EDSON NOGUEIRA ALVES RODRIGUES JÚNIOR

**Avaliação do envolvimento do sistema renina-
angiotensina nas alterações cardíacas dos
machos da prole de ratas Wistar alimentadas
com dieta hipossódica, normossódica e
hipersódica durante a gestação**

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

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Joel Claudio Heimann

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rodrigues Júnior, Edson Nogueira Alves

Avaliação do envolvimento do sistema renina-angiotensina nas alterações cardíacas dos machos da prole de ratas Wistar alimentadas com dieta hipossódica, normossódica e hipersódica durante a gestação / Edson Nogueira Alves Rodrigues Júnior. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Nefrologia.

Orientador: Joel Claudio Heimann.

Descritores: 1.Sistema renina-angiotensina 2.Hipertrofia ventricular esquerda
3.Cloreto de sódio 4.Programação fetal 5.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-185/11

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai, Professor Edson Nogueira Alves Rodrigues.

Agradeço por tudo que fez e tem feito por mim.

Ao senhor, meu total respeito, admiração e amor filial.

AGRADECIMENTOS

Não acho difícil agradecer, porém quando o agradecimento é feito a muitas pessoas é fácil que cometamos injustiças ao esquecermos alguém e algumas coisas. Dessa forma, antecipadamente peço desculpas por não citar todos um por um e pelo eventual esquecimento de pessoas ou fatos importantes.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Joel C. Heimann, por ter me aceito como aluno. Agradeço ainda pela sua paciência, solicitude, compreensão, pelo conhecimento compartilhado e por ter me tirado de situações difíceis. Obrigado por tudo e mais um pouco!

Agradeço ao Dr. Rui Toledo de Barros e ao Dr. Roberto Zatz por terem me admitido no programa de pós-graduação.

Agradeço à comissão de pós-graduação do Serviço de Nefrologia do Departamento de Clínica Médica da FMUSP pela oportunidade e por todos os auxílios para a participação em Congressos e Eventos.

Agradeço à Dra. Vanda Jorgetti e Dra. Viktoria Woronik pela amizade e carinho.

Agradeço à Dra. Luzia Furukawa e Ivone Oliveira por toda ajuda técnica, pela amizade e paciência.

Agradeço a todos os colegas e funcionários do LIM 16 e da patologia pela ajuda técnica, amizade e paciência

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVO	10
3	MÉTODOS	11
3.1	Animais	11
3.1.1	Protocolo experimental do grupo materno.....	11
3.1.2	Protocolo experimental do grupo prole.....	13
3.2	Determinação da pressão arterial caudal.....	16
3.3	Determinação da pressão intra-arterial	17
3.4	Ecocardiografia	18
3.5	Fixação do tecido cardíaco por perfusão	19
3.6	Estereologia do ventrículo esquerdo.....	21
3.6.1	Amostragem do ventrículo esquerdo.....	21
3.6.2	Estimativa da densidade numérica e do número total de núcleos de cardiomiócitos por ventrículo esquerdo.....	22
3.6.3	Estimativa da média do número de núcleos por cardiomiócito	25
3.6.4	Estimativa do número total de cardiomiócitos no ventrículo esquerdo	27
3.6.5	Estimativa do volume médio do cardiomiócito ($V(myocyte)$)	27
3.7	Área de secção transversal do cardiomiócito.....	28
3.8	Quantificação de fibrose intersticial.....	28
3.9	Dosagem da atividade da enzima conversora da angiotensina tecidual.....	29
3.10	Western blotting do sistema renina-angiotensina.....	31
3.11	Anticorpos para western blot.....	32

3.12	Quantificação de angiotensina II no ventrículo esquerdo	33
3.13	Avaliação da expressão gênica do sistema renina-angiotensina	34
3.13.1	Extração de RNA total do ventrículo esquerdo	34
3.13.2	Reação de transcriptase reversa (RT)	36
3.13.3	Reação de polimerase em cadeia (PCR)	36
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
5	RESULTADOS	39
5.1	Mães	39
5.1.1	Massa corpórea, consumo de ração e pressão arterial caudal.....	39
5.2	Proles.....	43
5.2.1	Peso corpóreo ao nascimento, peso corpóreo, consumo de ração, consumo de água e volume urinário na 20ª e 36ª semanas de idade, sódio e potássio séricos e excreção de sódio urinário em 24 horas medidos na 36ª semana de idade.....	43
5.2.2	Massa cardíaca ao nascimento e 36ª semana de idade e pressão arterial média na 36ª semana de idade	46
5.2.3	Análise ecocardiográfica do ventrículo esquerdo na 20ª e 30ª semanas de idade.....	50
5.2.4	Análise histológica do ventrículo esquerdo na 36ª semana de idade	52
5.2.5	Expressão gênica de componentes do sistema renina-angiotensina no ventrículo esquerdo	56
5.2.6	Expressão protéica de componentes do sistema renina-angiotensina, atividade da enzima conversora da angiotensina e quantificação do conteúdo de angiotensina II no ventrículo esquerdo.....	58
6	DISCUSSÃO.....	61
7	CONCLUSÕES.....	72
8	ANEXOS.....	73
8.1	FIGURAS.....	73
8.2	TABELAS.....	79
9	REFERÊNCIAS	89
APÊNDICES		

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Protocolo experimental do grupo materno	13
Figura 2 -	Protocolo experimental do grupo prole	14
Figura 3 -	Evolução ponderal e consumo de ração.....	40
Figura 4 -	Pressão arterial caudal de mães.....	42
Figura 5 -	Peso corpóreo ao nascimento da prole.....	43
Figura 6 -	Peso corpóreo, consumo de ração, consumo de água e volume urinário na 20ª e 36ª semanas de idade da prole.....	45
Figura 7 -	Excreção urinária de sódio, sódio sérico, potássio sérico na 36ª semana de idade da prole	46
Figura 8 -	Massa cardíaca ao nascimento normalizada pelo peso corpóreo da prole	47
Figura 9 -	Pressão arterial média e correlação entre pressão arterial média e massa ventricular esquerda da prole	49
Figura 10 -	Ecocardiografia da prole	51
Figura 11 -	Área de secção transversal do cardiomiócito e volume médio do cardiomiócito da prole	53
Figura 12 -	Número total de cardiomiócitos no ventrículo esquerdo, média do número de núcleos por cardiomiócito e fibrose intersticial da prole	54
Figura 13 -	Análise de regressão não linear ajustada à curva quadrática entre número de cardiomiócitos no ventrículo esquerdo e volume do cardiomiócito.	55
Figura 14 -	Expressão gênica dos componentes do sistema renina-angiotensina no ventrículo esquerdo da prole	57
Figura 15 -	Expressão protéica dos componentes do sistema renina-angiotensina no ventrículo esquerdo da prole	59
Figura 16 -	Atividade da enzima conversora de angiotensina no ventrículo esquerdo da prole.....	60
Figura 17 -	Conteúdo de angiotensina II no ventrículo esquerdo da prole....	60

Figuras no Anexo

Figura 1 -	Amostragem do ventrículo esquerdo.	73
Figura 2 -	“Plano de referência” e “plano correspondente”	74
Figura 3 -	“Grid” de contagem.....	75
Figura 4 -	Volume de referência.....	76
Figura 5 -	Contagem de núcleos. Princípio do “disector”	77
Figura 6 -	Curva de natriurese pressórica.....	78

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Evolução ponderal, consumo de ração e pressão arterial caudal conforme a idade, em semanas, de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação (13^a a 15^a semanas de idade)80
- Tabela 2** - Peso corpóreo (PC) ao nascimento, peso corpóreo, consume de ração (CR), consumo de água (CA) e volume urinário (VU) na 20^a e 36^a semana de idade e excreção urinária de sódio (NaU), natremia (NaS) e calemia (KS) na 36^a semana de idade de machos de proles de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação e que receberam dieta normossódica (HOnr, NRnr, HRnr) ou hipersódica (HOhr, NRhr, HRhr) da 21^a à 36^a semana de idade.....81
- Tabela 3** - Massa cardíaca normalizada pelo peso corpóreo (MC/PC) ao nascimento, massa ventricular esquerda normalizada pelo peso corpóreo (VE/PC), massa ventricular esquerda normalizada pelo comprimento da tíbia (VE/tíbia), massa ventricular esquerda não normalizada (VE) e pressão arterial média (PAM) na 36^a semana de idade de machos de proles de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação e que receberam dieta normossódica (HOnr, NRnr, HRnr) ou hipersódica (HOhr, NRhr, HRhr) da 21^a à 36^a semana de idade.....83
- Tabela 4** - Massa ventricular esquerda (MVE), espessura do septo interventricular (SI) e da parede posterior do ventrículo esquerdo (PP), diâmetro diastólico da cavidade do ventrículo esquerdo (DD) e espessura relativa da parede do ventrículo esquerdo (ERP) avaliados por ecocardiografia na 20^a e 30^a semana de idade e débito cardíaco (DC) avaliado por ecocardiografia na 30^a semana de idade de machos de proles de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação e que receberam dieta normossódica (HOnr, NRnr, HRnr) ou hipersódica (HOhr, NRhr, HRhr) da 21^a à 36^a semana de idade.....84

Tabela 5 - Área de secção transversal do cardiomiócito (AST), volume médio do cardiomiócito (VMC), número de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo (Num), media do número de núcleos por cardiomiócito (N/C) e fibrose intersticial (FI) na 36^a semana de idade de machos de proles de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação e que receberam dieta normossódica (HOnr, NRnr, HRnr) ou hipersódica (HOhr, NRhr, HRhr) da 21^a à 36^a semana de idade86

Tabela 6 - Expressão gênica (unidade arbitrária – UA) no ventrículo esquerdo dos receptores AT1 (AT1) e AT2 (AT2), renina, angiotensinogênio (Ango) e enzima conversora de angiotensina (ECAve) na 36^a semana de idade de machos de proles de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação e que receberam dieta normossódica (HOnr, NRnr, HRnr) ou hipersódica (HOhr, NRhr, HRhr) da 21^a à 36^a semana de idade.....87

Tabela 7 - Expressão protéica (unidade arbitrária, UA) dos receptores AT1 (AT1) e AT2 (AT2), renina, angiotensinogênio (Ango), enzima conversora de angiotensina 1 (ECA1), enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), atividade da enzima conversora da angiotensina (aECAve) e conteúdo de angiotensina II (AII – unidade arbitrária de fluorescência, UAF) no ventrículo esquerdo de machos de proles de 36 semanas de idade de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação e que receberam dieta normossódica (HOnr, NRnr, HRnr) ou hipersódica (HOhr, NRhr, HRhr) da 21^a à 36^a semana de idade.....88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A: Área do “grid”

CRA: Circunferência da raiz da aorta

DC: Débito cardíaco

DDCVE: Diâmetro diastólico da cavidade do ventrículo esquerdo

DNA: ácido desoxirribonucléico

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

FC: Frequência cardíaca

GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

HOhr: Proles de mães alimentadas com dieta hipossódica durante a gestação e que receberam dieta hipersódica da 21^a a 36^a semana de idade

HONr: Proles de mães alimentadas com dieta hipossódica durante a gestação e que receberam dieta normossódica por toda vida

HRhr: Proles de mães alimentadas com dieta hipersódica durante a gestação e que receberam dieta hipersódica da 21^a a 36^a semana de idade

HRnr: Proles de mães alimentadas com dieta hipersódica durante a gestação e que receberam dieta normossódica por toda vida

IDV: Valor de densidade integrada

MVE: massa ventricular esquerda

NaCl: Cloreto de sódio

N(myocytes/LV): Número total de cardiomiócitos no ventrículo esquerdo

Nn(nuclei/myocyte): Média harmônica de núcleos por cardiomiócito

N(nuclei/LV): Número total de núcleos de cardiomiócitos por ventrículo esquerdo

NPC: Número total de pontos incidentes sobre o colágeno intersticial

NRhr: Proles de mães alimentadas com dieta normossódica durante a gestação e que receberam dieta hipersódica da 21^a a 36^a semana de idade

NRnr: Proles de mães alimentadas com dieta normossódica durante a gestação e que receberam dieta normossódica por toda vida

NTP: Número total de pontos incidentes sobre o tecido cardíaco

Nv: Densidade numérica dos núcleos de cardiomiócitos

PBS: Phosphate buffered saline

PCR: Reação de polimerase em cadeia

Pmy: Pontos incidentes sobre cardiomiócitos

% colágeno VE: Porcentagem de colágeno no ventrículo esquerdo

PPVE: Parede posterior do ventrículo esquerdo

Pref: Pontos incidentes sobre o espaço de referência

$\bar{Q}$: Número de núcleos de cardiomiócitos contido em determinado volume

$\bar{Q}_1$: Número de cardiomiócitos com 1 núcleo

$\bar{Q}_2$: Número de cardiomiócitos com 2 núcleos

$\bar{Q}_3$: Número de cardiomiócitos com 3 núcleos

$\bar{Q}_4$: Número de cardiomiócitos com 4 núcleos

RNA: Ácido ribonucléico

RT: Transcriptase reversa

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SI: Septo interventricular

t: Espessura do corte

TRPV4: Transient receptor potential vanilloid 4 channel

VE: Ventrículo esquerdo

Vmyocardium: Volume total dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo

Vol: Volume do ventrículo esquerdo

Vref: Volume de referência

VTI: Integral velocidade tempo

Vv(my/ref): Volume relativo do ventrículo esquerdo ocupado por cardiomiócitos

RESUMO

Rodrigues Júnior ENA. *Avaliação do envolvimento do sistema renina-angiotensina nas alterações cardíacas dos machos da prole de ratas Wistar alimentadas com dieta hipossódica, normossódica e hipersódica durante a gestação* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 101p.

O objetivo do presente estudo consiste em avaliar o efeito da restrição ou sobrecarga de cloreto de sódio (NaCl) durante a gestação sobre a programação de possíveis alterações cardíacas nos machos da prole adulta e sua interação com o sistema renina-angiotensina miocárdico. Ratas Wistar foram alimentadas com dieta hipossódica (HO, 0,15%), normossódica (NR, 1,3%) ou hipersódica (HR2, 8% de NaCl) durante a gestação. Durante a lactação todas as mães receberam dieta NR, assim como as proles desde o desmame até a 20ª semana de idade. Ecocardiograma foi realizado na 20ª semana de idade não sendo constatada nenhuma diferença entre os grupos. Em seguida, metade das proles de cada grupo experimental recebeu uma sobrecarga crônica de cloreto de sódio na dieta na tentativa de revelar diferenças entre grupos, uma vez que a dieta hipersódica é comprovadamente um causador de hipertrofia cardíaca independente dos níveis de pressão arterial. Metade das proles de cada grupo passou a receber dieta hipersódica (hr, 4% de NaCl) da 21ª até a 36ª semana de idade (HOhr, NRhr, HRhr) e as proles restantes foram mantidas em dieta NR (HOnr, NRnr e HRnr) pelo mesmo período. Novo ecocardiograma foi realizado na 30ª semana de idade. Na 36ª semana de idade foi aferida a pressão arterial média e posteriormente os animais foram sacrificados para coleta do ventrículo esquerdo para análise histológica e expressão gênica e protéica dos componentes do sistema renina-angiotensina. As proles de mães alimentadas com dieta hipo ou hipersódica não apresentaram alterações estruturais ou funcionais cardíacas até a 36ª semana de idade, quando mantidas em dieta normossódica. Contudo, as proles HRhr apresentaram hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo não acompanhada de fibrose, independente da pressão arterial e dos níveis de angiotensina II miocárdica. Surpreendentemente as proles HOhr apresentaram menor pressão arterial quando comparadas com as proles HRhr, NRhr e HOnr. Embora as proles de mães alimentadas com dieta hipossódica durante a gestação não tenham apresentado alterações sugestivas de hipertrofia cardíaca, mesmo após sobrecarga crônica de sal na idade adulta, estas apresentaram menor débito cardíaco após sobrecarga crônica de sal na dieta quando comparadas com as proles HRhr e NRhr e maior número de núcleos por cardiomiócito quando comparadas com proles HOnr.

descritores: 1.Sistema renina-angiotensina 2.Hipertrofia ventricular esquerda 3.Cloreto de sódio 4.Programação fetal 5.Ratos Wistar

SUMMARY

Rodrigues Júnior ENA. *Evaluation of the involvement of the renin-angiotensin system on cardiac alterations in male offspring from dams fed a low-, normal- or high-salt diet during pregnancy* [thesis]. São Paulo. "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011. 101p.

The aim of the present study was to evaluate the effects of a low or high salt diet during pregnancy on the left ventricle of adult male offspring and its interaction with the cardiac renin-angiotensin system. Low- (LS, 0.15%), normal- (NS, 1.3%) or high-salt (HS, 8% NaCl) diet was given to Wistar rats during pregnancy. During lactation all dams received NS as well as the offspring after weaning. Echocardiogram was done at 20 weeks of age. No differences were observed. In an attempt to stimulate differences between groups, 50% of each offspring group was fed a high-salt (hs, 4% NaCl) diet from the 21st to the 36th week of age (LS_{hs}, NS_{hs}, HS_{hs}). The remaining 50% was maintained on NS (LS_{ns}, NS_{ns} and HS_{ns}). Echocardiogram was repeated at 30 weeks of age. Mean blood pressure (MBP), histology and left ventricular protein and gene expression of the renin-angiotensin system components were analyzed at 36 weeks of age. LS or HS diet during pregnancy was not associated with cardiac abnormalities in adult male offspring until the 36th week of age, when maintained on a NS diet. HS_{hs} offspring group presented a blood pressure and angiotensin II independent concentric left ventricular hypertrophy, with no fibrosis. Surprisingly, MBP was lower ($p<0.05$) in LS_{hs} offspring compared to HS_{hs}, NS_{hs} and LS_{ns}. Although we did not verify signs of left ventricular hypertrophy in offsprings from dams fed a LS diet, cardiac output was lower in LS_{hs} compared to HS_{hs} ($p<0.05$) and NS_{hs} ($p=0.06$) and average number of nuclei per cardiomyocyte was higher ($p<0.05$) in LS_{hs} compared to LS_{ns} offspring groups.

