qualificação, contribuindo de forma enriquecedora na discussão. Agradeço ainda toda sua equipe do Lim 16, que sempre me receberam tão bem, em especial à querida Dra. Luzia Furukawa, por nos auxiliar em dosagens de amostras, medidas de pressão nos camundongos e discussão de resultados, sempre muito atenciosa e prestativa em dividir o seu conhecimento conosco.

À Dra. Walcy Teodoro, por também nos abrir a porta do seu laboratório para fazermos a histologia, e do seu coração, tratando a mim e ao Diego com o mesmo carinho e atenção com que trata suas alunas, dividindo sua rica experiência de bancada, e dividindo as horas no seu concorrido microscópio óptico e da sua concorrida atenção. Sempre solícita, com seu sorriso, seu bom humor e suas histórias. Agradeço também a toda equipe do Lim17 que, assim como no Lim 16, sempre nos receberam muito bem, em especial a Dra. Paula Velosa, por estar sempre disposta a nos ajudar e nos ensinar, com paciência, doçura e uma didática natural dela; e a Isa Camargo, pela amizade, conversas e ajudas de bancada, sempre com sua meiguice!

À Dra. Maria Lúcia Corrêa-Gianella, pela participação na minha banca de qualificação, sendo atenciosa e generosa, dando ótimas contribuições.

À Profa. Márcia Marques Jericó, por não ter permitido que a nossa parceria acabasse junto com a faculdade. Foi ela quem me trouxe ao Lim 10, graças a ela tive a oportunidade de iniciar essa nova jornada. Ela me deu o direcionamento profissional, e continuou se fazendo presente como orientadora e amiga, como uma mãe! Agradeço ainda aos seus alunos-discípulos, os quais ela me permitiu conhecer

e dividir conhecimento: Sabrina Zbóril, Thais Grunho, Ariane Paola, Eronildo e Elídia. Esses merecem todo o sucesso, e por eles guardo muito carinho.

Ao meu pai, Fábio T. Fusco, e minha mãe, Vera Lucia Bueno, por serem a razão da minha força e do meu viver! É a eles que quero dar alegria e orgulho! A eles sou eternamente grata por terem me dado a vida, a educação e os bons valores que tenho. Desde sempre colocaram os estudos como importante, então posso dizer que é graças a eles que sempre fui dedicada aos estudos. Meu pai, por ser da área acadêmica, entende mais o que é o mestrado, minha mãe, por não ser da área, nem tanto. Independente disso, cada um a sua maneira, sempre me apoiaram a seguir meus objetivos e sonhos, fazem o que podem e o que não podem pelo meu crescimento profissional e como pessoa! Sem o apoio deles, nada disso seria possível! Sou muito orgulhosa dos pais que tenho e os amo acima de qualquer coisa!

À minha irmã, Carina, que mesmo com sua "braveza" de irmã mais velha, também sempre teve todo cuidado e preocupação que uma irmã mais velha tem com sua irmã caçula. E meu cunhado Felipe, que adotou a nossa família com todo seu imenso e generoso coração, estando realmente junto de nós em todos os momentos. E aos meus sobrinhos, meus dois anjinhos de luz, Maluzinha e Luquinhas. Ainda não sou mãe, mas o amor que tenho por eles deve chegar muito próximo disso, um amor infinito, que dou e que recebo, e que conforta, e que preenche, e que transborda!

Ao meu irmão, César Augusto B. Fusco (*i.m.*), por ser meu maior exemplo. Éramos quase gêmeos. Talvez pela diferença de idade de menos de um ano, o que nos permitiu desde sempre ter a mesma turma de amigos e se divertir e fazer quase tudo sempre juntos. Mas ainda assim, apenas este não seria um motivo, sempre teve algo a mais, uma imensa ligação que nos fazíamos sempre juntos sem qualquer esforço. Algo como almas-gêmeas. Agora nada mais é como antes, nem assistir e torcer para o Corinthians será como antes... Mas nosso amor, esse sim nunca mudará, será sempre infinito, seremos sempre ligados, de uma forma ou de outra, como sempre foi!

À Marlene Alvoredó, a grande companheira do meu pai, o que já seria motivo suficiente para gostar muito dela. Mas ela vai além, é sempre educada, carinhosa e prestativa, e ainda me ajuda sempre com a língua inglesa, que ainda não é meu

forte. Ao Aurélio, meu meio-irmão caçula, que mesmo com a pouca convivência, eu o amo como irmão por inteiro!

À todos da minha família, que é muito grande, entre tios e tias, primos e primas, avôs e avós (todos em memória), família em São Caetano, família em Penápolis. Todos são essenciais em minha vida, a todos amo infinitamente, mas cito alguns em especial, que estão sempre junto de mim de alguma forma, com um amor e carinho que vai além: tio Celso, Tia Mariazinha, Kleber, Ju e Bianquinha, Glau, Rodolfo, tia Nê, tia Simone e família, tia Andréa e família, tia Érika, Lelê e Katita.

Às minhas amigas de vida, que vem desde o colégio: Má, Pri, Tati, Mary, Piti e seus respectivos, e suas famílias, pela amizade e amor sincero de sempre!

Aos amigos de vida e pra toda uma vida, irmãos que meu irmão me deixou: Thá Baladei, Cris Nascimento, Leo Domingues, Ju Biscoito, Val Santana, Fred Lagoa, Gu Ribeiro, Tito e Aninha, Vitão e Claudinha, Thiaguinho e Elaine... além de toda a "População". "Amigo é a família que a gente escolhe" Eu sou uma sortuda, pois estes eu nem precisei escolher, meu irmão e a vida já me deram prontos de presente! Cada um com seu jeito me faz sentir a Amizade plenamente, me fazem sentir que posso tê-los comigo a qualquer momento!

Ao Rafa Di Jorge, pelo amor, pelo companheirismo em todos os momentos, e incentivo de todas as formas.

À Tânia Expedita, minha psicóloga, uma profissional excepcional! E mesmo com todo seu profissionalismo, sempre se preocupou comigo e cuida de mim com muito carinho.

Aos tantos amigos veterinários, que mesmo com a distância, sei que estão sempre presentes de alguma forma, em especial, à Carolzinha Marins, pela melhor amizade, melhor apoio, melhor preocupação, melhor parceria, perto ou longe, sabemos que podemos nos fazer presentes a qualquer momento!

Aos animais que participaram deste estudo, meus pequenos camundongos. Eu, como veterinária e ser humano, prezo muito pela vida deles, e procurei a todo momento do estudo, lhes garantir o máximo de bem-estar, além todo meu amor, carinho e respeito-por eles.

À minha eterna anjinha de quatro-patas, Gisa (*i.m.*), que despertou meu dom à veterinária, minha paixão pelos cães e meu amor a todos os animais.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (Fapesp), por acreditar na nossa pesquisa e financiar o nosso projeto, e à mim como aluna. Apoio este que foi fundamental para a execução deste projeto e possibilitou a minha dedicação a ele.

Finalizo dizendo que essa é uma parte muito importante da minha dissertação, já que, diante do mestrado turbulento que tive, eu não estaria conseguindo concluir se não fossem essas pessoas aqui citadas. Ainda poderia falar muito mais de cada uma dessas pessoas para tentar expressar o quanto cada uma delas significa muito para mim, mas daria uma tese inteira. Sendo assim, agradeço principalmente a Deus, pela vida, pela saúde, e pelas pessoas incríveis que ele colocou em meu caminho, por sempre ter me guiado para a melhor parte de todos os caminhos que percorri até hoje, ao longo dos meus 31 anos. Tudo e todos dizem muito sobre o que sou hoje, afinal... "Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós." (Antoine de Saint-Exupéry)

“Há ocasiões em que optamos por acreditar em algo que normalmente seria considerado absolutamente irracional. Isso não significa que seja mesmo irracional, mas certamente não é racional. Talvez exista a supra-racionalidade: a razão além das definições normais dos fatos ou da lógica baseada em dados. Algo que só faz sentido se você puder ver uma imagem maior da realidade.

Talvez seja aí que a fé se encaixe.”

(Livro: A cabana – William P. Young)

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

LISTA DE ABREVIATURA

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Sódio alimentar e risco de doença cardiovascular.....	6
1.2. Uso de anti-hipertensivos	11
1.3. Modelo animal de hipertensão experimental	12
3. OBJETIVO	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1. Modelo animal	17
4.2. Coleta de Sangue	17
4.3. Coleta de urina	17
4.4. Dosagens bioquímicas	18
4.5. Mensuração da pressão arterial sistólica caudal - PAc	18
4.6. Protocolo anestésico	18
4.7. Indução da Hipertensão Renovascular	19

4.7.1 Confeção do clipe de constrição.....	19
4.7.2 Procedimento cirúrgico.....	19
4.8. Obtenção dos cortes aórticos	20
4.9. Análises histopatológicas e quantificação de depósito lipídico no arco aórtico.....	20
4.10. Protocolo experimental	22
4.11. Protocolo experimental	25
4.12. Análise estatística.....	26
5. RESULTADOS.....	27
5.1. Animais normotensos ou hipertensos alimentados com dieta normossódica ou hipossódica	27
5.2. Animais normotensos ou hipertensos alimentados com dieta hipossódica, com ou sem tratamento de fármacos anti-hipertensivos	30
5.3. Peso dos rins	33
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÃO	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Figura representativa do clipe de constrição utilizado para indução de hipertensão renovascular.....19

Figura 2: Análise morfométrica dos cortes realizada pelo programa de análise de imagem.....22

Tabela 1: Peso corpóreo, hematócrito, PA, excreção urinária de sódio (U_{Na}), concentração plasmática de CT, TG e AGL em camundongos *knockout* para o receptor de LDL (LDLR KO) normotensos (N) submetidos à dieta normossódica (NS) ou à restrição de sódio (HS).....28

Tabela 2: Peso corpóreo, hematócrito, PA, excreção urinária de sódio (U_{Na}), concentração plasmática de CT, TG e AGL em camundongos *knockout* para o receptor de LDL (LDLR KO) hipertensos (H) submetidos à dieta normossódica (NS) ou à restrição de sódio (HS).....29

Tabela 3: Peso corpóreo, hematócrito, PA, concentração urinária de sódio (U_{Na}), concentração plasmática de CT, TG e AGL em camundongos *knockout* para o receptor de LDL (LDLR KO) normotensos (N) ou hipertensos (H) submetidos à dieta com restrição de sódio (HS), com ou sem tratamento anti-hipertensivo.....31

Tabela 4: Análise de regressão univariada entre infiltração de lípidos na parede arterial (segmentos I, II, III e IV do arco aórtico) e PA, concentração plasmática de CT, TG e AGL em camundongos *knockout* para o receptor de LDL normotensos ou hipertensos submetidos à dieta normossódica ou à restrição de sódio com ou sem tratamento anti-hipertensivo.....32

Tabela 5: Peso renal absoluto e peso renal relativo ao peso corpóreo em camundongos <i>knockout</i> para o receptor de LDL (LDLR KO) normotensos (N) ou hipertensos (H) submetidos à dieta normossódica (NS) ou à restrição de sódio (HS) com ou sem tratamento anti-hipertensivo.....	33
---	----

Figura 3: Infiltração de lípidos nas camadas íntima e média de diferentes segmentos do arco aórtico.....	34
---	----

LISTA DE ABREVIATURA

AGE - Produto de glicação avançada (*Advanced Glication End*)

AGL - Ácidos graxos livres

ANG - Angiotensina

APOE KO – *Knockout* para a apolipoproteína E

ARAI - Antagonistas dos receptores da angiotensina II

AT - Receptor de Angiotensina II

AVC - Acidente vascular cerebral

CML - Carboximetil-lisina

CT - Colesterol total

DCV – Doença cardiovascular

ECA - Enzima conversora de angiotensina

HAS - Hipertensão arterial sistêmica

HS - Hipossódico

ICAM - Molécula de Adesão Intracelular (*Intercellular Adhesion Molecule*)

IECA - Inibidores da enzima conversora de angiotensina

LDL - Lipoproteína de densidade baixa (*Low Density Lipoprotein*)

LDL KO - *Knockout* para o receptor de lipoproteína de densidade baixa

LOX-1 - receptor de LDL oxidada

LPL - Lipoproteína lipase

MAS – Receptor MAS

mRNA - Ácido Ribonucleico Mensageiro

NADPH oxidase - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Oxidase*)

NS - Normossódico

QM - Quilomícrom

PA - Pressão arterial

PAC - Pressão arterial sistólica caudal

RAGE - Receptor para Produtos de Glicação Avançada (*Advanced Glycation End Receptor*)

ROS - Espécies reativas de oxigênio (Reactive Oxygen Species)

SRAA - Sistema renina-angiotensina-aldosterona

TG – Triglicérides

U_{Na} - Excreção urinária de sódio

VCAM - Molécula de Adesão de Célula Vascular (*Vascular Cell Adhesion Molecule*)

VLDL - Lipoproteína de densidade muito baixa (*Very Low Density Lipoprotein*)

RESUMO

Fusco F.B. ***Losartana e hidralazina previnem o acúmulo arterial de lípides induzido pela restrição alimentar crônica de sódio em animais hipertensos e hiperlipidêmicos*** [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

A restrição alimentar de cloreto de sódio prejudica o perfil de lípides plasmáticos e a sensibilidade à insulina, favorecendo a aterosclerose em modelos animais dislipidêmicos. A hiperlipidemia e a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, isolados ou conjuntamente, estimulam a aterogênese. O objetivo deste estudo foi investigar a influência da restrição crônica de cloreto de sódio na dieta sobre a aterogênese utilizando-se camundongos hiperlipidêmicos (modelo de estudo para aterosclerose) e com hipertensão renovascular. Camundongos *knockout* para o receptor de lipoproteína de densidade baixa (LDLR KO) e com hipertensão renovascular cirurgicamente induzida (hipertensão dependente de angiotensina II endógena; *2-kidney, 1-clip*; 2K1C), tratados ou não com fármacos anti-hipertensivos (losartana ou hidralazina), foram alimentados *ad libitum* com ração contendo baixa concentração de sódio (HS) (0,15% NaCl) ou ração com concentração padrão de sódio (NS) (1,27% NaCl) a partir do desmame até completarem 5 meses de idade. Camundongos hipertensos submetidos à restrição de sódio apresentaram maior concentração plasmática de colesterol total (CT) e triglicérides (TG), quando comparados aos animais alimentados com dieta NS, confirmando nosso estudo anterior com camundongos normotensos. Os camundongos hipertensos alimentados com dieta HS apresentaram maior infiltração de lípides na parede do arco aórtico quando comparados aos animais NS, apesar da redução da pressão arterial (PA) obtida com a restrição de sódio. A dieta LS não alterou o peso corpóreo e o hematócrito dos animais, exceto em relação aos camundongos tratados com losartana os quais apresentaram discreta redução de hematócrito e das concentrações plasmáticas de TG e de ácidos graxos livres (AGL)

justificando, provavelmente, a menor infiltração de lípidos no arco aórtico destes animais. Quando comparados aos animais normotensos alimentados com dieta HS, os camundongos hipertensos tratados com losartana ou hidralazina apresentaram menor infiltração lipídica na vasculatura, sugerindo que mecanismos benéficos dos fármacos anti-hipertensivos sobre o metabolismo possam ter superado o efeito destes fármacos sobre a PA. Este estudo pode contribuir no esclarecimento dos mecanismos de ação dos fármacos anti-hipertensivos sobre a aterogênese e nas questões conflitantes em relação à restrição alimentar de sódio, hipertensão arterial, dislipidemia e doença cardiovascular prematura.

Descritores: Hipertensão Renovascular, Angiotensinas, Dieta hipossódica, Aterosclerose, Colesterol, Triglicérides.

ABSTRACT

Fusco F.B. ***Aortic lipid infiltration in renovascular hypertensive hyperlipidemic mice elicited by dietary sodium chloride restriction improves by losartan and hydralazine*** [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

This study sought to investigate the influence of chronic dietary sodium chloride restriction on atherogenesis utilizing renovascular hypertensive hyperlipidemic mice. Low density lipoprotein receptor knockout (LDLR KO) mice with renovascular hypertension (endogenous angiotensin II-dependent hypertension; 2-kidney, 1-clip - 2K1C), treated or not with antihypertensive drugs losartan or hydralazine, were fed ad libitum either a low-sodium diet (LS) (0.15% NaCl) or a normal-sodium chow (NS) (1.27% NaCl) from weaning to 5 months of age. Hypertensive mice showed higher plasma total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) concentrations on LS than on NS confirming our previous study on normotensive mice. In hypertensive mice aortic lipid infiltration was much greater on LS than on NS in spite of the reduction of the blood pressure (BP) attained by LS. LS did not modify the mouse body weight and hematocrit, however the latter was slightly but significantly diminished in the losartan-treated hypertensive group. In hypertensive mice plasma TG and nonesterified fatty acids (NEFA) levels were significantly reduced by losartan seemingly explaining the most significant of all reduction of aortic lipid infiltration reached in this group. Hypertensive mice fed LS diet either on losartan or hydralazine treatment had lower aortic lipid infiltration, suggesting that other beneficial metabolic actions of these drugs must have overcome their effect on BP, as compared to normotensive mice on LS diet. This study sheds light on mechanisms of action of antihypertensive drugs in atherosclerosis and on the conflicting issues regarding dietary sodium restriction on hypertension, dyslipidemia and premature cardiovascular disease in human populations.

Descriptors: Hypertension, renovascular; Angiotensins; Diet, sodium-restricted; Atherosclerosis; Cholesterol; Triglycerides.

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS), doença de origem multifatorial, é definida como a elevação crônica da pressão arterial (PA) sistêmica em valores acima de 140x90 mmHg [Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; (JAMES *et al.*, 2014); Organização Mundial da Saúde/Sociedade Internacional de Hipertensão (OMS/SIH) (WHO, 2012).

Fatores como obesidade, resistência insulínica, sedentarismo, ingestão inadequada de potássio e consumo excessivo de sódio e álcool contribuem para o desenvolvimento da HAS (CHOBANIAN *et al.*, 2003; WHELTON *et al.*, 2002). A HAS predispõe ao desenvolvimento das doenças isquêmicas vasculares, insuficiência cardíaca, insuficiência renal e eventos cerebrovasculares, levando à morbidade e morte prematura (GILES *et al.*, 2009; SAVOIA *et al.*, 2011; DAUGHERTY *et al.*, 2008; MALIK *et al.*, 2004; REDON *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2007).

A proporção de brasileiros com diagnóstico de HAS aumentou de 21,6%, em 2006, para 24,3% em 2012 (Ministério da Saúde; NUPENS/USP, 2013). Segundo dados da Sociedade Brasileira de Hipertensão (SBH), em 2014, a hipertensão foi diagnosticada em cerca de 30% da população brasileira. A hipertensão tem prevalência maior que 50% na terceira idade e está presente em 5% das crianças e adolescentes, sendo responsável por 40% dos infartos, 80% dos acidentes vasculares cerebrais (AVC) e 25% dos casos de insuficiência renal terminal. No mundo, de acordo com a OMS, cerca de 7 milhões de pessoas morrem a cada ano e 1,5 bilhões adoecem devido à HAS (SBH, 2014).

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) é um sistema neuroendócrino complexo e que está diretamente envolvido na manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico e, conseqüentemente, no controle da PA. Fatores como, diminuição da pressão de perfusão renal ou da concentração de NaCl, estimulam a atividade do SRAA através da liberação de renina pelas células justa-glomerulares (GIESTAS *et al.*, 2010). A renina circulante

converte o angiotensinogênio, um peptídeo inativo sintetizado pelo fígado, em angiotensina I, um decapeptídeo também inativo. Na via clássica, a enzima conversora de angiotensina (ECA), uma dipeptidil-carboxilase encontrada em sua maior parte no endotélio vascular pulmonar, catalisa a conversão da angiotensina I em um octapeptídeo na sua forma ativa, a angiotensina II (ANG II). A meia-vida da ANG II é efêmera (≈ 2 min), devido à rápida clivagem em angiotensina III (ANG III) e angiotensina IV (ANG IV) pelas aminopeptidases. Os efeitos vasoconstritores da ANG II devem-se à sua ligação aos receptores de angiotensina tipo I (AT1) (DAUGHERTY *et al.*, 2008; GIESTAS *et al.*, 2010; HSUEH *et al.*, 2011; SAYER *et al.*, 2014).

Os receptores AT1, amplamente distribuídos pelo organismo, medeiam a maioria dos efeitos fisiológicos e fisiopatológicos atribuídos à ANG II. Sua sinalização resulta em vasoconstrição, inflamação, estresse oxidativo, transcrição de fatores de crescimento responsáveis pela proliferação celular, estimulação da atividade do sistema nervoso simpático que podem ocasionar efeitos cardiovasculares adversos e elevação do potencial aterogênico, por aumento da contratilidade do miocárdio, hipertrofia ventricular, remodelamento cardíaco e aumento das arritmias (FERRARIO *et al.*, 2006; GIESTAS *et al.*, 2010; HSUEH *et al.*, 2011; SAYER *et al.*, 2014). Nos rins, promove o aumento da reabsorção de sódio nos túbulos proximais, inibição da liberação de renina, constrição arteriolar renal, com consequente aumento da taxa de filtração glomerular e redução do fluxo sanguíneo renal, liberação de hormônio antidiurético e de aldosterona, além de retenção de sódio e água no túbulo distal (FERRARIO *et al.*, 2006; GIESTAS *et al.*, 2010; HSUEH *et al.*, 2011; SAYER *et al.*, 2014). Portanto, a síntese crônica de ANG II pode contribuir para o desenvolvimento da hipertensão arterial e complicações associadas, além de processos pró-inflamatórios, pró-trombóticos e aterogênicos (GIESTAS *et al.*, 2010; HSUEH *et al.*, 2011).

Além do receptor AT1, outros tipos de receptores de ANG foram identificados, como os receptores tipos 2 (AT2), 3 (AT3) e 4 (AT4). Os AT2 são abundantes em diversos tecidos durante o período fetal, e sua

expressão diminui após o nascimento, porém a níveis ainda detectáveis. Este receptor é encontrado principalmente no coração e nos vasos sanguíneos (De Gasparo *et al.*, 2000). Frequentemente, a sinalização por meio dos receptores AT2 está relacionada à vasodilatação, anti-proliferação celular (fibroblastos, endotélio, miócitos), melhoria da função cardíaca e diminuição da reabsorção de sódio no tubo proximal. As ações vasculares do receptor AT2 podem ser aumentadas pelo bloqueio do receptor AT1. Assim sendo, alguns dos efeitos benéficos, que ocorrem quando há o bloqueio do AT1, nos vasos sanguíneos, coração e rins, parecem ser mediados, pelo menos em parte, pelo AT2 (Carey *et al.*, 2000). A função dos receptores AT3 ainda não está bem esclarecida. Os receptores AT4 induzem a liberação do inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1), através da ligação da ANG II e também dos seus peptídeos N-terminais ANG III [Angiotensina-(2-8)], que é quase tão potente quanto a Ang II, e ANG IV [Angiotensina-(3-8)], que possui eficácia biológica, mas é um agonista fraco por possuir baixa afinidade com o receptor AT1 (GIESTAS *et al.*, 2010; De Gasparo *et al.*, 2000). Efeitos fisiologicamente importantes também ocorrem por ação da angiotensina 1-7 (ANG 1-7), heptapeptídeo sintetizado a partir da ANG I ou da clivagem da porção C-terminal da ANG II, por ação de carboxipeptidases com homologia estrutural à ECA, designadas ECA 2. Atuando em receptores específicos denominados MAS, a ANG 1-7, contrariamente à ANG II, possui efeitos vasodilatadores e cardioprotetores (GIESTAS *et al.*, 2010).

O INTERHEART STUDY evidenciou que o risco populacional de infarto agudo do miocárdio, atribuível à hipertensão e à dislipidemia, foi de 18% e 49%, respectivamente, considerando diferentes regiões geográficas e etnias no mundo (YUSUF *et al.*, 2004). A hipercolesterolemia está frequentemente associada à hipertensão arterial sistêmica, sendo, ambas, os principais fatores de risco para doenças cardiovasculares (DCV) (CHOBANIAN *et al.*, 2003; DAUGHERTY *et al.*, 2008; FERRARIO *et al.*, 2002).

A hipercolesterolemia estimula a geração de peptídeos de angiotensina (DAUGHERTY *et al.*, 2004) e expressão de receptores AT1 na vasculatura. Estudos experimentais de contração vascular, realizados em anéis aórticos isolados, demonstraram que a vasoconstrição induzida por ANG II foi maior em coelhos hipercolesterolêmicos New Zealand quando comparados aos animais normocolesterolêmicos. A reatividade vascular diferenciada, induzida pela ANG II, resultou do incremento na densidade de receptores AT1 na superfície das células vasculares, fenômeno atribuído à estabilização do mRNA dos receptores AT1 em coelhos hipercolesterolêmicos. Tais resultados indicam que a hipercolesterolemia estimula a expressão e a função dos receptores AT1 *in vivo*. Estes eventos sugerem um novo mecanismo por meio do qual o aumento da concentração plasmática de colesterol pode estar envolvido na gênese e na progressão de doenças vasculares crônicas como, por exemplo, hipertensão, aterosclerose e arteriosclerose (NICKENIG *et al.*, 1997b).

Evidências experimentais associam a ANG II à deposição de lípidos na parede arterial, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), adesão aumentada de monócitos às células endoteliais, modificação das lipoproteínas de densidade baixa (LDL) e aumento na captação de LDL oxidada em macrófagos (CHOBANIAN *et al.*, 1992; FERRARIO *et al.*, 2002; NICKENIG *et al.*, 1997a e 1997b; WEISS *et al.*, 2001a).

Comparada à LDL nativa, a LDL modificada pela ANG II, via receptor AT1, é mais captada pelos receptores *scavenger* de macrófagos (FERRARIO *et al.*, 2002). Além disso, a ANG II, também via receptor AT1, aumenta a atividade das lipoxigenases dos macrófagos, o que aumenta a capacidade destas células de gerarem LDL oxidadas (FERRARIO *et al.*, 2002). Células endoteliais de coronária humana, *in vitro*, apresentam aumento da expressão do receptor de LDL oxidada (LOX-1) e maior captação de LDL oxidada em presença de ANG II, o que foi completamente bloqueado ao realizar-se pré-tratamento com losartana (antagonista do receptor AT1), evidenciando a relevância da interação entre LDL oxidada e ANG II na aterosclerose (LI *et al.*, 1999).

A incubação de células da musculatura lisa vascular, isoladas da aorta torácica de ratas Wistar, com LDL (isolada de plasma de indivíduos normocolesterolêmicos), aumenta a concentração de mRNA para os receptores AT1 de maneira dose-dependente, assim como a densidade desses receptores na superfície celular. Além disso, o aumento da concentração citosólica de cálcio induzido por ANG II é significativamente maior em células da musculatura lisa vascular pré-tratadas com LDL quando comparado ao de células controles sem pré-tratamento com LDL. Estes resultados revelam maior expressão de receptores AT1 nas células vasculares por meio de estabilização do mRNA, levando a uma resposta funcional exacerbada da vasculatura mediante a estimulação por ANG II (NICKENIG *et al.*, 1997a).

Pacientes hipercolesterolêmicos submetidos a infusão de ANG II apresentaram hipertensão e aumento na expressão de receptores AT1 em plaquetas, mais acentuados quando comparados a indivíduos normocolesterolêmicos. A redução da concentração plasmática de colesterol após tratamento com estatina reverteu a hipertensão induzida pela ANG II e diminuiu a densidade celular de receptores AT1 (NICKENIG *et al.*, 1999).