Descriptors: 1.Renin-angiotensin system 2.Hypertrophy, left ventricular 3.Sodium Chloride 4.Fetal programming 5.Rats, Wistar

1 INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos revelam que insultos que ocorrem durante a vida intra-uterina estão associados com diversas anormalidades, tanto funcionais quanto estruturais na vida adulta. Estes estudos detectaram associação entre baixo peso ao nascimento e subsequente diabetes tipo 2, hipertensão e obesidade na vida adulta [1]. Um dos primeiros estudos publicados nesta linha foi o de Barker e colaboradores. Estes autores analisaram registros de homens nascidos em Hertfordshire, Reino Unido, no período de 1911 a 1930 e verificaram uma associação entre o baixo peso ao nascimento e alto risco de morte por doenças coronarianas [2]. Mais tarde, em 1992, estes mesmos autores estabeleceram uma hipótese para explicar os resultados observados com base em um mecanismo chamado “thrifty phenotype” (“fenótipo econômico”). Eles postularam que o desenvolvimento fetal é sensível ao ambiente nutricional, ou seja, quando o ambiente é pobre em nutrientes ocorre uma resposta adaptativa que se inicia para otimizar o crescimento de órgãos vitais (cérebro, por exemplo), aumentando as probabilidades de sobrevivência do feto [3].

Embora a resposta adaptativa fetal capacite-o para sobreviver em ambiente intrauterino hostil este processo pode acarretar modificações permanentes no fenótipo do indivíduo, fenômeno este, denominado de programação fetal. A programação fetal pode ser consequência de mudanças no número ou distribuição de células diferenciadas e/ou

mudanças na expressão gênica devidas principalmente a alterações epigenéticas (ex. hipo ou hipermetilação de genes) [4].

A relação entre hipertensão na vida adulta e desnutrição protéica durante a gestação e lactação é bastante conhecida. Bogdarina e colaboradores, através de estudos em ratos, verificaram que a hipertensão vista neste modelo estava associada à hipometilação de regiões promotoras dos genes dos receptores AT1a e AT1b no rim e supra-renais respectivamente. Este fenômeno de hipometilação associou-se a uma maior expressão gênica destes receptores, sendo esta, a provável causa da hipertensão arterial encontrada nos animais. Tal hipótese é corroborada por estudo anterior que inibiu o aparecimento de hipertensão neste modelo através da suplementação com glicina na dieta materna [5]. A glicina é sabidamente um doador de radicais “metil”, influenciando o grau de metilação do DNA na fase embrionária e pós-natal precoce, levando a alteração na expressão gênica de diversas regiões promotoras [4].

Além da desnutrição protéica durante a gestação a sobrecarga de cloreto de sódio, durante o período perinatal, também foi associada ao desenvolvimento de maior pressão arterial na prole adulta. Em nosso laboratório, Silva e colaboradores, demonstraram que sobrecarga de sal na dieta materna resulta em maior pressão arterial na prole adulta acompanhada de maior conteúdo de angiotensina II nos glomérulos e uma ausência de modulação da atividade de renina plasmática em resposta à variação no consumo de sal na dieta [6].

Além da hipertensão arterial outros fatores associados a aumento de risco cardiovascular tais como resistência à insulina [7], obesidade [8] e hipertrofia ventricular esquerda [9] podem ser programados durante o período perinatal através da manipulação do conteúdo de cloreto de sódio na dieta materna. Com relação à hipertrofia cardíaca, Battista e colaboradores utilizando modelo de crescimento intra-uterino restrito induzido por dieta hipossódica (0,075% NaCl), em ratas Sprague-Dawley durante a última semana de gestação demonstraram maior relação entre massa do ventrículo esquerdo e massa corpórea na idade adulta apenas nas fêmeas da prole associado a aumento do volume do cardiomiócito e aumento da expressão gênica do peptídeo atrial natriurético, um marcador molecular de hipertrofia cardíaca, no ventrículo esquerdo [9].

Em estudo realizado em nosso laboratório, Lopes e colaboradores [10], demonstraram que os machos adultos da prole de ratas Wistar alimentadas com dieta hipossódica (0,15% NaCl) desde a 8^a semana de vida até o final da lactação apresentaram tendência a uma menor massa cardíaca, corrigida pela massa corpórea, comparada com prole de mães alimentadas com dieta normossódica pelo mesmo período. Esta diferença não foi observada na prole do grupo materno alimentado com dieta hipossódica e que recebeu captopril, um inibidor da enzima conversora da angiotensina, durante gestação e lactação [10].

Ding e colaboradores recentemente demonstraram aumento da massa cardíaca de fetos de ratas Sprague-Dawley submetidas à sobrecarga de cloreto de sódio (8% NaCl) durante a gestação acompanhado de

modificações no conteúdo protéico e expressão gênica de componentes do sistema renina-angiotensina cardíaco. Embora, a expressão protéica do receptor AT1, tenha permanecido aumentada no coração dos machos da prole com 12 semanas de idade a estrutura cardíaca destes animais não foi avaliada [11].

Desde a descoberta da renina em 1898 [12] o sistema renina-angiotensina tem sido considerado um sistema hormonal implicado no balanço eletrolítico e regulação da pressão arterial. Com o passar das décadas foi descoberta a existência de um sistema renina-angiotensina local caracterizado pela presença de seus componentes com comprovada capacidade de síntese de angiotensina II em diversos tecidos dentre eles o coração [13], rins [14], cérebro [15], pâncreas [16], tecido adiposo [17] entre outros, até que mais recentemente, foi caracterizada a presença de um sistema renina angiotensina intracelular conforme detalhado por Kumar e colaboradores [18] em artigo de revisão. Desta maneira o sistema renina angiotensina além de ser um sistema endócrino também representa um sistema parácrino e intrácrino com particularidades no processo de síntese e ação final de suas moléculas efetoras que variam conforme o tecido [18].

No início da cascata do sistema renina-angiotensina circulante encontra-se o angiotensinogênio que é o substrato da renina. O angiotensinogênio é sintetizado no hepatócito a partir de regulação por fatores nucleares de transcrição sendo posteriormente secretado para a circulação [19] onde alcança níveis plasmáticos mil vezes maiores que a concentração de angiotensina I e angiotensina II [20] sendo, desta maneira, a atividade

de renina plasmática o principal determinante dos níveis de angiotensina I no plasma [21].

O tecido renal é a principal fonte de produção e liberação de renina circulante. Por outro lado sua forma precursora, a prorenina, responde pela maior parcela da renina circulante (80 a 90%) devido ao fato de que outros tecidos, além do rim, também secretam a prorenina [22]. Frente a diversos estímulos [23] a renina, uma aspartil-protease, armazenada nos grânulos das células justaglomerulares das paredes das arteríolas aferentes renais é liberada para o plasma convertendo o angiotensinogênio, a partir da clivagem de sua porção N-terminal, no decapeptídeo angiotensina I [23]. Uma vez, na circulação, tanto a renina quanto a prorenina podem ligar-se a receptores em tecidos como coração e glândulas adrenais sendo, portanto, alvo de captação extra-renal [24,25]. Uma vez, ligada ao seu receptor tecidual, a renina e a prorenina catalisam a conversão de angiotensinogênio em angiotensina I localmente e ativam vias de sinalização intracelular como a das “mitogen activated protein kinase” “extracellular signal-regulated kinase 1/2” [26].

Uma vez formada a angiotensina I é convertida em angiotensina II (um octapeptídeo com potente ação vasopressora) pela ação da enzima conversora da angiotensina, uma dipeptidil carboxipeptidase circulante, ligada às células endoteliais de diversos leitos vasculares principalmente nos pulmões [27]. Embora existam outras vias de formação de angiotensina II em vários tecidos, como no coração, os níveis plasmáticos da angiotensina II estão primariamente sob dependência da atividade enzimática da renina e enzima conversora de angiotensina [27].

Embora a angiotensina II seja quantitativamente o principal peptídeo vasoativo circulante do sistema renina-angiotensina, vários outros peptídeos são produzidos pelo sistema, a exemplo da angiotensina III, angiotensina IV, e angiotensina 1-7 [28]. A angiotensina II alternativamente pode ser transformada em angiotensina 1-7 por meio da ação enzimática da enzima conversora da angiotensina 2 com perda de um aminoácido sendo que, esta angiotensina resultante, tem ação direta no receptor *Mas* [29].

Os efeitos teciduais da angiotensina II circulante são mediados através de receptores transmembrana acoplados à proteína G, havendo 2 subtipos principais (AT1 e AT2) [30]. A aldosterona, outro importante efector do sistema renina-angiotensina, envolvido no balanço eletrolítico e regulação da pressão arterial é sintetizada e secretada pela camada glomerulosa das glândulas supra-renais em resposta ao estímulo do receptor AT1 pela angiotensina II [31].

Nos últimos anos foram descritas inúmeras vias alternativas de síntese de angiotensina II por ação proteolítica das enzimas quimases, catepsinas [32] e calicreínas [33] sendo, as quimases, particularmente importantes na geração da angiotensina II no tecido cardíaco humano [34].

A angiotensina II é sabidamente um fator de crescimento cardíaco em ratos e outros mamíferos atuando tanto nos grandes vasos, coronárias, assim como no miocárdio propriamente dito. Um estudo que avaliou a adição de angiotensina II em cultura de cardiomiócitos fetais imaturos de ovino demonstrou a proliferação destas células através da maior captação de 5-bromo-2'-desoxiuridina. Esta ação proliferativa da angiotensina II nos

cardiomiócitos imaturos parece ser mediada pela via das “mitogen activated protein kinase” “extracellular signal-regulated kinase” [35].

A atuação da angiotensina II durante a embriogênese tardia e período pós-natal precoce parece ser responsável pela transição de hiperplasia para hipertrofia dos cardiomiócitos [36]. Embora a angiotensina II sabidamente atue, de maneira importante, na proliferação de fibroblastos cardíacos e hipertrofia de cardiomiócitos no período pré-natal tardio não foram encontradas evidências da presença da enzima conversora de angiotensina, nesta fase, no miocárdio de ratos embora tenha sido detectada em grandes vasos e coronárias. Desta maneira, interroga-se a existência de vias alternativas na produção embrionária cardíaca de angiotensina II [36]. Estas ações proliferativas da angiotensina II parecem ser mediadas principalmente por receptores AT1 que, juntamente com os receptores AT2, já se encontram presentes no período embrionário tardio do desenvolvimento cardíaco de ratos [36]. O bloqueio AT1 inibe o crescimento de cardiomiócitos em ratos neonatos [37] e a proliferação de fibroblastos [38], interferindo no crescimento do coração [39].

As ações da angiotensina II nos cardiomiócitos e fibroblastos de ratos neonatos mediadas pelo receptor AT2 parecem ser opostas às mediadas pelo receptor AT1, isto é, o crescimento e a proliferação celular são inibidos [40,41]. Com relação aos efeitos apoptóticos da angiotensina II, em cardiomiócitos de ratos neonatos, há trabalhos que sugerem intermediação do receptor AT2 [42] enquanto outros apontam para ação via AT1 [43].

Não se sabe ainda qual a importância de outros peptídeos ativos do sistema renina-angiotensina na embriogênese cardíaca como a

angiotensina 1-7. Estudos realizados em cultura de cardiomiócitos de ratos neonatais, por Tallant e colaboradores, demonstraram que incubação destas células com angiotensina 1-7 inibe o crescimento dos cardiomiócitos associado à inibição da via das “mitogen activated protein kinase” “extracellular signal-regulated kinase”1/2. Estas ações são mediadas pelo receptor *Mas* da angiotensina 1-7 [44].

Os estudos apresentados acima demonstram a importância do sistema renina-angiotensina fetal no desenvolvimento cardíaco e suas interações com a manipulação de cloreto de sódio na dieta materna. Fora do ambiente perinatal, o sistema renina-angiotensina cardíaco também desempenha um importante papel no processo de remodelamento miocárdico secundário a diversos estímulos tais como sobrecarga pressórica [45], denervação sino-aórtica [46] e dieta hipersódica [47]. Desta maneira, torna-se interessante a avaliação do sistema renina-angiotensina cardíaco em alterações estruturais miocárdicas observadas na prole adulta, programadas pela manipulação de cloreto de sódio durante o período perinatal.

Os efeitos da manipulação de cloreto de sódio durante o período perinatal, sobre o coração da prole, variam conforme a duração, intensidade do estímulo e gênero da prole estudada [10,9,11]. Trabalhos que até então demonstram alterações estruturais no coração das proles adultas utilizam-se da manipulação de cloreto de sódio na dieta materna durante o período de gestação e lactação ou apenas na última semana de gestação. Apenas 1 estudo avaliou os efeitos da sobrecarga de cloreto de sódio dada durante toda a gestação, sem incluir o período de lactação, sobre o coração dos

fetos, porém não avaliou possíveis alterações estruturais cardíacas na prole adulta. Desta forma, não sabemos se a manipulação de cloreto de sódio durante todo o período gestacional, excluindo-se a lactação, é capaz de induzir alterações estruturais cardíacas na prole adulta.

2 OBJETIVO

O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito da restrição ou sobrecarga de cloreto de sódio durante a gestação, sobre a programação de possíveis alterações cardíacas nos machos da prole adulta e sua interação com o sistema renina-angiotensina miocárdico.

3 MÉTODOS

Os experimentos propostos neste projeto de pesquisa identificado pelo número 0111/07, foram avaliados e aprovados no dia 29 de março de 2007 pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

3.1 Animais

3.1.1 Protocolo experimental do grupo materno

Ratas Wistar com 10 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da FMUSP, acondicionadas em gaiolas de plástico (1 animal por gaiola) em ambiente mantido a 25 °C, com períodos intercalados claros e escuros fixos de 12 horas, dieta e água *ad libitum*, foram alimentadas com dieta normossódica (1,3% de cloreto de sódio) (Nuvilab CR1-Colombo, PR-Brasil) até completarem 12 semanas de idade, quando foram acasaladas. Para o acasalamento uma fêmea e um macho permaneceram na mesma gaiola de plástico até ocorrer a cópula que foi verificada através de lavado vaginal, realizado todas as manhãs, através da infusão de 50-100µl de soro fisiológico intravaginal com auxílio de uma pipeta automática e ponteira

específica cuja ponta era posicionada no intróito vaginal. Depois de infundido o soro foi imediatamente aspirado com a mesma pipeta e o lavado colocado em lâmina e corado com leishman. Foi considerada a cópula no dia em que foram visualizados espermatozóides na lâmina. A partir deste momento as ratas foram divididas em três grupos de acordo com a dieta (Harlan Teklad, Madison, WI - USA) que passaram a receber até o final da prenhez:

Dieta hipossódica (HO): 0,15% de cloreto de sódio + 25% de proteínas

Dieta normossódica (NR): 1,3% de cloreto de sódio + 25% de proteínas

Dieta hipersódica (HR): 8% de cloreto de sódio + 25% de proteínas

Logo após o nascimento, a prole foi identificada e pesada, sendo selecionados 8 animais que permaneceram com a mãe e o restante foi sacrificado. A seleção dos recém nascidos que seriam mantidos com as mães foi feita de maneira que a média dos pesos daqueles que permaneceram com as mães fosse semelhante à média dos pesos daqueles que foram sacrificados.

A mãe recebeu dieta normossódica (Nuvilab CR1-Colombo, PR-Brasil) durante toda a lactação, sendo então separada da prole e sacrificada (Figura 1).

Figura 1

Figura 1 - Protocolo experimental do grupo materno

3.1.2 Protocolo experimental do grupo prole

Dentro das primeiras 24 horas do nascimento os recém nascidos foram pesados e 8 animais foram mantidos com suas mães sendo os demais sacrificados por decapitação para a coleta do coração. Os corações foram retirados e pesados. Depois do desmame, apenas os machos das proles foram incluídos no estudo, sendo mantidos em dieta normossódica (Nuvilab CR1-Colombo, PR-Brasil) até completarem 20 semanas de idade quando foram submetidos à análise ecocardiográfica. Como não foi verificada nenhuma alteração cardíaca até a 20ª semana de idade decidimos

submeter metade dos animais, de cada grupo experimental, a uma sobrecarga crônica de cloreto de sódio na dieta na tentativa de estimular o aparecimento de diferenças entre grupos até então não manifestadas uma vez que, a dieta hipersódica, é comprovadamente uma causadora de hipertrofia cardíaca independente dos níveis de pressão arterial [47]. Então, a partir da 21^a até a 36^a semana de idade, metade das proles de cada grupo experimental passou a receber dieta com 4% de cloreto de sódio e 25% de proteínas (hr - Harlan Teklad, Madison, WI - USA) e a outra metade das proles permaneceu em dieta normossódica (nr - Nuvilab CR1-Colombo, PR-Brasil) até a 36^a semana de idade (Figura 2).

Figura 2

GRUPO PROLE

† Logo após nascimento foram selecionados 8 animais e o restante da prole foi sacrificada

* Pressão arterial média

Gaiola metabólica

\$ Ecocardiograma

% Coleta de tecidos para análise histológica e avaliação dos componentes do sistema renina-angiotensina. Coleta de sangue para avaliação do sistema renina-angiotensina

Figura 2 - Protocolo experimental do grupo prole

Desta maneira, após a 20ª semana de idade, as proles foram subdivididas em 6 grupos experimentais conforme a dieta materna durante a gestação e a dieta que passaram a receber à partir da 21ª semana de idade compondo os seguintes grupos:

HO_{nr} - proles de mães alimentadas com dieta hipossódica e que foram mantidas em dieta normossódica por toda a vida;

HO_{hr} - proles de mães alimentadas com dieta hipossódica e que receberam dieta hipersódica da 21ª até a 36ª semana de idade;

NR_{nr} - proles de mães alimentadas com dieta normossódica e que foram mantidas em dieta normossódica por toda a vida;

NR_{hr} - proles de mães alimentadas com dieta normossódica e que receberam dieta hipersódica da 21ª até a 36ª semana de idade;

HR_{nr} - proles de mães alimentadas com dieta hipersódica e que foram mantidas em dieta normossódica por toda a vida;

HR_{hr} - proles de mães alimentadas com dieta hipersódica e que receberam dieta hipersódica da 21ª até a 36ª semana de idade;

Nova avaliação ecocardiográfica foi realizada na 30ª semana de idade das proles.

Os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas na 20ª e 36ª semanas de idade para coleta de urina, medida do volume urinário, consumo de ração e de água em 24 horas. Quando as proles completaram 36 semanas de idade uma parte dos animais foi anestesiada para implante de cânula em artéria carótida para medida de pressão arterial direta. Após medida da

pressão arterial os animais foram sacrificados por decaptação e o coração foi retirado, separado em átrios, ventrículo esquerdo e direito sendo as partes pesadas separadamente, acondicionadas em tubos plásticos, colocados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para futuras determinações.

Outra parte da prole foi anestesiada e teve seu coração fixado por perfusão, retirado e pesado. O coração foi separado em ventrículo esquerdo, direito e átrios, sendo estas partes pesadas separadamente. O ventrículo esquerdo foi armazenado para análise histológica em álcool 70° até ser emblocado.

3.2 Determinação da pressão arterial caudal

A pressão arterial caudal foi medida pelo método oscilométrico, sendo que os valores obtidos da pressão arterial caudal correspondem à pressão arterial sistólica. A pressão caudal foi medida por meio de equipamento de medida de pressão que é composto de uma bolsa inflável e um sensor piezoelétrico (RTBP 2000 - Kent Scientific Corporation, Torrington, Connecticut, USA), conectado a um computador para aquisição dos dados por meio do programa DASYLab 7.0 (DASYTec, National Instruments Company, Amherst, New Hampshire, USA).

As medidas foram realizadas com os animais acordados, previamente aquecidos e acondicionados em gaiolas de restrição aquecidas. Foram realizadas cerca de 5 medidas por animal sendo consideradas apenas

aquelas obtidas em condição de ausência de movimentação do animal. Foi calculada a média aritmética das 5 medidas para obtenção dos valores que foram considerados para aquele momento.

3.3 Determinação da pressão intra-arterial

Para avaliação da pressão arterial carotídea as proles, com 36 semanas de idade, foram submetidos à cirurgia para implantação de cateter de polietileno (PE 50) na artéria carótida. Para tanto os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de solução anestésica contendo 50 mg/kg de cetamina (Ketamin, Cristália, Brasil) associada com 5 mg/kg de xilazina (Rompun, Bayer, Brasil), foram posicionados em decúbito dorsal numa mesa cirúrgica aquecida e submetidos à tricotomia na região cervical anterior. Foi feita incisão longitudinal na altura da traquéia, sendo a carótida esquerda isolada dos músculos e tecidos adjacentes para implantação do cateter. Este foi preenchido com uma solução de heparina 500 U.I./mL e exteriorizado na região interescapular.

Após 3 dias de recuperação pós-cirúrgica o cateter foi conectado a um transdutor (Argon, Athens, TX, USA) ligado a um amplificador (Stemtech, INC, GPA-4 modelo 2, Wiscousin, USA) que, por sua vez, estava ligado ao computador. O animal foi mantido em sua gaiola para acomodação e ambientação somente quando se mostrava quieto e tranquilo a pressão arterial foi registrada durante 5-10 minutos. No caso de movimentação do

animal o registro era interrompido e recomeçado somente quando condições ideais eram novamente atingidas. O valor médio da pressão arterial após o registro foi calculado utilizando-se um programa específico para este tipo de análise (CODAS – Data Q instruments, Akron, Ohio, USA). A frequência cardíaca foi obtida da mesma maneira que a pressão arterial.

3.4 Ecocardiografia

Ecocardiografia transtorácica foi realizada nas proles com 20 e 30 semanas de idade por apenas um observador que não tinha conhecimento do protocolo experimental, usando o aparelho Sequoia 512 (ACUSON Corporation, Mountain View, CA), acoplado a um transdutor linear multifrequência de 10 a 14 megahertz. As imagens foram obtidas com o transdutor posicionado no tórax depilado do animal (decúbito lateral). Para otimizar a imagem um gel de transmissão foi usado entre o transdutor e o tórax do animal (General Imaging gel, ATL Inc., Reedsville, PA). Todas as medidas foram realizadas pelo mesmo observador baseando-se na média de 3 ciclos cardíacos consecutivos.

Para a realização do procedimento os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de solução anestésica contendo 50 mg/kg de cetamina (Ketamin, Cristália, Brasil) associado com 5 mg/kg de xilazina (Rompun, Bayer, Brasil).

A espessura das paredes e dimensões do ventrículo esquerdo (VE) foram obtidas a partir de uma visão de eixo curto ao nível da musculatura papilar. A massa ventricular esquerda (MVE) foi calculada pela equação (1), assumindo uma geometria esférica do ventrículo esquerdo e validada em ratos:

$$MVE = 1,047 \times [(DDCVE + PPVE + SI)^3 - DDCVE^3] \quad (1)$$

onde 1,047 é a densidade do músculo, DDCVE é o diâmetro da cavidade do ventrículo esquerdo ao final da diástole e PPVE e SI são as espessuras da parede posterior e do septo interventricular ao final da diástole, respectivamente. A espessura relativa da parede do ventrículo esquerdo foi calculada pela equação (2):

$$(PPVE/DDCVE) \times 2 \quad (2)$$

O débito cardíaco (DC) foi medido apenas na 30ª semana de idade e foi calculado utilizando-se do produto da integral velocidade-tempo aórtico (VTI aórtico), área da circunferência da raiz da aorta ($\pi(CRA/2)^2$) e frequência cardíaca (FC), através da equação (3) [48]:

$$DC = VTI \text{ aórtico} \times [\pi(CRA/2)^2] \times FC \quad (3)$$

3.5 Fixação do tecido cardíaco por perfusão

Após coletadas amostras de sangue o animal foi anestesiado através de injeção intraperitoneal de solução anestésica contendo 50 mg/kg de cetamina (Ketamin, Cristália, Brasil) associada com 5 mg/kg de xilazina (Rompun, Bayer, Brasil).

Estando o animal anestesiado foi administrada heparina, via intracárdica, na dose de 2 u/g de peso corpóreo.

Foi realizada laparotomia expondo todo o abdome e órgãos retroperitoneais seguida da ligadura de maior número possível de alças intestinais.

Em seguida o tórax foi aberto, com incisão ao longo do eixo longitudinal do esterno, seguida da incisão do músculo diafragma bilateralmente. O coração foi exposto por abertura do pericárdio seguido de corte com tesoura na aurícula direita. Após incisão na aurícula direita, a parede livre do ventrículo esquerdo foi puncionada, perpendicularmente, com agulha de calibre 12 Gauge, pouco acima do ápice ventricular.

Foi iniciada a infusão de cloreto de potássio (14 mmol/L) que foi realizada até ser evidenciada parada cardíaca. Em seguida foi iniciada infusão de soro fisiológico a 0,9% sendo ligada a aorta e veia cava inferior. A infusão de soro fisiológico foi feita até os órgãos estarem visualmente bem perfundidos seguido de infusão de paraformaldeído a 4% tamponado, na quantidade de 300 mL. As infusões de soro fisiológico e paraformaldeído foram realizadas na mesma pressão que a pressão arterial sistólica do rato aferida uma semana antes do sacrifício através da medida indireta caudal.

Depois de fixado por perfusão o coração foi retirado e isolado dos demais tecidos pericárdicos. O coração foi pesado inteiro e separado em átrios, ventrículo esquerdo e direito ficando, o septo interventricular, como parte do ventrículo esquerdo e sendo as partes pesadas separadamente. Em seguida o ventrículo esquerdo foi mergulhado em paraformaldeído a 4%

tamponado, onde ficou por 24 horas, sendo posteriormente transferido para o álcool 70% onde ficou até ser processado para análise histológica.

O peso pós-fixado do coração foi determinado a partir do material armazenado em etanol a 70% e transformado em volume (Vol) em cm^3 , dividindo-se o peso pós-fixado pela densidade do tecido cardíaco fixado que é igual a $1,06 \text{ g/cm}^3$ [49].

3.6 Estereologia do ventrículo esquerdo

3.6.1 Amostragem do ventrículo esquerdo

O ventrículo esquerdo foi seccionado seriadamente no sentido ápice-base em fatias de 2 mm de espessura (Anexos, Figuras 1a, 1b e 1c). Em seguida as fatias resultantes foram novamente seccionadas no sentido perpendicular ao primeiro corte (Anexos, Figuras 1d e 1e), gerando de 25 a 40 pequenos pedaços de tecido por ventrículo esquerdo que foram agrupados lado a lado e amostrados pela técnica do “fractionator” [50] para a estimativa da densidade numérica e número total de núcleos de cardiomiócitos por ventrículo esquerdo. Para isto, foram selecionados 1 em cada 4 pequenos pedaços começando, aleatoriamente, a partir dos 4 primeiros. Os pedaços selecionados (6 a 10 por ventrículo esquerdo) de um mesmo animal foram emblocados em um único bloco de parafina sem levar em consideração a ordem em que foram cortados ou a orientação espacial dos mesmos.

Dos pequenos pedaços remanescentes foi selecionado um (1) pequeno pedaço por animal, de 3 animais de cada grupo experimental, com a finalidade de avaliar a média do número de núcleos por cardiomiócito. Estes pequenos tecidos foram processados de maneira que os animais de mesmo grupo experimental ficassem agrupados em um único bloco de parafina.

3.6.2 Estimativa da densidade numérica e do número total de núcleos de cardiomiócitos por ventrículo esquerdo

A partir de cada bloco de parafina preparado para a contagem do número de núcleos de cardiomiócitos no ventrículo esquerdo foram cortadas, através de um micrótomo, duas (2) secções consecutivas de 3 μm de espessura [51], denominadas de "corte de referência" e "corte correspondente" sendo posteriormente coradas com Hematoxilina/Eosina.

A densidade numérica dos núcleos de cardiomiócitos foi estimada usando o princípio do "physical disector" [52] conforme explicado a seguir. Em microscopia óptica com aumento de 400 X, 200 a 300 campos por animal foram randomicamente selecionados no "corte de referência", fotografados e denominados de "planos de referência" (Anexos, Figura 2). O "corte correspondente" foi examinado, no mesmo aumento microscópico, com a finalidade de identificar os campos histológicos correspondentes aos selecionados previamente no "plano de referência" sendo, então, fotografados e denominados de "planos correspondentes" (Anexos, Figura 2).

Um “grid” em forma de quadrado (Anexos, Figura 3) com área de $2500 \mu\text{m}^2$ foi superimposto aos “planos de referência” e “correspondentes” (Anexos, Figura 4). Desta maneira cada par formado por um “plano de referência” e seu “plano correspondente” constitui um volume de referência (V_{ref}) determinado pelo produto entre a área do “grid” ($A - 2500 \mu\text{m}^2$) e a distância entre as 2 secções ($t - 3 \mu\text{m}$) e expresso pela equação (4):

$$V_{ref} = A \times t \quad (4)$$

Uma vez estabelecido o volume de referência foi realizada a contagem dos núcleos de cardiomiócitos presentes em cada volume de referência. Para tal apenas os núcleos de cardiomiócitos que estavam dentro do “grid” de contagem, não tocavam as linhas de exclusão do “grid” (margens inferior e esquerda) e apareciam apenas no “plano de referência” e não apareciam no respectivo “plano correspondente” foram contados (Anexos, Figura 5). O número de núcleos de cardiomiócitos contidos em um determinado volume de referência foi denominado de Q^- . Após os números de cardiomiócitos terem sido contados em cada unidade de volume (Q^-) os mesmos foram somados (ΣQ^-) assim como os seus respectivos volumes de referência ($\Sigma(A \times t)$). Em seguida o número total de cardiomiócitos contados (ΣQ^-) foi dividido pela somatória dos volumes de referência ($\Sigma(A \times t)$) gerando a equação (5) [52]:

$$Nv = \Sigma Q^- / \Sigma(A \times t) \quad (5)$$

onde Nv representa a densidade numérica dos núcleos de cardiomiócitos, ou seja, o número de núcleos de cardiomiócitos contidos em $1 \mu\text{m}^3$ de tecido cardíaco.

O número total de núcleos de cardiomiócitos por ventrículo esquerdo ($N(nuclei/LV)$) foi calculado multiplicando-se Nv pelo volume total dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo ($Vmyocardium$) correspondente. Para cálculo do $Vmyocardium$ primeiro foi calculado o volume relativo do ventrículo esquerdo ocupado por cardiomiócitos ($Vv(my/ref)$) sendo este multiplicado pelo volume do ventrículo esquerdo (Vol) já calculado conforme descrito previamente na sessão anterior (3.5). Para cálculo do volume relativo do ventrículo esquerdo ocupado por cardiomiócitos ($Vv(my/ref)$) foram usadas as secções coradas com Hematoxilina/Eosina inicialmente utilizadas para a contagem de núcleos de cardiomiócitos. Desta maneira foi randomicamente superimposto sobre estas secções um “grid” composto por pontos distribuídos de maneira sistemática e uniforme sendo que os pontos que caíram sobre os cardiomiócitos (Pmy) e os pontos que caíram sobre o espaço de referência ($Pref$), neste caso, todo o tecido que compõe o ventrículo esquerdo (cardiomiócitos, vasos sanguíneos, fibroblastos, interstício, etc), foram contados. A partir destes valores o valor relativo do ventrículo ocupado por cardiomiócitos ($Vv(my/ref)$) foi calculado pela equação (6):

$$Vv(my/ref) = Pmy/Pref \quad (6)$$

O volume total dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo ($Vmyocardium$) foi estimado pela equação (7):

$$Vmyocardium = Vol \times Vv(my/ref) \quad (7)$$

Devemos observar que este método utiliza uma estrutura bidimensional para cálculo de uma densidade volumétrica. Esta extrapolação pode ser feita visto

que o emblocamento dos tecidos foi realizado de maneira randômica propiciando a chance de que os cortes histológicos fossem realizados em todas as orientações [53].

3.6.3 Estimativa da média do número de núcleos por cardiomiócito

Como descrito previamente por Brüel e colaboradores [54] com algumas modificações, foram cortadas 8 secções consecutivas de 3 μ m de espessura dos blocos de parafina preparados especialmente para contagem do número de núcleos por cardiomiócitos. As secções foram alocadas em lâminas silanizadas e identificadas conforme a ordem de corte. Foi realizada imunohistoquímica com técnica de dupla marcação em todas as secções com o objetivo de delimitar os limites de cada cardiomiócito. Para visualizar os discos intercalados responsáveis pela conexão entre cardiomiócitos foi utilizado anticorpo monoclonal de camundongo anti-caderina (pan, C1821, Sigma-Aldrich, USA); com a finalidade de visualizar as bordas laterais dos cardiomiócitos foi utilizado anticorpo policlonal de coelho anti-colágeno tipo IV (10760, MP Biomedicals LLC, USA).

Os cortes foram desparafinizados e a peroxidase endógena foi bloqueada utilizando-se peróxido de hidrogênio a 3% em álcool absoluto por 30 minutos seguido por um banho de 5 minutos em PBS. As ligações inespecíficas foram bloqueadas por caseína (Dako North America, CA, USA) por 30 minutos. Os cortes foram incubados “overnight” a 4°C com um “mix” composto pelos anticorpos primários (anti-caderina: 1:5000 e anti-colágeno

tipo IV: 1:100) diluídos em PBS. Após lavados em PBS, os cortes foram incubados com anticorpos secundários por 30 minutos usando o método LSAB/HRP (K0609, Dako North America, CA, USA) seguido da adição de AEC cromógeno (K3464, Dako North America, CA, USA) e contracorado com Hemalumbre de Mayer (Merck, Darmstadt, Germany).

Os cardiomiócitos foram amostrados com base em seus núcleos utilizando-se de um “grid” quadriculado em aumento de 400 X e avaliados conforme a técnica do “physical disector” [52]. Os cortes centrais 4 e 5 foram escolhidos inicialmente como “plano de referência” e “plano correspondente” respectivamente. Os núcleos de cardiomiócitos presentes no “plano de referência” que não tocavam as linhas de exclusão (bordas esquerda e inferior) e estavam ausentes no “plano correspondente” foram contados. Em seguida o corte 5 passou a ser considerado como “plano de referência” e o corte 4 como “plano correspondente” sendo que os mesmos critérios foram utilizados para contagem dos núcleos. Todos os cardiomiócitos amostrados foram seguidos em ambas as direções através dos cortes consecutivos até que eles desaparecessem e fossem contados todos os núcleos presentes dentro dos mesmos. Foram avaliados cerca de 16 cardiomiócitos por animal. Pelo fato de os cardiomiócitos terem sido amostrados com base em seus núcleos, aqueles com 2 ou mais núcleos tiveram maior chance de serem amostrados quando comparados com cardiomiócitos com apenas 1 núcleo. Para corrigir este viés na amostragem, o número de cardiomiócitos mononucleados foi dividido por 1, o número de cardiomiócitos binucleados foi dividido por 2 e assim sucessivamente de maneira que a média (média

harmônica) de núcleos por cardiomiócito ($Nn(nuclei/myocyte)$) fosse calculada conforme a equação (8):

$$Nn(nuclei/myocyte) = \sum [Q_1^- + Q_2^- + Q_3^- + Q_4^-] / (\sum Q_1^-/1) + (\sum Q_2^-/2) + (\sum Q_3^-/3) + (\sum Q_4^-/4) \quad (8)$$

Onde Q_1^- é o número de cardiomiócitos com 1 núcleo, Q_2^- é o número de cardiomiócitos com 2 núcleos, Q_3^- é o número de cardiomiócitos com 3 núcleos e Q_4^- é o número de cardiomiócitos com 4 núcleos.

3.6.4 Estimativa do número total de cardiomiócitos no ventrículo esquerdo

O número total de cardiomiócitos por ventrículo esquerdo ($N(myocytes/LV)$) foi estimado conforme descrição de Brül e colaboradores [54] dividindo-se o número total de núcleos de cardiomiócito no ventrículo esquerdo $N(nuclei/LV)$ pela média do número de núcleos por cardiomiócito $Nn(nuclei/myocyte)$ e representado pela equação (9):

$$N(myocytes/LV) = N(nuclei/LV) / Nn(nuclei/myocyte) \quad (9)$$

3.6.5 Estimativa do volume médio do cardiomiócito ($V(myocyte)$)

O volume médio do cardiomiócito expresso em μm^3 foi estimado dividindo-se o volume total dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo ($V(myocardium)$) pelo número total de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo ($N(myocytes/LV)$) conforme a equação (10) [53]:

$$V(myocyte) = V(myocardium) / N(myocytes/LV) \quad (10)$$

3.7 Área de secção transversal do cardiomiócito

Os cortes corados com Hematoxilina/Eosina, para contagem do número de núcleos de cardiomiócitos, foram utilizados para avaliação da área de secção transversal do cardiomiócito. Os cortes utilizados foram selecionados aleatoriamente e avaliados em microscopia óptica com aumento de 400 X. Cardiomiócitos foram considerados elegíveis para avaliação da área de secção transversal apenas quando apareciam cortados transversalmente, apresentavam limites bem definidos e exibiam um núcleo central.