Coelhos hipercolesterolêmicos, camundongos *knockout* para a apolipoproteína E (apo E KO, modelo experimental de hiperlipidemia), e primatas não-humanos tratados com antagonistas de receptores AT1 apresentaram redução do estresse oxidativo e inflamação vascular, melhoria da função endotelial além de redução na progressão da aterosclerose, independentemente de alterações na PA e na concentração dos lípides plasmáticos, ressaltando a importância dos receptores de ANG II na fisiopatologia vascular (DOL *et al.*, 2001; HAYEK *et al.*, 1999; STRAWN *et al.*, 2000; WARNHOLTZ *et al.*, 1999).

Estudo realizado em camundongo duplo *knockout* para apo E e receptor AT1, alimentados com dieta rica em colesterol, evidenciou inibição do estresse oxidativo vascular e da disfunção endotelial, além de redução na formação de placas ateroscleróticas, independentemente da PA e da colesterolemia. Os efeitos observados neste modelo experimental também

se reproduziram em camundongos apo E KO tratados com antagonista para o receptor AT1 (WASSMANN *et al.*, 2004).

O estresse oxidativo, induzido pela ANG II devido ao aumento da produção de ROS, inibe a atividade de enzimas importantes da via glicolítica levando ao desvio de substrato pelas vias metabólicas. Disto resulta a formação de aldeídos bifuncionais, os quais modificam proteínas e lípidos intracelulares, gerando produtos de glicação avançada (AGE), como a carboximetil-lisina (CML) e a carboxietil-lisina. Os AGE, por sua vez, aumentam o estresse oxidativo, criando um ciclo vicioso que resulta em efeito pró-aterogênico do receptor de AGE (RAGE) e seus ligantes (BASTA, 2008; BROWNLEE, 2001; OHGAMI *et al.*, 2003). Estes resultados indicam a existência de um *cross-talk* entre os sistemas AGE-RAGE e renina-angiotensina.

Camundongos duplo *knockout* para o receptor de LDL e para RAGE, alimentados com dieta aterogênica, apresentaram redução significativa na complexidade das lesões ateroscleróticas quando comparados ao grupo controle (camundongos LDLR KO). Tal fato foi associado à redução da expressão de ICAM-1 e VCAM-1, menor estresse oxidativo na parede vascular (ânion superóxido) e diminuição na proliferação de macrófagos, fenômeno que caracteriza o papel do RAGE na patogênese da aterosclerose na vigência da hiperlipidemia (SUN *et al.*, 2009).

1.1. Sódio alimentar e risco de doença cardiovascular

A diminuição no consumo diário de sal pode contribuir substancialmente para a prevenção de eventos cardiovasculares na população geral, sendo este benefício semelhante aos obtidos com a redução do tabagismo, obesidade e da concentração de colesterol na LDL (LDL-colesterol) (BIBBINS-DOMINGO *et al.*, 2010; HE *et al.*, 2007). Assim, a restrição de sal na dieta é recomendada para prevenção e tratamento da HAS (CHOBANIAN *et al.*, 2003), com consequente diminuição dos riscos cardiovasculares envolvidos (BIBBINS-DOMINGO *et al.*, 2010; HE *et al.*, 2007).

Uma meta-análise demonstrou que a redução crônica no consumo de sal, mesmo que modesta, por período maior que quatro semanas, apresenta importante efeito hipotensor tanto em indivíduos normotensos quanto em hipertensos (HE *et al.*, 2002).

Cerca de 60% dos indivíduos hipertensos são considerados sensíveis ao sal, ou seja, respondem à alta ingestão de cloreto de sódio, com aumento da PA e, à restrição deste, com diminuição dos níveis pressóricos e de medicação anti-hipertensiva. Por outro lado, há indivíduos insensíveis à ingestão de NaCl, cuja função renal permite eficiente excreção de seu excesso, sem que ocorra aumento crônico na PA (HADDY, 2006).

Sabe-se que o excesso de sal na dieta, de forma crônica, contribui para o aumento da pressão sanguínea (DAHL *et al.*, 1968; LIMA *et al.*, 2006), e hipertrofia miocárdica do ventrículo esquerdo e da massa renal (LIMA *et al.*, 2006). A redução da PA, mesmo quando em pequena magnitude, pode ser relevante em termos populacionais, uma vez que contribui para diminuir substancialmente a prevalência de acidente vascular cerebral (AVC) e eventos cardiovasculares (STAMLER, 1991). Assim, a redução do consumo de sal é uma conduta preconizada para prevenir e tratar a HAS, com consequente diminuição de riscos cardiovasculares associados (BIBBINS-DOMINGO *et al.*, 2010; HE *et al.*, 2007).

Por outro lado, também tem sido evidenciado que a restrição alimentar crônica de cloreto de sódio, frequentemente, encontra-se associada a efeitos adversos como: diminuição da sensibilidade à insulina (AMES, 2001; FLISER *et al.*, 1995; GARG *et al.*, 2011; TOWNSEND *et al.*, 2007), aumento na atividade dos sistemas nervoso simpático (TADDEI *et al.*, 1995; BROOKS *et al.*, 2001) e renina-angiotensina (SUEMATSU *et al.*, 2010; IVANOVSKI *et al.*, 2005), além de hiperlipidemia (GRAUDAL *et al.*, 2012; CATANOZI *et al.*, 2001 e 2003; NAKANDAKARE *et al.*, 2008; RUPPERT *et al.*, 1994).

Cães alimentados com dieta hipossódica (0,05% de NaCl) apresentaram disfunção endotelial, intensificação da produção de ROS e redução da biodisponibilidade de óxido nítrico decorrentes da maior

concentração de ANG II circulante. Quando esses animais submetidos a dieta pobre em sal foram, simultaneamente, tratados com antagonista do receptor AT1, não houve disfunção endotelial, demonstrando que os efeitos deletérios à vasculatura decorrem da ligação da ANG II ao receptor AT1 com consequente produção de ânion superóxido e prejuízo à síntese de óxido nítrico (HUANG *et al.*, 2010; SUEMATSU *et al.*, 2010).

Camundongos apo E KO alimentados com dieta pobre em sal apresentaram aumento da concentração plasmática de colesterol e de ANG II. A maior área de lesão aterosclerótica na artéria aorta torácica foi positivamente correlacionada com a concentração de ANG II (IVANOVSKI *et al.*, 2005).

Estudo com 227 indivíduos saudáveis submetidos à dieta pobre em cloreto de sódio, durante sete dias, apresentou aumento na concentração plasmática de ANG II, aldosterona e maior resistência insulínica, quando comparados ao período em que foram submetidos à dieta rica em sal (GARG *et al.*, 2011). Pacientes com hipertensão primária, não obesos e não diabéticos foram distribuídos em grupos com sensibilidade ou resistência ao sal, os quais foram submetidos a *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico. Houve uma relação inversa entre a taxa de infusão de glicose com o índice de sensibilidade ao sal, assim como com a excreção urinária de norepinefrina, atividade de renina plasmática e concentração sérica de aldosterona (YATABE *et al.*, 2010).

Ratos Wistar alimentados, desde o período de desmame até 3 meses de idade com dieta pobre em cloreto de sódio apresentaram maior concentração plasmática de glicose, insulina, triglicérides (TG), colesterol e menor taxa de captação de glicose quando comparados aos animais que receberam dieta com concentração normal de sal, após serem submetidos ao *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico (RUIVO *et al.*, 2006). Desta maneira, algumas investigações têm mostrado associação entre a restrição alimentar de cloreto de sódio e a resistência insulínica, sendo que a hiperinsulinemia, a atividade aumentada do sistema nervoso simpático, e a supressão reduzida do sistema renina-angiotensina podem desempenhar

um papel importante nesta relação. Quando músculo sóleo de ratos Zucker não obesos (modelo experimental de síndrome metabólica) foi incubado com insulina e/ou ANG II, durante 2 h, houve inibição significativa do transporte de glicose dependente de insulina (39%) e diminuição da fosforilação (37%) da via de sinalização insulínica em sua porção distal (AKt Ser473 e glicogênio sintase cinase-3 β Ser9), ressaltando o papel da ANG II na resistência insulínica (DIAMOND-STANIC *et al.*, 2010).

Em estudos prévios observou-se que ratos Wistar submetidos a restrição alimentar crônica de NaCl apresentaram hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia decorrentes da diminuição na taxa de remoção plasmática das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), as principais transportadoras de TG na circulação. Além disso, observou-se maior concentração de ácidos graxos livres (AGL), independentemente de alterações na taxa de síntese hepática de VLDL e de peso corporal (CATANOZI *et al.*, 2001).

Devido à associação entre restrição de cloreto de sódio na dieta e a elevação dos lípides plasmáticos, procurou-se investigar se as variações de lipemia em camundongos normotensos e hiperlipidêmicos, submetidos a restrição de sal, estavam relacionadas à intensidade de depósitos lipídicos na íntima arterial. Demonstrou-se que a restrição crônica de sal estimulou a infiltração precoce de lípidos na parede arterial de camundongos *knockout* para o receptor de LDL (receptor B-E). A infiltração de lípidos no arco aórtico correlacionou-se somente com a concentração plasmática de AGL, sugerindo um estado de resistência insulínica (CATANOZI *et al.*, 2003).

A restrição de sal em pacientes não obesos e com hipertensão moderada não tratada alterou adversamente o perfil das lipoproteínas plasmáticas, havendo aumento da trigliceridemia no jejum e após sobrecarga de gordura, do conteúdo de colesterol em quilomícrons e VLDL, além de elevar os marcadores inflamatórios, condições encontradas na síndrome metabólica (NAKANDAKARE *et al.*, 2008). Estudos populacionais mostram que menor excreção urinária de sódio, consequente a diminuição na ingestão de sal, foi associada a maior mortalidade por doença arterial

coronariana (COHEN *et al.*, 2006 e 2008; STOLARZ-SKRZYPEK *et al.*, 2011). Investigações ressaltam uma relação em forma de J entre a ingestão de sódio e a morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares, na qual o consumo de sódio abaixo e acima de 2,5 e 6,0 g/dia, respectivamente, está associado ao aumento do risco cardiovascular (ALDERMAN, 2007; ALDERMAN *et al.*, 2012; O'DONNELL *et al.*, 2011).

Cerca de 23 estudos observacionais que relacionaram a ingestão de sódio às doenças cardiovasculares apresentaram resultados conflitantes (ALDERMAN *et al.*, 2012). A maioria dos estudos encontrou uma associação inversa entre o consumo de sódio e as doenças cardiovasculares em indivíduos com consumo médio de sódio menor que 4,5 g/dia; em indivíduos com consumo médio de sal maior que 4,5 g/dia, a maioria das investigações relatou associações diretas, ou seja, quanto maior a ingestão de sódio, maior o risco cardiovascular. Além disso, três estudos randomizados evidenciaram que os indivíduos com insuficiência cardíaca e que passaram a consumir 1,8 g de sódio, aumentaram significativamente a morbidade e mortalidade em comparação aos que ingeriam 2,8 g de sódio (CHANG *et al.*, 2006; PATERNA *et al.*, 2009 e 2011). Por outro lado, estudo randomizado em homens aposentados no Taiwan demonstrou que a ingestão média de 3,8 g de sódio melhorou a sobrevivência em comparação aos que consumiam 5,3 g de sódio (CHANG *et al.*, 2006; PATERNA *et al.*, 2008).

Portanto, os proponentes da diminuição do consumo alimentar de sódio alegam que a recomendação justifica-se porque foi convincentemente provado que a restrição de sódio diminui a PA, fato que certamente reduz o risco de infarto do miocárdio e AVC. Por outro lado, os céticos quanto aos benefícios da redução do consumo de sal argumentam que tal recomendação não garante um benefício à saúde pública quando se considera a taxa de morbidade ou mortalidade (ALDERMAN, 2010; STOLARZ-SKRZYPEK *et al.*, 2011).

1.2. Uso de anti-hipertensivos

Fármacos utilizados no tratamento da hipertensão incluem: beta-bloqueadores, diuréticos, inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), antagonistas dos receptores da angiotensina II (ARAII), bloqueadores do canal de cálcio, bloqueadores alfa-adrenérgicos e vasodilatadores (GIESTAS *et al.*, 2010).

Os ARA II, além da sua ótima atividade anti-hipertensiva têm, em particular, se mostrado útil em delinear o papel fisiopatológico da ANG II sobre as doenças cardiovasculares. Desenvolvidos desde o início de 1970, atuam como antagonistas seletivos destes receptores em tecidos-alvos, o que inclui, por exemplo, as arteríolas aferentes e eferentes do rim, músculo liso vascular e zona glomerulosa da glândula adrenal, sem efeito significativo conhecido sobre os outros subtipos de receptores (AT₂). Em 1990 foi desenvolvida a losartana, o primeiro ARA II ativo por via oral, e a partir de seus metabólitos foram sintetizados uma ampla classe de ARA II, como, valsartana, irbesartana, telmisartana, candesartana, olmesartana, entre outros (FERRARIO *et al.*, 2006; GIESTAS *et al.*, 2010; GOLDBERG *et al.*, 1995; SMITH *et al.*, 1992).

Um fato que tem sido considerado é que os IECAs bloqueiam a síntese da ANG II apenas na sua via clássica, enquanto a biossíntese desse peptídeo por vias alternativas como a da quimase (catalisa a síntese de ANG II a partir da ANG I, principalmente em tecidos cardiovasculares) permanece desbloqueada. Os antagonistas do receptor de angiotensina II, teoricamente, bloqueiam com maior eficácia os efeitos cardiovasculares da ANG II, por atuarem seletivamente nos receptores AT₁, que são responsáveis por mediar as ações mais conhecidas desse peptídeo (FERRARIO *et al.*, 2006; GIESTAS *et al.*, 2010).

O tratamento da hipertensão arterial por meio de diuréticos ou beta-bloqueadores tem sido associado, frequentemente, a alteração do catabolismo das VLDL, contribuindo para o aumento da trigliceridemia e da colesterolemia (AMES *et al.*, 1976; DAY *et al.*, 1982; SAVAGE *et al.*, 1998).