Para análise de imagem e quantificação da área de secção transversal foi utilizado o software ImageJ. O software foi calibrado medindo-se uma distância conhecida (régua de calibragem) em aumento de 400 X. Os limites de cada cardiomiócito foram circundados com a ferramenta “Freehand selection tool” e a área interna do cardiomiócito foi medida (μm^2). A média aritmética de 50 a 100 cardiomiócitos por coração foi considerada para análise estatística.

3.8 Quantificação de fibrose intersticial

As lâminas, depois de coradas por picrossirius, foram focalizadas com aumento de 200x e fotografadas em 12 campos diferentes por animal, escolhidos de maneira aleatória.

Foi sobreposto sobre os campos um painel composto de vários pontos equidistantes. O painel continha um total de 80 pontos e foram contados apenas os pontos que caíam sobre o colágeno intersticial (corado em vermelho). Os pontos que caíam fora do tecido cardíaco foram excluídos.

Para o cálculo da porcentagem de colágeno intersticial no ventrículo esquerdo (*% colágeno VE*) foram somados todos os pontos que caíram sobre o tecido cardíaco em todos os 12 campos (*NTP*) e somados todos os pontos que caíram sobre as regiões do interstício que continham colágeno (*NPC*). Os pontos que caíram sobre o colágeno perivascular não foram considerados como colágeno intersticial e entraram na somatória do número total de pontos (*NTP*).

O cálculo da *% colágeno VE* foi estimado conforme equação (11):

$$\% \text{ colágeno VE} = (NPC/NTP) \times 100 \quad (11)$$

3.9 Dosagem da atividade da enzima conversora da angiotensina tecidual

O tecido cardíaco (ventrículo esquerdo) foi coletado e homogeneizado em tampão borato com sacarose na proporção de 1 g de tecido para 10 mL de tampão. Após as amostras terem sido homogeneizadas foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes separados e armazenados a -80°C até o seu processamento.

A atividade da enzima foi determinada em 20 μL do sobrenadante dos homogenatos de ventrículo esquerdo que foram incubados respectivamente com 490 μL ou 480 μL do substrato da enzima conversora da angiotensina, Hippuril Histidil-Leucina (Hip His-Leu 5 mM), a 37°C durante 15 ou 30 minutos. Essa reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL de solução de NaOH (0,34 N). A seguir, acrescentou-se 100 μL da solução de α -ftaldialdeído (2%), protegido da luz e em temperatura ambiente. Esta substância liga-se ao produto da reação, His-Leu, e permite a sua leitura fluorimetricamente. Após 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 200 μL de HCl (3 N), sempre sob agitação. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi então submetido a leitura da intensidade de fluorescência em espectrofluorímetro (Shimadzu, RF-1501, Kyoto, JP), usando um comprimento de onda de 365 nm para excitação e de 495 nm para emissão.

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas sendo que a fluorescência intrínseca das amostras foi corrigida através de controles onde o material enzimático foi adicionado logo após a reação ser paralisada com NaOH 0,34 M, mantendo as demais etapas do ensaio inalteradas.

Para cada ensaio foi determinado uma curva padrão, relacionando-se a intensidade da fluorescência com quantidades conhecidas do produto formado (His-Leu). A atividade específica da enzima conversora da angiotensina foi expressa em nMoles His-Leu/min/mg de proteína nos tecidos.

A dosagem da proteína foi realizada nas amostras de tecidos onde foi medida a atividade da enzima conversora da angiotensina, pelo método micrométrico de Bradford [55].

3.10 Western blotting do sistema renina-angiotensina

Amostras de ventrículo esquerdo foram pesadas e depois homogeneizadas em tampão de extração protéica (100 mM KCl, 10 mM HEPES, 3 mM $MgCl_2$, 5 mM EDTA, 10% glicerol, 1 mM DTT, 10% SDS, 0,1 ml inibidor de proteinase (SIGMA). A concentração de proteínas foi determinada usando o método de Bradford [55]. Quantidades iguais de proteína para todas as amostras (100µg) foram misturadas a um tampão para SDS e colocadas nos *slots* do gel SDS - PAGE (sódio dodecilsulfato poliacrilamida) 12% e submetidas à eletroforese. Após este processo as amostras contidas no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose.

As membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado a 5% misturados a TBST por 30 minutos. Anticorpos primários policlonais foram adicionados na solução seguido das devidas encubações. A seguir os *blots* foram lavados e incubados com anticorpos secundários ligados a peroxidase (HRP) por 2 horas. O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado com a adição de substrato quimioluminescente ECL (Amersham Biosciences, UK).

A seguir os *blots* foram expostos aos filmes de raios-X (Agfa, Argentina) ou (Amersham.Biosciences, UK Ltd). As quantificações densitométricas das bandas foram feitas através do programa Scion image for Windows (Scion Corporation, USA). Os resultados da expressão protéica foram determinados pela razão entre a intensidade da banda de interesse e a intensidade da banda de gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

3.11 Anticorpos para western blot

Foram utilizados:

Primários

Angiotensinogênio - RDI - código (rtangenabm) - diluição 1:500 - 1 h de incubação.

Enzima conversora de angiotensina 1 - Santa Cruz Biotechnology - código (H-170) - sc 20791 - diluição 1:250 - 1 hora de incubação.

Enzima conversora de angiotensina 2 - Santa Cruz Biotechnology - código (H-175) - sc 20998 - diluição 1:250 - incubação “overnight”.

Receptor AT₁ - Santa Cruz Biotechnology - código (N-10)- sc 1173 - diluição 1:200 - incubação “overnight”.

Receptor AT₂ - Santa Cruz Biotechnology - código - sc 7420 - diluição 1:200 - 1 hora de incubação.

Renina - RDI - código (rtreninbm) - diluição 1:200 - 1 hora de incubação.

Gliceraldeido 3-fosfato desidrogenase - Santa Cruz Biotechnology - código (6C5) - sc 32233 - diluição 1:1000 - incubação “overnight”.

Secundários

Anti - camundongo - Dakopatts - código P-0260 - diluição - 1:5000 - 1 hora de incubação.

Anti - coelho - Amersham - código NA934V- diluição - 1:5000 - 1 hora de incubação.

Anti - cabra - Sigma - código A5420-diluição – 1:20000 - 1 hora de incubação.

3.12 Quantificação de angiotensina II no ventrículo esquerdo

Cortes do ventrículo esquerdo de cada animal foram desparafinizados a 60°C por 30 minutos seguido de imersão em xileno por 3 períodos de 9 minutos cada. Em seguida os cortes foram reidratados com etanol 100% por 2 períodos de 5 minutos cada seguido de 2 outros períodos adicionais de 3 minutos cada com etanol a 96%. Os cortes foram mantidos por 5 minutos em água destilada seguido de imersão em tampão citrato aquecido (0,21%, pH=6, 100°C) por 30 minutos. Os cortes foram lavados em PBS por 3 períodos de 10 minutos. Após, os cortes foram circulados com “PAP pen” (Vector Laboratories) com a finalidade de formar uma barreira a prova de água. Ligações não específicas foram bloqueadas através de incubação das secções com solução bloqueadora (albumina bovina sérica a 1% + 5% de sucrose em PBS) por 3 horas. O excesso da solução bloqueadora foi removido e os cortes foram incubados com “rabbit anti-angiotensin II polyclonal antibody” (Peninsula Laboratories, CA, USA) na diluição de 1:200, “overnight” a 4 °C. Os cortes foram lavados em PBS por 3 períodos de 10 minutos e incubado com um anticorpo fluorescente “goat anti-rabbit IgG”

(Dylight™680 conjugate) por 90 minutos a 4 °C. Em seguida os cortes foram lavados por 3 períodos de 20 minutos com PBS e “Tween 20”. A intensidade da fluorescência foi medida usando equipamento Odyssey (Li-Cor Biosciences) sendo os resultados expressos em unidades arbitrárias de fluorescência.

3.13 Avaliação da expressão gênica do sistema renina-angiotensina

3.13.1 Extração de RNA total do ventrículo esquerdo

A extração de RNA total foi realizada em 4 a 10 amostras por vez para evitar erros de manipulação e degradação do RNA das amostras durante a extração. Os tecidos (ventrículo esquerdo) armazenados em freezer -80°C foram pesados (balança AL200, Marte, Brasil) e colocados em tubo de ensaio de plástico estéril. Todo o procedimento foi realizado sob gelo. Foram acrescentados 2 mL de Trizol para cada 100 mg de tecido e homogeneizados em aparelho Ultra-Turrax (T-25, IKA Works Inc., North Carolina, EUA).

Deste homogenato foi transferido 1 mL para um tubo plástico livre de RNase e DNase e incubado por 5 minutos, à temperatura ambiente, para completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Este homogenato foi centrifugado a 4°C por 10 minutos a 12.000x g. Em seguida o sobrenadante foi transferido para outro tubo e foi adicionado 200 µL de clorofórmio para

separação da amostra em fase orgânica e inorgânica. Esta solução foi agitada no *vortex* e incubada à temperatura ambiente por 2 minutos e a seguir foi centrifugada a 4°C por 15 minutos, a 12.000x g. A fase superior (incolor) da solução foi transferida para outro tubo e acrescentado 500 μ L de álcool isopropílico. A mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada a 4°C por 10 minutos, a 12.000x g. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado por inversão do tubo e o *pellet* formado no fundo do tubo foi lavado com 1 mL de etanol 75% gelado. Novamente o material foi centrifugado (12.000x g, 5 min, 4°C) e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi ressuspendido com 100 μ L de água DEPC (dietilpirocarbonato) e esta solução foi incubada em banho seco a 65°C por 10 minutos. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C após a quantificação do RNA total.

A quantificação do RNA foi realizada através de leituras a 260 nm e 280 nm em espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-1100; Tokyo, JP). Para isso um tubo livre de RNase e DNase contendo 5 μ L de amostra e 995 μ L de água Milli-Q autoclavada foi incubado em banho seco a 65°C por 10 minutos. Uma unidade de densidade óptica, lida no comprimento de onda de 260 nm, equivale a 40 μ g/mL de RNA total.

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

3.13.2 Reação de transcriptase reversa (RT)

A síntese de DNA complementar foi realizada através da reação de RT utilizando-se a enzima transcriptase reversa ImProm II (Promega, Brasil). O protocolo para a síntese de DNA complementar foi dividido em três fases: na primeira, a fase de desnaturação, onde 1 µg de RNA total foi colocado em tubo livre de RNase e DNase. Adicionou-se 1 µL de oligo deoxirribonucleotídeo T(dT) 150 ng/mL e completou-se o volume com água DEPC para 5 µL. Os tubos foram colocados em termociclador (PTC-200, MJ Research, Inc., EUA) e incubados a 70°C por 5 minutos. Na segunda fase, chamada fase de anelamento, foi preparada uma solução constituída por 4 µL de tampão de reação 5X; 1 µL de dNTP [2'-Deoxinucleotídeo 5'-trifosfato] (10 mM); 2,4 µL de cloreto de magnésio (25 mM); 6,6 µL de água Milli-Q autoclavada e 1 µL de ImProm II e esta foi adicionada ao tubo de reação. Após a adição da solução, as amostras foram levadas ao termociclador utilizando um programa de 25°C por 5 minutos e depois 60 minutos a 42°C. Na última fase ocorreu a inativação da transcriptase reversa por aquecimento a 70°C por 15 minutos. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

3.13.3 Reação de polimerase em cadeia (PCR)

Uma alíquota de 1 µL de DNA complementar foi transferida para tubo livre de RNase e DNase onde foi realizada a reação de reação de polimerase em cadeia. Preparou-se uma solução de reação contendo para

cada tubo 2,5 μL de tampão PCR 10X [100 mM Tris HCl pH 8,5 e 500 mM KCl]; 0,75 μL de cloreto de magnésio (50 mM); 0,5 μL de dNTP (10 mM); 3 μL de *primer* sense (5 μM / μL); 3 μL de *primer* antisense (5 μM / μL); 0,4 μL de Taq DNA polimerase; 2,5 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 11,35 μL de água Milli-Q. A solução foi homogeneizada em *vortex*, adicionada ao tubo contendo amostra de DNA complementar e levado ao termociclador.

Os produtos da reação de reação de polimerase em cadeia foram analisados em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio usando um DNA ladder de 100 pares de base. Foi feito rotineiramente um controle negativo omitindo apenas o DNA complementar da reação de reação de polimerase em cadeia. As bandas foram semi-quantificadas usando o software Alpha ImagerTM 1220 version 5.5 (Alpha Innotech Corporation, EUA) e comparou relativamente com a expressão gênica do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), onde foi expressa como valor de densidade integrada (IDV/GAPDH).

As quantidades de DNA complementar, temperatura de anelamento e número de ciclos usados no PCR das amostras do coração estão descritos no quadro 1. É importante ressaltar que a temperatura de anelamento é específica do gene (*primer*).

Quadro 1 - DNA complementar, temperatura de anelamento e número de ciclos usados no PCR das amostras do coração

Gene	Quantidade de cDNA	Temperatura de anelamento	Número de ciclos
GAPDH	1 μL	68°C	30
Angiotensinogênio	1 μL	58,2°C	35
Renina	7 μL	58°C	40
Enzima conversora da angiotensina	2 μL	52,8°C	35
AT1	1 μL	61,5°C	40
AT2	7 μL	60°C	40

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de seus valores absolutos. Alguns dados que não apresentaram distribuição normal foram submetidos a transformação logarítmica (peso corpóreo e pressão arterial média) ou elevados à segunda potência (volume médio do cardiomiócito) a fim de aproximá-los da distribuição normal e melhorar o poder dos testes estatísticos realizados. Foi utilizada análise de variância de um fator (*One-Way ANOVA*) para comparação entre variáveis avaliadas em apenas 1 momento no tempo ou análise de variância de dois fatores (*Two-way ANOVA*) para comparação entre variáveis avaliadas em 2 momentos no tempo. As análises de variância, quando significativas, foram seguidas de pós-teste de Student-Newman-Keuls ou Fisher LSD sendo, este último, aplicado apenas quando o primeiro não conseguiu discriminar a diferença. A associação entre 2 variáveis foi avaliada utilizando valores absolutos, após verificação de distribuição normal dos valores, através de regressão linear (pressão arterial vs. massa ventricular esquerda) ou não linear ajustada à curva quadrática (número de cardiomiócitos vs. volume dos cardiomiócitos), sendo incluídos os animais de todos os grupos experimentais para análise.

O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Mães

5.1.1 Massa corpórea, consumo de ração e pressão arterial caudal

Em todos os 3 grupos maternos o peso corpóreo aumentou semanalmente ($p < 0,05$) da 12^a até a 15^a (última semana de gestação) semana de idade diminuindo ($p < 0,05$) logo após o parto, ou seja, na 16^a semana de idade. O peso corpóreo foi menor ($p < 0,05$) na última semana de gestação (15^a semana de idade) nas mães alimentadas com dieta hipossódica comparadas com as mães alimentadas com dieta normossódica (Figura 3A). O consumo de ração não foi diferente ($p > 0,05$) entre os diversos grupos maternos (Figura 3B) (Anexos, Tabela 1).

Figura 3 - A) Evolução ponderal (g) durante a gestação (13^a a 15^a semanas) e após a gestação (16^a a 18^a semanas) e **B)** consumo de ração (g/rato/dia) ao final de cada semana de gestação de mães alimentadas com dieta hipo (HO, n=5-8), normo (NR, n=5-8) ou hipersódica (HR, n=5-7) durante a gestação. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média de seus valores absolutos. Utilizado pós-teste de Fisher-LSD para evolução ponderal e pós-teste de Student-Newman-Keuls para consumo de ração. * $p < 0,05$ vs. a semana anterior dentro de um mesmo grupo (válido para todos os grupos), † $p < 0,05$ NR vs. HO, ‡ $p < 0,05$ HR vs. HO

Nas mães alimentadas com dieta hipossódica durante a gestação a pressão arterial caudal foi menor ($p<0,05$) na última semana de gestação (15ª semana de idade) quando comparada com as pressões aferidas na 14ª (2ª semana de gestação), 16ª, 17ª e 18ª semanas de idade. Nas mães alimentadas com dieta normossódica e hipersódica durante a gestação a pressão arterial, na última semana de gestação (15ª semana de idade), foi menor ($p<0,05$) apenas quando comparada com as pressões arteriais aferidas no período após o parto, ou seja, quando comparada com a 16ª e 18ª semana de idade nas mães alimentadas com dieta normossódica e quando comparada com a 17ª e 18ª semana de idade nas mães alimentadas com dieta hipersódica (Figura 4) (Anexos, Tabela1).

A pressão arterial foi maior ($p<0,05$) na 17ª semana de idade nas mães alimentadas com dieta hipersódica quando comparada com as mães alimentadas com dieta normossódica durante a gestação (Figura 4) (Anexos, Tabela1).

Figura 4 - Pressão arterial caudal (mmHg) durante (13^a a 15^a semanas) e após a gestação (16^a a 18^a semanas) de mães alimentadas com dieta hipo (HO, n=5-7), normo (NR, n=5-7) ou hipersódica (HR, n=5-7) durante a gestação. Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média de seus valores absolutos. Utilizado pós-teste de Fisher-LSD. * $p < 0,05$ vs. 14, 16, 17 e 18 semanas (apenas no grupo HO), † $p < 0,05$ vs. 16 e 18 semanas (apenas no grupo NR), ‡ $p < 0,05$ vs. 17 e 18 semanas (apenas no grupo HR), a $p < 0,05$ HR vs. NR

5.2 Proles

5.2.1 Peso corpóreo ao nascimento, peso corpóreo, consumo de ração, consumo de água e volume urinário na 20ª e 36ª semanas de idade, sódio e potássio séricos e excreção de sódio urinário em 24 horas medidos na 36ª semana de idade

O peso corpóreo ao nascimento dos machos da prole de mães alimentadas com dieta hipersódica durante a gestação foi maior ($p<0,05$) quando comparado com as proles de mães alimentadas com dieta hipo e normossódica durante a gestação. O peso corpóreo ao nascimento dos machos da prole de mães alimentadas com dieta hipossódica durante a gestação foi menor ($p<0,05$) quando comparado com a prole de mães alimentadas com dieta normossódica durante a gestação (Figura 5) (Anexos, Tabela 2).

Figura 5 - Peso corpóreo ao nascimento (g) dos machos da prole de mães alimentadas com dieta hipo (HO, n=44), normo (NR, n=46) ou hipersódica (HR, n=28) durante a gestação. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média de seus valores absolutos. Utilizado pós-teste de Student-Newman-Keuls. * $p<0,05$ vs. NR e HO, † $p<0,05$ vs. NR

O peso corpóreo na 20ª e 36ª semanas de idade permaneceu maior ($p<0,05$) nas proles de mães alimentadas com dieta hipersódica comparadas com as proles de mães alimentadas com dieta hipossódica. O peso corpóreo na 36ª semana de idade foi maior ($p<0,05$) nas proles alimentadas com dieta hipersódica durante a vida adulta comparadas com as proles de mesmo grupo materno mantidas em dieta normossódica, com exceção da prole de mães alimentadas com dieta normossódica durante a gestação. O peso corpóreo na 36ª semana de idade foi maior ($p<0,05$) na prole de mães alimentadas com dieta hipersódica durante a gestação e que receberam dieta hipersódica na idade adulta comparadas com a prole de mães alimentadas com dieta normossódica durante a gestação e que receberam dieta hipersódica na idade adulta (Figura 6A) (Anexos, Tabela 2).

O consumo de ração (Figura 6B) e de água (Figura 6C) não foi diferente ($p>0,05$) entre os diversos grupos tanto na 20ª quanto na 36ª semana de idade (Anexos, Tabela 2).

O volume urinário na 36ª semana de idade foi maior ($p<0,05$) nas proles alimentadas com dieta hipersódica durante a vida adulta comparadas consigo mesmas na 20ª semana de idade e com as proles de 36 semanas de idade e de mesmo grupo materno mantidas em dieta normossódica por toda vida (Figura 6D) (Anexos, Tabela 2).

Figura 6 - A) Peso corpóreo (g), **B)** consumo de ração (g/rato/dia), **C)** consumo de água (mL/rato/dia) e **D)** volume urinário (mL/rato/dia) na 20^a e 36^a semanas de idade dos machos da prole de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação e que receberam dieta normossódica (HOnr, n=7-16; NRnr, n=6-17; HRnr, n=5-13) ou hipersódica (HOhr, n=6-17; NRhr, n=8-18; HRhr, n=7-16) durante a idade adulta. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média de seus valores absolutos. Os valores do peso corpóreo foram submetidos à transformação logarítmica para análise estatística. Utilizado pós-teste de Student-Newman-Keuls. * $p < 0,05$ vs. HOnr da mesma idade, † $p < 0,05$ vs. HRhr da mesma idade, ‡ $p < 0,05$ vs. NRhr da mesma idade, a $p < 0,05$ 36 vs. 20 semanas de idade nos animais de mesmo grupo

A excreção de sódio urinário foi maior ($p < 0,05$) nas proles alimentadas com dieta hipersódica na idade adulta comparadas com as proles de mesmo grupo materno mantidas em dieta normossódica (Figura 7A) (Anexos, Tabela 2).

Os valores séricos de sódio (Figura 7B) e potássio (Figura 7C) não diferiram ($p > 0,05$) entre os diversos grupos experimentais (Anexos, Tabela 2).

Figura 7 - A) Excreção urinária de sódio (mmol/rato/dia), **B)** sódio sérico (mmol/L), **C)** potássio sérico (mmol/L) na 36ª semana de idade dos machos da prole de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação e que receberam dieta normossódica (HOhr, n=6; NRhr, n=6; HRhr, n=4-5) ou hipersódica (HOhr, n=8; NRhr, n=8; HRhr, n=4-5) durante a idade adulta. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média de seus valores absolutos. Utilizado pós-teste de Student-Newman-Keuls. * $p < 0,05$ vs. HOhr, † $p < 0,05$ vs. HRhr, ‡ $p < 0,05$ vs. NRhr

5.2.2 Massa cardíaca ao nascimento e 36ª semana de idade e pressão arterial média na 36ª semana de idade

A massa cardíaca ao nascimento, corrigida pelo peso corpóreo, foi maior ($p < 0,05$) na prole de mães alimentadas com dieta hipersódica comparada com as proles de mães alimentadas com dieta normo e hipossódica durante a gestação (Figura 8A) (Anexos, Tabela 3).

A massa cardíaca aferida na 36ª semana de idade foi maior ($p < 0,05$) na prole de mães alimentadas com dieta hipersódica durante a gestação e

que receberam dieta hipersódica na idade adulta comparada com a prole de mesmo grupo materno mantida em dieta normossódica e com as proles dos grupos maternos que foram alimentados com dieta normo e hipossódica durante a gestação e que receberam dieta hipersódica na idade adulta (Figura 8D). Contudo, quando a massa cardíaca foi normalizada pelo peso corpóreo (Figura 8B) ou comprimento da tíbia (Figura 8C), esta deixou de ser diferente entre os grupos ($p>0,05$) (Anexos, Tabela 3).

Figura 8 - A) Massa cardíaca ao nascimento normalizada pelo peso corpóreo (g/kg) dos machos da prole de mães alimentadas com dieta hipo (HO, $n=11$), normo (NR, $n=23$) ou hipersódica (HR, $n=15$) durante a gestação e massa ventricular esquerda normalizada pelo **B)** peso corpóreo (g/kg), **C)** comprimento da tíbia (g/m) e **D)** não normalizada (g) na 36ª semana de idade dos machos da prole de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação e que receberam dieta normossódica (HO_{nr}, $n=9-15$; NR_{nr}, $n=10-13$; HR_{nr}, $n=6-13$) ou hipersódica (HO_{hr}, $n=9-15$; NR_{hr}, $n=12-18$; HR_{hr}, $n=6-13$) durante a idade adulta. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média de seus valores absolutos. Utilizado pós-teste de Student-Newman-Keuls. * $p<0,05$ vs. HO e NR, † $p<0,05$ vs. NR_{nr}, HO_{hr} e HR_{nr}

A pressão arterial média foi menor ($p<0,05$) nas proles de mães alimentadas com dieta hipossódica durante a gestação e que receberam sobrecarga crônica de cloreto de sódio na idade adulta comparadas com proles de mesmo grupo materno mantidas em dieta normossódica e com as proles dos outros grupos maternos também submetidas à sobrecarga de cloreto de sódio na vida adulta (Figura 9A) (Anexos, Tabela 3).

Através de análise de regressão linear não foi verificada correlação ($p>0,05$; $r=0,014$) entre a pressão arterial média e a massa ventricular esquerda (Figura 9B).

Figura 9 - A) Pressão arterial média (mmHg) e **B)** correlação entre pressão arterial média (mmHg) e massa ventricular esquerda (g) na 36ª semana de idade dos machos da prole de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação e que receberam dieta normossódica (HOnr, n=7; NRnr, n=7; HRnr, n=6) ou hipersódica (HOhr, n=5; NRhr, n=7; HRhr, n=8) durante a idade adulta. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média de seus valores absolutos. Os valores de pressão arterial média foram submetidos à transformação logarítmica para análise estatística e utilizado pós-teste de Fisher-LSD. * $p < 0,05$ vs. HRhr, NRhr e HOnr

5.2.3 Análise ecocardiográfica do ventrículo esquerdo na 20ª e 30ª semanas de idade

A massa estimada (Figura 10A) e o diâmetro diastólico da cavidade do ventrículo esquerdo (Figura 10D) não foram diferentes entre os diversos grupos. A espessura do septo interventricular (Figura 10B) e da parede posterior do ventrículo esquerdo (Figura 10C) e a espessura relativa da parede do ventrículo esquerdo (Figura 10E) aumentaram ($p<0,05$) da 20ª para a 30ª semana de idade somente na prole de mães alimentadas com dieta hipersódica durante a gestação e que receberam dieta hipersódica na idade adulta. O débito cardíaco na 30ª semana de idade foi menor na prole de mães alimentadas com dieta hipossódica durante a gestação e que receberam dieta hipersódica na idade adulta comparada com as proles de mães alimentadas com dieta normossódica ($p=0,06$) e hipersódica ($p<0,05$) durante a gestação e que receberam dieta hipersódica na idade adulta e foi maior ($p<0,05$) na prole de mães alimentadas com dieta hipersódica durante a gestação e que receberam dieta hipersódica na idade adulta comparado com as proles de mesmo grupo materno mantidas em dieta normossódica (Figura 10F) (Anexos, Tabela 4).

Figura 10 - A) Massa ventricular esquerda (g), **B)** espessura do septo interventricular (cm), **C)** espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo (cm), **D)** diâmetro diastólico da cavidade do ventrículo esquerdo (cm), **E)** espessura relativa da parede do ventrículo esquerdo e **F)** débito cardíaco (mL/minuto) na 20ª e 30ª semana de idade dos machos da prole de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação e que receberam dieta normossódica (HOhr, n=7; NRhr, n=6-8; HRhr, n=3-5) ou hipersódica (HOhr, n=8; NRhr, n=8; HRhr, n=7) durante a idade adulta. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$ 30 vs. 20 semanas de idade nos animais de mesmo grupo, † $p < 0,05$ vs. HRhr, ‡ $p = 0,06$ vs. NRhr. Pós teste de Student-Newman-Keuls em todas as variáveis exceto para débito cardíaco onde foi realizado pós-teste de Fisher-LSD

5.2.4 Análise histológica do ventrículo esquerdo na 36ª semana de idade

A área de secção transversal (Figura 11A) e o volume médio do cardiomiócito (Figura 11B) foram maiores ($p<0,05$) na prole de mães alimentadas com dieta hipersódica durante a gestação e que recebeu dieta hipersódica na idade adulta comparada com a prole de mesmo grupo materno mantida em dieta normossódica e com as proles de mães alimentadas com dieta normo e hipossódica durante a gestação e que receberam dieta hipersódica na idade adulta (Anexos, Tabela 5).

Figura 11 - A) Área de secção transversal do cardiomiócito (μm^2) e **B)** volume médio do cardiomiócito ($\mu\text{m}^3 \times 10^4$) na 36^a semana de idade dos machos da prole de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação e que receberam dieta normossódica (HONr, n=7; NRnr, n=6; HRnr, n=5) ou hipersódica (HOhr, n=8; NRhr, n=8; HRhr, n=5) durante a idade adulta. Fotos em aumento de 400 X. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média de seus valores absolutos. Os valores do volume médio do cardiomiócito foram submetidos à transformação quadrática para análise estatística. Utilizado pós-teste de Student-Newman-Keuls. * $p < 0,05$ vs. NRhr, HOhr e HRnr

A fibrose intersticial (Figura 12C) e o número de cardiomiócitos (Figura 12A) no ventrículo esquerdo não foram diferentes ($p>0,05$) entre os diversos grupos. A média do número de núcleos por cardiomiócito foi maior ($p<0,05$) apenas na prole de mães alimentadas com dieta hipossódica durante a gestação e que recebeu dieta hipersódica na idade adulta comparada com a prole de mesmo grupo materno mantida em dieta normossódica (Figura 12B) (Anexos, Tabela 5).

Figura 12 - A) Número total de cardiomiócitos no ventrículo esquerdo, **B)** média do número de núcleos por cardiomiócito e **C)** fibrose intersticial (%) na 36ª semana de idade dos machos da prole de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação e que receberam dieta normossódica (HONr, n=3-7; NRnr, n=3-6; HRnr, n=3-5) ou hipersódica (HOhr, n=3-8; NRhr, n=3-8; HRhr, n=3-5) durante a idade adulta. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média de seus valores absolutos. Utilizado pós-teste de Student-Newman-Keuls. * $p<0,05$ vs. HONr

Através de regressão não-linear ajustada à curva quadrática, foi observada uma correlação negativa ($p < 0,0001$; $r = 0,81$) entre o volume e o número de cardiomiócitos no ventrículo esquerdo (Figura 13).

Figura 13 - Análise de regressão não linear ajustada à curva quadrática entre número de cardiomiócitos no ventrículo esquerdo e volume do cardiomiócito. Variáveis obtidas na 36ª semana de idade dos machos da prole de mães alimentadas com dieta hipo, normo ou hipersódica durante a gestação e que receberam dieta normossódica ou hipersódica durante a idade adulta. Para análise foram utilizados valores absolutos

5.2.5 Expressão gênica de componentes do sistema renina angiotensina no ventrículo esquerdo

A expressão gênica dos componentes do sistema renina-angiotensina não foi diferente ($p>0,05$) entre os diversos grupos experimentais exceto pela maior ($p<0,05$) quantidade de RNAm da enzima conversora da angiotensina na prole de mães alimentadas com dieta hipersódica durante a gestação e que recebeu dieta hipersódica na idade adulta comparada com a prole de mães alimentadas com dieta normossódica durante a gestação e que recebeu dieta hipersódica na idade adulta (Figura 14) (Anexos, Tabela 6).

Figura 14 - Expressão gênica (unidade arbitrária – UA) no ventrículo esquerdo do **A)** receptor AT1, **B)** receptor AT2, **C)** renina, **D)** angiotensinogênio e **E)** enzima conversora da angiotensina (ECA) na 36ª semana de idade dos machos da prole de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação e que receberam dieta normossódica (HOnr, n=8; NRnr, n=7; HRnr, n=8) ou hipersódica (HOhr, n=7; NRhr, n=10; HRhr, n=8) durante a idade adulta. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média de seus valores absolutos. Utilizado pós-teste de Student-Newman-Keuls. * $p < 0,05$ vs. NRhr

5.2.6 Expressão protéica de componentes do sistema renina-angiotensina, atividade da enzima conversora da angiotensina e quantificação do conteúdo de angiotensina II no ventrículo esquerdo

A expressão protéica de componentes do sistema renina-angiotensina (Figura 15), a atividade da enzima conversora de angiotensina (Figura 16) e o conteúdo de angiotensina II no ventrículo esquerdo (Figura 17) não foram diferentes ($p > 0,05$) entre os diversos grupos experimentais (Anexos, Tabela 7).

Figura 15 - Expressão protéica (unidade arbitrária – UA) no ventrículo esquerdo do **A)** receptor AT1, **B)** receptor AT2, **C)** renina, **D)** angiotensinogênio, **E)** enzima conversora da angiotensina 1 (ECA1) e **F)** enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) na 36ª semana de idade dos machos da prole de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação e que receberam dieta normossódica (HOhr, n=8; NRhr, n=7; HRhr, n=8) ou hipersódica (HOhr, n=7; NRhr, n=10; HRhr, n=8) durante a idade adulta. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média de seus valores absolutos. Utilizado pós-teste de Student-Newman-Keuls

Figura 16 - Atividade da enzima conversora de angiotensina (nmol His-Leu/minuto/mg) no ventrículo esquerdo de machos de 36 semanas de idade das proles de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação e que receberam dieta normossódica (HONr, n=8; NRnr, n=7; HRnr, n=8) ou hipersódica (HOhr, n=7; NRhr, n=10; HRhr, n=8) durante a idade adulta. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média de seus valores absolutos. Utilizado pós-teste de Student-Newman-Keuls

Figura 17 - Conteúdo de angiotensina II (unidade arbitrária de fluorescência) no ventrículo esquerdo de machos de 36 semanas de idade das proles de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação e que receberam dieta normossódica (HONr, n=6; NRnr, n=6; HRnr, n=5) ou hipersódica (HOhr, n=8; NRhr, n=8; HRhr, n=5) durante a idade adulta. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média de seus valores absolutos. Utilizado pós-teste de Student-Newman-Keuls

6 DISCUSSÃO

Mães

O peso materno, ao final da gestação, é uma somatória do ganho ponderal materno e do ganho ponderal por parte dos fetos. O menor peso corpóreo, ao final da gestação, apresentado pelas mães alimentadas com dieta hipossódica pode estar relacionado a restrição no crescimento intrauterino de suas proles, conforme verificado pelo baixo peso ao nascimento. A influência de variações no consumo calórico e/ou protéico durante a gestação sobre o peso materno torna-se pouco provável uma vez que o consumo de ração não foi diferente entre os grupos e as dietas divergem apenas nos seus conteúdos de cloreto de sódio. Alterações no balanço energético materno bem como menor retenção hidrossalina por parte destas mães, embora não avaliadas, também podem ter contribuído para o menor peso deste grupo materno ao final da gestação.

A pressão arterial durante toda a gestação (13ª a 15ª semanas de idade) não foi diferente entre os grupos experimentais. Este resultado confirma observação prévia feita por Leandro e colaboradores [56]. No entanto em trabalho realizado por Vidonho e colaboradores [7], a pressão arterial durante a gestação foi maior em mães que receberam dieta hipersódica desde 8ª semana de vida. O período mais prolongado de consumo de dieta no estudo de Vidonho e colaboradores pode ser uma explicação para a diferença na pressão arterial em relação ao presente estudo.

Proles

Vários são os modelos experimentais de baixo peso ao nascimento [57] dentre os quais podemos citar: restrição global de nutrientes à mãe [58,59] ou apenas restrição protéica [60], restrição de vitamina A [61], sódio [9,7] ou ferro [62], embolização placentária [63], redução cirúrgica do fluxo sanguíneo placentário [42] ou uso de esteróides [43].

Em estudo realizado por Leandro e colaboradores onde foram avaliadas possíveis causas relacionadas ao baixo peso ao nascimento, de proles de mães alimentadas com dieta hipossódica durante a gestação, não foi observado menor fluxo sanguíneo uterino ou placentário nestas ratas em comparação com ratas alimentadas com dieta normossódica, sendo afastado o papel da isquemia placentária como provável causa de baixo peso ao nascimento neste modelo. Leandro e colaboradores também não observaram alterações do sistema renina-angiotensina materno que justificassem o fenômeno [56].

Desta maneira, são necessários mais estudos para que sejam definidas as causas do baixo peso ao nascimento observado na prole de mães alimentadas com dieta hipossódica durante a gestação. Contudo, o maior peso corpóreo ao nascimento observado na prole de mães alimentadas com dieta hipersódica durante a gestação pode estar relacionado com alterações na oferta de oxigênio e nutrientes ao feto, visto que o fluxo sanguíneo uterino está aumentado nas mães submetidas a esta dieta durante a gestação [56].