A hidralazina pertence à classe de medicamentos que reduzem a PA por efeito vasodilatador direto. Exerce seu efeito vasodilatador periférico por meio de ação relaxante direta sobre a musculatura lisa dos vasos de resistência. O mecanismo de ação celular responsável por este efeito não é totalmente conhecido, mas acredita-se que seja por inibir a liberação de íons cálcio do retículo sarcoplasmático dependente de inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) (ELLERSHAW *et al.*, 2001). A hidralazina pode, ainda, sensibilizar ou manter a sensibilidade do tecido vascular através da inibição da NAD(P)H oxidase e, indiretamente, melhorando as ações do óxido nítrico (MUNZEL *et al.*, 1996), porém não necessariamente altera a concentração de ANG II plasmática e renal (BENTER *et al.*, 2011).

No estudo *Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension* (LIFE), a losartana foi mais eficaz que o atenolol (beta-bloqueador) na redução da morbi-mortalidade cardiovascular e mortalidade por todas as causas em pacientes com HAS, conferindo benefícios além da redução da PA (DAHLÖF *et al.*, 2002).

1.3. Modelo animal de hipertensão experimental

O uso de animais como modelo experimental de hipertensão fornece informações importantes sobre os aspectos da HAS, incluindo etiologia, fisiopatologia, complicações e tratamento. O modelo animal ideal para a pesquisa da HAS deve ter a anatomia, hemodinâmica e fisiologia vascular semelhantes às observadas em humanos, além de desenvolver as mesmas características e complicações da HAS no homem, e permitir a medição de variáveis hemodinâmicas e bioquímicas relevantes. Entretanto, nenhum modelo reflete perfeitamente o perfil da HAS humana, havendo, por isso, uma grande variedade de modelos animais disponíveis, para cada aspecto da doença humana. Assim, a escolha do modelo animal é orientada principalmente pelo questionamento experimental (SARIKONDA *et al.*, 2009).

O trabalho pioneiro de Goldblatt *et al.* (1934) levou ao desenvolvimento do primeiro modelo animal de hipertensão arterial, o

modelo de hipertensão 2-rins, 1- clipe (*2-kidney, 1-clip* - 2K1C), por meio da estenose unilateral da artéria renal de cães. Posteriormente, este modelo de hipertensão arterial foi reproduzido em outras espécies. Ambos os rins são preservados, porém um clipe de constrição (à semelhança de uma estenose clínica) é disposto em uma das artérias renais. Na ausência de danos ao rim contralateral, este modelo representa um modelo clássico de hipertensão dependente de angiotensina (SARIKONDA *et al.*, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

Alterações do metabolismo lipídico e de carboidratos tem sido demonstradas na vigência da restrição severa de sódio (CATANOZI *et al.*, 2001 e 2003; LIMA *et al.*, 2006; NAKANDAKARE *et al.*, 2008; RUIVO *et al.*, 2006; PRADA *et al.*, 2005). Estudos prévios, realizados em nosso laboratório, demonstraram que a hipertrigliceridemia, a hipercolesterolemia e a maior concentração de AGL em ratos submetidos à restrição crônica de NaCl são decorrentes de diminuição na taxa de remoção plasmática de VLDL (CATANOZI *et al.*, 2001). Houve infiltração precoce de lípidos na parede arterial de camundongos *knockout* para o receptor de LDL alimentados com ração pobre em sal. Estes depósitos prematuros de lípidos na artéria foram correlacionados com a concentração aumentada de AGL, sugerindo uma condição de resistência insulínica (CATANOZI *et al.*, 2003). A restrição crônica de sódio alterou adversamente o perfil das lipoproteínas plasmáticas, havendo maior conteúdo de colesterol e de lípidos totais em quilomícron (QM) e VLDL, aumento da trigliceridemia de jejum, insulinemia, e de marcadores inflamatórios característicos da síndrome metabólica (proteína C reativa, fator de necrose tumoral alfa e interleucina-6) em pacientes não obesos e com hipertensão moderada não tratada (NAKANDAKARE *et al.*, 2008).

A hiperlipidemia e a ativação do sistema renina-angiotensina são fatores que, mesmo quando isolados, estimulam o desenvolvimento da aterosclerose, sendo que a aterogênese é acelerada quando os mesmos encontram-se associados. Não há estudos demonstrando as implicações da dislipidemia, decorrente da restrição crônica de sódio no tratamento da HAS, sobre a aterogênese. Devem ser considerados, também, os efeitos pró-aterogênicos resultantes da interação da ANG II com o receptor AT1, no qual ocorre aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio, com consequente diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico, maior geração de produtos avançados de glicação e de mediadores inflamatórios.

Desta maneira, a indução de hipertensão arterial renovascular por meio do modelo 2K1C (*2-kidney, 1-clip*; hipertensão dependente de angiotensina II endógena) em camundongos dislipidêmicos (LDLR KO) constitui um importante modelo de hipertensão arterial e hiperlipidemia concomitantes para investigar as implicações da restrição crônica de sódio sobre a patogênese da aterosclerose. O tratamento com fármacos anti-hipertensivos pertencentes a diferentes classes permite avaliar a contribuição dos diferentes mecanismos anti-pressóricos sobre a aterogênese. A utilização de cloridrato de hidralazina viabiliza uma ação anti-hipertensiva dissociada de antagonismo sobre o receptor AT1. Esta condição possibilita investigar os efeitos da ANG II (resultante da dieta pobre em sal), desencadeados a partir de sua ligação aos receptores AT1, sobre os lípides plasmáticos, na ausência de hipertensão arterial.

Por outro lado, a losartana permite estudar os efeitos da ANG II sobre o metabolismo lipídico e a aterosclerose sem a transdução de sinal a partir do receptor AT1.

3. OBJETIVO

Avaliar o efeito da restrição crônica de cloreto de sódio associada ao tratamento anti-hipertensivo com losartana ou hidralazina, sobre o infiltrado de lípidos no arco aórtico de camundongos hipertensos e hiperlipidêmicos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Modelo animal

Os protocolos para utilização de animais deste projeto estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), e aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HC-FMUSP (protocolo nº 341/10). As matrizes dos animais *knockout* para receptor de LDL (modelo experimental para dislipidemia) foram adquiridas comercialmente do *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, Maine, EUA) e possuem base genética dos camundongos C57BL/6J, com manutenção homozigótica da colônia. Os animais são mantidos em biotério convencional (Centro de Manutenção e Experimentação de Animais da Clínica Médica – Disciplina de Reumatologia) com ciclo de 12 h luz/12 h escuro, à temperatura de 22 ± 2 °C, recebendo água e suas respectivas rações *ad libitum*.

4.2. Coleta de Sangue

Todas as determinações bioquímicas foram realizadas em alíquotas de sangue (140 µL) coletadas após os animais permanecerem 12 h sem acesso à ração, porém com livre acesso à água. O sangue foi coletado pela veia caudal, utilizando-se capilares previamente heparinizados. Com esta finalidade, os animais, excetuando-se a cauda, foram envolvidos em toalha com dimensões apropriadas, objetivando-se um procedimento adequado de imobilização (CONYBEARE *et al.*, 1988). O plasma foi obtido por meio de centrifugação do sangue, a 3000 rpm, a 4°C, durante 20 min.

4.3. Coleta de urina

A urina dos animais foi coletada utilizando-se gaiolas metabólicas individuais, apropriadas para camundongos, onde foram mantidos durante 24 h, com livre acesso à ração e à água, para determinação da excreção

urinária de sódio (U_{Na}). A dosagem de sódio urinário foi realizada utilizando fotômetro de chama (FC280, CELM).

4.4. Dosagens bioquímicas

Colesterol total (CT), TG e AGL foram determinados no plasma, por meio de *kits* enzimáticos colorimétricos (Labtest do Brasil e Randox Clinical Solutions). As determinações plasmáticas de TG e CT, assim como a medida do hematócrito, foram realizadas mensalmente.

4.5. Mensuração da pressão arterial sistólica caudal - PAc

A mensuração da pressão sistólica caudal é baseada no princípio da detecção da distensão do vaso arterial causada pelo pulso de sangue que flui através da cauda. Um sensor piezoelétrico altamente sensível detecta a distensão causada pelos pulsos e fornece um sinal que representa a relação da alteração (dP/dt) do pulso que foi análogo à velocidade do pulso. O *cuff* de oclusão e o sensor de pulso foram colocados suavemente sobre a cauda. Foram consideradas apenas as medidas obtidas na ausência de movimentação do animal. O aparelho utilizado é da marca Kent Scientific Corporation, EUA, modelo RTBP 2045. A medida de PAc foi obtida por meio da média de seis aferições consecutivas, durante dois dias consecutivos.

4.6. Protocolo anestésico

Uma hora antes da anestesia, cloridrato de tramadol foi injetado subcutaneamente (12,5 mg/Kg de peso corporal) como procedimento de analgesia preventiva (MOUEDDEN *et al.*, 2007). Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uma mistura de cloridrato de cetamina (Ketalar® - 50 mg/Kg de peso corporal) e cloridrato de xilazina (Rompum® - 10 mg/Kg peso corporal).

4.7. Indução da Hipertensão Renovascular

4.7.1 Confeção do clipe de constrição

O clipe de constrição foi confeccionado utilizando-se uma fita de prata com 0.25 mm de espessura por 1.5 mm de largura. Com o auxílio de um microscópio para dissecação, uma fenda (1 mm de longitude) com espessura de 0,051 mm foi feita na fita metálica e expandida para uma espessura de 0,076 mm. Com a fenda centrada, a fita de prata foi cortada no formato de um retângulo de 1,5x1 mm. As bordas foram arredondadas com uma lâmina (**Figura 1**) (JOHNS *et al.*, 1996).

Figura 1: Figura representativa do clipe de constrição utilizado para indução de hipertensão renovascular.

4.7.2 Procedimento cirúrgico

Os animais foram submetidos a laparotomia mediana crânio-caudal para o posicionamento de um clipe de constrição na artéria renal direita, no segmento proximal à artéria aorta (JOHNS *et al.*, 1996). A seguir, a musculatura abdominal e a pele foram suturadas e os animais mantidos em ambiente moderadamente aquecido para recuperação durante o período pós-cirúrgico imediato. No grupo controle (falso operado), foram realizados os mesmos procedimentos cirúrgicos com exceção da estenose na artéria

renal. Injeção subcutânea de cloridrato de tramadol (12,5 mg/Kg de peso corporal) foi mantida a cada 8 h durante 48 h, após o procedimento cirúrgico. Nos dias subsequentes, cloridrato de tramadol (12,5 mg/Kg de peso corporal) foi administrado no bebedouro até completar uma semana de período cirúrgico. Como antibioticoterapia preventiva pós-operatória, enrofloxacino (Chemitril® injetável 10%) (1 mL/40 Kg de peso corporal) foi administrado subcutaneamente uma vez ao dia, durante 3 dias.

4.8. Obtenção dos cortes aórticos

Após anestesia, os animais foram submetidos a uma toracotomia mediana crânio-caudal, objetivando-se a extração do coração e da artéria aorta. Com auxílio de um estereoscópio, o coração e a artéria aorta foram dissecados e transcordialmente perfundidos com solução gelada de cloreto de sódio 0,9%. e, a seguir, com criopreservante para assegurar a integridade das estruturas histológicas. Posteriormente, as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Utilizando-se um criostato (Leica, modelo CM1800 – Maryland, EUA), foram realizados cortes seriados transversais com 4 µm de espessura no segmento do arco aórtico ao longo de 1 cm de comprimento a partir da raiz aórtica. Foram investigados 4 domínios com 140µm de extensão cada, denominados segmentos I, II, III e IV, com intervalo de 1 mm de comprimento cada, sendo o segmento IV o mais próximo da raiz aórtica. Em seguida, três seções de dez cortes foram obtidas de cada segmento aórtico com intervalo de 100 µm entre cada seção (120 cortes histológicos de cada artéria aorta). Dez cortes de cada segmento foram, aleatoriamente, escolhidos para as análises histológicas. Desta maneira, 40 amostras do arco aórtico de cada animal foram analisadas microscopicamente.

4.9. Análises histopatológicas e quantificação de depósito lipídico no arco aórtico

A infiltração lipídica no espaço subendotelial e na camada média do arco aórtico foram avaliadas através da coloração histológica de *Oil Red O*,

em cada corte histológico, por um investigador experiente e independente do estudo (análise-cega), utilizando um microscópio óptico (Olympus BX51), conectado a uma câmera de vídeo (Olympus Co, St Laurent, Quebec, Canada) e a um programa de análise de imagens (*Image-Pro Plus 6.0*). Para a quantificação da infiltração lipídica no arco aórtico foram obtidas imagens digitais dos cortes histológicos positivamente marcados na área compreendida entre a íntima e a lâmina elástica externa. Uma a três áreas aleatórias foram demarcadas em cada campo utilizando a objetiva de 400x, sendo a área corada pelo *oil-red* quantificada pelo *software*. Durante as demarcações, houve o cuidado de se incluir apenas as áreas comprometidas da íntima e da camada média. Os resultados estão expressos como média percentual da área total comprometida nos cortes histológicos (**Figura 2**).

Figura 2: Análise morfométrica dos cortes realizada pelo programa de análise de imagem. As imagens são digitalizadas para obtenção das microfotografias do vaso em aumento de 400x, seguindo-se da seleção (em verde) da área a ser analisada, que compreende a região do espaço subendotelial e a média (A). Posteriormente, seleciona-se a tonalidade para coloração de Oil Red-O previamente estabelecida na área selecionada (B), seguida da soma das áreas marcadas (em vermelho) pelo padrão dentro da área delimitada (C). Por fim, há a conversão para mensuração da área total da região delimitada (D).