O maior peso corpóreo observado ao nascimento na prole de mães alimentadas com dieta hipersódica, manteve-se ao longo do crescimento quando comparado com as proles de mães alimentadas com dieta hipossódica. Este fenômeno não se deve a um menor ou maior consumo de dieta por parte de alguma das proles.

Proles que nascem com baixo peso podem apresentar recuperação do mesmo durante o crescimento. Este fenômeno, denominado de “catch-up growth”, é descrito como associado a doenças na vida adulta tais como obesidade, diabetes mellitus tipo 2,[64] hipertensão arterial [1] e maior risco de eventos coronarianos [1].

Embora nascidas com baixo peso, as proles de mães alimentadas com dieta hipossódica durante toda a gestação recuperam o peso na idade adulta quando comparadas com as proles de mães alimentadas com dieta normossódica configurando, desta forma, o fenômeno de “catch-up growth”. Conforme anteriormente descrito por Vidonho e colaboradores [7], de fato, estas proles apresentam alterações metabólicas na idade adulta, representado por uma menor sensibilidade à insulina e aumento nos níveis de colesterol e triglicérides plasmáticos. Contudo, estes autores não descreveram aumento dos níveis pressóricos ou quaisquer outras alterações cardiovasculares.

Battista e colaboradores [65] utilizando-se de uma restrição mais severa de cloreto de sódio (0,075% de cloreto de sódio) embora ofertada apenas na última semana de gestação de ratas Sprague-Dawley, demonstraram baixo peso ao nascimento em machos e fêmeas das proles comparadas com proles

de mesmo gênero de mães alimentadas com dieta controle (0,75% de cloreto de sódio). Estas proles de crescimento intra-uterino restrito não apresentaram recuperação do peso corpóreo em relação ao grupo controle quando verificado na 12ª semana de vida, porém tornaram-se hipertensas. Embora ambos, machos e fêmeas, tenham apresentado hipertensão arterial na idade adulta apenas as fêmeas evidenciaram sinais de hipertrofia ventricular esquerda. Esta variação nos resultados quando são utilizados diferentes protocolos de dieta materna sugere que o período de início, a duração e a intensidade de estímulo são importantes fatores que influenciam o peso da prole e a programação de doenças na idade adulta.

Em nosso estudo, apesar de as proles de mães alimentadas com dieta hipossódica durante a gestação terem confirmado a ocorrência de baixo peso ao nascimento e o subsequente crescimento compensatório (“catch-up growth”) descrito por Vidonho e colaboradores utilizando-se de modelo semelhante ao nosso [7], quando mantidas em dieta normossódica por toda vida, estas proles não evidenciaram nenhuma alteração pressórica ou cardíaca até a 36ª semana de idade. Contudo, quando foram submetidas à sobrecarga crônica de cloreto de sódio na vida adulta, alguns fenômenos foram observados e merecem ser comentados.

As proles de mães alimentadas com dieta hipossódica durante a gestação e que receberam dieta hipersódica na idade adulta, apresentaram uma diminuição da pressão arterial média não observada nos outros grupos maternos também submetidos à sobrecarga crônica de cloreto de sódio na vida adulta. A menor pressão arterial nesta situação foi inesperada, uma vez

que a alta ingestão de cloreto de sódio está associada com manutenção [66] ou aumento [67] dos níveis pressóricos.

De acordo com a teoria de Guyton [68], se os mecanismos renais de excreção de sódio estão preservados, a resposta esperada a um aumento transitório na ingestão de cloreto de sódio é um leve aumento na pressão arterial seguido de um aumento na excreção urinária de cloreto de sódio, permitindo que a pressão arterial retorne a seus valores prévios, sendo o inverso também verdadeiro. Esta relação entre pressão arterial e excreção de sódio descrita por Guyton compõe um modelo matemático denominado de curva de natriurese pressórica (Anexos, Figura 6A). Devido ao fato de este ser um sistema de ganho infinito, um aumento ou diminuição sustentada na pressão arterial somente ocorreria como consequência de mudanças também sustentadas nos mecanismos de manutenção da homeostase do sódio por parte do rim, composto principalmente pela resistência dos vasos pré-glomerulares, reabsorção tubular de sódio, capacidade de ultrafiltração glomerular ou uma combinação destas, incluindo a influência do sistema nervoso e hormonal sobre o controle da excreção renal de sódio [69]. Em última análise, um aumento ou diminuição sustentada na pressão arterial resultaria de modificações na curva de natriurese pressórica de maneira que o ponto de equilíbrio entre a ingestão e excreção de sódio se daria em níveis pressóricos maiores ou menores [68,70]. Desta maneira, levando-se em conta os mecanismos renais de controle da pressão arterial, assumimos que as proles adultas de mães alimentadas com dieta hipossódica durante a gestação apresentaram uma

mudança em sua curva de natriurese pressórica para a esquerda (Anexos, Figura 6C) ao longo do eixo da pressão arterial (eixo das ordenadas) ou um aumento na inclinação da curva (Anexos, Figura 6B) em resposta a sobrecarga crônica de sal na dieta. Os mecanismos responsáveis por esta mudança não podem ser elucidados pelo presente estudo, embora algumas especulações possam ser feitas baseadas em outros trabalhos.

Recentemente um estudo publicado por Gao e colaboradores [71] avaliou o papel de um osmo- e mecano-sensor denominado de “transient receptor potential vanilloid 4 channel” (TRPV4), na regulação da pressão arterial frente à sobrecarga de sal. Estes autores demonstraram que a ativação do TRPV4 reduz a pressão arterial e este efeito é potencializado pela alta ingestão de cloreto de sódio através do aumento da expressão deste receptor em nervos sensoriais e em artérias mesentéricas. Os mecanismos responsáveis pela ação de TRPV4 ainda permanecem por ser esclarecidos, contudo estudos sugerem que estes receptores ajam hiperpolarizando as células musculares lisas dos vasos [72] e liberando potentes neuropeptídeos vasodilatadores tais como “calcitonin gene-related peptide” e Substância P [73,74]. De qualquer forma, mais estudos são necessários para avaliar a interação da sobrecarga crônica de cloreto de sódio com a atividade dos receptores TRPV4 e seus efeitos sobre a diminuição da pressão arterial, inclusive em nosso modelo.

Além da alteração pressórica a pouco referida, outros resultados chamam-nos a atenção nas proles de mães alimentadas com dieta hipossódica durante a gestação. Um deles foi o menor débito cardíaco

destes animais em comparação com as proles dos outros grupos maternos após a sobrecarga crônica de cloreto de sódio na vida adulta. Embora não tenha sido verificada nenhuma alteração estrutural no ventrículo esquerdo que justifique o menor débito cardíaco, este resultado pode refletir uma diminuição da reserva funcional cardíaca destes animais e uma tendência a desenvolverem insuficiência cardíaca em situações específicas. Corroborando com esta hipótese Barker e colaboradores [75], em estudo recentemente publicado, verificou um maior risco de desenvolvimento de insuficiência cardíaca em pessoas que, nascidas com baixo peso, apresentavam um rápido crescimento entre a idade de 2 a 11 anos. Esta hipótese precisa ser avaliada por estudos adicionais.

Outro resultado interessante foi o aumento da média do número de núcleos por cardiomiócito em resposta a sobrecarga crônica de sal na dieta.

É sabido que até o final do 2º terço da gestação existe predomínio de cardiomiócitos de citoplasma pequeno e mononucleados que respondem a estímulos hemodinâmicos e humorais através de proliferação celular e são responsáveis pelo crescimento do coração através de um processo hiperplásico. A partir do início do último terço da gestação os cardiomiócitos continuam duplicando seu DNA com a formação de células binucleadas que desta vez, ao invés de continuarem o processo de divisão celular, passam a aumentar gradativamente de tamanho atingindo até o dobro do volume das células mononucleadas tornando-se cardiomiócitos maduros, considerados terminalmente diferenciados, perdendo sua capacidade de divisão celular. O processo de binucleação é essencial à maturação do cardiomiócito e

possibilita o processo de hipertrofia celular, ocorrendo continuamente até o final da gestação sendo o principal responsável pelo crescimento cardíaco nesta fase da gravidez de maneira que, próximo ao termo, cerca de 70% dos cardiomiócitos são binucleados [76]. Na vida adulta, perante alguns estímulos patológicos tais como infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca [77], ocorre ativação da síntese e duplicação do DNA do cardiomiócito havendo replicação celular e aumento no número de células binucleadas [78]. Desta forma, a dieta hipersódica ingerida pela prole adulta de mães alimentadas com dieta hipossódica durante a gestação agiria direta ou indiretamente ativando a síntese de DNA e o processo de cariocinese favorecendo o aumento de cardiomiócitos multinucleados. Embora o significado deste evento no contexto do presente estudo não esteja esclarecido, pelo que sabemos, esta é a primeira vez que tal fenômeno foi observado em resposta a sobrecarga de cloreto de sódio na vida adulta.

Conforme demonstrado por Ding e colaboradores [11], dieta hipersódica durante a gestação altera o desenvolvimento cardíaco fetal e induz modificações persistentes no sistema renina-angiotensina cardíaco. Em nosso estudo, confirmamos os efeitos da alta ingestão de cloreto de sódio sobre o desenvolvimento cardíaco dos machos da prole conforme verificado pelo aumento da massa cardíaca ao nascimento. Apesar destes achados, a prole adulta não evidenciou qualquer sinal de hipertrofia ou disfunção cardíaca nem alteração do sistema renina-angiotensina tecidual quando mantida em dieta normossódica até a 36ª semana de idade. Por outro lado, após exposição na idade adulta a um fator conhecidamente pró-hipertrófico

(dieta hipersódica), apenas as proles de mães alimentadas com dieta hipersódica durante a gestação desenvolveram sinais de hipertrofia ventricular esquerda conforme verificado por análise ecocardiográfica e histológica. O papel da dieta hipersódica como gerador de hipertrofia e fibrose ventricular esquerda é bem conhecido [47,79,66,59,80] e independe dos níveis de pressão arterial [47] como corroborado por nosso estudo. Este efeito varia conforme a intensidade, duração e idade de início da dieta [79,66,80]. Como exemplo, Ahn e colaboradores [81] demonstraram que embora um período de 8 semanas de dieta hipersódica começando à partir da 8ª semana de idade era capaz de induzir hipertrofia e fibrose cardíaca em ratos espontaneamente hipertensos, quando iniciado à partir da 20ª semana de idade, o estímulo não foi suficiente para induzir alterações cardíacas. A partir deste conhecimento, o início tardio (21ª semana de idade) da dieta hipersódica às nossas proles justifica que nem todos os animais apresentem alterações cardíacas, mas apenas aqueles predispostos para tal. Assim, nossos resultados demonstram que apenas os machos da prole de mães alimentadas com dieta hipersódica durante a gestação são programados ao desenvolvimento de hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo, mas não fibrose, em resposta à sobrecarga de cloreto de sódio na dieta durante a idade adulta. O padrão concêntrico de hipertrofia ventricular foi indicado pelo aumento da espessura relativa da parede do ventrículo esquerdo da 20ª à 30ª semana de idade [82].

Estudos prévios indicam que a hipertrofia ventricular esquerda secundária à dieta hipersódica é mediada pela angiotensina II [47,83]. Ferreira e colaboradores [47] demonstraram um aumento no conteúdo de

angiotensina II e na expressão gênica e protéica dos receptores AT1 no ventrículo esquerdo de animais submetidos à dieta hipersódica. Também foi verificado que a hipertrofia cardíaca foi evitada quando os animais receberam losartan, um fármaco bloqueador dos receptores AT1.

Estes dados associados a um aumento da expressão protéica dos receptores AT1 no ventrículo esquerdo dos fetos e prole adulta (12 semanas de idade) de mães alimentadas com dieta hipersódica durante a gestação, como demonstrado por Ding e colaboradores [11], apontaram para um provável papel causal da angiotensina II no desenvolvimento de hipertrofia do cardiomiócito observado em nosso estudo. Surpreendentemente esta hipótese não foi corroborada por nossos achados, pois não evidenciamos qualquer diferença, entre grupos, relacionada ao sistema renina-angiotensina cardíaco, exceto por um aumento isolado na expressão do gene da enzima conversora de angiotensina.

Vários mecanismos são implicados no processo de hipertrofia do cardiomiócito durante a vida adulta. A hipertrofia patológica tipicamente envolve ativação de receptores acoplados à proteína G, sinalização através da via das “mitogen-activated protein kinases” (MAPKs), calcineurina A entre outros [84]. O papel da sinalização intracelular via proteína G tem sido extensivamente investigado sendo o subtipo Gq apontado como o principal alvo para a ação de substâncias pró-hipertróficas como a angiotensina II, endotelina-1 e estímulo α adrenérgico [85]. A sinalização via proteína Gq também foi vinculada a apoptose do cardiomiócito e insuficiência cardíaca conforme demonstrado em modelo murino transgênico onde ocorre super-

expressão desta proteína [86]. A aldosterona ligada ao seu receptor mineralocorticóide também induz apoptose de cardiomiócitos através da via “c-Jun NH2-terminal kinase” (JNK) [87], hipertrofia através da via de transcrição P300/GATA4 [88] e inflamação e fibrose cardíaca através de estresse oxidativo [89]. Alta ingestão de cloreto de sódio foi implicada em maior síntese cardíaca de aldosterona e hipertrofia ventricular independente de níveis pressóricos [90]. De acordo com estes dados a ocorrência de hipertrofia do cardiomiócito, no presente modelo, pode estar relacionada a uma ampla variedade de mecanismos fisiopatológicos outros que não via angiotensina II. Estudos adicionais são necessários para avaliar quais destes mecanismos podem estar envolvidos no presente modelo.

Um aumento na ocorrência de apoptose dos cardiomiócitos é observado no processo de remodelamento cardíaco e tem sido implicado na transição de hipertrofia para insuficiência miocárdica [91,92]. Contudo alguns autores têm sugerido que a apoptose do cardiomiócito seja um fenômeno precoce no processo de hipertrofia ventricular [93,94] de maneira que uma onda apoptótica com redução no número de cardiomiócitos desencadearia uma série de respostas adaptativas nos cardiomiócitos remanescentes, culminando com hipertrofia dos mesmos [94]. Embora não tenhamos observado diferença no número de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo entre grupos, observamos uma correlação negativa significativa entre o número e o volume dos cardiomiócitos sugerindo que, pelo menos neste modelo, o processo de hipertrofia cardíaca possa estar acoplado a um número diminuído de cardiomiócitos.

7 CONCLUSÕES

Em conclusão, nossos dados fornecem novas evidências referentes ao processo de programação fetal das doenças cardiovasculares demonstrando que:

- 1- proles de mães alimentadas com dieta hipo ou hipersódica durante toda a gestação não apresentam alterações estruturais ou funcionais cardíacas até a 36ª semana de idade, quando mantidas em dieta normossódica;
- 2- dieta hipersódica durante a gestação programa hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo não mediada pela angiotensina II e independente dos níveis pressóricos em machos da prole em resposta a sobrecarga de cloreto de sódio na vida adulta;
- 3- dieta hipossódica durante a gestação programa queda da pressão arterial em resposta a sobrecarga crônica de cloreto de sódio na vida adulta em machos da prole. O significado deste resultado ainda necessita ser esclarecido;
- 4- não podemos descartar os efeitos da dieta hipossódica durante a gestação sobre a programação de alterações cardíacas nos machos da prole adulta.

8 ANEXOS

8.1 FIGURAS

Figura 1 - Amostragem do A) ventrículo esquerdo. B) e C) Cortes transversais com espessura de 2 mm realizados da base para o ápice ventricular. D) e E) As fatias cortadas foram novamente seccionadas a cada 2 mm resultando em vários pequenos pedaços de ventrículo esquerdo

Aumento de 400 x

“Plano de referência”

“Plano correspondente”

Figura 2 - Microscopia óptica em aumento de 400 X demonstrando o “plano de referência” obtido a partir do “corte de referência” e seu “plano correspondente” obtido à partir do “corte correspondente”. As secções foram coradas com Hematoxilina/Eosina

“Grid” de contagem área de $2500 \mu\text{m}^2$

Figura 3 - “Grid” de contagem na forma de um quadrado, com área de $2500 \mu\text{m}^2$, composto pelas linhas de exclusão (vermelhas) e linhas de inclusão (verdes)

“Plano de referência”

“Plano correspondente”

Figura 4 - Microscopia óptica em aumento de 400 X demonstrando o “plano de referência” e seu “plano correspondente” delimitados pelo “grid” de contagem. O conjunto composto pelas áreas delimitados pelo “grid” no “plano de referência” e em seu “plano correspondente” forma um volume de referência que é calculado multiplicando-se a área do “grid” pela distância entre os 2 planos, ou seja, a espessura da secção ($3\ \mu\text{m}$). As secções foram coradas com Hematoxilina/Eosina

“Plano de referência”

“Plano correspondente”

Figura 5 - Foram contados apenas os núcleos que apareciam dentro dos cardiomiócitos, estavam dentro do “grid” de contagem ou tocavam as linhas de inclusão (verdes), não tocavam as linhas de exclusão (vermelhas) e apareciam apenas no “plano de referência” e não apareciam no respectivo “plano correspondente”. No exemplo acima o número de núcleos contados no volume de referência foi de 2 e estão sinalizados por flechas. Os cortes acima foram corados com Hematoxilina/Eosina e fotografados em aumento de 400 X

Figura 6 - A) Curva de natriurese pressórica. O valor de pressão arterial capaz de manter uma excreção de sódio igual a ingestão do mesmo determina o ponto de equilíbrio (ponto 1). Quando ocorre um aumento na ingestão de sódio há um desvio do ponto de equilíbrio ao longo da curva para níveis pressóricos mais elevados levando a um aumento na excreção de sódio (ponto 2). Quando a ingestão de sódio retorna aos valores basais, o ponto de equilíbrio também retorna ao seu local inicial (ponto 1). Para que ocorra uma diminuição sustentada da pressão arterial é necessário uma mudança na **B)** inclinação da curva ou **C)** desvio da curva para esquerda. Em ambas as situações, o ponto de equilíbrio encontra-se em níveis pressóricos menores (ponto 3)

8.2 TABELAS

Tabela 1 - Evolução ponderal, consumo de ração e pressão arterial caudal conforme a idade, em semanas, de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação (13^a a 15^a semanas de idade)

	Evolução ponderal (g)						Consumo de ração (g/rato/dia)						Pressão arterial caudal (mmHg)					
semanas	HO	n	NR	n	HR	n	HO	n	NR	n	HR	n	HO	n	NR	n	HR	n
12	239	(7)	244	(7)	251	(7)							112	(7)	113	(7)	117	(7)
	±7		±7		±7								±5		±5		±5	
13	265	(7)	273	(7)	275	(7)	21	(7)	21	(7)	20	(7)	118	(7)	116	(7)	124	(7)
	±7*		±7*		±7*		±1		±1		±1		±6		±6		±5	
14	302	(7)	312	(7)	310	(7)	21	(7)	22	(7)	23	(7)	124	(7)	113	(7)	122	(7)
	±7*		±7*		±7*		±1		±1		±1		±6		±6		±6	
15	357	(7)	387	(7)	376	(7)	19	(7)	22	(7)	22	(7)	106	(7)	106	(7)	114	(7)
	±7*†		±7*		±7*		±1		±1		±1		±6 ^a		±5 ^b		±5 ^c	
16	298	(7)	320	(7)	316	(7)							124	(7)	123	(7)	128	(7)
	±8*		±8*		±9*								±5		±5		±6	
17	308	(7)	327	(7)	339	(7)							127	(7)	115	(7)	134	
	±8		±9		±8 [‡]								±5		±6		±6 [†]	(7)
18	305	(7)	330	(7)	331	(7)							134	(7)	122	(7)	132	(7)
	±9 [†]		±8		±8 [‡]								±5		±5		±6	

A 13^a, 14^a e 15^a semanas de idade correspondem respectivamente à 1^a, 2^a e 3^a semanas de gestação. Os resultados obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média de seus valores absolutos. Utilizado pós-teste de Student-Newman-Keuls para consumo de ração e pós-teste de Fisher-LSD para evolução ponderal e pressão arterial caudal.