4.10. Protocolo experimental

Camundongos *knockout* para o receptor de lipoproteína de densidade baixa (LDLR KO) foram alimentados, desde o desmame, com rações que contém os seguintes nutrientes (g/100g): caseína (28,7); sacarose (31,3); amido (20,0); óleo de soja (6,0); minerais e vitaminas. Quantidades crescentes de celulose são substituídas por cloreto de sódio. Os camundongos foram aleatoriamente distribuídos em grupos experimentais de acordo com as diferentes concentrações de cloreto de sódio na dieta e/ou fármacos anti-hipertensivos a serem recebidos. Os grupos foram alimentados com uma ração pobre em sal, designada ração hipossódica (HS), contendo 0,15% de cloreto de sódio, ou com ração contendo

concentração padrão de sal (1,27% de NaCl), designada ração normossódica (NS). A ração hipossódica utilizada neste estudo contém a concentração de cloreto de sódio suficiente para o desenvolvimento normal dos roedores (BRENSILVER *et al.*, 1985). O controle do peso corpóreo de cada animal e do consumo de ração por grupo foi iniciado após o desmame, e monitorado três vezes por semana até o final do experimento.

Ao completarem 2,5 meses de idade, o clipe de constrição foi cirurgicamente posicionado na artéria renal dos animais (denominados camundongos hipertensos – H). Uma semana após a cirurgia, iniciou-se o tratamento com fármacos anti-hipertensivos. Neste sentido, camundongos alimentados com ração hipossódica foram redistribuídos em grupos que receberam losartana (20 mg/Kg de peso corporal/dia) ou hidralazina (15 mg/Kg de peso corporal/dia) por meio da água dos bebedouros (FERREIRA *et al.*, 2010), substituídas diariamente. O grupo controle (normotenso - N) foi alimentado com dieta hipossódica ou normossódica sem que houvesse clipe na artéria renal e o tratamento com os anti-hipertensivos. Devido a fotossensibilidade da losartana, os bebedouros foram envolvidos em papel alumínio para serem permanentemente protegidos da luz. Após um mês da implantação do clipe renal, a pressão arterial caudal dos camundongos foi monitorada.

Ao completarem 5 meses de idade, animais de cada grupo experimental foram colocados em gaiolas metabólicas individuais durante um período de 24 h para determinação da excreção urinária de sódio. Também foram efetuadas as medidas finais de PA, hematócrito e das concentrações plasmáticas de CT, TG, AGL. Em seguida, os animais foram submetidos à extração da artéria aorta torácica para as análises histopatológicas.

Assim, foram formados 6 grupos experimentais:

- **Hipertenso Normossódico (H-NS)** – animais com clipe em artéria renal e alimentados com ração normossódica;

- **Hipertenso Hipossódico (H-HS)** – animais com clipe em artéria renal e alimentados com ração hipossódica;
- **Hipertenso Hipossódico + Losartana (H-HS+Los)** – animais com clipe em artéria renal, alimentados com ração hipossódica e tratados com losartana;
- **Hipertenso Hipossódico + Hidralazina (H-HS+Hid)** – animais com clipe em artéria renal, alimentados com ração hipossódica e tratados com hidralazina;
- **Normotenso Hipossódico (N-HS)** – animais apenas alimentados com ração hipossódica.
- **Normotenso Normossódico (N-NS)** - animais apenas alimentados com ração normossódica

4.11. Protocolo experimental

4.12. Análise estatística

As comparações estatísticas foram realizadas com o programa *GraphPad Prism 4* (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, 2003). O teste t de *Student* não pareado foi utilizado para comparação entre os grupos N-NS e N-HS assim como H-NS e H-HS. Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de *Newman-Keuls* foi aplicada para comparações entre os grupos hipossódicos. A análise univariada para examinar o efeito potencial da PA e das concentrações plasmáticas de CT, TG e AGL sobre o acúmulo de lípidos na parede arterial foi realizada por coeficiente de correlação de *Spearman*. Os resultados estão expressos como média $\pm$ D.P. Em todos os casos, foram consideradas significantes todas as situações nas quais o nível descritivo de significância for inferior a 5 % ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Animais normotensos ou hipertensos alimentados com dieta normossódica ou hipossódica

Não houve diferença de peso corpóreo e de hematócrito entre os grupos de animais normotensos ou hipertensos alimentados com dieta normossódica e hipossódica (**Tabelas 1 e 2**). A excreção urinária de sódio de 24 h foi menor nos animais submetidos à dieta hipossódica (**Tabelas 1 e 2**).

Os animais Hipertensos Hipossódicos apresentaram menor PA em comparação aos camundongos Hipertensos Normossódicos (H-HS vs H-NS) (**Tabela 2**). Embora os valores de PA sejam considerados normais nos animais normotensos, ainda assim, observou-se diminuição pressórica no grupo alimentado com dieta hipossódica em relação ao que recebeu ração normossódica (N-HS vs N-NS) (**Tabela 1**).

Com relação às variáveis lipídicas, observou-se que, os animais normotensos alimentados com dieta hipossódica (N-HS) apresentaram maior colesterolemia e trigliceridemia, após 12 h de restrição alimentar, quando comparados ao grupo normotenso sob dieta normossódica (N-NS) (**Tabela 1**). A concentração plasmática de AGL não foi diferente entre estes dois grupos (**Tabela 1**). Os mesmos resultados foram observados comparando-se o grupo Hipertenso Hipossódico (H-HS) ao Hipertenso Normossódico (H-NS) (**Tabela 2**).

A infiltração lipídica nos segmentos III e IV do arco aórtico foi precoce no grupo Hipertenso Hipossódico em relação ao Hipertenso Normossódico (**Figuras J-M**).

Tabela 1: Peso corpóreo, hematócrito, PA, excreção urinária de sódio (U_{Na}), concentração plasmática de CT, TG e AGL em camundongos *knockout* para o receptor de LDL (LDLR KO) normotensos (N) submetidos à dieta normossódica (NS) ou à restrição de sódio (HS)

	N-NS	N-HS
	(n=7)	(n=8)
Peso corpóreo (g)	24,5 ± 0,6	22,6 ± 0,9
Hematócrito (%)	51 ± 2	53 ± 4
PA (mmHg)	76 ± 3	67 ± 7 ^a
U_{Na} (mEq/24h)	0,043 ± 0,015	0,024 ± 0,008 ^a
CT (mg/dL)	506 ± 32	644 ± 108 ^a
TG (mg/dL)	165 ± 15	265 ± 66 ^a
AGL (mmol/L)	1,97 ± 0,17	1,64 ± 0,77

Camundongos LDLR KO machos, com 5 meses de idade, sem clipe de constrição na artéria renal (normotensos – N) alimentados *ad libitum* com dieta NS ou HS, durante 130 dias. Os resultados estão expressos como média ± D.P.; número de animais (n). O teste t de Student foi utilizado para comparações entre os grupos. ^aP <0,05 N-NS vs N-HS.

Tabela 2: Peso corpóreo, hematócrito, PA, excreção urinária de sódio (U_{Na}), concentração plasmática de CT, TG e AGL em camundongos *knockout* para o receptor de LDL (LDLR KO) hipertensos (H) submetidos à dieta normossódica (NS) ou à restrição de sódio (HS)

	H-NS (n=8)	H-HS (n=8)
Peso corpóreo (g)	24,7 ± 1,7	22,8 ± 2,5
Hematócrito (%)	52 ± 3	53 ± 2
PA (mmHg)	131 ± 4	107 ± 3 ^a
U_{Na} (mEq/24h)	0,077 ± 0,047	0,027 ± 0,018 ^a
CT (mg/dL)	544 ± 60	721 ± 190 ^a
TG (mg/dL)	126 ± 72	224 ± 34 ^a
AGL (mmol/L)	1,38 ± 0,27	1,74 ± 0,47

Camundongos LDLR KO machos, com 5 meses de idade, com clipe de constrição na artéria renal direita (hipertensos - H) alimentados ad libitum com dieta NS ou HS, durante 130 dias. Os resultados estão expressos como média ± D.P.; número de animais (n). O teste t de Student foi utilizado para comparações entre os grupos. ^aP < 0,05 H-NS vs H-HS.

5.2. Animais normotensos ou hipertensos alimentados com dieta hipossódica, com ou sem tratamento de fármacos anti-hipertensivos

Não houve diferença em relação ao peso corpóreo, excreção urinária de sódio e às concentrações plasmáticas de colesterol entre os grupos sob restrição de sódio (**Tabela 3**). Os camundongos tratados com losartana apresentaram redução de hematócrito, TG e AGL em relação aos demais animais sob restrição de sal (**Tabela 3**). Houve redução da PA nos grupos H-HS+Los, H-HS+Hid e N-HS quando comparados aos animais H-HS (**Tabela 3**).

A infiltração de lípidos foi menor nos segmentos I e II do arco aórtico dos animais tratados com losartana em relação aos demais grupos hipossódicos (H-HS+Los vs N-HS, H-HS e H-HS+Hid) (**Figuras A-I**). Nos segmentos III e IV do arco aórtico observou-se que o acúmulo precoce de lípidos foi maior nos animais Normotensos Hipossódicos do que em ambos os grupos que receberam fármacos anti-hipertensivos (N-HS vs H-HS+Los e HS+Hid). Os grupos Normotenso Hipossódico e Hipertenso Hipossódico apresentaram maior área vascular com infiltrado lipídico em relação aos demais animais hipertensos tratados com anti-hipertensivos (**Figuras O-X**). Em todos os segmentos aórticos estudados, os animais que receberam losartana apresentaram menor infiltração lipídica vascular quando comparados aos grupos H-HS e H-HS+Hid (**Figuras A-I e O-X**).

Considerando-se a PA e os lípidos plasmáticos (CT, TG e AGL), o coeficiente de *Spearman* indica que somente as concentrações plasmáticas de TG e AGL correlacionaram-se com as áreas de infiltrados lipídicos do arco aórtico (**Tabela 4**).

Tabela 3: Peso corpóreo, hematócrito, PA, concentração urinária de sódio (U_{Na}), concentração plasmática de CT, TG e AGL em camundongos *knockout* para o receptor de LDL (LDLR KO) normotensos (N) ou hipertensos (H) submetidos à dieta com restrição de sódio (HS), com ou sem tratamento anti-hipertensivo

	N-HS (n=8)	H-HS (n=8)	H-HS + LOS (n=7)	H-HS + HID (n=8)
Peso corpóreo (g)	22,6 ± 0,9	22,8 ± 2,5	21,2 ± 2,5	24 ± 0,5
Hematócrito (%)	53 ± 4	53 ± 2	45 ± 4 ^a	48 ± 3
PA (mmHg)	69 ± 7	107 ± 3 ^a	59 ± 4	65 ± 6
U_{Na} (mEq/24h)	0,024 ± 0,008	0,027 ± 0,018	0,027 ± 0,008	0,020 ± 0,009
CT (mg/dL)	644 ± 108	721 ± 190	763 ± 99	583 ± 107
TG (mg/dL)	265 ± 66	224 ± 34	145 ± 93 ^a	241 ± 73
AGL (mmol/L)	1,64 ± 0,77	1,74 ± 0,47	1,01 ± 0,26 ^a	1,84 ± 0,52

Camundongos LDLR KO, machos, com 5 meses de idade, sem (N) ou com clipe de constrição na artéria renal direita (hipertensão renovascular – H) alimentados ad libitum com dieta HS, durante 130 dias. Animais H-HS foram tratados durante 2,5 meses com losartana (Los) ou hidralazina (Hid) na água do bebedouro. Os resultados estão expressos como média ± D.P.; número de animais (n). Utilizou-se Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de Newman-Keuls para comparações entre os grupos HS. ^aP < 0,05 vs demais grupos.

Tabela 4: Análise de regressão univariada entre infiltração de lípidos na parede arterial (segmentos I, II, III e IV do arco aórtico) e PA, concentração plasmática de CT, TG e AGL em camundongos *knockout* para o receptor de LDL normotensos ou hipertensos submetidos à dieta normossódica ou à restrição de sódio com ou sem tratamento anti-hipertensivo

VARIÁVEIS	R		P	
	Segmento s I, II	Segmento s III, IV	Segmento s I, II	Segmentos III, IV
Colesterol total	0,005	0,245	0,982	0,299
Triglicérides	0,688 ^a	0,582 ^a	0,001	0,007
Ácidos graxos livres	0,358	0,478 ^a	0,122	0,033
Pressão arterial	- 0,124	0,176	0,604	0,457

Análise de correlação de Spearman considerando-se as áreas vasculares infiltradas com lípidos e PA, concentrações plasmáticas de CT, TG e AGL. ^a Correlação significativa. n=20 camundongos.

5.3. Peso dos rins

O peso do rim direito (com clipe de constrição na artéria renal) foi menor quando comparado ao esquerdo (sem clipe de constrição na artéria renal) nos animais submetidos à hipertensão renovascular (**Tabela 5**). Não foram observadas alterações de massa renal nos animais sem clipe de constrição em ambas as artérias renais (**Tabela 5**).

Tabela 5: Peso renal absoluto e peso renal relativo ao peso corpóreo em camundongos *knockout* para o receptor de LDL (LDLR KO) normotensos (N) ou hipertensos (H) submetidos à dieta normossódica (NS) ou à restrição de sódio (HS) com ou sem tratamento anti-hipertensivo

GRUPO	RIM DIREITO		RIM ESQUERDO	
	Absoluto	Relativo	Absoluto	Relativo
	(mg)	(mg/g)	(mg)	(mg/g)
H-NS (n=8)	60 ± 50 ^a	2,56 ± 2,25 ^b	210 ± 30	8,41 ± 1,16
H-HS (n=8)	20 ± 10 ^a	1,04 ± 0,41 ^b	200 ± 60	8,63 ± 1,78
H-HS+Los (n=7)	20 ± 10 ^a	1,16 ± 0,27 ^b	190 ± 30	8,87 ± 0,63
H-HS+Hid (n=8)	30 ± 5 ^a	1,15 ± 0,20 ^b	200 ± 20	8,29 ± 1,03
N-HS (n=8)	150 ± 30	6,63 ± 0,85	150 ± 30	6,53 ± 1,04
N-NS (n=7)	170 ± 20	6,76 ± 0,67	160 ± 20	6,71 ± 0,72

Camundongos LDLR KO, machos, com 5 meses de idade, sem (N) ou com clipe de constrição na artéria renal direita (hipertensão renovascular – H) alimentados ad libitum com dieta NS ou HS, durante 130 dias. Animais H-HS foram tratados durante 2,5 meses com losartana (Los) ou hidralazina (Hid) na água do bebedouro. Os resultados estão expressos como média ± D.P.; número de animais (n). O teste t de Student foi utilizado para comparações entre os grupos. ^a P<0,0001 rim direito (RD) vs rim esquerdo (RE) (valores absolutos) e ^b P<0,0001 RD vs RE (valores relativos). Peso renal relativo: (mg de peso renal/g de peso corpóreo).

Figura 3. Infiltração de lípidos nas camadas íntima e média de diferentes segmentos do arco aórtico. **Painel superior:** Maior infiltração de lípidos nos segmentos aórticos I e II em N-HS (A, B) e H-HS (C, D) quando comparada ao grupo H-HS+Los (E, F). O acúmulo lipídico foi mais tênue em camundongos H-HS+Los do que em H-HS+Hid (G, H, I). **Painel intermediário:** Maior infiltração de lípidos nos segmentos aórticos III e IV de animais H-HS (L, M) quando comparada ao grupo H-NS (J, K, N). **Painel inferior:** Maior infiltração de lípidos nos segmentos aórticos III e IV de animais N-HS (O, P) e H-HS (Q, R) quando comparada aos grupos H-HS+Los (S, T) e H-HS+Hid (U, V). Observe o menor acúmulo lipídico no arco aórtico dos camundongos H-HS+Los em relação aos animais H-HS+Hid (X). Hematoxilina eosina (HE) A,C,E,G,J,L,O,Q,S,U, 50µm; Oil red B,D,F,H,I,K,M,N,P,R,T,V,X, 50µm. ADV=adventícia, MED=média, INT=íntima. A seta indica infiltração lipídica. Teste t de Student foi utilizado para comparação entre os grupos H-NS e H-HS (N). ^b $P < 0,05$ H-NS vs H-HS. Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de Newman-Keuls foi aplicada para comparações entre os grupos HS (I,X). ^a $P < 0,05$ H-HS+Los vs demais grupos. ^c $P < 0,05$ H-HS+Hid vs N-HS e H-HS.

6. DISCUSSÃO

A HAS é um importante fator de risco cardiovascular. A redução do consumo de sal é uma conduta não farmacológica preconizada para prevenir e tratar a HAS, com consequente diminuição de riscos cardiovasculares associados (BIBBINS-DOMINGO *et al.*, 2010; HE *et al.*, 2007). Porém, sabe-se que a restrição crônica de sódio na dieta leva à diminuição da sensibilidade à insulina (AMES, 2001; FLISER *et al.*, 1995; GARG *et al.*, 2011; TOWNSEND *et al.*, 2007), aumento na atividade dos sistemas nervoso simpático (TADDEI *et al.*, 1995; BROOKS *et al.*, 2001) e renina-angiotensina (SUEMATSU *et al.*, 2010; IVANOVSKI *et al.*, 2005), além de hiperlipidemia (GRAUDAL *et al.*, 2012; CATANOZI *et al.*, 2001 e 2003; NAKANDAKARE *et al.*, 2008; RUPPERT *et al.*, 1994).

Na presente investigação, avaliou-se o efeito da restrição alimentar crônica de sódio, associada a tratamento anti-hipertensivo com losartana ou hidralazina, sobre o infiltrado de lípides na aorta de camundongos hipertensos e dislipidêmicos. Em outras palavras, investigamos se a redução da PA por meio da restrição de sódio alimentar é capaz de modular a aterogênese em modelo animal de hipertensão e dislipidemia.

O modelo de hipertensão experimental de Goldblatt (1934), 2K1C (2-*kidney*, 1-*clip*) aplicado em camundongos LDLR KO foi bem estabelecido, conforme evidenciado pela elevação da PA e pela diferença de massa entre os rins direito (com artéria renal cirurgicamente estenosada) e esquerdo (sem clipe constritor na artéria). Observou-se aumento compensatório da massa renal esquerda decorrente da hipoperfusão no rim direito. Não houve alteração de peso entre os rins nos animais sem clipe de constrição nas artérias renais. Os grupos tratados com dieta hipossódica apresentaram diminuição de PA quando comparados aos animais alimentados com dieta normossódica, mostrando o efeito hipotensor da restrição de NaCl. A redução da PA foi potencializada pelo uso dos fármacos anti-hipertensivos concomitante à restrição de sódio na dieta.

Ressalta-se que, neste estudo, não houve diferença de peso corpóreo e de hematócrito entre os grupos de animais normotensos ou hipertensos

alimentados com dieta normossódica e hipossódica, evidenciando que não houve interferência destes parâmetros sobre as alterações lipídicas encontradas.

Houve redução de hematócrito nos animais que receberam administração de losartana. Há evidências que a ANG II é um regulador fisiologicamente importante da eritropoiese. A ANG II é um fator de crescimento de progenitores eritróides que, em colaboração com a eritropoetina, aumenta a massa de hemácias. Além disso, a ANG II atua como um secretagogo de eritropoetina. Estes mecanismos explicam a diminuição de hematócrito mediante a utilização dos inibidores da enzima de conversão de ANG II e dos antagonistas dos receptores AT1 ou, ainda, para a anemia observada em diversas condições clínicas (VLAHAKOS *et al.*, 2010).

A dosagem do sódio urinário ratificou a concentração de sódio das respectivas dietas oferecidas aos animais e comprovou a eficácia do protocolo experimental.

No presente estudo, o aumento da colesterolemia e da trigliceridemia nos grupos tratados com dieta hipossódica (N-NS vs N-HS e H-NS vs H-HS) corrobora os resultados obtidos em estudos prévios do laboratório (CATANOZI *et al.*, 2001; 2003; NAKANDAKARE *et al.*, 2008), nos quais foram observados hiperlipidemia decorrente de menor remoção plasmática VLDL após restrição de NaCl (CATANOZI *et al.*, 2001). Este fenômeno está relacionado a uma atividade prejudicada da enzima lipoproteína lipase (LPL), a qual hidrolisa TG do núcleo da VLDL e quilomícrons na circulação. O aumento da concentração de colesterol e de lípidos totais em QM e VLDL, mediante a restrição crônica de NaCl, está relacionada à resistência insulínica (NAKANDAKARE *et al.*, 2008). Embora a resistência insulínica não tenha sido investigada neste estudo, sabe-se que na sua vigência há diminuição de atividade da enzima LPL, o que favorece o desenvolvimento de hipertrigliceridemia (ZHANG, 2009). Investigações têm ressaltado importantes associações entre funções hemodinâmicas e não-hemodinâmicas da ANG II com o estado de resistência insulínica. Neste

sentido, a administração intravenosa de ANG II (100 ng/Kg/min) em ratos Sprague-Dawley, durante 120 min, reduziu a sinalização insulínica, o volume de sangue microvascular e a captação muscular de glicose (CHAI *et al.*, 2010). O bloqueio do receptor AT1 com losartana aumentou em aproximadamente 30% o volume de sangue microvascular, indicando um potente efeito vasoconstritor (hemodinâmico) sobre a circulação muscular (CHAI *et al.*, 2010). Estudos em humanos confirmaram esta relação, demonstrando que a ANG II diminui o fluxo sanguíneo microvascular à musculatura esquelética e que este efeito é revertido com a administração de bloqueador do receptor AT1 (GOOSSENS *et al.*, 2004; SAUDER *et al.*, 2012).

A ligação da ANG II ao receptor AT1 aumenta a produção de endotelina 1, um potente vasoconstritor, e de superóxido, o qual promove a conversão de óxido nítrico a peroxinitrito reduzindo, desta forma, a biodisponibilidade de óxido nítrico (LAPLANTE *et al.*, 2005).

Em relação aos efeitos não-hemodinâmicos da ANG II sobre a resistência insulínica, tem sido mostrado que a ligação da ANG II ao receptor AT1 influencia negativamente a translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) à membrana plasmática, a captação de glicose estimulada por insulina e a sinalização intracelular desencadeada pela insulina na musculatura esquelética (VELLOSO *et al.*, 1996; OGIHARA *et al.*, 2002, DIAMOND-STANIC *et al.*, 2010). Músculo sóleo de ratos Zucker incubado, *in vitro*, com insulina e ANG II apresentou redução de 39% na captação de glicose dependente de insulina quando comparado às preparações que continham somente músculo e insulina. Os resultados do estudo indicaram que a ANG II deve ter prejudicado a sinalização intracelular, deflagrada pela insulina, mediante a geração de espécies reativas de oxigênio (DIAMOND-STANIC *et al.*, 2010). Desta maneira, no presente estudo, a diminuição nas concentrações plasmáticas de TG e AGL observada nos camundongos tratados com losartana, bloqueador seletivo do receptor AT1, pode ser proveniente de melhoria no estado de resistência insulínica suscitada pela restrição de sal e pela hipertensão renovascular, ambas implicadas na

estimulação do SRAA. A melhoria do perfil lipídico pode justificar o menor acúmulo arterial de lípidos nos animais tratados com losartana. Estes achados podem ser reforçados pela análise de regressão univariada que mostrou uma relação positiva entre a infiltração de lípidos na parede arterial do arco aórtico e as concentrações circulantes de TG e AGL. Assim como previamente publicado (GARG *et al.*, 2014; PRADA *et al.*, 2005), estas alterações sugerem um estado de resistência insulínica proveniente da restrição alimentar crônica de cloreto de sódio. Deve ser considerado que a restrição de sódio, isoladamente ou associada à hidralazina, reduziu a PA de maneira similar à losartana (N-HS vs HS+Los e H-HS+Hid vs H-HS+Los), porém, sem apresentar a mesma eficiência desta última em relação à proteção da vasculatura contra a infiltração lipídica. Entretanto, existem evidências convincentes de que a ANG II estimula o desenvolvimento da aterosclerose. Estudos desenvolvidos com camundongos duplo *knockout* para apolipoproteína E e para o receptor AT1 subtipo A (AT1_A) e com camundongos duplo *knockout* para o receptor de LDL e para o receptor AT1_A mostraram menor desenvolvimento de placa aterosclerótica, independentemente de alterações na concentração plasmática de lípidos e na PA, quando comparados aos respectivos controles que expressavam receptor AT1_A. Portanto, outros mecanismos pró-ateroscleróticos do SRAA, desvinculados das concentrações plasmáticas de CT, TG e AGL, não devem ser negligenciados (WASSMANN *et al.*, 2004; DAUGHERTY *et al.*, 2004). Os receptores de angiotensina tipo 2 (AT2) podem atuar como antagonistas dos receptores AT1 na modulação da PA, reatividade vascular e apoptose (SIRAGY *et al.*, 2001; YAMADA *et al.*, 1999). Deve ser ressaltado que não houve aumento compensatório da expressão de receptor AT2 nos camundongos *knockout* para o receptor AT1_A. Além disso, a deficiência de receptor AT2 em camundongos não apresentou efeito sobre a área de lesão vascular (DAUGHERTY *et al.*, 2004). Tem sido sugerido diversos mecanismos potenciais pelos quais a ANG II promove a aterosclerose. Além de alterações em PA (WEISS *et al.*, 2001b), pode-se mencionar potentes estímulos para a geração de ROS com consequente aumento da expressão

de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento redox-sensíveis implicados na patogênese da aterosclerose com atuação de agentes quimiotáticos e moléculas de adesão (WEISS *et al.*, 2001b).

Os resultados do presente estudo, no qual houve menor acúmulo de lípidos na parede arterial de animais submetidos à restrição de sódio e tratados com losartana, reforçam os achados da literatura, descritos acima, que enfatizam a influência da sinalização intracelular, a partir do receptor AT1, assim como do bloqueio do SRAA na aterogênese.

A maior infiltração lipídica nos segmentos III e IV do arco aórtico dos camundongos hipertensos submetidos somente a restrição de sal pode ser decorrente da maior PA quando comparados ao grupo tratado com hidralazina (H-HS vs H-HS+Hid) uma vez que não houve diferença em relação ao peso corpóreo e às concentrações plasmáticas de CT, TG e AGL. Por outro lado, embora a PA tenha sido maior nos animais H-HS a infiltração vascular de lípidos, assim como a concentração de lípidos circulantes, não foram diferentes em comparação ao grupo normotenso hipossódico (H-HS vs N-HS). Com os resultados obtidos, torna-se difícil estimar a influência efetiva da PA sobre a aterogênese precoce.

Os resultados deste estudo mostram que, apesar do efeito hipotensor, a restrição alimentar crônica de cloreto de sódio favoreceu a dislipidemia (com elevação de CT e TG no plasma) (N-HS vs N-NS e H-HS vs H-NS), assim como o acúmulo precoce de lípidos na parede do arco aórtico em relação à dieta normossódica (H-HS vs H-NS).

Embora haja consenso para diminuição do consumo de sódio, visando a redução da PA, alterações metabólicas provocadas pela restrição alimentar de sódio (diminuição da sensibilidade à insulina, aumento na atividade dos sistemas nervoso simpático e renina-angiotensina e hiperlipidemia) podem reduzir a eficiência na prevenção de doenças cardiovasculares. A hipertensão arterial frequentemente está associada ao diabetes tipo 2 e dislipidemias, sendo indicada a redução do consumo de sal para estes indivíduos. Neste sentido, estudo prospectivo com 638 indivíduos com diabetes tipo 2 mostrou que a menor excreção urinária de sódio de 24 h

foi independentemente associada à maior mortalidade cardiovascular. Desta maneira, sugere-se que adequações na recomendação populacional para reduzir o consumo de sal devam ser realizadas de acordo com a presença das diferentes doenças associadas à hipertensão (EKINCI *et al.*, 2011).