* $p < 0,05$ vs. a semana anterior no mesmo grupo.

† $p < 0,05$ vs. NR na mesma semana.

‡ $p < 0,05$ vs. HO na mesma semana.

^a $p < 0,05$ vs. 14, 16, 17 e 18 semanas dentro do mesmo grupo.

^b $p < 0,05$ vs 16 e 18 semanas dentro do mesmo grupo.

^c $p < 0,05$ vs. 17 e 18 semanas dentro do mesmo grupo.

Tabela 2 - Peso corpóreo (PC) ao nascimento, peso corpóreo, consume de ração (CR), consumo de água (CA) e volume urinário (VU) na 20^a e 36^a semana de idade e excreção urinária de sódio (NaU), natremia (NaS) e calemia (KS) na 36^a semana de idade de machos de proles de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação e que receberam dieta normossódica (HONr, NRnr, HRnr) ou hipersódica (HOhr, NRhr, HRhr) da 21^a à 36^a semana de idade.

Ao nascimento												
	LS		n		NS		n		HS		N	
PC (g)	5,4±0,1 ^c		(44)		6,4±0,1		(46)		6,9±0,1 ^b		(28)	
20 semanas de idade												
	HO _{nr}	n	NR _{nr}	n	HR _{nr}	N	HO _{hr}	n	NR _{hr}	n	HR _{hr}	N
PC (g)	472±12	(16)	487±12	(17)	510±14*	(13)	466±12 [†]	(17)	478±12 [†]	(18)	514±12	(16)
CR (g/rato/dia)	18,7±2,0	(7)	17,7±2,0	(7)	24,2±2,4	(5)	17,6±1,9	(8)	15,6±1,9	(8)	19,8±2,0	(7)
CA (g/rato/dia)	29,9±3,2	(7)	28,8±3,5	(6)	31,6±3,8	(5)	31,3±3,1	(8)	26,0±3,0	(8)	26,7±3,2	(7)
VU (mL/rato/dia)	10,9±2,4	(7)	13,1±2,6	(6)	14,2±2,8	(5)	12,8±2,6	(6)	12,0±2,2	(8)	12,8±2,4	(7)

continua

conclusão - Peso corpóreo (PC) ao nascimento, peso corpóreo, consume de ração (CR), consumo de água (CA) e volume urinário (VU) na 20^a e 36^a semana de idade e excreção urinária de sódio (NaU), natremia (NaS) e calemia (KS) na 36^a semana de idade de machos de proles de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação e que receberam dieta normossódica (HOnr, NRnr, HRnr) ou hipersódica (HOhr, NRhr, HRhr) da 21^a à 36^a semana de idade

36 semanas de idade												
	HOnr	n	NRnr	n	HRnr	N	HOhr	n	NRhr	n	HRhr	N
PC (g)	553±12 ^a	(16)	587±13 ^a	(15)	615±14 ^{*†a}	(13)	613±12 ^{*†a}	(17)	624±12 ^{†a}	(18)	666±14 ^a	(12)
CR (g/rato/dia)	19,0±1,4	(16)	17,4±1,4	(15)	21,3±1,5	(13)	15,3±1,3	(17)	15,9±1,3	(18)	17,0±1,4	(14)
CA (g/rato/dia)	26,3±2,1	(16)	22,3±2,2	(15)	31,4±2,4	(13)	30,3±2,1	(17)	29,2±2,1	(17)	34,7±2,3	(14)
VU (mL/rato/dia)	11,7±1,6	(16)	11,7±1,6 [‡]	(15)	14,0±1,8 [†]	(13)	21,3±1,5 ^{*a}	(17)	20,4±1,5 ^a	(18)	23,9±1,7 ^a	(14)
NaU (mmoL/dia)	1,2±0,2	(6)	1,3±0,2 [‡]	(6)	1,5±0,2 [†]	(5)	7,4±0,9 [*]	(8)	6,7±0,8	(8)	8,0±0,6	(5)
NaS (mmoL/L)	150±2	(6)	148±2	(6)	143±5	(4)	148±2	(8)	147±2	(8)	145±1	(4)
KS (mmoL/L)	5,6±0,2	(6)	5,4±0,3	(6)	5,4±0,3	(4)	5,4±0,1	(8)	5,3±0,1	(8)	5,5±0,1	(4)

* $p < 0,05$ vs. HOnr.

† $p < 0,05$ vs. HRhr.

‡ $p < 0,05$ vs. NRhr.

^a $p < 0,05$ 36 vs. 20 semanas de idade nos animais de mesmo grupo.

^b $p < 0,05$ vs. HO e NR.

^c $p < 0,05$ vs. NR.

Tabela 3 - Massa cardíaca normalizada pelo peso corpóreo (MC/PC) ao nascimento, massa ventricular esquerda normalizada pelo peso corpóreo (VE/PC), massa ventricular esquerda normalizada pelo comprimento da tíbia (VE/tíbia), massa ventricular esquerda não normalizada (VE) e pressão arterial média (PAM) na 36^a semana de idade de machos de proles de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação e que receberam dieta normossódica (HOnr, NRnr, HRnr) ou hipersódica (HOhr, NRhr, HRhr) da 21^a à 36^a semana de idade

Ao nascimento												
	HO		n		NR		n		HR		n	
MC/PC (g/kg)	5,88±0,20		(11)		5,69±0,12		(23)		6,42±0,20*		(15)	
36 semanas de idade												
	HO _{nr}	n	NR _{nr}	n	HR _{nr}	n	HO _{hr}	n	NR _{hr}	n	HR _{hr}	N
VE/PC (g/kg)	1,86±0,05	(15)	1,79±0,05	(13)	1,77±0,05	(13)	1,80±0,04	(15)	1,85±0,04	(18)	1,91±0,04	(13)
VE/tibia (g/m)	23,4±1,0	(9)	23,0±1,0	(10)	21,5±1,0	(6)	24,2±0,8	(9)	25,1±0,9	(12)	25,8±0,5	(6)
VE (g)	1,06±0,03	(15)	1,07±0,03	(13)	1,10±0,04	(13)	1,10±0,03	(15)	1,16±0,04	(18)	1,28±0,03 [†]	(13)
PAM (mmHg)	123±5	(7)	120±3	(7)	126±3	(6)	109±6 [‡]	(5)	121±3	(7)	126±3	(8)

Os resultados obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média de seus valores absolutos. Os valores da PAM foram submetidos à transformação logarítmica para análise estatística. Utilizado pós-teste de Student-Newman-Keuls exceto para PAM onde foi utilizado pós-teste de Fisher-LSD.

* $p < 0,05$ vs. HO e NR.

[†] $p < 0,05$ vs. NRhr, HOhr e HRnr.

[‡] $p < 0,05$ vs. HOnr, NRhr e HRhr.

Tabela 4 - Massa ventricular esquerda (MVE), espessura do septo interventricular (SI) e da parede posterior do ventrículo esquerdo (PP), diâmetro diastólico da cavidade do ventrículo esquerdo (DD) e espessura relativa da parede do ventrículo esquerdo (ERP) avaliados por ecocardiografia na 20^a e 30^a semana de idade e débito cardíaco (DC) avaliado por ecocardiografia na 30^a semana de idade de machos de proles de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação e que receberam dieta normossódica (HOnr, NRnr, HRnr) ou hipersódica (HOhr, NRhr, HRhr) da 21^a à 36^a semana de idade

20 semanas de idade												
	HOnr	n	NRnr	n	HRnr	n	HOhr	n	NRhr	n	HRhr	n
MVE (g)	0,81±0,06	(7)	0,91±0,05	(8)	0,84±0,08	(3)	0,77±0,06	(8)	0,85±0,06	(8)	0,90±0,07	(7)
SI (cm)	0,15±0,01	(7)	0,17±0,01	(8)	0,14±0,01	(3)	0,15±0,01	(8)	0,15±0,01	(8)	0,15±0,01	(7)
PP (cm)	0,16±0,01	(7)	0,17±0,01	(8)	0,14±0,01	(3)	0,15±0,01	(8)	0,15±0,01	(8)	0,15±0,01	(7)
DD (cm)	0,79±0,03	(7)	0,80±0,02	(8)	0,86±0,04	(3)	0,80±0,02	(8)	0,84±0,02	(8)	0,85±0,03	(7)
ERP	0,40±0,03	(7)	0,43±0,03	(8)	0,33±0,05	(3)	0,38±0,02	(8)	0,36±0,02	(8)	0,37±0,02	(7)
30 semanas de idade												
MVE (g)	0,90±0,06	(7)	0,87±0,06	(6)	0,84±0,07	(5)	0,84±0,06	(8)	0,93±0,06	(8)	0,97±0,07	(7)
SI (cm)	0,17±0,01	(7)	0,15±0,01	(6)	0,16±0,01	(5)	0,15±0,01	(8)	0,16±0,01	(8)	0,18±0,01 ^a	(7)
PP (cm)	0,17±0,01	(7)	0,15±0,01	(6)	0,16±0,01	(5)	0,16±0,01	(8)	0,16±0,01	(8)	0,18±0,01 ^a	(7)

conclusão - Massa ventricular esquerda (MVE), espessura do septo interventricular (SI) e da parede posterior do ventrículo esquerdo (PP), diâmetro diastólico da cavidade do ventrículo esquerdo (DD) e espessura relativa da parede do ventrículo esquerdo (ERP) avaliados por ecocardiografia na 20^a e 30^a semana de idade e débito cardíaco (DC) avaliado por ecocardiografia na 30^a semana de idade de machos de proles de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação e que receberam dieta normossódica (HOnr, NRnr, HRnr) ou hipersódica (HOhr, NRhr, HRhr) da 21^a à 36^a semana de idade

30 semanas de idade												
	HOnr	n	NRnr	n	HRnr	n	HOhr	n	NRhr	n	HRhr	n
DD (cm)	0,77±0,03	(7)	0,82±0,03	(6)	0,81±0,03	(5)	0,80±0,02	(8)	0,83±0,02	(8)	0,78±0,03	(7)
ERP	0,47±0,03	(7)	0,38±0,04	(6)	0,39±0,04	(5)	0,39±0,02	(8)	0,39±0,02	(8)	0,46±0,02 ^a	(7)
DC (mL/minuto)	49,4±4,4	(7)	59,7±6,2	(6)	49,4±5,4	(5)	52,2±3,6 [†]	(8)	64,4±3,7	(8)	68,3±5,9*	(7)

Os resultados obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média de seus valores absolutos. Utilizado pós-teste de Student-Newman-Keuls exceto para DC onde foi utilizado pós-teste de Fisher-LSD.

^a $p < 0,05$ 36 vs. 20 semanas de idade nos animais de mesmo grupo.

* $p < 0,05$ vs. HOhr e HRnr.

[†] $p = 0,06$ vs. NRhr.

Tabela 5 - Área de secção transversal do cardiomiócito (AST), volume médio do cardiomiócito (VMC), número de cardiomiócitos do ventrículo esquerdo (Num), media do número de núcleos por cardiomiócito (N/C) e fibrose intersticial (FI) na 36ª semana de idade de machos de proles de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação e que receberam dieta normossódica (HOnr, NRnr, HRnr) ou hipersódica (HOhr, NRhr, HRhr) da 21ª à 36ª semana de idade

	HOnr	n	NRnr	n	HRnr	n	HOhr	n	NRhr	n	HRhr	n
AST (μm^2)	197 $\pm$ 9	(7)	208 $\pm$ 8	(6)	212 $\pm$ 11	(5)	204 $\pm$ 7	(8)	194 $\pm$ 10	(8)	253 $\pm$ 20*	(5)
VCM ($\mu\text{m}^3 \times 10^4$)	1,68 $\pm$ 0,25	(7)	1,70 $\pm$ 0,11	(6)	1,66 $\pm$ 0,34	(5)	1,82 $\pm$ 0,26	(8)	1,50 $\pm$ 0,16	(8)	2,54 $\pm$ 0,24*	(5)
Num ($\times 10^7$)	2,69 $\pm$ 0,45	(7)	2,13 $\pm$ 0,23	(6)	2,19 $\pm$ 0,36	(5)	1,96 $\pm$ 0,24	(8)	2,06 $\pm$ 0,17	(8)	1,73 $\pm$ 0,21	(5)
N/C	1,62 $\pm$ 0,02	(3)	1,62 $\pm$ 0,03	(3)	1,60 $\pm$ 0,02	(3)	1,75 $\pm$ 0,05 [†]	(3)	1,71 $\pm$ 0,03	(3)	1,66 $\pm$ 0,02	(3)
FI (%)	5,84 $\pm$ 0,50	(7)	5,52 $\pm$ 0,44	(6)	5,50 $\pm$ 0,35	(5)	5,91 $\pm$ 0,55	(8)	5,27 $\pm$ 0,32	(8)	4,37 $\pm$ 0,48	(5)

Os resultados obtidos estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média de seus valores absolutos. Os valores do VMC foram submetidos à transformação quadrática para análise estatística. Utilizado pós-teste de Student-Newman-Keuls.

* $p < 0,05$ vs. NRhr, HOhr e HRnr.

[†] $p < 0,05$ vs. HOnr.

Tabela 6 - Expressão gênica (unidade arbitrária – UA) no ventrículo esquerdo dos receptores AT1 (AT1) e AT2 (AT2), renina, angiotensinogênio (Ango) e enzima conversora de angiotensina (ECAve) na 36^a semana de idade de machos de proles de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação e que receberam dieta normossódica (HOnr, NRnr, HRnr) ou hipersódica (HOhr, NRhr, HRhr) da 21^a à 36^a semana de idade

	HOnr	n	NRnr	n	HRnr	n	HOhr	n	NRhr	n	HRhr	n
AT1 (UA)	1,30±0,02	(8)	1,27±0,06	(7)	1,26±0,07	(8)	1,28±0,03	(7)	1,27±0,08	(10)	1,25±0,07	(8)
AT2 (UA)	0,18±0,03	(8)	0,25±0,03	(7)	0,22±0,03	(8)	0,19±0,03	(7)	0,24±0,03	(10)	0,20±0,03	(8)
Renina (UA)	0,24±0,03	(8)	0,19±0,02	(7)	0,24±0,03	(8)	0,23±0,03	(7)	0,21±0,02	(10)	0,26±0,03	(8)
Ango (UA)	0,56±0,07	(8)	0,57±0,09	(7)	0,60±0,10	(8)	0,58±0,08	(7)	0,62±0,10	(10)	0,53±0,08	(8)
ECA (UA)	0,86±0,05	(8)	0,83±0,03	(7)	0,95±0,05	(8)	0,86±0,05	(7)	0,79±0,02	(10)	0,99±0,06*	(8)

Os resultados obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média de seus valores absolutos. Utilizado pós-teste de Student-Newman-Keuls.

* $p < 0,05$ vs. NRhr.

Tabela 7 - Expressão protéica (unidade arbitrária, UA) dos receptores AT1 (AT1) e AT2 (AT2), renina, angiotensinogênio (Ango), enzima conversora de angiotensina 1 (ECA1), enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), atividade da enzima conversora da angiotensina (aECAve) e conteúdo de angiotensina II (AII – unidade arbitrária de fluorescência, UAF) no ventrículo esquerdo de machos de proles de 36 semanas de idade de mães alimentadas com dieta hipo (HO), normo (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação e que receberam dieta normossódica (HONr, NRnr, HRnr) ou hipersódica (HOhr, NRhr, HRhr) da 21^a à 36^a semana de idade

	HONr	n	NRnr	n	HRnr	n	HOhr	n	NRhr	n	HRhr	n
AT1 (UA)	4,82±2,00	(8)	16,34±11,88	(7)	31,75±26,13	(8)	9,14±3,96	(7)	23,11±12,92	(10)	6,75±2,64	(8)
AT2 (UA)	5,81±3,37	(8)	12,63±8,66	(7)	15,58±13,90	(8)	10,29±7,39	(7)	18,50±9,88	(10)	6,00±3,65	(8)
ECA1 (UA)	7,98±3,67	(8)	10,66±2,70	(7)	6,91±2,38	(8)	9,85±4,69	(7)	14,09±3,68	(10)	8,18±2,42	(8)
ECA2 (UA)	7,40±1,94	(8)	15,60±9,04	(7)	11,66±3,75	(8)	5,88±2,03	(7)	18,12±9,02	(10)	8,67±2,46	(8)
Ango (UA)	3,76±1,34	(8)	4,34±0,59	(7)	6,08±1,75	(8)	3,71±1,41	(7)	3,33±0,61	(10)	5,03±0,81	(8)
Renina (UA)	1,72±0,51	(8)	3,31±1,18	(7)	3,28±1,29	(8)	1,81±0,54	(7)	2,28±0,46	(10)	4,68±2,08	(8)
aECAve (nmol His- Leu/minuto/mg)	19,4±4,9	(8)	17,9±1,9	(7)	14,8±1,6	(8)	13,7±2,8	(7)	19,2±2,5	(10)	15,8±1,6	(8)
AII (UAF)	0,51±0,02	(6)	0,47±0,03	(6)	0,52±0,07	(5)	0,57±0,05	(8)	0,51±0,12	(8)	0,46±0,05	(5)

Os resultados obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média de seus valores absolutos. Utilizado pós-teste de Student-Newman-Keuls.