A redução moderada do consumo alimentar de sal, geralmente, tem sido eficaz para reduzir a pressão arterial (JAMES *et al.*, 2014). A diminuição do consumo alimentar de sal de 9-12g/dia para o nível recomendado de menos de 5-6g/dia tem efeitos benéficos tanto na prevenção quanto para o tratamento da hipertensão arterial essencial. A OMS tem recomendado intensamente a diminuição da ingestão de sal como uma das ações globais prioritárias e tem estimulado os países a instaurarem medidas que reduzam a ingestão de sal para diminuir o risco de mortalidade por hipertensão, doenças cardiovasculares e acidente vascular cerebral (WHO, 2012). No entanto, alguns achados indicam aumento do risco de morbidade e mortalidade por DCV em condições extremas de baixa ingestão de sal. Pesquisas futuras poderão informar as estratégias assim como as metas ideais de redução do consumo populacional de sódio. Deve ser ressaltado que o modelo experimental utilizado no presente estudo permite compreender a interação da restrição crônica de sódio, com SRAA, hipertensão arterial e as concentrações dos lípides plasmáticos e sua influência na aterogênese. Entretanto, os resultados obtidos a partir deste modelo experimental não podem se contrapor aos objetivos de redução do consumo mundial de sal conforme as recomendações do *American Heart Association* (LLOYD-JONES *et al.*, 2010; APPEL *et al.*, 2011) e da OMS (WHO, 2012).

7. CONCLUSÃO

Apesar do efeito hipotensor, a restrição alimentar crônica de sódio favoreceu o aumento da concentração plasmática de colesterol e de triglicérides, assim como o acúmulo precoce de lípidos na parede do arco aórtico em relação à dieta normossódica nos camundongos hipertensos e hiperlipidêmicos. No entanto, o tratamento com losartana ou hidralazina reduziu o infiltrado de lípidos na aorta independentemente da ação destes fármacos sobre a pressão arterial.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDERMAN MH. Presidential Address: 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension: dietary sodium and cardiovascular disease: the 'J'-shaped relation. *J Hypertens*. 2007;25(5):903-7.

ALDERMAN MH. Reducing dietary sodium: the case for caution. *JAMA*. 2010;303(5):448-9.

ALDERMAN MH, COHEN HW. Dietary sodium intake and cardiovascular mortality: controversy resolved? *Curr Hypertens Rep*. 2012;14(3):193-201.

AMES RP, HILL P. Elevation of serum lipid levels during diuretic therapy of hypertension. *Am J Med*. 1976;61(5):748-57.

AMES RP. The effect of sodium supplementation on glucose tolerance and insulin concentrations in patients with hypertension and diabetes mellitus. *Am J Hypertens*. 2001;14(7 Pt 1):653-9.

APPEL LJ, FROHLICH ED, HALL JE, PEARSON TA, SACCO RL, SEALS DR, SACKS FM, SMITH SC JR, VAFIADIS DK, VAN HORN LV. The importance of population-wide sodium reduction as a means to prevent cardiovascular disease and stroke: a call to action from the American Heart Association. *Circulation*. 2011;123(10):1138-43.

BASTA G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis*. 2008;196(1):9-21.

BENTER IF, YOUSIF MH, ALSALEH FM, RAGHUPATHY R, CHAPPELL MC, DIZ DI. Angiotensin-(1-7) blockade attenuates captopril- or hydralazine-induced cardiovascular protection in spontaneously hypertensive rats treated with NG-nitro-L-arginine methyl ester. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011;57(5):559-67.

BIBBINS-DOMINGO K, CHERTOW GM, COXSON PG, MORAN A, LIGHTWOOD JM, PLETCHER MJ, GOLDMAN L. Projected effect of dietary salt reductions on future cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2010;362(7):590-9.

BRENSILVER JM, DANIELS FH, LEFAVOUR GS, MALSEPTIC RM, LORCH JA, PONTE ML, et al. Effect of variations in dietary sodium intake on sodium excretion in mature rats. *Kidney Int*. 1985;27:497-502.

BROOKS VL, SCROGIN KE, MCKEOGH DF. The interaction of angiotensin II and osmolality in the generation of sympathetic tone during changes in dietary salt intake. *Ann NY Acad Sci*. 2001;940:380-94.

BROWNLEE M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20.

CAREY, R.M., WANG, Z.Q., SIRAGY, H.M. Role of the Angiotensin Type 2 Receptor in the Regulation of Blood Pressure and Renal Function. *Hypertension*. 2000;35:155-163.

CATANOZI S, ROCHA JC, NAKANDAKARE ER, PASSARELLI M, MESQUITA CH, SILVA AA, DOLNIKOFF MS, HARADA LM, QUINTÃO ECR, HEIMANN JC. The rise of plasma lipid concentration elicited by dietary sodium chloride restriction in Wistar rats is due to an impairment of the plasmatriacylglycerol removal rate. *Atherosclerosis*. 2001;158:81-6.

CATANOZI S, ROCHA JC, PASSARELLI M, GUZZO ML, ALVES C, FURUKAWA LNS, NUNES VS, NAKANDAKARE ER, HEIMANN JC, QUINTÃO ECR. Dietary sodium chloride restriction enhances aortic wall lipid storage and raises plasma lipid concentration in LDL receptor knockout mice. *J Lipid Res*. 2003;44(4):727-32.

CHAI W, WANG W, LIU J, BARRETT EJ, CAREY RM, CAO W, LIU Z. Angiotensin II type 1 and type 2 receptors regulate basal skeletal muscle microvascular volume and glucose use. *Hypertension*. 2010;55(2):523-30.

CHANG HY, HU YW, YUE CS, WEN YW, YEH WT, HSU LS, TSAI SY, PAN WH. Effect of potassium-enriched salt on cardiovascular mortality and medical expenses of elderly men. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(6):1289-96.

CHOBANIAN AV, HAUDENSCHILD CC, NICKERSON C, HOPE S. Trandolapril inhibits atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Hypertension*. 1992;20(4):473-7.

CHOBANIAN AV, BAKRIS GL, BLACK HR, CUSHMAN WC, GREEN LA, IZZO JL Jr, JONES DW, MATERSON BJ, OPARIL S, WRIGHT JT Jr, ROCCELLA EJ; National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*. 2003;289(19):2560-72.

COHEN HW, HAILPERN SM, FANG J, ALDERMAN MH. Sodium intake and mortality in the NHANES II follow-up study. *Am J Med*. 2006;119(3):275.e7-14.

COHEN HW, HAILPERN SM, ALDERMAN MH. Sodium intake and mortality follow-up in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Gen Inter Med*. 2008;23(9):1297-302.

CONYBEARE G, LESLIE GB, ANGLES K, BARRETT RJ, LUKE JS, GASK DR. An improved simple technique for the collection of blood samples from rats and mice. *Lab Anim*. 1988;22(2):177-82.

DAHL LK, KNUDSEN KD, HEINEMA, LEITL GJ. Effects of chronic excess salt ingestion. Modification of experimental hypertension in the rat by variations in the diet. *Circ Res*. 1968;22(1):11-8.

DAHLÖF B, DEVEREUX RB, KJELDSSEN SE, JULIUS S, BEEVERS G, DE FAIRE U, FYHRQUIST F, IBSEN H, KRISTIANSSON K, LEDERBALLE-PEDERSEN O, LINDHOLM LH, NIEMINEN MS, OMVIK P, OPARIL S, WEDEL H, LIFE Study Group. Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomized trial against atenolol. *Lancet*. 2002;359(9311):995-1003.

DAUGHERTY A, RATERI DL, LU H, INAGAMI T, CASSIS LA. Hypercholesterolemia stimulates angiotensin peptide synthesis and contributes to atherosclerosis through the AT1A receptor. *Circulation*. 2004;110(25):3849-57.

DAUGHERTY A, LU H, RATERI DL, CASSIS LA. Augmentation of the renin-angiotensin system by hypercholesterolemia promotes vascular diseases. *Future lipidol*. 2008;3(6):625-36.

DAY JL, METCALFE J, SIMPSON CN. Adrenergic mechanism in control of plasma lipid concentrations. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1982;284(6323):1145-8.

DE GASPARO M, CATT KJ, INAGAMI T, WRIGHT JW, UNGER T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*. 2000;52(3):415-72.

DIAMOND-STANIC MK, HENRIKSEN EJ. Direct inhibition by angiotensin II of insulin-dependent glucose transport activity in mammalian skeletal muscle involves a ROS-dependent mechanism. *Arch Physiol Biochem*. 2010;116(2):88-95.

DOL F, MARTIN G, STAELS B, MARES AM, CAZAUBON C, NISATO D, JANIAK P, SCHAEFFER P, HERBERT JM. Angiotensin AT1 receptor antagonist irbesartan decreases lesion size, chemokine expression, and macrophage accumulation in apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2001;38(3):395-405.

EKINCI EI, CLARKE S, THOMAS MC, MORAN JL, CHEONG K, MACISAAC RJ, JERUMS G. Dietary salt intake and mortality in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2011;34(3):703-9.

ELLERSHAW DC, GURNEY AM. Mechanisms of hydralazine induced vasodilation in rabbit aorta and pulmonary artery. *Br J Pharmacol*. 2001;134(3):621-31.

FERRARIO CM, SMITH R, LEVY P, STRAWN W. The hypertension-lipid connection: insights into the relation between angiotensin II and cholesterol in atherogenesis. *Am J Med Sci*. 2002;323(1):17-24.

FERRARIO CM. Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2006;7(1):3-14.

FERREIRA DN, KATAYAMA IA, OLIVEIRA IB, ROSA KT, FURUKAWA LN, COELHO MS, CASARINI DE, HEIMANN JC. Salt-induced cardiac hypertrophy and interstitial fibrosis are due to a blood pressure-independent mechanism in Wistar rats. *J Nutr*. 2010;140(10):1742-51.

FLISER D, FODE P, ARNOLD U, NOWICKI M, KOHL B, RITZ E. The effect of dietary salt on insulin sensitivity. *Eur J Clin Invest*. 1995;25(1):39-43.

GARG R, WILLIAMS GH, HURWITZ S, BROWN NJ, HOPKINS PN, ADLER GK. Low salt diet increases insulin resistance in healthy subjects. *Metabolism*. 2011;60(7):965-8.

GARG R, SUN B, WILLIAMS J. Effect of low salt diet on insulin resistance in salt-sensitive versus salt-resistant hypertension. *Hypertension*. 2014;64(6):1384-7.

GIESTAS A, PALMA I, RAMOS MH. Sistema renina angiotensina aldosterona e sua modulação farmacológica. *Acta Med Port*. 2010;23(4):677-88.

GILES TD, MATERSON BJ, COHN JN, KOSTIS JB. Definition and classification of hypertension: an update. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2009;11(11):611-4.

GOLDBERG MR, BRADSTREET TE, McWILLIAMS EJ, TANAKA WK, LIPERT S, BJORNSSON TD, WALDMAN SA, OSBORNE B, PIVADORI L, LEWIS G, et al. Biochemical effects of losartana, a nonpeptide angiotensina II receptor antagonist, on the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertensive patients. *Hypertension*, 1995;25(1):37-46.

GOLDBLATT H, LYNCH J, HANZAL RF, SUMMERVILLE WW. Studies on experimental hypertension: I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med*. 1934;59:347-79.

GOOSSENS GH, BLAAK EE, SARIS WH, VAN BAAK MA. Angiotensin II-induced effects on adipose and skeletal muscle tissue blood flow and lipolysis in normal-weight and obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2690-6.

GRAUDAL NA, HUBECK-GRAUDAL T, JURGENS G. Effects of low-sodium diet vs. high-sodium diet on blood pressure, renin, aldosterone, catecholamines, cholesterol, and triglyceride (Cochrane Review). *Am J Hypertens*. 2012;25(1):1-15.

HADDY FJ. Role of dietary salt in hypertension. *Life Sci*. 2006;79(17):1585-1592.

HAYEK T, ATTIAS J, COLEMAN R, BRODSKY S, SMITH J, BRESLOW JL, KEIDAR S. The angiotensin-converting enzyme inhibitor, fosinopril, and the angiotensin II receptor antagonist, losartan, inhibit LDL oxidation and attenuate atherosclerosis independent of lowering blood pressure in apolipoprotein E deficient mice. *Cardiovasc Res*. 1999;44(3):579-87.

HE FJ, MACGREGOR JA. Effect of modest salt reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized trials. Implications for public health. *J Hum Hypertens*. 2002;16(11):761-70.

HE FJ, MACGREGOR JA. Salt, blood pressure and cardiovascular disease. *Curr Opin Cardiol*. 2007;22(4):298-305.

HSUEH WA, WYNE K. Renin-angiotensin-aldosterone system in diabetes and hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2011;13(4):224-37.

HUANG A, YAN C, SUEMATSU N, CUEVAS A, YANG YM, KERTOWIDJOJO E, HINTZE TH, KALEY G, SUN D. Impaired flow-induced dilation of coronary arterioles of fed a low-salt diet: roles of ANGII, PKC, and NAD(P)H oxidase. *Am J Physiol*. 2010;299:H1476-83.

IVANOVSKI O, SZUMILAK D, NGUYEN-KHOA T, DECHAUX M, MASSY ZA, PHAN O, MOTHU N, LACOUR B, DRUEKE TB, MUNTZEL M. Dietary salt restriction accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2005;180(2):271-6.

JAMES PA, OPARIL S, CARTER BL, CUSHMAN WC, DENNISON-HIMMELFARB C, HANDLER J, LACKLAND DT, LEFEVRE ML, MACKENZIE TD, OGEDEGBE O, SMITH SC JR, SVETKEY LP, TALER SJ, TOWNSEND RR, WRIGHT JT JR, NARVA AS, ORTIZ E. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA*. 2014;311(5):507-20.

JOHNS C, GAVRAS I, HANDY DE, SALOMAO A, GAVRAS H. Models of experimental hypertension in mice. *Hypertension*. 1996;28:1064-9.

LAPLANTE MA, WU R, MOREAU P, DE CHAMPLAIN J. Endothelin mediates superoxide production in angiotensin II-induced hypertension in rats. *Free Radic Biol Med*. 2005;38(5):589-96.

LI DY, ZHANG YC, PHILIPS MI, SAWAMURA T, MEHTA JL. Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured human coronary artery endothelial cells by angiotensin II type 1 receptor activation. *Circ Res*. 1999;14;84(9):1043-9.

LIMA NK, LIMA FB, DOS SANTOS EA, OKAMOTO MM, SUMIDA DH, HELL NS, FURUKAWA LN, HEIMANN JC. Effect of lifelong high- or low-salt intake on blood pressure, left ventricular mass and plasma insulin in Wistar rats. *Am J Med Sci*. 2006;331(6):309-14.

LLOYD-JONES DM, HONG Y, LABARTHE D, MOZAFFARIAN D, APPEL LJ, VAN HORN L, GREENLUND K, DANIELS S, NICHOL G, TOMASELLI GF, ARNETT DK, FONAROW GC, HO PM, LAUER MS, MASOUDI FA, ROBERTSON RM, ROGER V, SCHWAMM LH, SORLIE P, YANCY CW, ROSAMOND WD; American Heart Association Strategic Planning Task Force and Statistics Committee. Defining and setting national goals for cardiovascular health promotion and disease reduction: the American Heart Association's strategic Impact Goal through 2020 and beyond. *Circulation*. 2010;121(4):586-613.

MALIK S, WONG ND, FRANKLIN SS, KAMATH TV, L'ITALIEN GJ, PIO JR, WILLIAMS GR. Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation*. 2004;110(10):1245-50.

MINISTÉRIO DA SAÚDE: Hipertensão arterial atinge 23,3% dos brasileiros. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/index.cfm/?portal=pagina.visualizarArea&codArea=312>>. (26/04/2011) Acesso em: Maio, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE: Hipertensão atinge 24,3% da população adulta. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2013/11/hipertensao-atinge-24-3-da-populacao-adulta/pressao-arterial-dados-ms.jpg/view>>. Acesso em: Novembro, 2014.

MOUEDDEN ME, MEERT TF. Pharmacological evaluation of opioid and non-opioid analgesics in a murine bone cancer model of pain. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007;86(3):458-67.

MUNZEL T, KURZ S, RAJAGOPALAN S, THOENES M, BERRINGTON WR, THOMPSON JA, FREEMAN BA, HARRISON DG. Hydralazine prevents

nitroglycerin tolerance by inhibiting activation of a membrane-bound NADH oxidase. A new action for an old drug. *J Clin Invest*. 1996;98(6):1465-70.

NAKANDAKARE ER, CHARF AM, SANTOS FC, NUNES VS, ORTEGA K, LOTTENBERG AM, MION D Jr, NAKANO T, NAKAJIMA K, D'AMICO EA, CATANOZI S, PASSARELLI M, QUINTÃO EC. Dietary salt restriction increases plasma lipoprotein and inflammatory marker concentrations in hypertensive patients. *Atherosclerosis*. 2008;200(2):410-6.

NICKENIG G, SACHINIDIS A, MICHAELSEN F, BÖHM M, SEEWALD S, VETTER H. Upregulation of Vascular Angiotensin II Receptor Gene Expression by Low-Density Lipoprotein in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation*. 1997a;95(2):473-8.

NICKENIG G, JUNG O, STREHLOW K, ZOLK O, LINZ W, SCHÖLKENS BA, BÖHM M. Hypercholesterolemia is associated with enhanced angiotensin AT1-receptor expression. *Am J Physiol*. 1997b;272(6 Pt 2):H2701-7.

NICKENIG G, BÄUMER AT, TEMUR Y, KEBBEN D, JOCKENHÖVEL F, BÖHM M. Statin-sensitive dysregulated AT1 receptor function and density in hypercholesterolemic men. *Circulation*. 1999;100(21):2131-4.

O'DONNELL MJ, YUSUF S, MENTE A, GAO P, MANN JF, TEO K, MCQUEEN M, SLEIGHT P, SHARMA AM, DANS A, PROBSTFIELD J, SCHMIEDER RE. Urinary sodium and potassium excretion and risk of cardiovascular events. *JAMA*. 2011;306(20):2229-38.

OGIHARA T, ASANO T, ANDO K, CHIBA Y, SAKODA H, ANAI M, SHOJIMA N, ONO H, ONISHI Y, FUJISHIRO M, KATAGIRI H, FUKUSHIMA Y, KIKUCHI M, NOGUCHI N, ABURATANI H, KOMURO I, FUJITA T. Angiotensin II-induced insulin resistance is associated with enhanced insulin signaling. *Hypertension*. 2002;40(6):872-9.

OHGAMI N, MIYAZAKI A, SAKAI M, KUNIYASU A, NAKAYAMA H, HORIUCHI S. Advanced glycation end products (AGE) inhibit scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport: a new crossroad of AGE to cholesterol metabolism. *J Atheroscler Thromb*. 2003;10(1):1-6.

PATERNA S, GASPARE P, FASULLO S, SARULLO FM, DI PASQUALE P. Normal-sodium diet compared with low-sodium diet in compensated congestive heart failure: is sodium an old enemy or a new friend? *Clin Sci (Lond)*. 2008;114(3):221-30.

PATERNA S, PARRINELLO G, CANNIZZARO S, FASULLO S, TORRES D, SARULLO FM, DI PASQUALE P. Medium term effects of different dosage of diuretic, sodium, and fluid administration on neurohormonal and clinical

outcome in patients with recently compensated heart failure. *Am J Cardiol.* 2009;103(1):93-102.

PATERNA S, FASULLO S, PARRINELLO G, CANNIZZARO S, BASILE I, VITRANO G, TERRAZZINO G, MARINGHINI G, GANCI F, SCALZO S, SARULLO FM, CICE G, DI PASQUALE P. Short-term effects of hypertonic saline solution in acute heart failure and long-term effects of a moderate sodium restriction in patients with compensated heart failure with New York Heart Association class III (Class C) (SMAC-HF Study). *Am J Med Sci.* 2011;342(1):27-37.

PRADA PO, COELHO MS, ZECCHIN HG, DOLNIKOFF MS, GASPARETTI AL, FURUKAWA LN, SAAD MJ, HEIMANN JC. Low salt intake modulates insulin signaling, JNK activity and IRS-1ser307 phosphorylation in rat tissues. *J Endocrinol.* 2005;185(3):429-37.

REDON J, CIFKOVA R, LAURENT S, NILSSON P, NARKIEWICZ K, ERDINE S, MANCIA G, SCIENTIFIC COUNCIL OF THE EUROPEAN SOCIETY OF HYPERTENSION. The metabolic syndrome in hypertension: European society of hypertension position statement. *J Hypertens.* 2008;26(10):1891-900.

RUIVO GF, LEANDRO SM, do NASCIMENTO CA, CATANOZI S, ROCHA JC, FURUKAWA LN, DOLNIKOFF MS, QUINTÃO EC, HEIMANN JC. Insulin resistance due to chronic salt restriction is corrected by alpha and beta blockade and by L-arginine. *Physiol Behav.* 2006;88(4-5):364-70.

RUPPERT M, OVERLACK A, KOLLOCH R, KRAFT K, LENNARZ M, STUMPE KO. Effects of severe and moderate salt restriction on serum lipids in nonobese normotensive adults. *Am J Med Sci.* 1994;307Suppl1:S87-90.

SARIKONDA KV, WATSON RE, OPARA OC, DIPETTE DJ. Experimental animal models of hypertension. *J Am Soc Hypertens.* 2009;3(3):158-65.

SAUDER MA, LIU J, JAHN LA, FOWLER DE, CHAI W, LIU Z. Candesartan acutely recruits skeletal and cardiac muscle microvasculature in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(7):E1208-12.

SAVAGE PJ, PRESSEL SL, CURB JD, SCHRON EB, APPLGATE WB, BLACK HR, COHEN J, DAVIS BR, FROST P, SMITH W, GONZALEZ N, GUTHRIE GP, OBERMAN A, RUTAN G, PROBSTFIELD JL, STAMLER J. Influence of long-term, low-dose, diuretic-based, antihypertensive therapy on glucose, lipid, uric acid, and potassium levels in older men and women with isolated systolic hypertension: The Systolic Hypertension in the Elderly Program. SHEP Cooperative Research Group. *Arch Intern Med.* 1998;158(7):741-51.

SAVOIA C, D'AGOSTINO M, LAURI F, VOLPE M. Angiotensin type 2 receptor in hypertensive cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2011;20(2):125-32.

SAYER G, BHAT G. The renin-angiotensin-aldosterone system and heart failure. *Cardiol Clin*. 2014;32(1):21-32,vii.

SIQUEIRA AF, FRANCO LI, GIMENO SG, MATSUMURA LK, ABDALLA DS, DE BARROS N Jr, FERREIRA SR, JBDSG. Macrovascular disease in a Japanese-Brazilian population of high prevalence of metabolic syndrome: associations with classical and non-classical risk factors. *Atherosclerosis*. 2007;195(1):160-166.

SIRAGY HM, CAREY RM. Angiotensin type 2 receptors: potential importance in the regulation of blood pressure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001;10(1):99-103.

SMITH RD, CHIU AT, WONG PC, HERBLIN WF, TIMMERMANS PB. Pharmacology of nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1992;32:135-65.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO (SBH): Sociedade Brasileira de Hipertensão lança campanha “Conheça sua pressão arterial” e faz eventos gratuitos por todo Brasil. Disponível em: <<http://www.sbh.org.br/geral/acampanha.asp>>. (Abril, 2014). Acesso em: Novembro, 2014.

STAMLER R. Implications of the INTERSALT study. *Hypertension*. 1991;17(1Suppl):116-20.

STOLARZ-SKRZYPEK K, KUZNETSOVA T, THIIIS L, TIKHONOFF V, SEIDLEROVÁ J, RICHART T, JIN Y, OLSZANECKA A, MALVUTINA S, CASIGLIA E, FILIPOYSKÝ J, KAWECKA-JAZCZ K, NIKITIN Y, STAESSEN JA; EUROPEAN PROJECT ON GENES IN HYPERTENSION (EPOGH) INVESTIGATORS. Fatal and nonfatal outcomes, incidence of hypertension, and blood pressure changes in relation to urinary sodium excretion. *JAMA*. 2011;305(17):1777-85.

STRAWN WB, CHAPPELL MC, DEAN RH, KIVLIGHN S, FERRARIO CM. Inhibition of early atherogenesis by losartan in monkeys with diet-induced hypercholesterolemia. *Circulation*. 2000;101(13):1586-93.

SUEMATSU N, OJAIMI C, RECCHIA FA, WANG Z, SKAYIAN Y, XU X, ZHANG S, KAMINSKI PM, SUN D, WOLLIN MS, KALEY G, HINTZE TH. Potential mechanisms of low sodium diet-induced cardiac disease: superoxide-NO in the heart. *Circ Res*. 2010;106:593-600.

SUN L, ISHIDA T, YASUDA T, KOJIMA Y, HONJO T, YAMAMOTO Y, YAMAMOTO H, ISHIBASHI S, HIRATA K, HAYASHI Y. RAGE mediates oxidized LDL-induced pro-inflammatory effects and atherosclerosis in non-diabetic LDL receptor-deficient mice. *Cardiovasc Res*. 2009;82(2):371-81.

TADDEI S, VIRDIS A, MATTEI P, FAVILLA S, SALVETTI A. Angiotensin II and sympathetic activity in sodium-restricted essential hypertension. *Hypertension*. 1995;25(4Pt1):595-601.

TOWNSEND RR, KAPOOR S, McFADDEN CB. Salt intake and insulin sensitivity in healthy human volunteers. *Clin Sci (Lond)*. 2007;113(3):141-8.

VLAHAKOS DV¹, MARATHIAS KP, MADIAS NE. The role of the renin-angiotensin system in the regulation of erythropoiesis. *Am J Kidney Dis*. 2010;56(3):558-65.

VELLOSO LA, FOLLI F, SUN XJ, WHITE MF, SAAD MJ, KAHN CR. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(22):12490-5.

WARNHOLTZ A, NICKENIG G, SCHULZ E, MACHARZINAR, BRÄSEN JH, SKATCHKOV M, HEITZER T, STASCH JP, GRIENDLING KK, HARRISON DG, BÖHM M, MEINERTZ T, MÜNZEL T. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation*. 1999;99(15):2027-33.

WASSMANN S, CZECH T, VAN EICKELS M, FLEMING I, BÖHM M, NICKENING G. Inhibition of diet-induced atherosclerosis and endothelial dysfunction in apolipoprotein E/Angiotensin II type 1A receptor double-knockout mice. *Circulation*. 2004;110(19):3062-7.

WEISS D, SORESCU D, TAYLOR WR. Angiotensin II and atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 2001a;87(8A):25-32C.

WEISS D, KOOLS JJ, TAYLOR WR. Angiotensin II-induced hypertension accelerates the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Circulation*. 2001b;103(3):448-54.

WHELTON PK, HE J, APPEL LJ, CUTLER JA, HAVAS S, KOTCHEN TA, ROCCELLA EJ, STOUT R, VALLBONA C, WINSTON MC, KARIMBAKAS J; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Primary prevention of hypertension: clinical and public health advisory from The National High Blood Pressure Education Program. *JAMA*. 2002;288(15):1882-8.

WHO. Guideline: Sodium intake for adults and children. Geneva, World Health Organization (WHO), 2012.

YAMADA H, AKISHITA M, ITO M, TAMURA K, DAVIET L, LEHTONEN JY, DZAU VJ, HORIUCHI M. AT2 receptor and vascular smooth muscle cell differentiation in vascular development. *Hypertension*. 1999;33(6):1414-9.

YATABE MS, YATABE J, YONEDA M, WATANABE T, OTSUKI M, FELDER RA, JOSE PA, SANADA H. Salt sensitivity is associated with insulin resistance, sympathetic overactivity, and decreased suppression of circulating renin activity in lean patients with essential hypertension. *Am J Clin Nutr*. 2010;92(1):77-82.

YUSUF S, HAWKEN S, OUNPUU S, DANS T, AVEZUM A, LANAS F, MCQUEEN M, BUDAJ A, PAIS P, VARIGOS J, LISHENG L; INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004;364(9438):937-52.

ZHANG C1, JIN Y, LIU T, LIU F, ITO T. Hypertriglyceridemia in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits was associated with increased production and reduced catabolism of very-low-density lipoproteins. *Pathobiology*. 2009;76(6):315-21.