9 REFERÊNCIAS

1. Osmond C, Barker DJ. Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. *Environ Health Perspect.* 2000;108:545-3.
2. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet.* 1989;2:577-80.
3. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia.* 1992;35:595-601.
4. Bogdarina I, Welham S, King PJ, Burns SP, Clark AJL. Epigenetic Modification of the Renin-Angiotensin System in the Fetal Programming of Hypertension. *Circ Res.* 2007;100:520-526.
5. Jackson AA, Dunn RL, Marchand MC, Langle-Evans SC. Increased systolic blood pressure in rats induced by a maternal low-protein diet is reversed by dietary supplementation with glycine. *Clin Sci (Lond).* 2002;103:633-9.
6. da Silva AA, de Noronha IL, de Oliveira IB, Malheiros DM, Heimann JC. Renin-angiotensin system function and blood pressure in adult rats after perinatal salt overload. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2003;13:133-9.
7. Vidonho AF Jr, da Silva AA, Catanozi S, Rocha JC, Beutel A, Carillo BA, Furukawa LN, Campos RR, de Toledo Bergamaschi CM, Carpinelli AR, Quintão EC, Dolnikoff MS, Heimann JC. Perinatal salt restriction: a new pathway to programming insulin resistance and dyslipidemia in adult wistar rats. *Pediatr Res.* 2004;56:842-8.

8. Lopes KL, Furukawa LN, de Oliveira IB, Dolnikoff MS, Heimann JC. Perinatal salt restriction: a new pathway to programming adiposity indices in adult female Wistar rats. *Life Sci.* 2008;26;82:728-32.
9. Battista MC, Calvo E, Chorvatova A, Comte B, Corbeil J, Brochu M. Intra-uterine growth restriction and the programming of left ventricular remodelling in female rats. *J Physiol.* 2005;565:197-205.
10. Lopes KL. Avaliação do sistema renina-angiotensina tecidual e circulante em prole de ratas que receberam sobrecarga ou restrição de sal na dieta durante a gestação e amamentação. [Tese]. São Paulo, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2006.
11. Ding Y, Lv J, Mao C, Zhang H, Wang A, Zhu L, Zhu H, Xu Z. High-salt diet during pregnancy and angiotensin-related cardiac changes. *J Hypertens.* 2010;28:1290-7.
12. Tigerstedt R, Bergman PG. Niere und Kreislauf. *Skand Arch Physiol.* 1898;8:223-71.
13. Danser AH. Local renin-angiotensin systems: the unanswered questions. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35:759-68.
14. Haller H, Park JK, Lindschau C, Meyer M, Menne J; Renin Academy. Spotlight on renin: intrarenal renin-angiotensin system - important player of the local milieu. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2006;7:122-5.
15. Sakai K, Sigmund CD. Molecular evidence of tissue reninangiotensin systems: a focus on the brain. *Curr Hypertens Rep.* 2005;7,135-40.

16. Leung PS, Carlsson PO. Pancreatic islet renin angiotensin system: its novel roles in islet function and in diabetes mellitus. *Pancreas*. 2005;30:293-8.
17. Goossens GH, Jocken JW, Blaak EE, Schiffers PM, Saris WH, van Baak MA. Endocrine role of the renin-angiotensin system in human adipose tissue and muscle: effect of beta-adrenergic stimulation. *Hypertension*. 2007;49:542-7.
18. Kumar R, Singh VP, Baker KM. The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends Endocrinol Metab*. 2007;18:208–14.
19. Brasier AR, Li J. Mechanisms for inducible control of angiotensinogen gene transcription. *Hypertension*. 1996;27:465-75.
20. Navar LG, Nishiyama A. Intrarenal formation of angiotensin II. *Contrib Nephrol*. 2001;135:1-15.
21. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev*. 2007;59:251-287.
22. Castrop H, Höcherl K, Kurtz A, Schweda F, Todorov V, Wagner C. Physiology of kidney renin. *Physiol Rev*. 2010;90:607-73.
23. Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm*. 2007;13:9-20.
24. Peters J, Farrenkopf R, Clausmeyer S, Zimmer J, Kantachuvesiri S, Sharp MG, Mullins JJ.. Functional significance of prorenin internalization in the rat heart. *Circ. Res*. 2002;90:1135-41.

25. Clausmeyer S, Stürzebecher R, Peters J. An alternative transcript of the rat renin gene can result in a truncated prorenin that is transported into adrenal mitochondria. *Circ Res*. 1999;84:337-44.
26. Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest*. 2002;109:1417-27.
27. Ichihara A, Kobori H, Nishiyama A, Navar LG. Renal renin-angiotensin system. *Contrib Nephrol*. 2004;143:117-30.
28. Haulică I, Petrescu G, Slătineanu SM, Bild W, Mihaila CN, Ioniță T. New bioactive angiotensins formation pathways and functional involvements. *Rom J Intern Med*. 2004;42:27-40.
29. Santos RA, Simões e Silva AC, Maric C, Silva DMR, Machado RP, de Buhr I, Heringer-Walther S, Pinheiro SVB, LopesMT, Bader M, Mendes EP, Lemos VS, Campagnole-Santos MJ, Schultheiss HP, Speth R, Walther T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G-protein coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:8258-63.
30. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensina II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev*. 2000;52:11-34.
31. Mulrow PJ. Angiotensin II and aldosterone regulation. *Regul Pept*. 1999;80:27-32.
32. Tonnesen MG, Klempner MS, Austen KF, Wintroub BU. Identification of a human neutrophil angiotensin II-generating protease as cathepsin G. *J Clin Invest*. 1982;69:25-30.

33. Arakawa K, Maruta H. Ability of kallikrein to generate angiotensin II-like pressor substance and a proposed 'kinin-tensin enzyme system.' *Nature*. 1980;288:705-6.
34. Urata H, Kinoshita A, Misono KS, Bumpus FM, Husain A. Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart. *J Biol Chem*. 1990;265:22348-57.
35. Sundgren NC, Giraud GD, Stork PJS, Maylie JG, Thornburg KL. Angiotensin II stimulates hyperplasia but not hypertrophy in immature ovine cardiomyocytes. *J Physiol*. 2003;548:881-91.
36. Hunt RA, Ciuffo GM, Saavedra JM, Tucker DC. Quantification and localization of angiotensin II receptors and angiotensin converting enzyme in the developing rat heart. *Cardiovasc Res*. 1995;29:834-40.
37. Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res*. 1993;73:413-23.
38. Schorb W, Booz GW, Dostal DE, Conrad KM, Chang KC, Barker KM. Angiotensin II is mitogenic in neonatal rat cardiac fibroblasts. *Circ Res*. 1993;72:1245-54.
39. Beinlich CJ, White GJ, Barker KM, Morgan HE. Angiotensin II and left ventricular growth in newborn pig heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1991;23:1031-38.
40. Booz GW, Baker KM. Role of type 1 and 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension*. 1996;28:635-40.

41. van Kesteren CA, van Heugten HA, Lamers JM, Saxena PR, Schalekamp MA. Angiotensin II-mediated growth and antigrowth effects in cultured neonatal rat cardiac myocytes and fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29:2147-57.
42. Hayashida W, Horiuchi M, Grandchamp J, Dzau VJ. Antagonistic action of angiotensin type-1 and type-2 receptor on apoptosis in cultured neonatal rat ventricular myocytes [abstract]. *Hypertension.* 1996;28:535.
43. Kajstura J, Cigola E, Malhotra A, Li P, Cheng W, Meggs L.G Anversa P. Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29:859-70.
44. Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H1560-6.
45. Mazzolai L, Nussberger J, Aubert JF, Brunner DB, Gabbiani G, Brunner HR, et al. Blood pressure-independent cardiac hypertrophy induced by locally activated renin-angiotensin system. *Hypertension.* 1998;31:1324-30.
46. Piratello AC, Moraes-Silva I, Paulini J, Souza PR, Sirvente R, Salemi V, Flues K, Moreira ED, Mostarda C, Cunha T, Casarini DE, Irigoyen MC. Renin angiotensin system and cardiac hypertrophy after sinoaortic denervation in rats. *Clinics (São Paulo).* 2010;65:1345-50.
47. 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;140:1742-51.

48. Litwin SE, Katz SE, Morgan JP, Douglas PS. Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation*. 1994;89:345-54.
49. Brüel A, Oxlund H, Nyengaard JR. Growth hormone increases the total number of myocyte nuclei in the left ventricle of adult rats. *Growth Horm IGF Res*. 2002;12:106-15.
50. Gundersen HJ. The smooth fractionator. *J Microsc*. 2002;207:191-210.
51. Austin A, Fagan DG, Mayhew TM. A stereological method for estimating the total number of ventricular myocyte nuclei in fetal and postnatal hearts. *J Anat*. 1995;187:641-7.
52. Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc*. 1984;134:127-36.
53. Mühlfeld C, Nyengaard JR, Mayhew TM. A review of state-of-the-art stereology for better quantitative 3D morphology in cardiac research. *Cardiovasc Pathol*. 2010;19:65-82.
54. Brüel A, Nyengaard JR. Design-based stereological estimation of the total number of cardiac myocytes in histological sections. *Basic Res Cardiol*. 2005;100:311-9.
55. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.

56. Leandro SM, Furukawa LN, Shimizu MH, Casarini DE, Seguro AC, Patriarca G, Coelho MS, Dolnikoff MS, Heimann JC. *Physiol Behav.* 2008;95:145-51.
57. Schreuder M, Delemarre-van de Waal H, van Wijk A. Consequences of intrauterine growth restriction for the kidney. *Kidney Blood Press Res.* 2006;29:108-25.
58. Rivière G, Michaud A, Breton C, VanCamp G, Laborie C, Enache M, Lesage J, Deloof S, Corvol P, Vieau D. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and ACE activities display tissue-specific sensitivity to undernutrition-programmed hypertension in the adult rat. *Hypertension.* 2005;46:1169-74.
59. Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG. Permanent reduction in heart and kidney organ growth in offspring of undernourished rat dams. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;193:1224-32.
60. Welham SJ, Wade A, Woolf AS. Protein restriction in pregnancy is associated with increased apoptosis of mesenchymal cells at the start of rat metanephrogenesis. *Kidney Int.* 2002;61:1231-42.
61. Lelievre-Pegorier M, Vilar J, Ferrier ML, Moreau E, Freund N, Gilbert T, Merlet-Benichou C. Mild vitamin A deficiency leads to inborn nephron deficit in the rat. *Kidney Int.* 1998;54:1455-62.
62. Lewis RM, Forhead AJ, Petry CJ, Ozanne SE, Hales CN. Long-term programming of blood pressure by maternal dietary iron restriction in the rat. *Br J Nutr.* 2002;88:283-90.

63. Mitchell EK, Louey S, Cock ML, Harding R, Black MJ. Nephron endowment and filtration surface area in the kidney after growth restriction of fetal sheep. *Pediatr Res*. 2004;55:769-73.
64. Hales CN, Ozanne SE. The dangerous road of catch-up growth. *J Physiol*. 2003;547:5-10.
65. Battista MC, Oligny LL, St-Louis J, Brochu M. Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;283:E124-31.
66. Yuan B, Leenen FHH. Dietary sodium intake and left ventricular hypertrophy in normotensive rats. *Am J Physiol*. 1991;261:H1397-401.
67. 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;331:309-14.
68. Guyton AC, Coleman TG, Cowley AW Jr et al. Arterial pressure regulation: Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension. *Am J Med*. 1972;52:584-94.
69. Montani JP, Van Vliet BN. Understanding the contribution of Guyton's large circulatory model to long-term control of arterial pressure. *Exp Physiol*. 2009;94:382-8.
70. Hall JE, Guyton AC, Brands MW. Pressure-volume regulation in hypertension. *Kidney Int*. 1996;49:S35-41.

71. Gao F, Sui D, Garavito RM, Worden RM, Wang DH. Salt intake augments hypotensive effects of transient receptor potential vanilloid 4: functional significance and implication. *Hypertension*. 2009;53:228-35.
72. Earley S, Heppner TJ, Nelson MT, Brayden JE. TRPV4 forms a novel Ca²⁺ signaling complex with ryanodine receptors and BKCa channels. *Circ Res*. 2005;97:1270-79.
73. Kawasaki H, Takasaki K, Saito A, Goto K. Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat. *Nature*. 1988;335:164-7.
74. Oh-hashii Y, Shindo T, Kurihara Y, Imai T, Wang Y, Morita H, Imai Y, Kayaba Y, Nishimatsu H, Suematsu Y, Hirata Y, Yazaki Y, Nagai R, Kuwaki T, Kurihara H. Elevated sympathetic nervous activity in mice deficient in α -CGRP. *Circ Res*. 2001;89:983-90.
75. Barker DJ, Gelow J, Thornburg K, Osmond C, Kajantie E, Eriksson JG. The early origins of chronic heart failure: impaired placental growth and initiation of insulin resistance in childhood. *Eur J Heart Fail*. 2010;12:819-25.
76. Thornburg K, Jonker S, O'Tierney P, Chattergoon N, Louey S, Faber J, Giraud G. Regulation of the cardiomyocyte population in the developing heart. *Prog Biophys Mol Biol*. 2010:1-11.
77. Quaini F, Cigola E, Lagrasta C, Sacconi G, Quaini E, Rossi C, Olivetti G, Anversa P. End-stage cardiac failure in humans is coupled with the induction of proliferating cell nuclear antigen and nuclear mitotic division in ventricular myocytes. *Circ Res*. 1994;75:1050-63.

78. Perennec J, Willemin M, Pocholle P, Hatt PY, Crozatier B. Cardiac structural abnormalities in Syrian hamsters with spontaneous cardiomyopathy or subjected to cardiac overloads. *Basic Res Cardiol*. 1992;87:54-64.
79. Yu HCM, Burrell LM, Black MJ, Wu LL, Dilley RJ, Cooper ME, Johnston CI. Salt induces myocardial and renal fibrosis in normotensive and hypertensive rats. *Circulation*. 1998;98:2621-28.
80. Frohlich ED, Chien Y, Sesoko S, Pegram BL. Relationship between dietary sodium intake, hemodynamics, and cardiac mass in SHR and WKY rats. *Am J Physiol*. 1993;264:R30-4.
81. Ahn J, Varagic J, Slama M, Susic D, Frohlich ED. Cardiac structural and functional responses to salt loading in SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:H767-72.
82. Muiesan ML, Salvetti M, Monteduro C, Bonzi B, Painsi A, Viola S, Poisa P, Rizzoni D, Castellano M, Agabiti-Rosei E. Left ventricular concentric geometry during treatment adversely affects cardiovascular prognosis in hypertensive patients. *Hypertension*. 2004;43:731-8.
83. Le Corvoisier P, Adamy C, Sambim L, Crozatier B, Berdeaux A, Michel JB, Hittinger L, Su J. The cardiac renin-angiotensin system is responsible for high-salt diet-induced left ventricular hypertrophy in mice. *Eur J Heart Fail*. 2010;12:1171-8.
84. Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:589-600.

85. McMullen JR, Jennings GL. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: Novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34:255-62.
86. Adams JW, Sakata Y, Davis MG, Sah VP, Wang Y, Liggett SB, Chien KR, Brown JH, Dorn GW 2nd. Enhanced Galphaq signaling: a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95:10140-5.
87. De Silva DS, Wilson RM, Hutchinson C, Ip PC, Garcia AG, Lancel S, Ito M, Pimentel DR, Sam F. Fenofibrate inhibits aldosterone-induced apoptosis in adult rat ventricular myocytes via stress-activated kinase-dependent mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296:H1983-93.
88. Yoshida Y, Morimoto T, Takaya T, Kawamura T, Sunagawa Y, Wada H, Fujita M, Shimatsu A, Kita T, Hasegawa K. Aldosterone signaling associates with p300/GATA4 transcriptional pathway during the hypertrophic response of cardiomyocytes. *Circ J*. 2010;74:156-62.
89. Sun Y, Zhang J, Lu L, Chen SS, Quinn MT, Weber KT. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart : role of oxidative stress. *Am J Pathol*. 2002;161:1773-81.
90. Takeda Y, Yoneda T, Demura M, Miyamori I, Mabuchi H. Sodium-induced cardiac aldosterone synthesis causes cardiac hypertrophy. *Endocrinology*. 2000;141:1901-4.
91. Bing OH. Hypothesis: apoptosis may be a mechanism for the transition to heart failure with chronic pressure overload. *J Mol Cell Cardiol*. 1994;26:943-8.

92. Moorjani N, Ahmad M, Catarino P, Brittin R, Trabzuni D, Al-Mohanna F, Narula N, Narula J, Westaby S. Activation of apoptotic caspase cascade during the transition to pressure overload-induced heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:1451-8.
93. Choi YH, Cowan DB, Moran AM, Colan SD, Stamm C, Takeuchi K, Friehs I, del Nido PJ, McGowan FX Jr. Myocyte apoptosis occurs early during the development of pressure-overload hypertrophy in infant myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009;137:1356-62.
94. Teiger E, Than VD, Richard L, Wisnewsky C, Tea BS, Gaboury L, Tremblay J, Schwartz K, Hamet P. Apoptosis in pressure overload-induced heart hypertrophy in the rat. *J Clin Invest*. 1996;97:2891-97.

APÊNDICES

Submission Confirmation

Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases (nmcd@unina.it) [Adicionar contato](#)

03/05/2011 17:33

Para: jheimann@usp.br;

Dear Dr. Joel C. Heimann,

Your submission entitled "Salt intake during pregnancy alters offspring's myocardial structure" has been received by Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/nmcd/>.

Your username is: JHEIMANN

If you need to retrieve password details please go to: http://ees.elsevier.com/nmcd/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases