Isis Akemi Katayama

**Hipertrofia miocárdica induzida por consumo
elevado de sal na dieta : avaliação do sistema
renina-angiotensina e do efeito da
N-acetilcisteína**

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

Área de concentração: Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Joel Claudio Heimann

**São Paulo
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Katayama, Isis Akemi

Hipertrofia miocárdica induzida por consumo elevado de sal na dieta : avaliação do sistema renina-angiotensina e do efeito da N-acetilcisteína / Isis Akemi Katayama. -- São Paulo, 2014.

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

Orientador: Joel Claudio Heimann.

Descritores: 1.Cardiomegalia/fisiopatologia 2.Cloreto de sódio na dieta
3.Sistema renina-angiotensina 4.Fibrose/fisiopatologia 5.Pressão arterial
6.Acetilcisteína 7.Losartan 8.Hidralazina 9.Modelos animais 10.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-38/14

DEDICATÓRIA

À minha querida família,

Sempre presente nos momentos alegres e difíceis da minha vida
e que sempre estive disposta a fazer qualquer sacrifício por mim.
Obrigada pelo amor, incentivo e apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao *Prof. Dr. Joel C. Heimann*, a quem tenho como exemplo e que admiro pelo seu caráter, incentivo e inteligência ímpar. Obrigada pela oportunidade, pela confiança e por todos estes anos de aprendizado. O senhor foi fundamental para minha formação profissional e pessoal.

Dra. Luzia Naoko Shinohara Furukawa pela disposição em ajudar sempre, pelos ensinamentos e amizade. Serei eternamente grata e sentirei muitas saudades!

A *Ivone Braga de Oliveira* pela ajuda diária, paciência e amizade. Ainda volto para gente tomar as nossas cervejas! Vou sentir sua falta!

Dra. Miriam Serman Dolnikoff pelo apoio profissional e pessoal.

À querida *Helô Shimizu* pelas dosagens de TBARS e pelas piadas e risadas nos corredores.

À amiga *Dra. Karen L. L. Jang* por estar ao meu lado durante todos esses anos de laboratório, pelas risadas e viagens. Você é um exemplo de competência!

À amiga *Sônia de Fátima Soto* pela amizade, ajuda e companheirismo. Obrigada por dividir todo o estresse do Western Blot comigo, você foi muito importante nesse processo. Sentirei falta de dividir o quarto com você nas viagens!

Ao *Rafael Canavel Pereira* por toda ajuda com os animais e em todo projeto. Obrigada pela oportunidade de me ensinar a orientar. Levarei sua amizade para sempre com carinho.

À *Ellen P. de Brito Dopona* por toda ajuda no projeto. Sua contribuição para o projeto e para mim foram extremamente importantes.

À *Daniele Nunes Ferreira*, a quem devo todo meu aprendizado como aluna de iniciação científica. Você me ensinou muito e contribuiu para que eu me tornasse mais crítica e independente. Obrigada!

À *Carolina Romão e Guilherme Marchesi* pela amizade, pelas brincadeiras e risadas. O ambiente de trabalho ficava muito mais divertido com vocês.

À *Dra. Camilla F. Wenceslau* que passou um curto período conosco no laboratório, mas trouxe ensinamentos fundamentais para esse projeto e se tornou uma querida amiga.

À *Dra. Débora Rothstein Ramos*, pela amizade construída nos últimos anos e pela ajuda que sempre me deu.

À todos os amigos do Laboratório de Hipertensão Experimental, *Flávia, Priscila, Carina e Maria Angélica* pelo apoio e amizade.

Ao *Prof. Dr. Rui de Toledo Barros* e ao *Prof. Dr. Roberto Zatz* por terem me aceitado no programa de pós-graduação da Nefrologia.

Ao *Walter Campestre* pelos cuidados com os animais, mas principalmente pelas risadas e amizade.

À todos do *LIM 16* e da *FMUSP* que de alguma forma direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e para minha formação.

Aos meus pais *Paulo e Bartira*, pelo amor incondicional, pelas lutas incessantes pelo meu melhor, por serem meus maiores exemplos de vida e por sempre me guiarem pelo caminho do bem. Amo muito vocês!

Aos meus irmãos *Juninho, Thata e Analu* por serem meus primeiros companheiros de vida. Obrigada pelo forte sentimento que nos une e que só a gente é capaz de entender. Amo muito vocês!

Aos meus cunhados *Ana Paula e Miller* por serem os irmãos que a vida me trouxe e principalmente por completarem nossa família e fazerem meus irmãos felizes. Amo vocês!

Aos meus sobrinhos *Luca e Duda* por serem a luz e alegria em minha vida. Obrigada por me ensinarem a amar de um jeito que eu ainda não conhecia. Vocês são os amores da Titi!

Aos melhores amigos *Mariana, Rodrigo, Mônica, Sabrina e Aruan* pela amizade de anos, pelo constante suporte e carinho. A distância apenas fortalece ainda mais nossos laços. Amo vocês!

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

À *Faculdade de Medicina e ao programa de Pós-graduação da Nefrologia* por terem me aceitado.

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

À Deus, por ter colocado todas essas pessoas em meu caminho e por ter me abençoado a cada minuto nessa longa, dura, porém gratificante jornada.

Agradecimento especial

À pessoa mais importante da minha vida, meu amado marido *Francisco, meu Ga*. O melhor companheiro que alguém poderia ter, que sempre me apoiou em todas as minhas escolhas, que me ajudou em todos os momentos para a realização desse projeto, que foi o ombro quando precisei de consolo e descanso, mas também puxou minha orelha e me impulsionou quando eu ameaçava desmoronar. Nada disso teria acontecido sem você. Nada disso teria sentido sem você. Te amo absurdamente!

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: 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de figuras do anexo

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	20
3	MÉTODOS.....	22
3.1	Animais e dietas.....	23
3.2	Protocolo experimental.....	24
3.3	Tratamento medicamentoso.....	25
3.3.1	Cloridrato de hidralazina	25
3.3.2	Losartan	26
3.3.3	N-Acetilcisteína	26
3.4	Evolução ponderal.....	27
3.5	Pressão arterial caudal.....	27
3.6	Avaliação do consumo de ração, ingestão hídrica e coleta de urina para dosagem de sódio urinário	28
3.7	Hematócrito.....	29
3.8	Coleta de tecidos e medida das massas cardíaca total, ventricular esquerda e direita.....	29
3.9	Medida do diâmetro transverso do cardiomiócito e porcentagem de fibrose intersticial.....	30
3.9.1	Preparação do tecido cardíaco para análises histológicas	30
3.9.1.1	Processo de parafinização do tecido cardíaco.....	30
3.9.1.2	Desparafinização para coloração histológica	31
3.9.1.3	Coloração com ácido Periódico de Schiff (PAS)	31
3.9.1.4	Coloração com tricrômio de Masson.....	32

3.10	Reação de imuno-histoquímica para quantificação da angiotensina II no ventrículo esquerdo e no ventrículo direito	33
3.11	Avaliação da atividade dos receptores AT1 e AT2	34
3.12	Determinação da concentração de aldosterona sérica.....	34
3.13	Avaliação da expressão gênica dos componentes do SRA.....	35
3.13.1	Extração de RNA total dos ventrículos esquerdo e direito	35
3.13.2	Reação de transcriptase reversa (RT)	36
3.13.3	Reação de polimerase em cadeia (PCR)	37
3.14	Western blot	39
3.15	Ensaio de TBARS no miocárdio	40
3.16	Análise estatística	41
4	RESULTADOS.....	42
4.1	Peso corpóreo	43
4.2	Pressão arterial caudal.....	44
4.3	Peso corpóreo, pressão arterial caudal e frequência cardíaca avaliada na 18ª semana de vida.....	45
4.4	Consumo de ração, ingestão hídrica e volume urinário.....	45
4.5	Excreção de sódio urinário de 24 horas, sódio sérico e hematócrito	47
4.6	Massas cardíaca total, ventricular esquerda e ventricular direita sem correção e corrigidas pelo comprimento da tibia	47
4.7	Diâmetro transverso do cardiomiócito nos ventrículos esquerdo e direito	51
4.8	Área de fibrose intersticial nos ventrículos esquerdo e direito.....	53
4.9	TBARS no miocárdio.....	57
4.10	Concentração de aldosterona sérica	58
4.11	Conteúdo de angiotensina II nos ventrículos esquerdo e direito	59
4.12	Expressão gênica dos componentes do SRA nos ventrículos esquerdo e direito.....	62
4.13	Expressão proteica dos componentes do SRA e da enzima quimase nos ventrículos esquerdo e direito.....	70
4.14	Avaliação da ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada dos receptores AT1 e AT2 nos ventrículos esquerdo e direito ...	79

5	DISCUSSÃO.....	83
6	CONCLUSÕES.....	91
7	ANEXOS.....	93
8	REFERÊNCIAS	96
9	APÊNDICES	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

All: Angiotensina II

AGTO: Angiotensinogênio

ANP: Peptídeo atrial natriurético

AT1: Receptor de angiotensina II do tipo 1

AT2: Receptor de angiotensina II do tipo 2

BSA: Bovine Serum Albumin

bpm: Batimentos por minuto

cDNA: DNA complementar

cm: centímetro

CT: Comprimento da tíbia

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DNAase: Enzima que degrada DNA

dNTP: 2'-Deoxinucleotídeo 5'-trifosfato

DTM: Diâmetro transversal do miócito

ECA: Enzima conversora de angiotensina I

ECA2: Enzima conversora de angiotensina 2

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

EUA: Estados Unidos da América

FI: Fibrose intersticial

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

HC: Hipertrofia cardíaca

HS: Dieta hipersódica 8%

HZ: Hidralazina

LOS: Losartan

MDA: Malonaldeído

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

mL: mililitro

μL: microlitro

μm: micrômetro

mRNA: Ácido ribonucléico mensageiro

NAC: N-acetilcisteína

NaCl: Cloreto de sódio

NS: Dieta normossódica

O₂^{-•}: Radical superóxido

OH[•]: Radical hidroxila

PAC: Pressão arterial caudal

PAS: ácido Periódico de Schiff

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

PBS: Phosphate buffered saline

RNA: Ácido ribonucléico

RNAase: Enzima que degrada RNA

ROS: Reactive oxygen species

RT-PCR: Transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SOD: Superóxido dismutase

SRA: Sistema renina angiotensina

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA: ácido tricloroacético

TGF- β : Transforming growth factor beta

VE: Ventrículo esquerdo

VD: Ventrículo direito

UA: Unidade arbitrária

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Padrões de hipertrofia ventricular esquerda	7
Figura 2:	Tipos de hipertrofia do cardiomiócito e disposição dos sarcômeros	7
Figura 3:	Representação de um coração normal (esquerda) e de um coração com os cardiomiócitos hipertrofiados e com aumento de fibrose (direita)	9
Figura 4.	Protocolo experimental.....	25
Figura 5.	Peso corpóreo	43
Figura 6.	Pressão arterial caudal.....	44
Figura 7.	A) Consumo de ração, B) ingestão hídrica e C) volume urinário	46
Figura 8.	A) Excreção urinária de sódio (mEq/24h), B) sódio sérico e C) hematócrito.....	48
Figura 9.	A) Massa cardíaca total, B) Massa ventricular esquerda e C) Massa ventricular direita (g) sem correção.....	49
Figura 10.	A) Massa cardíaca total, B) Massa ventricular esquerda e C) Massa ventricular direita corrigida pelo comprimento da tíbia (g/cm)	50
Figura 11.	A) Diâmetro transverso do cardiomiócito (μm) do ventrículo esquerdo e B) Diâmetro transverso do cardiomiócito (μm) do ventrículo direito	51
Figura 12.	Diâmetro transverso do cardiomiócito do ventrículo esquerdo e do ventrículo direito	52
Figura 13.	A) Fibrose intersticial (%) do ventrículo esquerdo e B) Fibrose intersticial (%) do ventrículo direito	53
Figura 14.	Fibrose intersticial do ventrículo esquerdo e do ventrículo direito	54
Figura 15.	TBARS cardíaco	57
Figura 16.	Aldosterona sérica	58
Figura 17.	A) Conteúdo de angiotensina II no VE e B) no VD.....	59
Figura 18.	 Conteúdo de angiotensina II no VE e no VD60	

Figura 19. A) Expressão gênica do angiotensinogênio no VE e B) no VD	63
Figura 20. A) Expressão gênica da renina no VE e B) no VD	64
Figura 21. A) Expressão gênica da ECA no VE e B) no VD.....	65
Figura 22. A) Expressão gênica da ECA2 no VE e B) no VD	66
Figura 23. A) Expressão gênica do receptor AT1 no VE e B) no VD	67
Figura 24. A) Expressão gênica do receptor AT2 no VE e B) no VD	68
Figura 25. A) Expressão proteica do angiotensinogênio no VE e B) no VD	71
Figura 26. A) Expressão proteica da renina no VE e B) no VD	72
Figura 27. A) Expressão proteica da ECA no VE e B) no VD.....	73
Figura 28. A) Expressão proteica da ECA2 no VE e B) no VD.....	74
Figura 29. A) Expressão proteica do receptor AT1 no VE e B) no VD	75
Figura 30. A) Expressão proteica do receptor AT2 no VE e B) no VD	76
Figura 31. A) Expressão proteica da enzima quimase no VE e B) no VD	77
Figura 32. Avaliação da ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada dos receptores AT1 e AT2 nos ventrículos esquerdo e direito	80
Figura 33. Avaliação da ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada dos receptores AT1 e AT2 nos ventrículos esquerdo e direito (imagem)	81

LISTA DE FIGURAS DO ANEXO

- Figura 1:** Representação esquemática do aparelho utilizado para a medida de pressão arterial caudal 94
- Figura 2:** Representação esquemática da gaiola metabólica utilizada para a avaliação do consumo de ração, ingestão hídrica, volume urinário e coleta de amostra urinária 95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidade de cDNA, temperatura de anelamento e número de ciclos utilizados em cada gene no tecido cardíaco.....	38
Tabela 2. Sequências dos primers utilizados	38
Tabela 3. Variáveis hemodinâmicas, Consumo de ração, ingestão hídrica e água, volume urinário, sódio urinário e sérico e hematócrito	55
Tabela 4. Peso corpóreo, massas cardíaca total, do VE e VD corrigidas pelo comprimento da tíbia e sem correção, diâmetro transverso do cardiomiócito e fibrose intersticial do VE e VD	56
Tabela 5. TBARS cardíaco, concentração de aldosterona sérica e conteúdo de angiotensina II nos ventrículos esquerdo e direito.....	61
Tabela 6. Expressão gênica do angiotensinogênio, renina, ECA, ECA2, AT1 e AT2 no VE e no VD.....	69
Tabela 7. Expressão proteica do angiotensinogênio, renina, ECA, ECA2, AT1, AT2 e quimase no VE e no VD	78
Tabela 8. Avaliação da ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada do receptor AT1 e AT2 (unidade arbitrária de fluorescência) nos ventrículos esquerdo e direito	82

RESUMO

Katayama IA. *Hipertrofia miocárdica induzida por consumo elevado de sal na dieta: avaliação do sistema renina-angiotensina e do efeito da N-acetilcisteína* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014. 104p.

As doenças cardiovasculares são a maior causa de morte no mundo e entre essas doenças, a hipertrofia cardíaca (HC) tem se destacado especialmente por ser um fator de risco de insuficiência cardíaca. A HC é um fenômeno que acompanha a hipertensão arterial e no qual se observa aumento de proteínas estruturais e contráteis dos cardiomiócitos, havendo muitas vezes concomitantemente aumento do colágeno intersticial. Fatores independentes da pressão arterial também podem contribuir para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. Dentre estes fatores, a sobrecarga de sal na dieta tem se destacado. Diversos estudos comprovam o efeito hipertrófico do sal. Em modelos animais onde se estudou sobrecarga de sal, não foi detectado aumento da atividade de renina plasmática, sugerindo que o sistema renina-angiotensina aldosterona (SRA) circulante pode não estar envolvido no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. Apesar de alguns estudos tentarem elucidar o papel do sal no desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda, os mecanismos pelo qual o sal atua ainda não estão totalmente esclarecidos. Neste contexto, o objetivo do presente estudo é observar os fenômenos que ocorrem no ventrículo esquerdo em resposta a sobrecarga de sal na dieta na tentativa de elucidar sua fisiopatologia. Para tanto, ratos Wistar machos foram divididos em cinco grupos de acordo com a dieta (normossódica 1,26% e hipersódica 8% de NaCl) e com o tratamento (losartan, cloridrato de hidralazina ou N-acetilcisteína). Foi avaliada a evolução ponderal, pressão arterial caudal, medida do diâmetro transverso do cardiomiócito, fibrose intersticial, expressão gênica e proteica dos componentes do SRA, dosagem de aldosterona sérica e cardíaca, dosagem de TBARS cardíaco, concentração de angiotensina II e estado conformacional dos receptores AT1 e AT2. Os principais resultados observados foram: o aumento do consumo de ração (com elevada concentração de NaCl) do grupo HS+NAC e consequente aumento na pressão arterial e peso corpóreo; o desenvolvimento de HC independente do incremento da pressão arterial no grupo HS+HZ e a prevenção total ou parcial dessa hipertrofia através dos tratamentos com losartan e N-acetilcisteína, respectivamente e prevenção da fibrose intersticial nos grupos tratados com hidralazina, losartan e N-acetilcisteína.

Descritores: 1. Cardiomegalia/fisiopatologia 2. Cloreto de sódio na dieta 3. Sistema renina-angiotensina 4. Fibrose/fisiopatologia 5. Pressão arterial 6. Acetilcisteína 7. Losartan 8. Hidralazina 9. Modelos animais 10. Ratos Wistar

ABSTRACT

Katayama IA. *Cardiac hypertrophy induced by high salt diet: renin-angiotensin system and N-acetylcysteine effect* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014. 104p.

Cardiovascular diseases are the leading cause of death worldwide and among these diseases, the cardiac hypertrophy (CH) has been highlighted, especially as an important risk factor for developing heart failure. The CH is a phenomenon that accompanies hypertension and in which there is increased structural and contractile proteins in cardiomyocytes, with often concomitant increase of interstitial collagen. Blood pressure independent risk factors can also contribute to the development of cardiac hypertrophy. Among these factors, the high salt intake has been outstanding. Several studies confirm the hypertrophic effect of salt. In animal models submitted to salt overload, no increase in plasma renin activity was observed, suggesting that the renin-angiotensin (RAS) circulating system may not be involved in the development of cardiac hypertrophy. Although some studies attempting to elucidate the role of salt in the development of left ventricular hypertrophy, the mechanisms by which salt acts are not yet fully understood. In this context, the objective of this study is to observe the phenomena occurring in the left ventricle in response to dietary salt overload in an attempt to elucidate its pathophysiology. Male Wistar rats were divided into five groups according to their diet (1.26% and 8% NaCl) and treatment (losartan, hydralazine or N-acetylcysteine). We evaluated the body weight, tail-cuff blood pressure, the transverse diameter of the cardiomyocyte, interstitial fibrosis, gene and protein expression of RAAS components, serum and cardiac aldosterone dosage, cardiac TBARS, angiotensin II concentration and binding of conformation-specific anti-AT1 and anti-AT2 antibodies. The main results were: increased food intake (with high NaCl content) in the HS + NAC group and consequent increase in blood pressure and body weight; developing blood pressure-independent CH in the HS + HZ group partial or total prevention of such hypertrophy by treatment with losartan and N-acetylcysteine, respectively, and prevention of interstitial fibrosis in groups treated with hydralazine, losartan and N-acetylcysteine.

Keywords: 1. Cardiomegaly/pathophysiology 2. Sodium chloride on diet 3. Renin-angiotensin system 4. Fibrosis/pathophysiology 5. Arterial pressure 6. Acetylcysteine 7. Losartan 8. Hydralazine 9. Animal models 10. Wistar rats

1 INTRODUÇÃO

De acordo com vários estudos, as doenças cardiovasculares são as mais frequentes causas de morte no mundo (Gu et al. 2010., Devereux et al., 1983). Entre essas doenças, a presença de hipertrofia cardíaca (HC) constitui um indicador de grande relevância de risco de morbidade e mortalidade cardiovascular. O estudo conhecido como “Framingham Heart Study”, mostrou que os indivíduos portadores de HC, diagnosticada por alterações eletrocardiográficas, têm risco de morte seis vezes maior que a população geral. Sendo assim, muitos estudos têm abordado essa alteração com o intuito de encontrar formas de prevenção e tratamento, diminuindo dessa maneira, o alto risco de morte (Levy et al., 1990).

Conceito

De uma forma geral, o termo HC é usado para definir um conjunto de alterações moleculares, celulares e intersticiais cardíacas, manifestadas clinicamente como modificações de tamanho, massa, geometria e função do coração. Os cardiomiócitos são as principais células envolvidas nesse processo, porém outros componentes como fibroblastos e células endoteliais também estão envolvidos.

A HC é um processo adaptativo do miocárdio decorrente de estímulos mecânicos e/ou humorais. À medida que os estímulos persistem, os cardiomiócitos atingem o limite máximo de hipertrofia, resultando em morte celular, desencadeamento de processos inflamatórios e consequente formação

de fibrose cardíaca. Ao longo do tempo, as fibras hipertrofiadas do coração se tornam menos capazes de contrair e relaxar, resultando em uma rigidez do órgão (Weber et al., 1990).

Causas

- ✓ Hipertensão arterial sistêmica: pacientes hipertensos têm maior risco de desenvolver HC devido à sobrecarga pressórica imposta ao coração. O músculo cardíaco hipertrofia com o intuito de se adaptar a essa nova condição, mas com o passar do tempo e com a persistência da hipertensão arterial, essa situação passa a ser patológica. Essa é a principal causa da hipertrofia cardíaca (Schmieder et al., 1996).

- ✓ Senilidade: por si só, é fator de risco para complicações cardiovasculares na população em geral. Um estudo realizado na população de *Framingham*, nos Estados Unidos, demonstrou que a HC pode ser observada em 6% dos indivíduos com idade inferior a trinta anos e em 43% dos indivíduos na sétima década de vida (Kannel et al., 1987; Nejat et al., 1976).

- ✓ Obesidade: não resta dúvida de que a obesidade é fator de risco para o aparecimento de doenças cardiovasculares, embora o exato mecanismo não seja bem conhecido. O aumento de peso provoca um aumento do débito cardíaco, do volume sistólico e da pressão de enchimento ventricular, concomitante à expansão do volume intravascular e diminuição da resistência vascular periférica. Esse

aumento do volume sanguíneo total e do débito cardíaco tende a causar dilatação ventricular e por fim uma hipertrofia excêntrica compensatória do ventrículo esquerdo (VE).

Por outro lado, a hipertensão arterial sistêmica ocorre mais frequentemente em obesos que em indivíduos normais em qualquer idade. Dessa forma, pacientes obesos e hipertensos podem apresentar um aumento da carga hemodinâmica tanto por aumento de volume quanto por aumento de pressão, servindo estas de estímulos para o desenvolvimento de HC (Lauer et al., 1991; de Simone et al., 1994).

- ✓ Diabetes mellitus: diabetes mellitus e hipertensão arterial são fatores de risco independentes para doenças cardiovasculares e frequentemente coexistem em um mesmo paciente (Sowers et al., 2001). A cardiomiopatia do diabetes se caracteriza principalmente por HC e déficit no relaxamento ventricular (Shehadeh et al., 1995; Bells 1995). Apesar de a cardiomiopatia diabética ter sido descrita há vários anos, os mecanismos moleculares e fisiopatológicos responsáveis por seu desenvolvimento ainda não foram totalmente elucidados. Evidências apontam para uma participação do sistema-renina-angiotensina-aldosterona (SRA) cardíaco e ações autócrinas e parácrinas do IGF-1 como possíveis mecanismos moleculares mediadores do fenótipo de HC (Sowers et al., 2001).

- ✓ Usuário de drogas: outra associação com a presença de HC que está começando a ter importância epidemiológica é a toxicomania, porém estudos ainda precisam ser realizados para elucidar seus mecanismos.

- ✓ Hormônios tireoideanos: estudos mostram que esses hormônios possuem uma íntima relação com a função cardíaca, sendo assim, altos níveis desses hormônios podem desencadear o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como por exemplo a HC (Tavares et al., 2013).
- ✓ Exercício físico: a HC causada por esse estímulo ocorre como forma de adaptação ao exercício físico regular. Muitos autores acreditam que a HC estimulada pelo exercício físico seja fisiológica, pois a sobrecarga induzida por exercício físico é intermitente, diferentemente da hipertrofia dita patológica, que possui um estímulo contínuo, como por exemplo no caso de pacientes hipertensos. Embora, por muito tempo a hipertrofia causada pelo exercício físico tenha sido considerada fisiológica, muitos autores contestam esse conceito, uma vez que já é conhecido que esse tipo de estímulo pode causar não só HC do tipo excêntrica (mais comum), como também concêntrica (Colan, 1997).
- ✓ Sal: A ingestão de grandes quantidades de cloreto de sódio (NaCl) tem sido apontada como um importante determinante da hipertrofia cardíaca (Fröhlich et al., 1993). Apesar de numerosos estudos clínicos e experimentais detectarem seu efeito hipertensor (Beauchamp e Engelman, 1991; He e Whelton, 2002), tem se tornado cada vez mais evidente que o sal pode induzir hipertrofia cardíaca, independentemente de fatores hemodinâmicos (Fröhlich et al., 1993; Ferreira et al., 2010). Desse modo, vários estudos visam elucidar os mecanismos pelos quais o sal pode induzir hipertrofia cardíaca. Um estudo de Du Cailar e colaboradores (1992) investigou a associação entre excreção de sódio urinário e massa ventricular esquerda em

amostras de pessoas hipertensas ou normotensas. Em ambos os grupos, a excreção de sódio urinário em 24 horas correlacionou-se positivamente com a massa ventricular, sugerindo que o sódio possui efeito cardiotrófico tanto em normotensos quanto em hipertensos.

Outro estudo realizado confirmou o efeito do sal independentemente de fatores hemodinâmicos, onde foi observado o desenvolvimento da HC não só no ventrículo esquerdo, como também no ventrículo direito (VD). A presença de hipertrofia ventricular direita, embora moderada, pode ser um indicativo da ausência do efeito pressórico do sal, uma vez que esse ventrículo não é submetido à sobrecarga de pressão (Schwarz et al., 2005). Além disso, alguns estudos sugerem que a sobrecarga de sal pode aumentar a produção de alguns fatores no coração, tais como fator transformador de crescimento beta ($TGF-\beta$) (Yu et al., 1998), angiotensina II (AngII) e aldosterona (Ferreira et al., 2010; Takeda et al., 2000), podendo assim induzir as respostas hipertrófica e fibrótica.

Tipos de hipertrofia

Do ponto de vista fenotípico, a HC pode ser classificada de duas maneiras: excêntrica ou concêntrica. A hipertrofia cardíaca excêntrica ocorre devido à um estímulo de sobrecarga de volume e é caracterizada pela adição dos sarcômeros em série, resultando em um crescimento longitudinal da célula com concomitante aumento do diâmetro da cavidade ventricular. Já a hipertrofia cardíaca do tipo concêntrica ocorre devido à uma sobrecarga de pressão e é caracterizada pela adição dos sarcômeros em paralelo. Dessa forma, há um crescimento na largura da célula, e portanto, nesse tipo de hipertrofia é observado uma redução da cavidade ventricular (Figuras 1 e 2).

Figura 1: Padrões de hipertrofia ventricular esquerda
 Fonte: modificado de Gupta et al., 2007

Figura 2: Tipos de hipertrofia do cardiomiócito e disposição dos sarcômeros
 Fonte: modificado de Garcia et al., 2008 e Aplin et al., 2009

Marcadores da hipertrofia cardíaca

Durante o desenvolvimento da HC, é possível observar o aumento da expressão de alguns genes que costumam ser expressos no período de desenvolvimento cardíaco fetal ou também chamado perinatal, como por exemplo, genes do peptídeo natriurético atrial (ANP) e de proteínas contráteis fetais, principalmente a miosina de cadeia pesada do tipo beta (β -MCP). Consequentemente ocorre um aumento na síntese de proteínas, característico do processo de crescimento celular. Dessa forma, esses genes são utilizados como marcadores de HC (Izumo et al., 1988).

Matriz extracelular

A matriz extracelular miocárdica é um componente muito importante para o tecido cardíaco, pois está intimamente ligada à função contrátil do coração. Além disso, está também envolvida na sustentação dos cardiomiócitos e da rede capilar. Basicamente, a matriz extracelular é um complexo de macromoléculas estáveis que une as células do tecido. Seus principais componentes são diferentes tipos de moléculas de colágeno, proteoglicanos, fibronectina, elastina, laminina e glicoproteínas. Suas principais funções são: suporte mecânico, via para migração celular, coesão e armazenamento de substâncias (Janicki et al., 1994). O colágeno é produzido pelos fibroblastos e em situações patológicas também passam a ser produzidos por miofibroblastos. Os miofibroblastos são fibroblastos que expressam α -actina de músculo liso (α -SMA), ou seja, estas células possuem um aparato contrátil composto de filamentos de actina. A formação destas células é controlada por fatores autócrinos e parácrinos como, por exemplo, All

e o TGF- β (Lijnen et al., 2001). A quantidade de colágeno produzida pelos fibroblastos depende de um fino balanço entre os processos de síntese e degradação. Estímulos como o TGF- β , a AII e espécies reativas de oxigênio podem levar à um aumento de fibroblastos, aumentando consequentemente a síntese de colágeno. Quando a síntese excede a degradação, ocorre acúmulo de colágeno, processo também conhecido como fibrose. O aumento de tecido fibroso aumenta a rigidez do miocárdio e dificulta o enchimento diastólico, predispondo ao desenvolvimento de insuficiência ventricular diastólica (Janicki et al., 2006) (Figura 3).

Figura 3: Representação de um coração normal (esquerda) e de um coração com os cardiomiócitos hipertrofiados e com aumento de fibrose (direita)

Fonte: modificado de Berk et al., 2007

Sistema renina-angiotensina-aldosterona clássico

O SRA corresponde a um sistema hormonal cujo papel fundamental está relacionado com o controle da pressão arterial e da homeostase da volemia. Basicamente, a AII, substância efetora do SRA, é produto da reação catalítica

iniciada pela ação da renina sobre o seu substrato, o angiotensinogênio. Esta reação dá origem a angiotensina I que ao passar pela circulação pulmonar sofre a ação da enzima conversora da angiotensina (ECA), resultando na formação da angiotensina II (Reid et al., 1978).

Componentes do SRA clássico

✓ Renina

É uma enzima proteolítica sintetizada nas células do aparelho justaglomerular presente nas arteríolas aferentes do rim (Gomez et al., 1990). Essa enzima é sintetizada como pré-pró-renina, que é clivada em pró-renina e posteriormente em renina ativa, a qual é liberada na circulação após estímulo. Os principais estímulos para a liberação desta enzima são a hipoperfusão renal, produzida por hipotensão ou depleção de volume e depleção de sódio (Toda et al., 2007).

✓ Angiotensinogênio e enzima conversora de angiotensina:

O angiotensinogênio é estruturalmente uma grande proteína globular, com peso molecular entre 55 a 65 kDa produzida pelo fígado na presença de glicocorticóides e estrógenos (Clauser et al., 1989; Morris et al., 1979). Do fígado este substrato é liberado para a circulação para ser clivado pela renina, gerando o decapeptídeo angiotensina I. Esta, por sua vez é clivada pela ECA, uma metaloprotease produzida pelas células endoteliais principalmente do pulmão. A ECA age sobre a angiotensina I excluindo dois aminoácidos da porção carboxi-terminal, liberando o octapeptídeo angiotensina II, um potente vasoconstritor.

✓ **Angiotensina II:**

Dentre as ações clássicas desse peptídeo, destacam-se a manutenção e modulação da pressão arterial, o controle do volume extracelular e a regulação da circulação sistêmica e renal, efeitos esses bastante conhecidos. Primeiro a angiotensina II promove retenção renal de sódio e água causando consequentemente expansão do volume plasmático. Este efeito é mediado tanto pelo aumento da secreção de aldosterona pelo córtex adrenal como pela estimulação direta da reabsorção tubular de sódio. Segundo, a angiotensina II produz vasoconstrição arteriolar, elevando a resistência vascular sistêmica, podendo então levar a um aumento da pressão sanguínea (Roks et al., 1997; Wu et al., 2005).

✓ **Aldosterona:**

É o principal hormônio mineralocorticoide, produzido pela zona glomerulosa da glândula adrenal em resposta a angiotensina II ou a uma dieta rica em potássio. Porém, estudos recentes mostram que outros tecidos além da glândula adrenal podem ser capazes de sintetizar a aldosterona, como por exemplo, tecido cardiovascular e o sistema nervoso central (Pippal et al., 2008; Takeda et al., 2000).

Os principais efeitos da aldosterona são reabsorção tubular de sódio e secreção tubular de potássio. Quando ocorre a reabsorção do sódio nos túbulos renais, a água é absorvida osmoticamente, levando a um aumento do volume extracelular e consequentemente o aumento da pressão arterial (Young et al., 2008).

Os efeitos da aldosterona são mediados pelo receptor mineralocorticoide, que faz parte da superfamília dos receptores esteróides. É intrinsicamente um

receptor não seletivo. Estudos mostraram que *in vitro* pode se ligar tanto à hormônios mineralocorticóides como glicocorticóides com uma mesma afinidade (Funder et al., 1968).

✓ **Receptor AT1:**

O AT1 é um receptor de membrana, com sete domínios transmembrana e acoplado à proteína G. Em roedores é encontrado nas isoformas AT1a e AT1b. Quando a angiotensina II se liga ao receptor, uma cascata de eventos celulares é desencadeada, resultando nas ações desse peptídeo. Os efeitos mais conhecidos são: vasoconstrição, secreção de aldosterona, reabsorção de sódio renal e respostas pressóricas (Touyz, 2003; Lijnen et al., 2001).

✓ **Receptor AT2:**

Assim como o receptor AT1, o AT2 também é um receptor de membrana, com sete domínios transmembrana e acoplado à proteína G. A angiotensina II também se liga a esse receptor, desencadeando ações, na sua maioria, opostas a ativação do receptor AT1, desempenhando, portanto um papel protetor (Horiuchi et al., 1999; Levy, 2005).

✓ **Angiotensina 1-7 e ECA 2**

A angiotensina (1-7) pode ser formada diretamente a partir da angiotensina I pela ação de muitas peptidases, incluindo a neuro-endopeptidase (NEP24.11) e a prolilendopeptidase (PEP) ou pode ser formada a partir da angiotensina II via PEP ou pela prolil-carboxipeptidase. Estudos afirmam que a NEP24.11 possui o papel principal na formação da angiotensina (1-7) tanto circulante como tecidual (Yamamoto et al., 1992).

Mais recentemente, a via para a produção de angiotensina (1-7) foi esclarecida através da clonagem e caracterização de um homólogo da ECA, a

ECA2. Essa enzima mostrou converter a angiotensina II em angiotensina (1-7). Os efeitos da ECA2, que funciona como uma carboxipeptidase consiste tanto na remoção de um resíduo de aminoácido da angiotensina I para gerar a angiotensina 1-9, um peptídeo ainda com função não bem esclarecida, como degradar a angiotensina II para formar o peptídeo biologicamente ativo angiotensina (1-7).

Quando ligada ao seu receptor Mas, a angiotensina (1-7) provoca efeitos contrários àqueles desencadeados pela ligação da AII no receptor AT1. Um estudo realizado no leito vascular arterial de um homem jovem e saudável, a angiotensina (1-7) foi capaz de antagonizar a vasoconstrição induzida pela angiotensina II (Ueda et al., 2000). Portanto, tanto a angiotensina (1-7) como a ECA 2, desempenham possíveis papéis protetores.

Participação do sistema renina-angiotensina na hipertrofia e fibrose intersticial cardíaca

Atualmente, considera-se que o SRA não é um sistema exclusivamente humoral circulante, envolvido apenas na regulação da pressão arterial e equilíbrio hidroeletrolítico. Já é bem estabelecido que todos os componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona (angiotensinogênio, renina, enzima conversora de angiotensina e receptores de angiotensina II) necessários para a biossíntese e ação da angiotensina II estão presentes no coração (Baker et al., 1992; Dzau, 1987) e que ocorre formação deste peptídeo no tecido cardíaco (Re, 2003; De Mello et al., 2000). Estes componentes estão distribuídos nos cardiomiócitos, fibroblastos e células endoteliais cardíacas e interessante muitos estudos mostraram que o SRA tecidual é regulado de maneira

independente do circulante (Dostal e Baker, 1999). Sendo assim, alguns autores acreditam que o SRA tecidual desempenha um papel importante na hipertrofia ventricular esquerda (Weber, 1994; Yamazaki, 1996).

Angiotensina II no coração

A angiotensina II é um octapeptídeo conhecido principalmente por sua ação vasoconstritora, porém, outras funções já foram descritas. Atualmente é considerada uma citocina pró-inflamatória que estimula a liberação de outras citocinas, induz apoptose, aumenta a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e estimula a proliferação celular. Por isso, a All possui um papel central em processos responsáveis pelo desenvolvimento da HC (Brasier et al., 2000; Schluter et al., 2008).

A maioria das vias de sinalização induzidas pela All nos cardiomiócitos é mediada pelo receptor AT1. Este conjunto ligante-receptor pode ser um potente estimulador de hipertrofia ventricular esquerda (Yamazaki et al., 1996), aumentando a produção de uma variedade de proteínas que estão relacionadas com a hipertrofia cardíaca, além de induzir acúmulo de matriz extracelular e formação de fibrose, aumentando a probabilidade de desenvolver insuficiência diastólica.

Em um estudo realizado em cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos, foi observado que a All via receptor AT1 induziu a expressão de fatores de crescimento, tais como TGF- β 1 e fator de crescimento de fibroblasto (FGF) que estimularam o desenvolvimento tanto de hipertrofia cardíaca como fibrose intersticial (Sadoshima et al., 1993).

Além do receptor AT1, a angiotensina II também pode ativar outro receptor, o AT2. Esse receptor é expresso em grande quantidade durante o período fetal, porém logo após o nascimento, sua expressão é drasticamente diminuída (Huang et al., 1996). Em relação aos efeitos desencadeados por este receptor no tecido cardíaco, ainda são motivos de controvérsia. Alguns estudos apontam que este receptor possui propriedades anti-proliferativas e, portanto, opostos aos observados pelo efeito decorrente da ligação da angiotensina II ao receptor AT1 (Xu et al., 2000). Por outro lado, há evidências da literatura sugerindo que a estimulação do receptor AT2 no coração, desencadeia efeitos hipertróficos (D'amore et al., 2005).

Aldosterona no coração

Assim como os outros componentes do SRA, a aldosterona também é sintetizada em alguns tecidos. Na literatura, estudos mostraram que a aldosterona quando ligada ao seu receptor mineralocorticoide, leva a uma maior produção de espécies reativas de oxigênio, desencadeando processos inflamatórios e fibrose tecidual. A relação entre aldosterona e fibrose já é bem estabelecida e o modelo de fibrose cardíaca em resposta a aldosterona e dieta rica em sal foi descrito pela primeira vez por Brilla e Weber no qual se observou que a aldosterona exógena associada com dieta rica em sal produz hipertensão, HC, fibrose perivascular e intersticial, síntese de colágeno no miocárdio e deterioração da função diastólica (Brilla et al., 1992 e 1994). Outro estudo mostrou os mesmos resultados, porém independentemente do incremento da pressão arterial (Young et al., 1995). Além disso, há relatos de que a aldosterona também seja capaz de aumentar a expressão do receptor AT1 e o tratamento

com losartan foi capaz de prevenir parcialmente a HC e a fibrose induzidas por esse hormônio em ratos (Robert et al., 1999; Takeda et al., 2000).

ECA2 e angiotensina (1-7) no coração

Um componente que tem recebido muita atenção é a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2). No coração a ECA2 cliva a angiotensina I gerando o peptídeo angiotensina (1-9), que pode posteriormente ser convertido em angiotensina (1-7) pela ECA. Por outro lado, a ECA2 pode também clivar diretamente a angiotensina II para gerar angiotensina (1-7). Numerosos estudos têm verificado que a angiotensina (1-7), através da sua ligação com o receptor Mas, têm efeitos anti-proliferativos e cardioprotetores, ou seja, contrários àqueles observados pela angiotensina II ao se ligar ao receptor AT1. Um possível mecanismo para este efeito antagônico da angiotensina (1-7) seria a inibição da atividade de proteínas da família MAPKs (*p38 mitogen-activated protein kinase*) envolvidas no processo de hipertrofia dos cardiomiócitos (Raizada et al., 2007).

Quimase cardíaca: via alternativa de síntese de angiotensina II

Além da via clássica do SRA, foram descritas vias alternativas para a síntese de angiotensina II no tecido cardíaco. Um importante componente desta via é uma enzima denominada quimase, capaz de clivar a angiotensina I o que resulta na produção de angiotensina II. Esta enzima é encontrada no interstício do miocárdio e a sua localização está provavelmente relacionada à presença local de mastócitos. Apesar da quimase estar presente em maiores concentrações no coração de humanos, cachorros e hamsters, onde é

responsável por aproximadamente 90% de geração de angiotensina II cardíaca (Urata et al., 1990), há estudos que mostram a presença dessa enzima em corações de ratos (Balcells et al., 1997).

Estresse oxidativo e a hipertrofia cardíaca e a fibrose intersticial

Espécies reativas de oxigênio são produzidas principalmente pelas mitocôndrias do metabolismo celular normal durante a conversão de oxigênio em água. As principais ROS são o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^{\cdot}$). Por outro lado, as células possuem mecanismos de defesa, conhecidos como antioxidantes como por exemplo as vitaminas C e E e as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (Yu., 2004). Desse modo, o estresse oxidativo se caracteriza pelo desequilíbrio entre a produção e a remoção de espécies reativas de oxigênio. Essas espécies podem modificar ou danificar macromoléculas como o DNA, proteínas e lipídios, e por isso têm sido cada vez mais relacionadas à diversas doenças como o câncer, artrite e doenças renais e cardiovasculares como por exemplo a hipertrofia cardíaca e a fibrose intersticial. Um estudo de Siwik e colaboradores (1999) mostrou que a inibição da SOD em cardiomiócitos isolados de ratos neonatos, induziu um aumento moderado de ROS e teve como consequência apoptose e desenvolvimento de HC.

Diversos fatores podem induzir o estresse oxidativo cardíaco, como aumento na concentração de AII (Lang et al., 2000), estímulo mecânico no miocárdio (Aikawa et al., 2001) e processos inflamatórios (Yao et al., 2006).

É conhecido que a utilização de antioxidantes é capaz de inibir o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca induzida por estímulos como a

angiotensina II (Nakamura et al., 1998) e o hipertireoidismo (Araujo et al., 2007). Recentemente vários grupos de pesquisa têm focado em estudar os efeitos do tratamento com antioxidantes nas mais diversas patologias e muitos mostraram que o tratamento com antioxidantes como as vitaminas C e E e o NAC é capaz de prevenir totalmente ou parcialmente o aparecimento de diversas doenças (Shimizu et al., 2012; Araujo et al., 2007; Nakamura et al., 1998). Esses achados dão suporte à participação do estresse oxidativo nos mecanismos de hipertrofia e fibrose cardíaca.

Background

Um estudo prévio realizado em nosso laboratório (Ferreira et al., 2010) verificou que a sobrecarga de sal na dieta induz hipertrofia do cardiomiócito e fibrose intersticial independente de aumento da pressão arterial e concomitante com maior massa ventricular esquerda e direita. O tratamento com losartan preveniu a hipertrofia do cardiomiócito, mas não a fibrose intersticial do ventrículo esquerdo e direito, sugerindo que o receptor AT1 pode não ser um pré-requisito para a formação de fibrose cardíaca induzida pelo sal. Houve diminuição da atividade da renina plasmática e de aldosterona sérica em todos os grupos de animais que receberam sobrecarga de sal na dieta, sugerindo que o SRA circulante pode não estar envolvido no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, porém todos os grupos alimentados com sobrecarga de sal apresentaram maior conteúdo de All no miocárdio, apesar das expressões gênica e proteica da ECA cardíaca não ter sido diferente entre os grupos estudados.

Conforme os estudos citados acima, são vários os indícios que indicam que a sobrecarga de sal na dieta exerce efeitos tróficos sobre o miocárdio, podendo ser independente de seu efeito sobre a pressão arterial. No entanto, estudos adicionais são importantes para ampliar a compreensão do efeito da sobrecarga de sal na dieta sobre o miocárdio, incluindo a elucidação de possíveis mecanismos ainda não conhecidos.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a participação do SRA tecidual no desenvolvimento de hipertrofia cardíaca no modelo de sobrecarga de sal na dieta.

Objetivos específicos

1. Avaliar as expressões gênica e proteica dos componentes do SRA no ventrículo esquerdo e no ventrículo direito.
2. Quantificar a enzima quimase no tecido cardíaco na tentativa de entender o mecanismo responsável pelo maior conteúdo de angiotensina II no miocárdio de ratos que receberam sobrecarga de sal.
3. Verificar o envolvimento do estresse oxidativo em processos pró-hipertrófico e pró-fibrótico no tecido cardíaco.

3 MÉTODOS

Os experimentos realizados nesse estudo foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa – CAPPesq - do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP), protocolo número 1132/09.

3.1 Animais e dietas

Foram utilizados ratos Wistar machos recém-desmamados (3 semanas de idade) provenientes do Centro de Bioterismo da FM-USP.

Ao chegarem ao biotério deste laboratório os ratos passaram por um período de adaptação de três dias. Após este período os animais foram divididos em cinco grupos de acordo com a dieta (Harlan Teklad – Wisconsin, EUA) e o tratamento.

Dieta normossódica (NS): 1,27% de NaCl + 25% de proteínas

Dieta hipersódica (HS): 8% de NaCl + 25% de proteínas

Dieta hipersódica + cloridrato de hidralazina (HS+HZ)

Dieta hipersódica + losartan (HS+LOS)

Dieta hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC)

Os animais foram acondicionados em gaiolas de plástico (40x33cm) com quatro animais por gaiola mantidas em ambiente com temperatura de 25°C, com ciclos claro-escuro fixos de 12 horas.

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

3.2 Protocolo experimental

O peso corporal dos animais foi avaliado semanalmente da 3^a até a 18^a semana de vida. Na 6^a semana de idade foi realizada a primeira medida da pressão arterial caudal e a partir da 7^a semana, a pressão arterial foi medida quinzenalmente até a 18^a semana de vida. Na 18^a semana, os ratos foram transferidos para gaiola metabólica. O consumo de ração, ingestão hídrica e coleta de urina para dosagem de sódio foram realizados durante três dias. Em seguida, estes animais foram eutanasiados para coleta de sangue e tecidos. As seguintes variáveis foram medidas: massas cardíaca total, ventricular esquerda e direita (sem e com correção pelo comprimento da tíbia), diâmetro transversal do cardiomiócito nos ventrículos esquerdo e direito, porcentagem de fibrose intersticial nos ventrículos esquerdo e direito, ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) cardíaco, concentração de aldosterona sérica, conteúdo de angiotensina II em ambos os ventrículos, expressão gênica e proteica dos componentes do SRA, expressão proteica da quimase e ensaio do estado conformacional dos receptores AT1 e AT2 (Figura 4).

Figura 4. Protocolo experimental

3.3 Tratamento medicamentoso

Os ratos com sete semanas de vida, alimentados com dieta HS, foram subdivididos em grupos de acordo com o tratamento medicamentoso a partir da 7ª semana de vida.

3.3.1 Cloridrato de hidralazina

Esta droga foi utilizada no intuito de dissociar o efeito direto do sal do aumento da pressão arterial no grupo HS. O cloridrato de hidralazina produz vasodilatação periférica em razão de sua ação direta sobre as paredes dos vasos sanguíneos, reduzindo desta forma, a pressão arterial. Esta medicação

foi diluída na água de beber (15mg/kg/dia) no grupo de ratos HS+HZ a partir da 7^a semana de idade até a 18^a semana.

OBS: O estudo de Ferreira et al. (2010) seguiu as doses preconizadas na literatura para o uso da hidralazina em ratos (Grimm et al., 1998), porém foi necessário o ajuste desta dose. Inicialmente, em um grupo piloto, a hidralazina foi administrada na concentração de 20mg/kg/dia no grupo HS+HZ, o qual apresentou uma queda acentuada da pressão arterial. E logo nos primeiros dias, para continuar o tratamento, a concentração foi reduzida para 15mg/kg/dia com o objetivo de igualar a pressão do grupo HS+HZ ao grupo NS (controle). Vale lembrar que de acordo com o incremento do peso corpóreo dos animais, foi feito um ajuste na dose administrada.

3.3.2 Losartan

Para verificar se o bloqueio do receptor AT1 iria prevenir a hipertrofia do cardiomiócito e a fibrose intersticial induzida pela sobrecarga de sal foi dado losartan (20mg/kg/dia) diluído na água de beber a partir da 7^a semana de idade até 18^a semana. Esta dose foi baseada em estudos da literatura (Oliveira et al., 2009) e no estudo prévio do laboratório (Ferreira et al., 2010). Houve ajuste da dose conforme o aumento do peso corpóreo dos animais.

3.3.3 N-Acetilcisteína

Essa droga é um tiol, precursor da glutathiona e portanto, um potente agente antioxidante. O NAC foi administrado com o intuito de verificar se existe

participação de mecanismos oxidantes no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca e fibrose intersticial. A N-acetilcisteína foi diluída na água de beber (600mg/L/dia) a partir da 7ª semana de vida até a 18ª semana de idade. Essa dose foi baseada em estudos da literatura (Shimizu et al., 2012).

3.4 Evolução ponderal

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

3.5 Pressão arterial caudal

A pressão arterial foi medida pelo método oscilométrico. A pressão caudal foi medida por meio de um equipamento acoplado a um transdutor de pressão (RTBP 2000 - Kent Scientific Corporation - Connecticut, EUA), o qual fornece um sinal analógico. Este sinal analógico é digitalizado e registrado utilizando-se um sistema computadorizado de aquisição e análise dos dados utilizando o programa DASyLab 7.0 (DASyTec, National Instruments Company - New Hampshire, EUA).

Em um estudo anterior realizado pelo nosso laboratório, foi observado que os animais que receberam sobrecarga de sal na dieta, desde o desmame até 72ª semana de idade, apresentaram maior pressão arterial a partir da 7ª semana de vida (da Costa Lima et al., 1995). Com base neste

estudo, no presente trabalho a aferição da pressão arterial caudal (PAC), foi realizada na 6ª semana e após isso, quinzenalmente a partir da 7ª até a 18ª semana de idade.

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

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

Cada animal com 18 semanas de vida, previamente pesado, foi transferido da gaiola de plástico para gaiola metabólica de policarbonato (modelo 650-0100, Nalgene Brand Products - New York, EUA). Foi oferecida uma quantidade conhecida de dieta NS ou HS (50g/dia/gaiola) e água (100 ml/dia/gaiola). Durante três dias e no mesmo horário, foi pesado o que sobrou da ração fornecida, quantificada a ingestão hídrica e o volume urinário. Uma amostra de urina ficou armazenada em freezer -20°C para dosagem de sódio.

As amostras de urina foram coletas após um período de um dia de adaptação dos animais na gaiola metabólica. Foram coletadas amostras de urina de 24 horas de todos os grupos de dieta.

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

3.7 Hematócrito

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

3.8 Coleta de tecidos e medida das massas cardíaca total, ventricular esquerda e direita

Quando completaram 18 semanas de vida, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico i.p. (Cristália - São Paulo, Brasil) e o coração foi perfundido pelo ventrículo esquerdo sequencialmente pelas seguintes soluções: solução fisiológica (para retirada de células sanguíneas dos vasos do coração), cloreto de potássio 14mM (para induzir a despolarização concomitante das fibras cardíacas), solução fisiológica (para retirada do cloreto de potássio) e Dubosq-Brasil (para a fixação do tecido). Após a perfusão, o coração foi retirado e pesado. Os ventrículos foram separados e também pesados, seccionados em corte transversal, desidratados com soluções de etanol e incluídos em parafina para análise histológica.

Para a realização das técnicas de RT-PCR, Western blot e ensaio de TBARS cardíaco, foi realizada a eutanásia por guilhotina. Em seguida, o animal foi colocado sobre o gelo para a retirada do coração, o qual foi colocado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado em *freezer* -70°C.

3.9 Medida do diâmetro transverso do cardiomiócito e porcentagem de fibrose intersticial

3.9.1 Preparação do tecido cardíaco para análises histológicas

3.9.1.1 Processo de parafinização do tecido cardíaco

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

O processo de inclusão inicia pela desidratação com álcool em concentrações progressivas [álcool 50% (uma vez), álcool 70% (uma vez), álcool 96% (duas vezes), álcool absoluto (duas vezes)], seguida da diafanização [álcool absoluto + xilol e xilol (três vezes)]. Em seguida, os tecidos foram imersos em parafina fundida a 60°C. O material parafinado foi incluso em blocos e após solidificação, permaneceu em temperatura ambiente.

Antes de ser cortado, o tecido cardíaco incluso nos blocos de parafina permaneceu por trinta minutos a -20°C. Os blocos foram cortados em micrótomo (Reichert Yung Supercut 2065 Leica - Nussloch, Alemanha) com navalhas descartáveis, em cortes com espessura de 4 a 5µm e aderidos em lâminas previamente revestidas por silano 2%. As lâminas com os cortes permaneceram na estufa (Fabbe-Primar - São Paulo, Brasil) a 60°C por 2 horas e em seguida foram armazenadas em temperatura de 4°C.

3.9.1.2 Desparafinização para coloração histológica

Para a realização das colorações histológicas, as lâminas passaram por um processo de desparafinização, ou seja, permaneceram 9 minutos em xilol por três vezes. Em seguida, as lâminas foram desidratadas, por meio de banho de álcool absoluto (Merck – Darmstadt, Alemanha) por 5 minutos, duas vezes e seguida de álcool 96% por 3 minutos, duas vezes. Para finalizar este processo, as lâminas foram imersas em água destilada e processadas para as colorações histológicas ou hidratadas em solução salina fosfato-tamponada-PBS 1x, pH 7,4 para a realização de imuno-histoquímica.

3.9.1.3 Coloração com ácido Periódico de Schiff (PAS)

Após o processo de desparafinização, diafanização e hidratação, as lâminas foram lavadas em água destilada e permaneceram no ácido periódico 1% durante 10 minutos. Após isto, as lâminas foram lavadas em água destilada. As lâminas foram coradas pelo reativo de Schiff durante 45 minutos em ambiente escuro e lavadas em água corrente durante 10 a

15 minutos. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris (preparada no laboratório) por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e montadas com lamínulas com o meio permanente, Permout.

As lâminas coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) foram utilizadas para medir o diâmetro transversal dos cardiomiócitos. Após a coloração, as lâminas foram analisadas utilizando-se um microscópio acoplado a um monitor de vídeo com uma régua transparente milimetrada sobre a tela, onde um milímetro de régua equivale a 1,15 micrômetros de tecido. Foram analisadas aproximadamente 40 fibras, sempre na altura do núcleo. Esta medida foi realizada sob o aumento de 400X e em campos aleatórios.

3.9.1.4 Coloração com tricrômio de Masson

Após o processo de desparafinização, diafanização e hidratação, as lâminas foram coradas com tricrômio Masson para medir a porcentagem de fibrose no interstício cardíaco pela técnica de contagem de pontos. Esta técnica consiste em um sistema de microscópio acoplado a um monitor de vídeo cuja imagem é preenchida por 160 pontos uniformemente distribuídos. Foram contados os pontos que correspondem à área ocupada pela fibrose (coloração azul). Os ventrículos esquerdo e direito foram totalmente analisados sob um aumento de 200X. Os resultados foram apresentados em porcentagem de área ocupada pela fibrose.

3.10 Reação de imuno-histoquímica para quantificação da angiotensina II no ventrículo esquerdo e no ventrículo direito

Após desparafinização, as lâminas foram levadas à uma panela de vapor com tampão citrato por 30 minutos para exposição dos epítomos. Os tecidos foram circulados com a caneta PAP *pen* (Vector Laboratories – California, EUA), formando uma barreira à prova de água. As lâminas foram pré-incubadas com o *kit Avidin/Biotin blocking kit* (Vector Laboratories – California, EUA) e após isso, foram incubadas com anticorpo primário anti-angiotensina II (Peninsula – California, EUA) na diluição de 1:300, à 4°C, *overnight* e em câmara úmida.

Ao final deste período, as lâminas foram lavadas em PBS durante 5 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com uma solução de anticorpo secundário biotilado IgG anti-coelho (Vector Laboratories – California, EUA) por 45 minutos, seguidos de uma incubação com o *kit Vectastain ABC-AP* (Vector Laboratories – California, EUA) por 30 minutos. A revelação foi realizada com um substrato cromógeno Fast Red.

A quantificação da AII em ambos os ventrículos foi realizada em microscópio óptico com aumento de 200x, sendo a positividade contada por porcentagem de área (mesmo método utilizado na quantificação da fibrose intersticial).

3.11 Avaliação da atividade dos receptores AT1 e AT2

Após a desparafinização as lâminas foram incubadas com solução de bloqueio (BSA 1% + sacarose 5% diluído em solução tampão PBS), por 3 horas. O BSA foi utilizado para bloquear as ligações inespecíficas e a sacarose para manter a conformação do receptor. O excesso da solução bloqueio foi retirado e os cortes foram incubados com anticorpos policlonais anti-AT1 e anti-AT2 conjugados com fluoróforos DY-682 (vermelho) e DY-800 (verde), respectivamente, que reconhecem a conformação ativada destes receptores (Proteimax – São Paulo, Brasil) por uma hora, na diluição de 1:1000 em temperatura ambiente e em câmara úmida e escura. Após esse período os cortes foram lavados três vezes com solução PBS durante vinte minutos cada.

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

3.12 Determinação da concentração de aldosterona sérica

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

A aldosterona foi determinada pelo método de radioimunoensaio utilizando o *kit* comercial Coat a Count Aldosterone da marca Siemens Healthcare Diagnostics Inc. (Califórnia, EUA).

3.13 Avaliação da expressão gênica dos componentes do SRA

3.13.1 Extração de RNA total dos ventrículos esquerdo e direito

Os tecidos armazenados em *freezer* -70°C foram pesados e colocados em tubo de ensaio de plástico estéril. Foi acrescentado 1mL de Trizol para cada 100mg de tecido e homogeneizados em aparelho Ultra-Turrax (T-25, IKA Works Inc., EUA).

O homogenato foi transferido para um tubo de 2mL, livre de RNase e DNase, e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Este homogenato foi centrifugado a $12.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C . Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo *Eppendorff* onde foram adicionados 200 μL de clorofórmio para separação da amostra em fase orgânica e inorgânica. Esta solução foi agitada no vórtex e incubada à temperatura ambiente por 2 minutos e a seguir foi centrifugada por 15 minutos, a 4°C e $12.000 \times g$. A fase incolor da solução foi transferida para outro tubo ao qual foram acrescentados 500 μL de álcool isopropílico. A solução foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada por 10 minutos, a 4°C e $12.000 \times g$. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado por inversão do tubo e o *pellet* formado no fundo do tubo foi lavado com 1mL de etanol 75% gelado. Novamente o material foi centrifugado ($12.000 \times g$, 5 minutos, 4°C) e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi ressuspendido com 100 μL de água DEPC (dietilpirocarbonato) e esta solução foi incubada em banho seco a 65°C por 10 minutos. As amostras foram armazenadas em *freezer* -70°C .

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

Para o cálculo da pureza do RNA, a leitura a 260nm, que detecta RNA, foi dividida pela leitura a 280nm, que detecta proteína. Foram consideradas apenas as amostras cujo valor foi entre 1,8 e 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 (cDNA) foi feita através da reação de transcriptase reversa utilizando-se a enzima transcriptase reversa ImProm II (Promega - Brasil). O protocolo para a síntese de cDNA foi dividido em três fases; sendo a primeira a fase de desnaturação, onde 1µg de RNA total foi colocado em tubo livre de RNase e DNase e foi adicionado a este 1µL de oligo deoxirribonucleotídeo T(dT) a 150 mg/mL, após isto foi então completado o volume com 4µL de água DEPC. Os tubos foram colocados em termociclador (PTC-200, Peltier *Thermal Cycler*, MJ Research, Inc., USA) e incubados a 70°C por 5 minutos.

Para a segunda fase, chamada fase de anelamento, foi preparado um volume de uma solução (“*mix*”) em função do número de amostras. Esta

solução é constituída por 4 μ L tampão de reação 5X + 1 μ L dNTP mix (10 mM). 2,4 μ L MgCl₂ (25mM), 6,6 μ L água Milli-Q autoclavada e 1 μ L ImProm II. Para cada amostra foi adicionado 15 μ L desta solução. Após a adição da solução, as amostras foram levadas ao termociclador utilizando um programa de 25°C por 5 minutos e depois 60 minutos a 42°C. Na última fase ocorre 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 μ L de cDNA foi transferida para tubo livre de RNase e DNase onde foi feita a reação de PCR. Foi preparado uma solução de reação contendo, para cada tubo, 2,5 μ L tampão PCR 10X, 0,75 μ L MgCl₂ (50mM), 0,5 μ L dNTP (10mM), 3 μ L “primer” de amplificação I (5 μ Mol), 3 μ L “primer” de amplificação II (5 μ Mol), 0,4 μ L de Taq polimerase, 2,5 μ L DMSO e 11,35 μ L água Milli-Q. A solução foi homogeneizada em vórtex e para cada tubo contendo amostra de cDNA foi adicionado 24 μ L desta solução e levado ao termociclador.

As tabelas a seguir mostram as quantidades de cDNA, temperatura de anelamento e número de ciclos que foram usados para fazer o PCR e a sequência dos primers utilizados. É importante ressaltar que a temperatura de anelamento é dependente do gene (“primer”) usado e o número de ciclos, do tipo de tecido em que é realizado o PCR.

Tabela 1. Quantidade de cDNA, temperatura de anelamento e número de ciclos utilizados em cada gene no tecido cardíaco

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	64,3°C	40
ECA	2 µL	52,8°C	35
ECA 2	2 µL	72°C	35
AT ₁	1 µL	61,5°C	40
AT ₂	7 µL	60°C	40

Tabela 2. Sequências dos primers utilizados

Primers para <i>Rattus norvegicus</i>	
GAPDH	5' TGA TGC TGG TGC TGA GAT TGT CGT -3' 5' TTG TCA TTG AGA GCA ATG CCA GCC -3'
Angiotensinogênio	5' AGC ACG ACT TCC TGA CTT GG -3' 5' TAG ATG GCG AAC AGG AAC GG -3'
Renina	5' CAT TAC CAG GGC AAC TTT CAC -3' 5' TCA TCG TTC CTG AAG GAA TTC -3'
ECA	5' ACA GCT ATA ACT CGA GTG -3' 5' ATG TCG TAA ATG TTC TCC -3'
ECA2	5' CAA AGT TCA CTT GCT TCT TGG -3' 5' TAC TGT AAA TGG TGC TCA TGG -3'
AT ₁	5' TCG AAT TCC ACC TAT GTA AGA TCG CTT C -3' 5' TCG GAT CCG CAC AAT CGC CAT AAT TAT CC -3'
AT ₂	5' GCA TGA GTG TTG ATA GGT ACC AAT CGG -3' 5' CCC ATA GCT ATT GGT CTT CAG CAG ATG -3'

3.14 Western blot

A expressão protéica dos componentes do SRA (angiotensinogênio, renina, ECA, ECA 2, AT1 e AT2) e da enzima quimase foi quantificada pela técnica de Western blot nas amostras de ventrículo esquerdo e direito de todos os grupos estudados.

Amostras dos ventrículos esquerdo e direito foram homogeneizadas separadamente utilizando o tampão de lise RIPA (Millipore – Massachusetts, EUA). Cada amostra foi quantificada utilizando o *kit* Pierce BCA *Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific Inc. – Massachusetts, EUA).

Quantidades iguais de proteína para todas as amostras (100µg) foram misturadas a um tampão de amostra Laemmli e aplicadas nos *slots* do gel SDS – PAGE (sódio dodecilsulfato poliacrilamida) 12% e submetidas à eletroforese em cuba para mini-gel (Bio-Rad, Brasil). Após este processo, as amostras contidas no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose. Para assegurar que o processo de transferência de fato ocorreu, as membranas foram coradas com Ponceu S. No passo seguinte, as membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado a 5% diluído em TBS por 3 horas. Após este procedimento, as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários: anti-angiotensinogênio (1:500, Fitzgerald Industries International – Massachusetts, EUA), anti-renina (1:250, Fitzgerald Industries International – Massachusetts, EUA), anti- ECA (1:300, Santa Cruz Biotechnology – California, EUA), anti-ECA2 (1:250, Santa Cruz Biotechnology – California, EUA), anti-AT1 (1:200, Santa Cruz Biotechnology – California, EUA), anti-AT2 (1:200, Santa Cruz Biotechnology – California, EUA), anti-quimase (1:1500, Proteimax Biotecnologia - São Paulo, Brasil) e anti-GAPDH (1:1000, SIGMA - Missouri, EUA) *overnight*.

A seguir as membranas foram lavadas com TBST e incubadas com anticorpos secundários ligados a peroxidase (HRP) por 2 horas. O imunocomplexo antígeno-anticorpo foi visualizado com o substrato quimioluminescente ECL (Amersham Biosciences - UK). A intensidade das bandas foi visualizada através de um sistema de captura de imagem (ImageQuant 350, GE – EUA).

Os resultados foram determinados pela razão entre a intensidade da banda de interesse e a intensidade da banda do GAPDH e sua quantificação através do programa ImageQuant TL (GE – EUA).

3.15 Ensaio de TBARS no miocárdio

O tecido cardíaco foi pesado e homogeneizado imediatamente em tampão fosfato gelado, pH 7,4. Após a homogeneização, a proteína foi dosada pelo método de Bradford. A seguir foi adicionado 1mL de ácido tricloroacético (TCA) 17,5% à 1mL do homogenato que continha 1,0 a 1,8 mg de proteína. Adicionou-se 1mL de ácido tiobarbitúrico (0,6%), pH 2,0 e o homogenato foi colocado em banho de água fervendo por 15 minutos e em seguida foi colocado novamente no gelo. Foi adicionado 1mL de TCA 70% e a mistura foi incubada por 20 minutos em temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada por 15 minutos a 2000 rpm e o sobrenadante foi lido no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 534 nm.

A quantidade de TBARS, expressa em nano moles foi calculada usando coeficiente de extinção molar equivalente ao do malonaldeído (MDA).

A quantidade de TBARS cardíaco foi expressa em nmol por mg de proteína (nmol/mg).

3.16 Análise estatística

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

4 RESULTADOS

4.1 Peso corpóreo

O peso corpóreo no desmame foi semelhante entre os cinco grupos estudados (NS=69,0 $\pm$ 2,15; HS=69,3 $\pm$ 2,70; HS+HZ=66,75 $\pm$ 2,9; HS+LOS=71,5 $\pm$ 2,0; HS+NAC=75,8 $\pm$ 2,0). Porém, a partir da 8ª semana de vida, o peso corpóreo foi menor nos animais do grupo HS+HZ, que foram alimentados desde o desmame com dieta hipersódica e passaram a receber hidralazina a partir da 7ª semana de idade quando comparado com os animais dos grupos controle e HS+NAC. Na 9ª semana o peso corpóreo foi menor no grupo HS quando comparado com os grupos NS e HS+NAC e a partir da 14ª semana, o peso corpóreo do grupo HS+LOS também foi menor comparado com os grupos controle e HS+NAC. Até a 18ª semana não foi observado diferença de peso corpóreo entre os grupos HS, HS+HZ e HS+LOS, assim como entre os grupos NS e HS+NAC (Figura 5 e Tabela 4).

Figura 5. Evolução ponderal de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=12), hipersódica (HS, n=12), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=12), hipersódica + losartan (HS+LOS, n=11) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=14) desde o desmame até a 18ª semana de idade. Variável medida uma vez por semana do desmame até a 18ª semana de idade. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. *p<0,05 HS+HZ vs. NS e HS+NAC; #p<0,05 HS vs. NS e HS+NAC; °p<0,05 HS+LOS vs. NS e HS+NAC

4.2 Pressão arterial caudal

Na 6^a semana de vida, não houve diferença na PAc entre os cinco grupos experimentais. Porém, a PAc foi maior nos grupos HS e HS+NAC a partir da 7^a semana de idade quando comparado com os grupos NS, HS+HZ e HS+LOS e esse perfil foi mantido até a 18^a semana de idade. Entretanto, a PAc foi maior no grupo HS+NAC quando comparado com o grupo alimentado com a dieta hipersódica. Não houve diferença na PAc entre os grupos NS, HS+HZ e HS+LOS (Figura 6 e Tabela 3).

Figura 6. Pressão arterial caudal (mmHg) de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=14), hipersódica (HS, n=12), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=12), hipersódica + losartan (HS+LOS, n=11) ou hipersódica + acetilcisteína (HS+NAC, n=14) desde o desmame até a 18^a semana de idade. Variável medida na 6^a semana e quinzenalmente a partir da 7^a até a 18^a semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média. *p<0,05 vs. NS, HS, HS+HZ e NS+LOS; #p<0,05 vs. NS, HS+HZ e HS+LOS

4.3 Peso corpóreo, pressão arterial caudal e frequência cardíaca avaliada na 18ª semana de vida

O peso corpóreo na 18ª semana de vida foi maior nos grupos NS e HS+NAC quando comparados com os grupos HS, HS+HZ e HS+LOS. A pressão arterial caudal foi maior nos grupos HS e HS+NAC quando comparados com os grupos NS, HS+HZ e HS+LOS, comprovando o efeito anti-hipertensivo de ambos os tratamentos. A pressão arterial foi maior no grupo HS+NAC comparada com o grupo HS, indicando a ausência de um efeito anti-hipertensivo da N-acetilcisteína. A frequência cardíaca não foi diferente entre os grupos (Tabelas 3 e 4).

4.4 Consumo de ração, ingestão hídrica e volume urinário

Os resultados a seguir foram avaliados durante três dias, na 18ª semana de idade dos ratos mantidos em gaiolas metabólicas individuais.

Houve um maior consumo de ração no grupo HS+NAC quando comparado com os demais grupos estudados. A ingestão hídrica e volume urinário foram maiores nos animais dos grupos HS, HS+HZ e HS+LOS quando comparado com o grupo NS, entretanto, foram menores quando comparados com o grupo HS+NAC. Estes resultados estão representados na (Figura 7 Tabela 3).

Figura 7. A) Consumo de ração (g/24h), **B)** ingestão hídrica (mL/24h) e **C)** volume urinário (mL/24h) de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=8), hipersódica (HS, n=7), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=8), hipersódica + losartan (HS+LOS, n=7) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=8) desde o desmame até a 18^a semana de idade. Variável medida na 18^a semana de idade. Os valores obtidos estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Letras iguais indicam ausência de diferença, $p < 0.05$

4.5 Excreção de sódio urinário de 24 horas, sódio sérico e hematócrito

O sódio urinário avaliado na 18ª semana de vida foi maior nos quatro grupos que receberam dieta hipersódica quando comparados com o grupo alimentado com dieta normossódica, entretanto, foi ainda maior no grupo HS+NAC quando comparado com os demais grupos alimentados com dieta hipersódica. O sódio sérico e o hematócrito foram avaliados na 18ª semana de vida e não foram diferentes entres os cinco grupos experimentais estudados (Figura 8 e Tabela 3).

4.6 Massas cardíaca total, ventricular esquerda e ventricular direita sem correção e corrigidas pelo comprimento da tibia

As massas cardíaca total, do ventrículo esquerdo e do ventrículo direito sem correção estão representadas na figura 9 e tabela 4 e as massas cardíaca total, do ventrículo esquerdo e do ventrículo direito, corrigidas pelo comprimento da tibia, estão representadas na figura 10 e tabela 4.

Figura 8. A) Excreção urinária de sódio (mEq/24h), **B)** sódio sérico e **C)** hematócrito de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=8), hipersódica (HS, n=7-8), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=8), hipersódica + losartan (HS+LOS, n=7-8) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=8) desde o desmame até a 18^a semana de idade. Variável medida na 18^a semana de idade. Os valores obtidos estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Letras iguais indicam ausência de diferença, $p < 0.05$

Figura 9. A) Massa cardíaca total, **B)** Massa ventricular esquerda e **C)** Massa ventricular direita (g) de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=16), hipersódica (HS, n=16), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=15), hipersódica + losartan (HS+LOS, n=15) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=14) desde o desmame até a 18^a semana de idade. Variável medida na 18^a semana de idade. Os valores obtidos estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Letras iguais indicam ausência de diferença, $p < 0.05$

Figura 10. A) Massa cardíaca total, **B)** Massa ventricular esquerda e **C)** Massa ventricular direita corrigida pelo comprimento da tíbia (g/cm) de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=16), hipersódica (HS, n=16), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=15), hipersódica + losartan (HS+LOS, n=15) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=14) desde o desmame até a 18ª semana de idade. Variável medida na 18ª semana de idade. Os valores obtidos estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Letras iguais indicam ausência de diferença, $p < 0.05$

4.7 Diâmetro transverso do cardiomiócito nos ventrículos esquerdo e direito

O diâmetro transverso do cardiomiócito foi maior nos grupos HS e HS+HZ tanto no ventrículo esquerdo como no direito quando comparados com os demais grupos e o grupo HS+NAC obteve um valor intermediário entre os grupos NS e HS+LOS e os grupos HS e HS+HZ no ventrículo esquerdo (Figuras 11 e 12 e Tabela 4).

Figura 11. A) Diâmetro transverso do cardiomiócito (μm) do ventrículo esquerdo e **B)** Diâmetro transverso do cardiomiócito (μm) do ventrículo direito de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=8), hipersódica (HS, n=8), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=8) hipersódica + losartan (HS+LOS, n=7) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=6) desde o desmame até a 18^a semana de idade. Variável medida na 18^a semana de idade. Os valores obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. Letras iguais indicam ausência de diferença, p<0.05

Figura 12. Diâmetro transverso do cardiomiócito do ventrículo esquerdo e do ventrículo direito de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=8), hipersódica (HS, n=8), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=8) hipersódica + losartan (HS+LOS, n=7) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=6) desde o desmame até a 18^a semana de idade. Coloração com PAS e aumento de 400X

4.8 Área de fibrose intersticial nos ventrículos esquerdo e direito

A área de fibrose intersticial foi maior no grupo HS tanto no ventrículo esquerdo como no direito quando comparado com os demais grupos experimentais. Já o grupo HS+NAC obteve valores intermediários entre os grupos NS, HS+HZ e HS+LOS e o grupo HS. (Figuras 13 e 14 e Tabela 4).

Figura 13. A) Fibrose intersticial (%) do ventrículo esquerdo e **B)** Fibrose intersticial (%) do ventrículo direito de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=8), hipersódica (HS, n=8), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=8), hipersódica + losartan (HS+LOS, n=7) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=6-7) desde o desmame até a 18ª semana de idade. Variável medida na 18ª semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Letras iguais indicam ausência de diferença, $p < 0.05$

Figura 14. Fibrose intersticial do ventrículo esquerdo e do ventrículo direito de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=8), hipersódica (HS, n=8), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=8), hipersódica + losartan (HS+LOS, n=7) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=6-7) desde o desmame até a 18ª semana de idade. Coloração com Tricrômio de Masson e aumento de 400X

Tabela 3. Variáveis hemodinâmicas, Consumo de ração, ingestão hídrica e água, volume urinário, sódio urinário e sérico e hematócrito dos animais dos grupos NS, HS, HS+HZ, HS+LOS ou HS+NAC avaliados na 18a semana de idade

	NS	<i>n</i>	HS	<i>n</i>	HS+HZ	<i>n</i>	HS+LOS	<i>n</i>	HS+NAC	<i>n</i>
PAC, <i>mmHg</i>	110.7±1.64 ^a	14	143.1±4.09 ^b	12	116.4±1.85 ^a	12	116.5±1.64 ^a	11	166.8±1.63 ^c	14
Frequência cardíaca, <i>bpm</i>	383.8±12.08	14	368.3±9.56	12	376.7±7.07	12	388.2±10.10	11	396.3±4.16	14
Consumo de ração, <i>g/24 horas</i>	16.63±1.85 ^a	8	15.73±0.91 ^a	7	14.3±0.59 ^a	8	16.58±0.98 ^a	7	23.72±0.63 ^b	8
Ingestão hídrica, <i>mL/24 horas</i>	25.13±2.57 ^a	8	57.57±3.61 ^b	7	56.25±7.23 ^b	8	56.86±3.24 ^b	7	93.63±1.85	8
Volume urinário, <i>mL/24 horas</i>	11.38±1.52 ^a	8	48.57±2.94 ^{b,c}	7	39.5±5.12 ^b	8	44.14±2.31 ^b	7	56.13±1.0 ^c	8
Na urinário, <i>mmol/24 horas</i>	2.3±0.25 ^a	8	14.52±0.88 ^b	7	12.58±1.56 ^b	8	13.94±1.13 ^b	7	19.06±1.38 ^c	8
Na sérico, <i>mmol/L</i>	152.4±3.46	8	152.0±2.38	8	148.5±2.16	8	149.9±2.62	8	148.9±1.98	8
Hematócrito, %	49.26±0.45	8	49.5±0.53	8	48.88±0.5	8	49.25±0.45	8	49.13±0.39	8

PAC=pressão arterial caudal, Na=sódio.

Os resultados obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média. Letras iguais indicam ausência de diferença, $p < 0.05$.

Tabela 4. Peso corpóreo, massas cardíaca total, do VE e VD corrigidas pelo comprimento da tíbia e sem correção, diâmetro transverso do cardiomiócito e fibrose intersticial do VE e VD dos animais dos grupos NS, HS, HS+HZ, HS+LOS ou HS+NAC avaliados na 18^a semana de idade

	NS	<i>n</i>	HS	<i>n</i>	HS+HZ	<i>n</i>	HS+LOS	<i>n</i>	HS+NAC	<i>n</i>
Peso corpóreo, g	572±12.07 ^a	12	489±8.31 ^b	12	481±10.08 ^b	12	514±15.41 ^b	11	551±9.20 ^a	14
Massa cardíaca/CT, g/cm	0.34±0.01 ^a	16	0.51±0.02 ^b	16	0.47±0.02 ^{bc}	15	0.38±0.01 ^{ac}	15	0.43±0.008 ^c	14
Massa/CT VE, g/cm	0.25±0.007 ^a	16	0.35±0.01 ^b	16	0.31±0.01 ^c	15	0.26±0.009 ^a	15	0.29±0.003 ^{ac}	14
Massa/CT VD, g/cm	0.06±0.002 ^a	16	0.08±0.003 ^b	16	0.08±0.003 ^b	15	0.07±0.002 ^c	15	0.07±0.002 ^c	14
Massa cardíaca, g	1.59±0.11 ^a	16	2.27±0.11 ^b	16	2.11±0.12 ^{bc}	15	1.74±0.05 ^{ac}	15	1.97±0.03 ^c	14
Massa VE, g	1.18±0.02 ^a	16	1.59±0.07 ^b	16	1.43±0.06 ^{bc}	15	1.19±0.03 ^a	15	1.31±0.01 ^{ac}	14
Massa VD, g	0.29±0.008 ^a	16	0.39±0.01 ^b	16	0.39±0.01 ^b	15	0.34±0.01 ^c	15	0.35±0.0 ^{bc}	14
DTC - VE, μ m	12.58±0.47 ^a	8	19.68±0.44 ^c	8	18.93±0.76 ^c	8	13.2±0.33 ^a	7	15.91±0.75 ^b	6
DTC - VD, μ m	11.82±0.32 ^a	8	17.73±0.56 ^b	8	16.45±0.71 ^b	8	11.97±0.45 ^a	7	12.87±0.41 ^a	6
FI - VE, % área	0.21±0.02 ^a	8	0.55±0.04 ^b	8	0.15±0.03 ^a	8	0.15±0.02 ^a	7	0.32±0.04 ^c	7
FI - VD, % área	0.31±0.03 ^a	8	0.81±0.06 ^b	8	0.42±0.03 ^{ac}	8	0.40±0.05 ^{ac}	7	0.51±0.06 ^c	6

DCT=diâmetro transverso do cardiomiócito, CT=comprimento da tíbia, FI=fibrose intersticial.

Os resultados obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média. Letras iguais indicam ausência de diferença, p<0.05.

4.9 TBARS no miocárdio

A concentração de TBARS no miocárdio, medida na 18ª semana de idade, foi maior nos animais dos grupos HS, HS+HZ e HS+LOS quando comparado com os grupos NS e HS+NAC (Figura 15 e Tabela 5).

Figura 15. TBARS cardíaco (nmol/mg/mL) em ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=6), hipersódica (HS, n=6), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=6), hipersódica + losartan (HS+LOS, n=6) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=6) desde o desmame até a 18ª semana de idade. Variável medida na 18ª semana de idade. Os valores obtidos estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Letras iguais indicam ausência de diferença, $p < 0.05$

4.10 Concentração de aldosterona sérica

A concentração de aldosterona sérica foi menor nos animais que receberam a dieta HS desde o desmame e que passaram a receber hidralazina, losartan ou N-acetilcisteína a partir da 7ª semana de idade quando comparado com os animais que receberam dieta NS (Figura 16 e Tabela 5).

Figura 16. Aldosterona sérica (pg/mL) em ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=10), hipersódica (HS, n=10), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=10), hipersódica + losartan (HS+LOS, n=10) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=7) desde o desmame até a 18ª semana de idade. Variável medida na 18ª semana de idade. Os valores obtidos estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Letras iguais indicam ausência de diferença, $p < 0.05$

4.11 Conteúdo de angiotensina II nos ventrículos esquerdo e direito

O conteúdo de angiotensina II foi maior nos grupos que receberam sobrecarga de sal na dieta, independente dos tratamentos com hidralazina, losartan ou N-acetilcisteína quando comparados com o grupo controle em ambos os ventrículos (Figuras 17 e 18 e Tabela 5).

Figura 17. A) Conteúdo de angiotensina II no VE (% de área) e **B)** no VD (% de área) em ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=8), hipersódica (HS, n=8), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=8), hipersódica + losartan (HS+LOS, n=8) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=8) desde o desmame até a 18ª semana de idade. Variável medida na 18ª semana de idade. Os valores obtidos estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Letras iguais indicam ausência de diferença, $p < 0.05$

Figura 18. Conteúdo de angiotensina II no VE e no VD em ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=8), hipersódica (HS, n=8), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=8), hipersódica + losartan (HS+LOS, n=8) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=8) desde o desmame até a 18^a semana de idade. Aumento de 400X

Tabela 5. TBARS cardíaco, concentração de aldosterona sérica e conteúdo de angiotensina II nos ventrículos esquerdo e direito avaliados na 18ª semana de idade dos animais dos grupos NS, HS, HS+HZ, HS+LOS ou HS+NAC

	NS	<i>n</i>	HS	<i>n</i>	HS+HZ	<i>n</i>	HS+LOS	<i>n</i>	HS+NAC	<i>n</i>
TBARS cardíaco, <i>nmol/mg/mL</i>	0.76±0.22 ^a	6	2.57±0.38 ^b	6	2.93±0.64 ^b	6	2.87±0.26 ^b	6	0.83±0.08 ^a	6
Aldosterona sérica, <i>pg/mol</i>	64.70±15.72 ^a	10	26.74±2.64 ^b	10	34.02±3.60 ^b	10	38.92±5.61 ^b	10	29.14±2.10 ^b	7
Angiotensina II - VE, % <i>area</i>	0.03±0.01 ^a	8	0.17±0.02 ^b	8	0.16±0.02 ^b	8	0.17±0.04 ^b	8	0.17±0.02 ^b	8
Angiotensina II - VD, % <i>area</i>	0.02±0.01 ^a	8	0.15±0.02 ^b	8	0.15±0.03 ^b	8	0.15±0.02 ^b	8	0.15±0.02 ^b	8

Os resultados obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média. Letras iguais indicam ausência de diferença, $p < 0.05$.

4.12 Expressão gênica dos componentes do SRA nos ventrículos esquerdo e direito

A expressão gênica do angiotensinogênio, da renina, ECA, ECA 2, dos receptores AT₁ e AT₂ nos ventrículos esquerdo e direito foram avaliados na 18ª semana de idade dos animais dos grupos NS, HS, HS+HZ, HS+LOS e HS+NAC. GAPDH foi o gene controle e os seus resultados não variaram entre os grupos experimentais.

Não houve diferença na expressão gênica dos componentes do SRA nos ventrículos esquerdo e direito nos cinco grupos estudados, com exceção do receptor AT1 no VE, cuja expressão gênica foi maior nos grupos HS e HS+HZ quando comparado com os outros três grupos experimentais (Figuras 19, 20, 21, 22, 23 e 24 e Tabela 6).

Figura 19. A) Expressão gênica do angiotensinogênio no VE (IDV) e **B)** expressão gênica do angiotensinogênio no VD (IDV) em ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n= 5-8), hipersódica (HS, n= 6-8), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=7-8), hipersódica + losartan (HS+LOS, n= 8) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=7) desde o desmame até a 18^a semana de idade. Variável avaliada na 18^a semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média

Figura 20. A) Expressão gênica da renina no VE (IDV) e **B)** expressão gênica da renina no VD (IDV) em ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n= 5-8), hipersódica (HS, n= 6-8), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=7-8), hipersódica + losartan (HS+LOS, n= 8) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=7) desde o desmame até a 18^a semana de idade. Variável avaliada na 18^a semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média

Figura 21. A) Expressão gênica da ECA no VE (IDV) e **B)** expressão gênica da ECA no VD (IDV) em ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n= 5-8), hipersódica (HS, n= 6-8), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=7-8), hipersódica + losartan (HS+LOS, n= 8) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=7) desde o desmame até a 18^a semana de idade. Variável avaliada na 18^a semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média

Figura 22. A) Expressão gênica da ECA2 no VE (IDV) e **B)** expressão gênica da ECA2 no VD (IDV) em ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n= 5-8), hipersódica (HS, n= 6-8), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=7-8), hipersódica + losartan (HS+LOS, n= 8) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=7) desde o desmame até a 18^a semana de idade. Variável avaliada na 18^a semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média

Figura 23. A) Expressão gênica do receptor AT1 no VE (IDV) e **B)** expressão gênica do receptor AT1 no VD (IDV) em ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n= 5-8), hipersódica (HS, n= 6-8), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=7-8), hipersódica + losartan (HS+LOS, n= 8) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=7) desde o desmame até a 18^a semana de idade. Variável avaliada na 18^a semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média

Figura 24. A) Expressão gênica do receptor AT2 no VE (IDV) e **B)** expressão gênica do receptor AT2 no VD (IDV) em ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n= 5-8), hipersódica (HS, n= 6-8), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=7-8), hipersódica + losartan (HS+LOS, n= 8) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=7) desde o desmame até a 18ª semana de idade. Variável avaliada na 18ª semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média

Tabela 6. Expressão gênica do angiotensinogênio, renina, ECA, ECA2, AT1 e AT2 no VE e no VD dos animais dos grupos NS, HS, HS+HZ, HS+LOS ou HS+NAC

	NS	<i>n</i>	HS	<i>n</i>	HS+HZ	<i>n</i>	HS+LOS	<i>n</i>	HS+NAC	<i>n</i>
Angiotensinogênio - VE, (<i>IDV</i>)	0.35±2.87	8	0.37±0.01	8	0.41±0.02	7	0.35±0.01	8	0.40±0.01	7
Angiotensinogênio - VD, (<i>IDV</i>)	0.61±0.05	5	0.54±0.05	6	0.58±0.04	8	0.47±0.04	8	0.62±0.04	7
Renina - VE, (<i>IDV</i>)	0.71±0.02	8	0.68±0.02	8	0.67±0.02	7	0.67±0.02	8	0.74±0.01	7
Renina - VD, (<i>IDV</i>)	0.59±0.05	5	0.71±0.06	6	0.62±0.01	8	0.57±0.02	8	0.58±0.02	7
ECA - VE, (<i>IDV</i>)	0.87±0.03	8	0.83±0.05	8	0.97±0.06	7	0.97±0.05	8	1.05±0.16	7
ECA - VD, (<i>IDV</i>)	0.46±0.02	5	0.47±0.02	6	0.48±0.01	8	0.43±0.02	8	0.52±0.01	6
ECA2 - VE, (<i>IDV</i>)	0.41±3.29	8	0.43±3.48	8	0.37±2.61	7	0.34±2.74	8	0.35±2.49	7
ECA2 - VD, (<i>IDV</i>)	0.38±0.03	5	0.40±0.03	6	0.44±0.02	8	0.39±0.02	8	0.35±0.01	7
AT1 - VE, (<i>IDV</i>)	0.39±0.03 ^a	8	0.53±0.04 ^b	8	0.57±0.03 ^b	7	0.32±0.01 ^a	8	0.36±0.02 ^a	7
AT1 - VD, (<i>IDV</i>)	0.34±0.03	8	0.40±0.03	6	0.37±0.009	8	0.33±0.01	8	0.32±0.01	7
AT2 - VE, (<i>IDV</i>)	0.52±0.04	8	0.51±0.03	8	0.45±0.03	7	0.44±0.02	8	0.48±0.03	7
AT2 - VD, (<i>IDV</i>)	0.41±0.01	5	0.42±0.01	6	0.36±0.01	8	0.45±0.01	8	0.44±0.04	7

Os resultados obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média. Letras iguais indicam ausência de diferença, $p < 0.05$.

4.13 Expressão proteica dos componentes do SRA e da enzima quimase nos ventrículos esquerdo e direito

A expressão proteica do angiotensinogênio, da renina, ECA, ECA 2, dos receptores AT₁ e AT₂ nos ventrículos esquerdo e direito foram avaliados na 18ª semana de idade dos animais dos grupos NS, HS, HS+HZ, HS+LOS e HS+NAC. GAPDH foi o gene controle e os seus resultados não variaram entre os grupos experimentais.

Não houve diferença na expressão proteica dos componentes do SRAA nos ventrículos esquerdo e direito nos cinco grupos estudados, com exceção do receptor AT₁, cuja expressão proteica foi maior nos grupos HS e HS+HZ quando comparado com os outros três grupos experimentais (Figuras 25, 26, 27, 28, 29, 30 e 31 e Tabela 7).

Figura 25. A) Expressão proteica do angiotensinogênio no VE (unidade arbitrária – UA) e **B)** expressão proteica do angiotensinogênio no VD (unidade arbitrária – UA) em ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=8), hipersódica (HS, n=8), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=8), hipersódica + losartan (HS+LOS, n= 7-8) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=7) desde o desmame até a 18^a semana de idade. Variável avaliada na 18^a semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média

Figura 26. A) Expressão proteica da renina no VE (unidade arbitrária – UA) e **B)** expressão proteica da renina no VD (unidade arbitrária – UA) em ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=8), hipersódica (HS, n=8), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=8), hipersódica + losartan (HS+LOS, n=6-7) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=6) desde o desmame até a 18^a semana de idade. Variável avaliada na 18^a semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média

Figura 27. A) Expressão proteica da ECA no VE (unidade arbitrária – UA) e **B)** expressão proteica da ECA no VD (unidade arbitrária – UA) em ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=8), hipersódica (HS, n=8), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=6-8), hipersódica + losartan (HS+LOS, n=5-8) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=6-7) desde o desmame até a 18^a semana de idade. Variável avaliada na 18^a semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média

Figura 28. A) Expressão proteica da ECA2 no VE (unidade arbitrária – UA) e **B)** expressão proteica da ECA2 no VD (unidade arbitrária – UA) em ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=8), hipersódica (HS, n=7-8), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=8), hipersódica + losartan (HS+LOS, n=5-8) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=7) desde o desmame até a 18^a semana de idade. Variável avaliada na 18^a semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média

Figura 29. A) Expressão proteica do receptor AT1 no VE (unidade arbitrária – UA) e **B)** expressão proteica do receptor AT1 no VD (unidade arbitrária – UA) em ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=6-8), hipersódica (HS, n=6-8), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=6-8), hipersódica + losartan (HS+LOS, n=5-8) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=7) desde o desmame até a 18ª semana de idade. Variável avaliada na 18ª semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média

Figura 30. A) Expressão proteica do receptor AT2 no VE (unidade arbitrária – UA) e **B)** expressão proteica do receptor AT2 no VD (unidade arbitrária – UA) em ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=8), hipersódica (HS, n=7), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=8), hipersódica + losartan (HS+LOS, n=6-7) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=7) desde o desmame até a 18^a semana de idade. Variável avaliada na 18^a semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média

Figura 31. A) Expressão proteica da enzima quimase no VE (unidade arbitrária – UA) e **B)** expressão proteica da enzima quimase no VD (unidade arbitrária – UA) em ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=8), hipersódica (HS, n=8), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=8), hipersódica + losartan (HS+LOS, n=7) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=7) desde o desmame até a 18^a semana de idade. Variável avaliada na 18^a semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média

Tabela 7. Expressão proteica do angiotensinogênio, renina, ECA, ECA2, AT1, AT2 e quimase no VE e no VD avaliados na 18ª semana de vida dos animais dos grupos NS, HS, HS+HZ, HS+LOS ou HS+NAC

	NS	<i>n</i>	HS	<i>n</i>	HS+HZ	<i>n</i>	HS+LOS	<i>n</i>	HS+NAC	<i>n</i>
Angiotensinogênio - VE, (UA)	10.2±0.96	8	9.7±1.08	8	9.8±1.21	8	10.6±1.26	7	9.2±0.47	7
Angiotensinogênio - VD, (UA)	17.2±3.68	8	19.4±2.33	8	18.3±2.01	8	19.0±2.58	8	18.6±2.88	7
Renina - VE, (UA)	0.9±0.10	8	0.9±0.07	8	1.1±0.16	8	0.9±0.08	6	1.0±0.16	6
Renina - VD, (UA)	11.2±2.27	8	11.9±1.58	8	11.7±2.20	8	9.9±0.93	7	11.9±2.89	6
ECA - VE, (UA)	10.1±3.72	8	9.5±2.16	8	7.2±1.99	6	8.8±1.79	5	6.3±0.77	7
ECA - VD, (UA)	3.2±0.33	8	3.4±0.19	8	3.0±0.19	8	3.2±0.41	8	3.6±0.32	6
ECA2 - VE, (UA)	3.8±0.43	8	4.4±0.57	8	3.6±0.56	8	3.6±0.52	8	3.3±0.51	7
ECA2 - VD, (UA)	2.2±0.10	8	2.2±0.15	7	2.2±0.14	8	2.1±0.25	5	2.0±0.17	7
AT1 - VE, (UA)	3.4±0.28 ^a	6	5.1±0.33 ^b	6	5.3±0.51 ^b	6	2.8±0.29 ^a	5	3.3±0.38 ^a	7
AT1 - VD, (UA)	0.4±0.05 ^a	8	0.8±0.06 ^b	8	0.9±0.09 ^b	8	0.4±0.07 ^a	8	0.4±0.08 ^a	7
AT2 - VE, (UA)	0.05±0.004	8	0.06±0.007	7	0.04±0.010	8	0.04±0.005	7	0.04±0.008	7
AT2 - VD, (UA)	0.03±0.004	8	0.03±0.004	7	0.02±0.003	8	0.02±0.004	6	0.02±0.002	7
Quimase – VE, (UA)	0.6±0.02	8	0.8±0.05	8	0.9±0.07	8	0.7±0.08	7	0.8±0.05	7
Quimase – VD, (UA)	0.3±0.06	8	0.5±0.05	8	0.5±0.07	8	0.4±0.05	7	0.4±0.06	7

Os resultados obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média. Letras iguais indicam ausência de diferença, $p < 0.05$.

4.14 Avaliação da ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada dos receptores AT1 e AT2 nos ventrículos esquerdo e direito

A ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada do receptor AT1 em ambos os ventrículos foi maior nos grupos HS e HS+HZ quando comparado com os grupos NS, HS+LOS e HS+NAC. A ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada do receptor AT2 não foi diferente em ambos os ventrículos dos cinco grupos estudados (Figuras 32 e 33 e Tabela 8).

Figura 32. A) Avaliação da ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada do receptor AT1 (unidade arbitrária de fluorescência) no VE, **B)** VD, **C)** avaliação da ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada do receptor AT2 (unidade arbitrária de fluorescência) no VE e **D)** no VD de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=8), hipersódica (HS, n=8), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=8), hipersódica + losartan (HS+LOS, n=8) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=8) desde o desmame até a 18^a semana de idade. Variável avaliada na 18^a semana de idade. Os valores obtidos estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média

Figura 33. Avaliação da ligação dos anticorpos que reconhecem a conformação ativada dos receptores AT1 e AT2 no ventrículo esquerdo e no ventrículo direito de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=8), hipersódica (HS, n=8), hipersódica + hidralazina (HS+HZ, n=8), hipersódica + losartan (HS+LOS, n=8) ou hipersódica + N-acetilcisteína (HS+NAC, n=8) desde o desmame até a 18^a semana de idade

Tabela 8. Avaliação da ligação do anticorpo que reconhece a conformação ativada do receptor AT1 e AT2 (unidade arbitrária de fluorescência) nos ventrículos esquerdo e direito dos animais dos grupos NS, HS, HS+HZ, HS+LOS ou HS+NAC. Variáveis analisadas na 18^a semana de idade

	NS	<i>n</i>	HS	<i>n</i>	HS+HZ	<i>N</i>	HS+LOS	<i>n</i>	HS+NAC	<i>n</i>
AT1 - VE, <i>UAF</i>	247.2±28.54 ^a	8	426±42.29 ^b	8	412.5±46.33 ^b	8	255.4±20.74 ^a	8	255.2±44.13 ^a	8
AT1 - VD, <i>UAF</i>	68.38±5.54 ^a	8	98.52±8.63 ^b	8	94.92±5.67 ^b	8	58.92±4.79 ^a	8	61.60±4.92 ^a	8
AT2 - VE, <i>UAF</i>	77.83±5.92	8	79.34±7.11	8	78.16±7.93	8	80.04±7.44	8	74.29±4.93	8
AT2 - VD, <i>UAF</i>	36.37±3.01	8	33.26±3.61	8	33.14±4.51	8	41.65±3.47	8	35.53±4.50	8

Os resultados obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média. *UAF*=unidade arbitrária de fluorescência. Letras iguais indicam ausência de diferença, $p < 0.05$.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, a massa cardíaca corrigida pelo comprimento da tíbia foi maior nos grupos HS e HS+HZ quando comparado com os grupos NS e HS+LOS. A massa cardíaca corrigida pelo comprimento da tíbia no grupo HS+NAC foi intermediária entre os grupos. Concordando com esse resultado, a análise histológica mostrou um perfil semelhante no VE. Já no VD, o diâmetro transverso do cardiomiócito foi maior nos grupos HS e HS+HZ quando comparado com os demais. Além disso, o maior diâmetro transverso no VD induzido pela dieta hipersódica é também um indicativo que esta alteração seja independente do aumento da pressão arterial, já que o VD não é submetido à sobrecarga pressórica sistêmica. Outro achado que dá suporte a essa informação, é a prevenção total do aumento do diâmetro transverso do cardiomiócito no VD no grupo HS+NAC, diferentemente da prevenção parcial que ocorreu no VE, lembrando que esse grupo foi o que apresentou os maiores valores de pressão arterial.

O diâmetro transverso do grupo HS+LOS não foi diferente do grupo NS, sugerindo uma ativação do receptor AT1 no mecanismo de hipertrofia cardíaca induzida pelo consumo elevado de sal na dieta. Interessantemente, esse tratamento também preveniu a formação de fibrose intersticial em ambos ventrículos. Em concordância com esse resultado, um estudo realizado por Kramer et al. (2002) mostrou que o losartan possui propriedades antiinflamatórias via o seu metabólito EXP3179 e essa propriedade independe do seu efeito bloqueador do receptor AT1. Em relação ao tratamento com

hidralazina, houve uma prevenção da fibrose induzida pelo sal, mas não da hipertrofia do cardiomiócito. Uma possível explicação é que além da propriedade vasodilatadora, a hidralazina também possui algumas propriedades antiinflamatórias. Neves e colaboradores (2005) observaram que a hidralazina atenuou a deposição de colágenos do tipo I e III e a fibrose perivascular em ratos que receberam infusão de angiotensina II mais o tratamento com hidralazina. Corroborando ainda mais com esses resultados, em um trabalho realizado em nosso laboratório por Ferreira et al., foi observado que a fibrose ventricular esquerda e direita induzida pela sobrecarga de sal foi prevenida pela hidralazina em ratos Wistar submetidos ao mesmo protocolo experimental do presente estudo, sugerindo um papel inibidor de fibrose além do efeito vasodilatador desta droga.

A pressão caudal a partir da sétima semana de vida foi maior nos animais alimentados com dieta hipersódica desde o desmame. Interessantemente, a pressão caudal foi ainda mais elevada nos animais alimentados com dieta hipersódica e que receberam N-acetilcisteína a partir da 7ª semana de idade comparado aos grupos alimentados com dieta hipersódica que receberam ou não algum tipo de tratamento (hidralazina ou losartan) no mesmo período.

No presente estudo, na 18ª semana de idade, o peso corpóreo dos animais que foram alimentados com dieta hipersódica desde o desmame e que foram tratados com hidralazina ou losartan, foi menor quando comparado com o grupo NS. Porém, o peso corpóreo dos animais que receberam dieta hipersódica e tratados com N-acetilcisteína, foi semelhante ao do grupo NS. É importante ressaltar que não foi observada diferença de peso corpóreo no

desmame entre os grupos estudados (período em que os animais ainda não tinham recebido as diferentes dietas), sugerindo que os resultados de peso corpóreo na vida adulta foram influenciados pelo maior consumo de sal na dieta por um longo período. Corroborando com estes resultados, em um estudo anterior deste laboratório, Coelho et al., 2006, em modelo experimental semelhante, observaram que o peso corpóreo de animais alimentados com dieta hipersódica foi menor comparado aos animais alimentados com dieta normo e hipossódica. Interessantemente, neste estudo os autores observaram que o grupo de animais alimentados com dieta hipersódica consumiram uma quantidade maior de ração comparado aos animais dos outros três grupos. O estudo desses autores constatou uma alteração no gasto energético destes animais, já que ratos alimentados com dieta pobre em sal tiveram menor gasto energético e o inverso foi observado nos ratos alimentados com dieta rica em sal. Porém, no caso do grupo que recebeu sobrecarga de sal e N-acetilcisteína, o tratamento com tal fármaco pareceu afetar o apetite dos animais desse grupo, uma vez que seu consumo de ração foi quase duas vezes maior quando comparado com os outros grupos experimentais.

Esse maior consumo de ração e conseqüentemente de sal pode explicar a maior pressão arterial no grupo HS+NAC e o maior peso corpóreo quando comparado com os outros grupos que receberam dieta hipersódica. No entanto, ainda falta uma explicação plausível para o mecanismo responsável pelo efeito da N-acetilcisteína no apetite.

Como esperado, a ingestão hídrica e a diurese foram maiores nos animais dos grupos HS, HS+HZ e HS+LOS quando comparados com o grupo NS. Este achado confirma resultados anteriores deste laboratório (da Costa

Lima et al., 1997). Já no grupo HS+NAC a ingestão hídrica e a diurese foram maiores quando comparadas com todos os demais grupos experimentais.

A excreção de sódio urinário de 24 horas foi maior nos grupos que HS, HS+HZ e HS+LOS quando comparado com o grupo controle que recebeu dieta normossódica, entretanto, como esperado, o grupo HS+NAC apresentou uma excreção de sódio maior que todos os outros grupos experimentais, uma vez que o consumo de sal desse grupo também foi maior.

No presente trabalho, o sódio sérico e o hematócrito não foram diferentes entre os cinco grupos estudados. Apesar de ambos não serem os indicadores de volemia mais adequados, estes resultados podem dar um indício de que a hipertrofia miocárdica não é decorrente de uma expansão volêmica.

Visando avaliar a funcionalidade do tratamento com N-acetilcisteína como um antioxidante e os níveis oxidantes nos cinco grupos experimentais, foi realizado o ensaio de TBARS no miocárdio. Esse ensaio verifica a concentração principalmente de malondialdeído (MDA) que é o produto final da peroxidação lipídica e um dos indicadores de danos oxidativos às células e tecidos mais utilizado. A concentração de TBARS no miocárdio foi maior nos grupos alimentados com dieta hipersódica, indicando maior concentração de MDA. No entanto, a maior concentração de TBARS no miocárdio foi prevenida no grupo que recebeu tratamento com N-acetilcisteína, confirmando, portanto, o efeito antioxidante desse tratamento. Com o intuito de tentar elucidar os possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento de hipertrofia do cardiomiócito e fibrose intersticial miocárdica causada pelo sal, o presente estudo avaliou o efeito crônico desta dieta sobre o SRA circulante e tecidual.

Neste estudo, a sobrecarga de sal na dieta causou um aumento na concentração de All no coração dos animais dos grupos HS, HS+HZ, HS+LOS e HS+NAC e uma diminuição na concentração de aldosterona sérica nos animais desses mesmos grupos comparados com os animais do grupo NS, reforçando o achado de que existe um SRA local e que este é regulado de forma independente do SRA circulante (Baker et al., 1992; De Mello et al., 2000). Além disso, esses resultados sugerem que o SRA circulante pode não estar envolvido no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca nesse modelo experimental.

Em relação à expressão gênica dos componentes do SRA (angiotensinogênio, renina, ECA, ECA2 e receptor AT2), não houve diferença entre os cinco grupos estudados, confirmando dados anteriores do laboratório de Ferreira e colaboradores (2010) de que a ECA parece não ser a responsável pelo aumento do conteúdo de All nos grupos que receberam sobrecarga de sal. Entretanto, a expressão gênica do receptor AT1 foi maior no ventrículo esquerdo dos grupos HS e HS+HZ quando comparados com os demais grupos experimentais. De maneira interessante, os resultados da expressão proteica desses mesmos componentes, mostraram um perfil bastante semelhante ao da expressão gênica.

Para avaliar o estado funcional dos receptores AT1 e AT2, foram utilizados anticorpos conformation específica que se ligam a receptores acoplados à proteína G nas membranas das células e reconhecem a forma ativada destes receptores. No presente estudo, a ligação do anticorpo conformation específica anti-AT1 estava aumentado em ambos os ventrículos dos animais dos grupos HS e HS+HZ quando comparados com os outros

grupos experimentais. Ao se deparar com um aumento da concentração de All nos grupos que foram alimentados com sal, o aumento das expressões gênica e proteica do receptor AT1 e o aumento da ativação desse receptor em ambos os ventrículos dos animais dos grupos HS e HS+HZ, grupos com diâmetro transverso do cardiomiócito maior quando comparado aos demais, pode-se afirmar que a HC nesse modelo experimental se desenvolveu através da ligação da All com o receptor AT1. Dando suporte a esse resultado, o grupo HS+LOS, apesar da concentração de All maior no miocárdio, apresentou expressões gênica e proteica, ativação do receptor AT1 e o diâmetro transverso do cardiomiócito semelhantes ao grupo NS.

Para explicar o aumento da expressão proteica do receptor AT1, Zou e colaboradores (2004), mostraram que o estresse mecânico é capaz de induzir HC *in vivo* através da ativação desse receptor, sem o envolvimento da All, entretanto, isso não parece estar ocorrendo no modelo experimental do presente estudo, pois, além de ocorrer aumento de All nos grupos alimentados com dieta rica em sódio, o grupo HS+HZ apesar de não apresentar um aumento no estresse mecânico (pressão arterial normal), possui a expressão do AT1 aumentada e o contrário ocorre com o grupo HS+NAC, que apesar de possuir um aumento no estresse mecânico cardíaco, não apresenta aumento na expressão desse receptor.

Interessantemente, o grupo HS+NAC apresentou uma ligação do anticorpo conformação específica anti-AT1 semelhante ao grupo controle e uma possível explicação para esse achado é que alguns antioxidantes como o NAC podem ter uma ação importante como redutores de pontes dissulfeto. Esses antioxidantes possuem grupos sulfidril livres que podem interagir com as

pontes dissulfeto do receptor AT1, alterando sua estrutura terciária e tendo como consequência a inibição da interação All-receptor AT1 (Ullian et al., 2005), diminuindo a ativação desse receptor.

Já a ligação do anticorpo conformação específica anti-AT2 não foi diferente entre os grupos. Esse resultado sugere que o desenvolvimento da HC e da fibrose intersticial, parece não ter a participação desse receptor.

Apesar da expressão proteica da quimase no VE ter sido maior no grupo HS+HZ quando comparado com os demais grupos, não é possível afirmar que essa enzima seja responsável pela produção de All no coração dos animais desse protocolo experimental, pois no VD, a expressão da quimase não foi diferente entre os cinco grupos estudados. Entretanto, sabe-se que há outras vias alternativas que podem sintetizar All diretamente da angiotensina I, independente da ECA, como por exemplo, a enzima elastase-2 (Becari et al., 2011). Serão necessários estudos futuros para elucidar a origem do aumento de All no tecido cardíaco de animais nesse modelo experimental.

6 CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados deste projeto de pesquisa confirmam dados já existentes na literatura e também evidências novas referentes à HC induzida pela sobrecarga de sal crônica na dieta, demonstrando que:

1. O SRA tecidual está diretamente envolvido no desenvolvimento da HC, mais especificamente através da ligação da All ao seu receptor AT1.
2. O SRA parece não estar envolvido na formação de fibrose intersticial nesse modelo experimental, uma vez que fármacos como a hidralazina e a N-acetilcisteína foram capazes de prevenir tal processo. Apesar do losartan também prevenir a formação da fibrose cardíaca, o estudo de Krammer e colaboradores mostrou que esse efeito antifibrótico é independente da sua ação bloqueadora do receptor AT1.
3. O estresse oxidativo parece estar envolvido no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca e da fibrose intersticial no modelo de sobrecarga de sal, uma vez que o tratamento com NAC conseguiu melhorar o grau de ambas. No caso da HC, provavelmente pela sua capacidade de alterar a estrutura do receptor AT1, impedindo a ligação da All, embora não tenha conseguido diminuir os níveis pressóricos.
4. Aparentemente, no modelo de sobrecarga de sal, o aumento da concentração de All no miocárdio não se dá nem pela ECA e tampouco pela quimase.

7 ANEXOS

PRESSÃO ARTERIAL CAUDAL

Método osciloscópio

$$\begin{cases} \text{PA sistólica} \\ \text{Frequência cardíaca} \end{cases}$$

Monitor do Computador

Figura 1: Representação esquemática do aparelho utilizado para a medida de pressão arterial caudal

Legenda:

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

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

8 REFERÊNCIAS

Aplin M, Bonde MM, Hansen JL. Molecular determinants of angiotensin II type 1 receptor functional selectivity. *J Mol Cell Cardiol*, 2009; 46(1):15-24.

Araujo A, Enzweiler A, et al. Oxidative stress activates insulin-like growth factor I receptor protein expression, mediating cardiac hypertrophy induced by thyroxine. *Mol Cell Biochem*, 2007; 303:89-95.

Aikawa R, Nagai T, Tanaka M, Zou Y, et al. Reactive oxygen species in mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001; 289:901-7.

Balcells E, Meng QC, Johnson WH Jr, Oparil S, Dell'Italia LJ. Angiotensin II formation from ACE and chymase in human and animal hearts: methods and species considerations. *Am J Physiol*, 1997; 273(4):H1769-74.

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

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

Becari C, Oliveira EB, Salgado MC. Alternative pathways for angiotensin II generation in the cardiovascular system. *Braz J Med Bio Res*, 2011; 44(9):914-9.

Bell DS. Diabetic cardiomyopathy. A unique entity or a complication of coronary artery disease? *Diabetes Care*, 1995; 18(3):708-14.

Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest*, 2007; 117(3):568-575.

Brasier Ar, Jamaluddin M, Han Y, Patterson C, Runge MS. Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor. *Mol Cell Biochem*, 2000; 212:155-69.

Brilla CG, Tan LB, Pick R. Remodeling of the rat right and left ventricle in experimental hypertension. *Circ Res*, 1990; 67:1355-67.

Brilla CG, and Weber KT. Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med*, 1992; 120:893-901.

Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT. Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *J Mol Cell Cardiol*, 1993; 25:563-75.

Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT. Collagen metabolism cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol*, 1994; 26:809-20.

Clauser E, Gaillard I, Wei L, Corvol P. Regulation of angiotensinogen gene. *Am J Hypertens*, 1989; 2(5):403-10.

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

Colan SD. Mechanisms of left ventricular systolic and diastolic function in physiologic hypertrophy of athlete's heart. *Clinical Cardiology*, 1997; 15(3):355-75.

Cooper G. Basic determinants of myocardial hypertrophy: a review of molecular mechanisms. *Ann Rev Med*, 1997; 48:13-23.

Da Costa Lima NK, Lima FB, dos Santos EA, Okamoto MM, Matsushita DH, Hell NS, Heimann JC. Chronic salt overload increases blood pressure and improves glucose metabolism without changing insulin sensitivity. *Am J Hypertens*, 1997; 10:720-7.

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

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

de Simone G, Devereux RB, Roman MJ, Alderman MH, Laragh JH. Relation of obesity and gender to left ventricular hypertrophy in normotensive and hypertensive adults. *Hypertension*, 1994; 23(1):600-6.

Devereux RB, Pickering TG, Harshfield GA, Kleinert HD, Denby L, Clark L, Pregibon D, Jason M, Kleiner B, Borer JS, Laragh JH. Left ventricular hypertrophy in patients with hypertension: importance of blood pressure response to regularly recurring stress. *Circulation*, 1983; 68:470-6.

Dostal DE, Baker KM. The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circ Res*, 1999; 85:643-50.

Du Cailar G, Ribstein J, Daures JP, Mimran A. Sodium and left ventricular mass in untreated hypertensive and normotensive subjects. *Am J Physiol*, 1992; 263:H177-81.

Dzau VJ. Implications of local angiotensin production in cardiovascular physiology and pharmacology. *Am J Cardiol*, 1987; 59:59A- 65A.

Ferreira DN, Katayama IA, Oliveira IB, Rosa KT, 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.

Franco MCP, Akamine EH, Di Marco GS, Casarini DE, Fortes ZB, Tostes RCA, Carvalho MH, Nigro D. NADPH oxidase and enhanced superoxide generation in intrauterine undernourished rats: involvement of the rennin-angiotensin system. *Cardiovasc Res*, 2003; 767-775.

Fröhlich 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-R34.

Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AL. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science*, 1988; 242:583-585.

Garcia JAD, Incerpi EK. Fatores e mecanismos envolvidos na hipertrofia ventricular esquerda e o papel anti-hipertrofico do ácido nítrico. *Arq Bras Cardiol*, 2008; 90(6):443-450.

Gomez RA, Chevalier RL, Carey RM, Peach MJ. Molecular biology of the renal renin-angiotensin system. *Kidney Int*, 1990; 38(30):18-23.

Grimm D, Kromer EP, Bocker W, Bruckschlegel G, Holmer SR, Riegger GA, Schunkert H. Regulation of extracellular matrix protein in pressure-overload cardiac hypertrophy: effects of angiotensin converting enzyme inhibition. *J Hypertens*, 1998, 16:1345-55.

Gu AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Judd SE, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Mackey RH, Magid DJ, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER 3rd, Moy CS, Mussolino ME, Neumar RW, Nichol G, Pandey DK, Paynter NP, Reeves MJ, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 2014;129:e28-e292.

Gupta S, Das B, Sen S. Cardiac hypertrophy: mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 2007; 9(6):623-652.

He J, Whelton PK. Salt intake, hypertension and risk of cardiovascular disease: an important public health challenge. *Int J Epidemiol*, 2002; 31:327-31.

Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension*, 1999; 33(2):613-21.

Huang XC, Richards EM, Sumners C. Mitogen-activated protein kinases in rat brain neuronal cultures are activated by angiotensin II type 1 receptors and inhibited by angiotensin II type 2 receptors. *J Biol Chem*, 1996; 271(26):15635-41.

Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988; 85:339-43.

Jalil JE, Doering CW, Janicki JS, Pick R, Shroff SG, Weber KT. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circ Res*, 1989; 64:1041-50.

Janick JS, Brower GL, Gardner JD et al. Cardiac mast cell regulation of matrix metalloproteinase-related ventricular remodeling in chronic pressure or volume overload. *Cardiovasc Res*, 2006; 69:657-65.

Janicki JS, Matsubara BB. Myocardial collagen and left ventricular diastolic dysfunction. In: *Left ventricular diastolic dysfunction and heart failure*. 3 ed. Philadelphia, 1994.

Kannel WB, Levy D, Cupples LA. Left ventricular hypertrophy and risk of cardiac failure: insights from the Framingham Study. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1987; 10(6):135-140.

Kramer C, Sunkomat J, Witte J, Luchtefeld M, Walden M et al. Angiotensin II receptor-independent anti-inflammatory and antiaggregatory properties of losartan: role of the active metabolite EXP3179. *Circ Res*, 2002; 90:770-76.

Lang D, Mosfer SI, Shakesby A, Donaldson F, Lewis MJ. Coronary microvascular endothelial cell redox state in left ventricular hypertrophy: the role of angiotensin II. *Circ Res*, 2000; 86:463-9.

Lauer MS, Anderson KM, Kannel WB, Levy D. The impact of obesity on left ventricular mass and geometry. The Framingham Heart Study. *JAMA*, 1991; 266(5):231-6.

Levy BI. How to explain the differences between renin angiotensin system modulators. *Am J Hypertens*, 2005; 18(9):134-141.

Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*, 1990; 322:1561-6.

Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Angiotensin II-induced stimulation of collagen secretion and production in cardiac fibroblasts is mediated via angiotensin II subtype 1 receptors. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2001; 2(2):117-22.

Lindpainter K, Jin M, Niedermajer N, Wilhelm MJ, Ganten D. Cardiac angiotensinogen and its local activation in the isolated perfused beating heart. *Circ Res*, 1990; 67:564-73.

Morris BJ, Iwamoto HS, Reid IA. Localization of angiotensinogen in rat liver by immunocytochemistry. *Endocrinology*, 1979; 105(3):796-800.

Nakamura K, Fushimi K et al. Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor- α and angiotensin II. *Circulation*, 1998; 98:794-9.

Nejat M, Greif E. The aging heart. The clinical review. *Med Clin North Am*, 1976; 60(6):1059-78.

Neves MF, Amiri F, Virdis A, Diep QN, Schiffrin EL. Role of aldosterone in angiotensin II-induced cardiac and aortic inflammation, fibrosis and hypertrophy. *Can J Physiol Pharmacol*, 2005; 83(11):999-1006.

Oliveira EM, Sasaki MS, Cerêncio M, Baraúna VG, Krieger JE. Local renin-angiotensin system regulates left ventricular hypertrophy induced by swimming training independent of circulating renin: a pharmacological study. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2009; 10:15-23.

Pippal JB, Fuller PJ. Structure-function relationships in the mineralocorticoid receptor. *J Mol Endoc*, 2008; 4(1):405-413.

Raizada MK, Ferreira AJ. Ace2: a new target for cardiovascular disease therapeutics. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007; 50(2):112-9.

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

Reid IA, Morris BJ, Ganong WF. The renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol*, 1978; 40:377-410.

Robert V, Heymes C, Silvestre JS, Sabri A, Swynghedauw B, Delcayre C. Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt-induced fibrosis. *Hypertension*, 1999; 33:981-6.

Roks AJM, Buikema H, Pinto YM, van Gilst WH. The renin-angiotensin system and vascular function: the role of angiotensin II, angiotensin-converting enzyme, and alternative conversion of angiotensin I. *Heart Vessels*, 1997; 12(5):119-24.

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

Schwarz T, Schwab J, Schaefele T, Gottwik MG, Bar I, Schmieder RE. Does acute volume depletion influence the assessment of left ventricular structure, function and vascular compliance. *J Hypertens*, 2005; 23:S9.

Schluter KD, Wenzel S. Angiotensin II: A hormone involved in and contributing to pro-hypertrophic cardiac networks and target of anti-hypertrophic cross-talks. *Pharmacology & Therapeutics*, 2008; 119:311-25.

Schmieder RE, Langenfeld MRW, Friedrich A, Schobel HP, Gatzka CD, Weihprecht H. Angiotensin II related to sodium excretion modulates left ventricular structure in human essential hypertension. *Circulation*, 1996; 94(6):1304-1309.

Shehadeh A, Regan TJ. Cardiac consequences of diabetes mellitus. *Clin Cardiol*, 1995; 18(4):301-5.

Shimizu MH, Volpini RA, de Bragança AC, Campos R, Canale D, Sanches TR, Andrade L, Seguro AC. N-acetylcysteine attenuates renal alterations induced by senescence in the rat. *Exp Gerontol*, 2013; 48:298-303.

Siwik D, Tzortzis J et al. Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase induces cell growth, hypertrophic phenotype, and apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes in vivo. *Circ Res*, 1999; 85:147-53.

Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension*, 2001; 37(6):1053-9.

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

Takeda Y, Yoneda T, Demura , Miyamori I, Mabuchi H. Cardiac aldosterone production in genetically hypertensive rats. *Hypertension*, 2000; 36(4):495-500.

Takeda Y, Yoneda T, Demura M, Usukura M, Mabuchi H. Calcineurin inhibition attenuates mineralocorticoid-induced cardiac hypertrophy. *Circulation*, 2002; 105:677-9.

Tavares FM, da Silva IB, Gomes DA, Barreto-Chaves ML. Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) is associated with increased tolerance of the hyperthyroid heart to ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2013; 27(5):393-402.

Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Interaction of endothelial nitric oxide and angiotensin in the circulation. *Pharmacol Rev*, 2007; 59(1):54-87.

Touyz RM. The role of angiotensin II in regulating vascular structural and functional changes in hypertension. *Curr Hypertens Rep*, 2003; 5(2):155-64.

Ueda S, Masumori-maemoto S, Ashino K et al. Angiotensin-(1-7) attenuates vasoconstriction evoked by angiotensin II but not by noradrenaline in man. *Hypertension*, 2000; 35(4):998-1001.

Ullian ME, Gelasco AK, Fitzgibbon WR, Beck CN, Morinelli TA. Acetylcysteine decreases angiotensin II receptor binding in vascular smooth muscle cells. *J Am Soc Nephrol*, 2005; 16:2346-53.

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.

Xu J, Carretero OA, Liu YH, Shesely EG, Yang F, Kapke A, Yang XP. Role of AT2 receptors in the cardioprotective effect of AT1 antagonists in mice. *Hypertension*, 2000; 40:244-50.

Weber KT, Sun Y, Guarda E. Structural remodeling in hypertensive heart disease and the role of hormones. *Hypertension*, 1994; 23:869-77.

Weber KT, Pick R, Silver MA, Moe GW, Janicki JS, Zucker IH, Armstrong PW. Fibrillar collagen and remodeling of dilated left ventricle. *Circulation*, 1990; 82:1387-401.

Wollert KC, Drexler H. Regulation of cardiac remodeling by nitric oxide: focus on cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis. *Heart Fail Rev*, 2002; 7:317-25.

Wu Q, Kuo HC, Deng GG. Serine proteases and cardiac function. *Biochim Biophys Acta*, 2005; 1751(1):82-94.

Yamamoto K, Chappell K, Broshinan KB, Ferrario CM. In vivo metabolism of angiotensin I by neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 1992; 19(6):692-6.

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

Yao EH, Yu Y, Fukuda N. Oxidative stress on progenitor and stem cells in cardiovascular diseases. *Curr Pharm Biotechnol*, 2006; 7:101-8.

Young MJ. Mechanisms of mineralocorticoid receptor-mediated cardiac fibrosis and vascular inflammation. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2008; 17(3):174-180.

Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev*, 1994; 74:139-162.

Young M, Head G, Funder J. Determinants of cardiac fibrosis in experimental hypermineralocorticoid states. *Am J Physiol*, 1995; 269:E657-62.

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

Xu J, Carretero OA, Liu YH, Shesely EG, Yang F, Kapke A, Yang XP. Role of AT2 receptors in the cardioprotective effect of AT1 antagonists in mice. *Hypertension*, 2000; 40(3):244-50.

Zou Y, Akazawa H, Qin Y, Sano M, Takano H, Minamino T, Makita N, Iwanaga K, Zhu W, Kudoh S, Toko H, Tamura K, Kihara M, Nagai T, Fukamizu A, Umemura S, Iiri T, Fujita T, Komuro I. Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nat Cell Biol*, 2004; 6:499-506.

9 APÊNDICES

Joel C. Heimann

De: "The Journal of Nutrition Editorial Office" <jnsubmit@nutrition.org>
Data: terça-feira, 4 de fevereiro de 2014 13:49
Para: "Joel Heimann" <jheimann@usp.br>
Assunto: JN Manuscript Submission

MS ID#: NUTRITION/2014/192054

MS TITLE: High salt intake induces cardiomyocyte hypertrophy in rats in response to local angiotensin II AT1 receptor activation

Dear Joel Claudio Heimann:

This is an automatic message acknowledging your online submission to JN.

Your manuscript has been sent to the editor for preliminary review. About one-fifth of submitted manuscripts are returned to authors after a careful internal review by one or more editors, but without external review. The decision to return a manuscript without external review will be made as expeditiously as possible.

Manuscripts that pass this preliminary evaluation may be assessed a \$75 submission and handling fee, unless the corresponding author is a member of the American Society for Nutrition. The manuscript submission fee is not assessed on the following manuscript categories: Recent Advances in Nutritional Sciences (RANS), Biographical Article, History of Nutrition, Commentary and Letters to the Editor and Errata.

Please monitor your e-mail carefully for an invoice for the manuscript submission fee. Unless the manuscript is exempt from the fee or a waiver is granted, manuscripts will not be sent for external review until payment is received.

Thank you for submitting your work to The Journal of Nutrition.

Sincerely,

The Journal of Nutrition Editorial Office

04/02/2014

**MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO AO PERIÓDICO
JOURNAL OF NUTRITION**

Full title: High salt intake induces cardiomyocyte hypertrophy in rats in response to local angiotensin II AT1 receptor activation

Full author names: Isis A. Katayama¹, Rafael C. Pereira¹, Ellen P . Dopona¹, Maria H. M. Shimizu², Luzia N. S. Furukawa¹, Ivone B. Oliveira¹, Joel C. Heimann¹.

Institutions: ¹*Laboratory of Experimental Hypertension of the Department of Internal Medicine of the University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil*

²*Laboratory of Basic Research in Kidney Diseases of the Department of Internal Medicine of the University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil*

Correspondence to: Joel C. Heimann, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - Departamento de Clínica Médica - Laboratório de Hipertensão Experimental - Av. Dr. Arnaldo, 455 - sala 3342 - 01246-903 São Paulo, SP - Brasil

Phone: 55-11-30618354, 55-15-997095520, FAX: 55-11-30617261

E-mail: jheimann@usp.br

Authors' names for PubMed indexing: Katayama IA, Pereira RC, Dopona EPB, Shimizu MH, Furukawa LN, Oliveira IB, Heimann JC.

Word count for the entire manuscript: 6.342

Number of figures: 4

Number of tables: 6

Supplemental material: none

Short title: High salt diet induces cardiomyocyte hypertrophy

Sources of financial support: *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (São Paulo State Research Foundation) supported this work - Grant number 2009/14476-1.

No conflicts of interest

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the leading cause of death. Among these diseases, cardiac hypertrophy (CH) is an important risk factor for developing heart failure. CH accompanies increased structural and contractile proteins in cardiomyocytes with an often concomitant increase of interstitial fibrosis (IF). Risk factors that are independent of blood pressure (BP) can contribute to the development of CH. Among these factors, high salt intake (HS) has been prominent. In animals subjected HS, no increase in plasma renin activity was observed, suggesting that the circulating renin-angiotensin system (RAS) may not be involved in the development of CH. Although some studies have attempted to elucidate the role of salt in the development of this disease, the mechanisms by which salt acts are not yet fully understood. In this context, the objective of this study was to observe the phenomena occurring in the heart in response to HS in an attempt to elucidate its pathophysiology and thereby contribute to the prevention and treatment of this disease. Male Wistar rats were divided into 5 groups according to diet (1.27% or 8% NaCl) and treatment (losartan, hydralazine or N-acetylcysteine). The tail-cuff BP, transverse diameter of the cardiomyocyte, IF, AT1 gene and protein expression, serum aldosterone, cardiac angiotensin II, cardiac TBARS and binding of conformation-specific anti-AT1 and anti-AT2 antibodies in both ventricles were measured. The primary finding was the occurrence of BP-independent CH in the HS+HZ group and a partial or total prevention of such hypertrophy via treatment with N-acetylcysteine or losartan. The prevention of CH using N-acetylcysteine indicates that oxidative stress is linked with HS-induced CH. The prevention of IF using all 3 treatments and an increase in the AT1 gene and protein expression and activity in groups that developed CH (HS and HS+HZ) confirmed that CH occurred via the AT1 receptor in this experimental model.

28 INTRODUCTION

29 Cardiovascular diseases make up the leading cause of death worldwide.
30 Among these diseases, cardiac hypertrophy (CH)¹ has been highlighted,
31 especially as an important risk factor for heart failure. The Framingham Heart
32 Study showed that individuals who had CH and who were diagnosed via ECG
33 changes presented a sixfold increase in their risk of death than the general
34 population. Thus, many studies have addressed this pathology with goals of
35 prevention and treatment, thereby reducing the risk of death (1-3). Generally,
36 CH is the term used to define a set of molecular, cellular and interstitial changes
37 that are manifested clinically as changes in the size, mass, geometry and
38 function of the heart. These alterations are accompanied by increased protein
39 synthesis, changes in the organization of the structure of the sarcomeres and
40 the activation of the early genes (*c-jun*, *c-fos* and *c-myc*) and fetal genes (e.g.,
41 atrial natriuretic factor [ANF], beta-myosin heavy chain [β -MHC] and skeletal
42 alpha actin [SKA]), which in turn are used as hypertrophy markers (4,5).
43 Cardiac hypertrophy can be caused by such factors as hemodynamic
44 (hypertension), environmental (diet) and humoral (RAS) or genetic factors
45 (idiopathic hypertrophy). The ingestion of large amounts of sodium chloride
46 (NaCl, salt) has been identified as an important contributor to CH (6). Although
47 numerous clinical and experimental studies have detected its hypertensive
48 effect (7,8), salt can also induce CH independent of its hemodynamic effects

¹ **Abbreviations used:** AI, angiotensin I; AII, angiotensin II; ACE, angiotensin-converting enzyme; ANF, atrial natriuretic factor; AT1, angiotensin II type 1 receptor; AT2, angiotensin II type 2 receptor; β -MHC, beta-myosin heavy chain; BP, blood pressure; CH, cardiac hypertrophy; HS, high-salt diet, 8% NaCl; HS+HZ, HS+hydralazine (15 mg·kg⁻¹·d⁻¹); HS+LOS, HS+losartan (20 mg·kg⁻¹·d⁻¹); LV, left ventricle; MDA, malondialdehyde; NAC, N-acetylcysteine; NS, normal-salt diet, 1.27% NaCl; RAS, renin-angiotensin system; ROS, reactive oxygen species; RV, right ventricle; SKA, skeletal alpha actin; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; TcBP, tail-cuff blood pressure

(7,9). Therefore, many studies have attempted to elucidate the mechanisms by which salt induces CH. One of the pathways more closely related to CH is the renin-angiotensin system (RAS), and it is well-established that all RAS components are locally synthesized in the cardiac tissue (10-13). These components are distributed in cardiomyocytes, fibroblasts and endothelial and vascular smooth muscle cells and, interestingly, are regulated independently of circulating RAS (9,14).

Angiotensin II (All) acts on cardiac tissue in a similar way to a proinflammatory cytokine, stimulating the release of other cytokines, inducing apoptosis, increasing the generation of reactive oxygen species (ROS) and stimulating cell growth and proliferation. The majority of the effects of All on cardiomyocytes are mediated by AT1 receptors. When coupled, this ligand-receptor connection may be a potent stimulator of myocardial hypertrophy (15), increasing the production of a variety of proteins that are related to CH and inducing extracellular matrix accumulation and fibrosis formation. The increase of fibrous tissue increases myocardial stiffness and impairs diastolic filling, predisposing the patient to diastolic failure (16).

In addition to the AT1receptor, All can also stimulate another receptor, AT2. The effects that this receptor has on cardiac tissue remain a matter of controversy. Some studies suggest that this receptor possesses anti-proliferative effects and thus the opposite of the effect observed due to the binding of All to the AT1 receptor (17). However, there is evidence in the literature suggesting that the *in vitro* stimulation of the AT2 receptor causes

constitutive cardiomyocyte hypertrophy via an ERK1/2 MAPK-independent pathway (18).

In addition to the classical RAS pathway, alternative routes have been described for the synthesis of All in cardiac tissue. An important component of this pathway is an enzyme called chymase, which is capable of cleaving angiotensin I (AI), resulting in All production (19). Chymase is present in higher concentrations in the human heart and is accountable for up to 90% of the generation of All; there are studies that also demonstrate the presence of chymase in the hearts of rats (20).

Oxidative stress is related to CH and is characterized by an imbalance between the production and removal of ROS. Several factors can induce cardiac oxidative stress such as increased All concentrations (21), mechanical stress (22) and inflammatory processes (23). In isolated cardiomyocytes, a moderate increase of ROS was observed to induce hypertrophy and apoptosis (24). It is known that the use of antioxidants such as vitamin E can inhibit the hypertrophy induced by All in neonatal rat cardiomyocytes (25), and N-acetylcysteine can also attenuate cardiac hypertrophy in Wistar rats subjected to 5/6 nephrectomy (26).

A previous study from our laboratory (9) found that dietary salt overload induced blood pressure-independent CH and increased left ventricular mass and interstitial fibrosis. There was a decrease in plasma renin activity and serum aldosterone in all animals that received dietary salt overload, suggesting that the circulating RAS may not be involved in the development of CH. However, all groups fed a high-salt diet had higher cardiac All contents.

Understanding how high salt intake induces CH can aid in lowering CH prevalence and reducing the morbidity and mortality rates associated with this disease. Therefore, to better understand the effects of high dietary salt intake on the structural and functional changes of the myocardium and the mechanisms involved in this process, this study aimed to verify the involvement of cardiac RAS and oxidative stress in an experimental model.

MATERIALS AND METHODS

The experiments were previously approved by the Committee of Research Projects Evaluation of the University of São Paulo School of Medicine, Brazil (certificate no. 1132/09).

Animals

Male Wistar rats obtained from the Institutional Animal Facility of the University of São Paulo School of Medicine were housed in a temperature-controlled environment at 25°C on a 12-hour (hr) light/dark cycle and with free access to food and water.

The rats were fed a normal- (NS: 1.3%) or high- (HS: 8%) salt diet (Harlan Teklad) from weaning (3 weeks of age) to adulthood (18 weeks of age). All diets were pelleted. The only difference between the diets was their sodium chloride content (9).

At 7 weeks of age, 3 HS subgroups received hydralazine (HS+HZ: 15 mg/kg/day), losartan (HS+LOS: 20 mg/kg/day) or N-acetylcysteine (HS+NAC: 600 mg/L/day) in their drinking water. All dosages were based on previous studies (9,27).

Experimental protocol

The body weight was measured weekly from 3 until 18 weeks of age. The blood pressure (BP) was measured at 6 weeks of age and every 2 weeks from 7 to 18 weeks of age. At 18 weeks of age, the rats were individually housed in metabolic cages (model 650-0100, Nalgene Brand Products) for 24-hr urine collection for volume and sodium determination. Blood was collected from the tail vein for measuring the serum aldosterone and sodium concentrations, as well as hematocrit. At 18 weeks of age, the rats were decapitated for organ collection or perfused for histological analysis.

Blood pressure measurement

Tail-cuff blood pressure (TcBP) was measured via an oscillometric method (Kent Scientific, model RTBP 2045 with the RTBP 001 acquisition system) in conscious animals. The TcBP was recorded every 2 weeks from 6 to 18 weeks of age, and the means of all values were used in the calculations.

Serum sodium, potassium and aldosterone, and urine sodium and potassium concentrations

The serum and urinary sodium and potassium were evaluated using a flame spectrophotometer (model FC 280, CELM).

The serum aldosterone was assayed using a commercial RIA kit (Coat-a-Count - Siemens).

Histological analysis

At 18 weeks of age, the rats were anesthetized with sodium pentobarbital (40 mg.kg⁻¹ body weight⁻¹ intraperitoneally). Cardiac arrest was induced at

diastole with 14 mM intra-cardiac KCl followed by perfusion fixation with Dubosque-Brasil. The heart was quickly removed and weighed. Both ventricles were dissected and weighed separately and transversely sectioned at the midpoint between the apex and the base and fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin blocks.

Five- μ m-thick sections were cut from the blocked tissue and stained with periodic acid-Schiff for cardiomyocyte transverse diameter determination. The cardiomyocyte transverse diameter was measured using a microscope connected to a video monitor with an adapted millimeter ruler. The measurements were taken along the short axis of the cardiomyocytes at the level of the nucleus.

At least 50 left ventricle (LV) and 30 right ventricle (RV) cardiomyocytes were analyzed in each section with a magnification of 400X (Nikon).

For the quantification of interstitial fibrosis areas using a point counting method, the sections were stained with Masson's Trichrome. The tissue slices were examined under a magnification of 400X (Nikon). The amount of fibrosis was expressed as the percentage of the total area of the specified section of the heart.

Angiotensin II determination in both ventricles

Immunohistochemistry was performed on 5- μ m-thick sections that were mounted on glass slices precoated with 2% silane for All content in both ventricles. The sections were deparaffinized and rehydrated using conventional techniques. Thereafter, the sections were circled immediately with a PAP pen (Vector Laboratories) to form a waterproof barrier and were preincubated with

an Avidin/Biotin blocking kit (Vector Laboratories). The sections were then washed and incubated with a protein block serum-free (DAKO) for 30 minutes. Afterward, they were incubated overnight with the primary antibody anti-angiotensin II (Peninsula) at 4°C. The sections were washed and incubated with a biotinylated anti-rabbit IgG (Vector Laboratories) for 45 minutes, followed by incubation with a Vectastain ABC-AP kit (Vector Laboratories) for 30 minutes.

The quantification of the angiotensin II-positive areas was performed using a point counting method. The total area of the 2 slices per animal (both ventricles) was examined under a magnification of 200 X (Nikon).

Cardiac TBARS

The cardiac levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), which are markers of lipid peroxidation, were determined using the thiobarbituric acid assay as previously described (27). The results were corrected via tissue protein content, which was measured using a commercially available kit (Pierce BCA Protein Assay kit - Thermo Scientific Inc.).

RNA isolation and gene expression of RAS components in both ventricles

The gene expression was assessed via RT-PCR as previously described (28). The primers used for RT-PCR are included in **Table 1**.

Protein expression of RAS components and chymase on both ventricles

The protein expression was measured via Western Blot according to the following protocol.

Samples of the LV and RV were homogenized separately using a RIPA Lysis Buffer (Millipore). The total protein concentration was quantified in each sample using a BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific Inc.).

Aliquots of 100 µg of the total protein from the homogenized tissue were electrophoretically separated via 12% SDS-PAGE and were transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories Inc.) for 1.5 hr at 20 V using a semidry transfer cell (Bio-Rad Laboratories Inc.). To ensure an adequate protein transfer, the membranes were stained with Ponceau S. The membranes were blocked for 2 hrs with 5% nonfat dry milk to prevent nonspecific antibody binding and incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: anti-angiotensinogen (1:500, Fitzgerald Industries International), anti-renin (1:250, Fitzgerald Industries International), anti-ACE (1:300, Santa Cruz Biotechnology), anti-ACE2 (1:250, Santa Cruz Biotechnology), anti-AT1 (1:200, Santa Cruz Biotechnology), anti-AT2 (1:200, Santa Cruz Biotechnology), anti-chymase (1:1500, Proteimax Biotechnologia) and anti-GAPDH (1:1,000, SIGMA).

The membranes were washed with Tris-buffered saline plus Tween (TBST) and were incubated with a secondary anti-goat IgG-peroxidase conjugate antibody produced in rabbit at 1:10,000 (Santa Cruz Biotechnology) for 2 hrs, anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase conjugate antibody at 1:5,000 (DAKO) for 2 hrs, or anti-mouse IgG-horseradish peroxidase conjugate antibody at 1:3,000 (DAKO) for 2 hrs. The membranes were then thoroughly washed, and the immunocomplexes were detected using a peroxidase-luminol chemiluminescence system (ECL). The intensity of the individual bands was quantified via optical densitometry using ImageQuant TL (GE) divided by the

GAPDH density and expressed as arbitrary units (AU/GAPDH). A prestained protein marker (Bio-Rad, precision plus protein standards) was used as a molecular weight standard.

Binding of conformation-specific anti-AT1 and anti-AT2 antibodies in both ventricles

The sections were deparaffinized and rehydrated using conventional techniques. Thereafter, the sections were circled with a PAP pen (Vector Laboratories) to form a waterproof barrier. The sections were incubated with a blocking solution (1% bovine serum albumin + 5% sucrose in PBS) to prevent nonspecific antibody binding for 3 hrs. The sections were then incubated with the anti-AT1 and anti-AT2 conformation-specific polyclonal antibodies conjugates with DY-682 (red) and DY-800 (green) fluorophores, respectively (Proteimax Biotecnologia).

The slices were washed with PBS, and the fluorescence intensity was measured using Odyssey equipment (LI-COR Biosciences).

Statistical analysis

Differences between the 5 groups were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) with a post hoc test. The changes in TcBP over time were analyzed via a two-way analysis of variance with Bonferroni's post hoc test. The results are presented as the means $\pm$ SEM. The calculations were performed using Prism® 4.0 (GraphPad® Software). $P<0.05$ was considered significant.

RESULTS

Tail-cuff blood pressure and heart rate

In the sixth week of life, there was no difference in TcBP between the 5 experimental groups. However, the TcBP was higher in the HS and HS+NAC groups from the 7th week of age when compared with the NS, HS+HZ and HS+LOS groups, and this profile was maintained until the 18th week of age. Additionally, the TcBP was higher in the HS+NAC group compared with the group fed a high-salt diet, indicating the absence of an antihypertensive effect of N-acetylcysteine. TcBP did not differ between those with NS, HS+HZ or HS+LOS (**Table 2**). The heart rate did not differ between any experimental groups (Table 2).

Food and water intake, 24-hour-urinary volume, 24-hour-urinary sodium, serum sodium and hematocrit

The food intake was higher in the NS+NAC group than all other groups. The water intake and urine volume were higher in the HS, HS+HZ and HS+LOS groups compared with the NS group; however, these items were lower when compared with the HS+NAC group (Table 2).

At 18 weeks of age, the urinary sodium was higher in the 4 groups that received a high-salt diet compared with the control group; however, this increase was higher in the HS+NAC group than in the other groups that were fed a high-salt diet. The serum sodium and hematocrit at 18 weeks of age did not differ between the 5 experimental groups (Table 2).

Body weight and cardiac index

The body weight between 3 and 8 weeks of age was similar among the 5 groups. At 8 weeks of age, the body weight was lower in the HS+HZ group

compared with the control and HS+NAC groups. At the 9th week of age, the body weight was lower in the HS group than the NS and HS+NAC groups. At the 14th week of age, the body weight in the HS+LOS group was also lower than the NS and HS+NAC groups. At 18 weeks of age, no differences were observed in body weight between the HS, HS+HZ or HS+LOS groups or between the NS and HS+NAC groups (**Table 3**).

The ratios between the cardiac mass (cardiac index), LV mass (LV index), RV mass (RV index) and tibia length measured in the 18-week-old Wistar rats were greater in the HS and HS+HZ groups than in the NS and HS+LOS groups. The HS+NAC group showed intermediate values between the HS, HS+HZ and NS, HS+LOS groups (Table 3). The cardiac mass not corrected for tibial length was also analyzed. The cardiac, LV and RV masses were similar to the cardiac, LV and RV indices (Table 3).

Cardiomyocyte transverse diameter and interstitial fibrosis in both ventricles

The cardiomyocyte transverse diameter was larger in the HS and HS+HZ groups in both ventricles compared with the other groups. However, the HS+NAC group presented an intermediate value in the LV; in the RV group, this value was equal to that of the NS group, showing partial prevention in the LV and full prevention in the RV (**Figure 1**).

Myocardium Masson's trichrome stain revealed that the interstitial fibrosis was higher in in both ventricles of the HS group than the other experimental groups. The HS+NAC group had more interstitial fibrosis than the NS, HS+HZ or HS+LOS groups in RV; however, in the LV, this value in the

HS+NAC group was only higher than the NS group. These results suggest that interstitial fibrosis was completely prevented via the hydralazine and losartan treatments and partially prevented via the N-acetylcysteine treatment (Figure 1).

Serum aldosterone and LV and RV angiotensin II content

The serum aldosterone concentration was lower in the HS, HS+HZ, HS+LOS and HS+NAC groups than the NS group. The angiotensin II content in the LV and RV in all HS-fed groups was greater than those in the NS group (Table 4).

Gene and protein expression of cardiac RAS components

There were no differences in the gene or protein expression of the RAS components in both ventricles in the 5 groups, with the exception of the AT1 receptor. The gene and protein expression of the AT1 receptor were lower in the NS, HS+LOS and HS+NAC groups compared with the HS and HS+HZ groups (Tables 5 and 6).

The protein expression of chymase was higher in the HS+HZ group compared with the other experimental groups for the LV and did not differ between the 5 groups for the RV (Table 6).

The AT1 gene expression in the LV was higher in the HS and HS+HZ groups compared with the other groups; there were no differences for the RV.

The AT1 protein expression was higher in the HS and HS+HZ groups compared with the other groups for both the LV and RV (Figure 2).

Cardiac TBARS

The TBARS in the myocardium was lower in the NS and HS+NAC groups than the HS, HS+HZ and HS+LOS groups (**Figure 3**).

Binding of conformation-specific anti-AT1 and anti-AT2 antibodies in the LV and RV

The binding of the antibody that recognizes the activated conformation of the AT1 receptor in the left ventricle was higher in the HS and HS+HZ groups than the other groups. There were no significant differences between the groups for the RV.

There was no difference between the ventricles in the affinity of the conformation-specific anti-AT2 receptor antibody (**Figure 4**).

DISCUSSION

In this study, the animals fed a high-salt diet from weaning showed higher TcBP from the seventh week of life. However, the animals that were fed a high-salt diet and that received N-acetylcysteine from the 7th week of age showed even higher levels of TcBP, and the groups that were fed a high-salt diet and that received treatment with hydralazine or losartan in the same period showed normal levels of blood pressure (with no differences compared with the NS group). At 18 weeks of age, the body weight of the animals fed with salt overload and treated with hydralazine or losartan was lower compared with the NS group. Interestingly, N-acetylcysteine impeded the lower body weight result of a high salt intake. It should be noted that there were no differences in body weight between the groups at weaning (a period in which the animals had not yet received different diets), suggesting that the body weight of the adult was influenced by an increase in dietary salt intake over a long period. Corroborating

these findings in a previous study from this laboratory (using the same experimental model), Coelho et al. (29) observed that, despite consuming a greater amount of food, the animals fed a high-salt diet had lower body weight compared with the animals fed a low- or normal-sodium diet. These authors observed a change in the energy expenditure of these animals, as the rats fed a low-salt diet had lower energy expenditure, and the opposite was observed in rats fed a high-salt diet. However, in the group that received salt overload and N-acetylcysteine, treatment with this drug appeared to affect the appetite of the animals; their food intake was higher compared with the other groups. This increased food intake in rats treated with N-acetylcysteine may explain the higher blood pressure and higher body weight compared with the other groups that received a high-salt diet. However, a plausible explanation remains to be found for the effect of N-acetylcysteine on appetite, and more studies are required to elucidate this finding.

As expected, the water intake and diuresis were higher in the animals of the HS, HS+HZ and HS+LOS groups compared with those of the NS group. In the HS+NAC group, the water intake and diuresis were higher than all other groups, possibly due to the increased salt intake.

The 24-hour urinary sodium excretion was higher in the HS, HS+HZ and HS+LOS groups compared with the control group, which received a normal salt diet. As expected, the HS+NAC group had increased sodium excretion compared with the other experimental groups because the salt intake in this group was also higher.

351 Because the serum sodium and hematocrit were not different between
352 the 5 groups, it may be conjectured that myocardial hypertrophy is not due to a
353 volume expansion.

354 The higher cardiac index in the HS and HS+HZ groups compared with
355 the NS and HS+LOS groups is indicative of a possible blood pressure-
356 independent hypertrophic effect of salt intake, which confirms the results
357 observed in a previous study by our group (9). The partial prevention of an
358 increase in the cardiac index in response to N-acetylcysteine is potentially due
359 to the restricted response of myocardial fibrosis in both ventricles and the
360 restricted response of the cardiomyocyte diameter in the LV but not the RV. In
361 agreement with this result, the histological analysis showed a similar profile of
362 the transverse diameter of the cardiomyocytes. In the RV, the transverse
363 diameter was higher in the HS and HS+HZ groups than the other groups.
364 Moreover, the largest transverse diameter of the cardiomyocytes in the RV-
365 induced salt diet also indicates that this finding is independent of increased
366 blood pressure because the RV is not subjected to systemic blood pressure.
367 Another finding that supports this information was that, in the RV, the HS+NAC
368 group showed a complete prevention of the increase in the transverse diameter
369 of the cardiomyocytes, which was dissimilar to the partial prevention that
370 occurred in the LV (likely due to the very high blood pressure levels in this
371 group). The transverse diameter of the HS+LOS group was not different from
372 the NS group, suggesting that the salt-induced cardiac hypertrophy was due to
373 the AT1 receptor activation. Interestingly, the treatment with losartan prevented
374 the formation of interstitial fibrosis in both ventricles. In agreement with this
375 result, a study by Kramer et al. (30) showed that losartan possesses anti-

inflammatory properties via its metabolite EXP3179 and that this property is independent of the effect of the AT1 receptor blocker. In a previous study from our laboratory using the same experimental protocol, losartan treatment did not prevent fibrosis. Further studies are needed to explain this discrepancy. One possible explanation for the observed prevention of interstitial fibrosis but not of cardiomyocyte hypertrophy via hydralazine is that, in addition to its vasodilation properties, hydralazine also has some anti-inflammatory properties. Neves et al. (31) observed that hydralazine attenuated the deposition of type I and III collagen and perivascular fibrosis in rats receiving angiotensin II infusions. Corroborating these results, a study conducted in our laboratory by Ferreira et al. (9) observed that left and right ventricular fibrosis induced via salt overload was prevented via hydralazine in rats subjected to the same experimental protocol, suggesting an anti-inflammatory effect beyond the vasodilator effect of this drug.

To evaluate the antioxidant effect of treatment with N-acetylcysteine, a TBARS assay was performed in the myocardium. This test verifies the concentration of malondialdehyde (MDA), which is an end product of lipid peroxidation and an indicator of oxidative damage to cells and tissues. An increased TBARS concentration in the myocardium in the groups fed a high-salt diet was prevented in the group that received N-acetylcysteine, thus confirming its antioxidant effect.

With the intent to elucidate the possible mechanisms involved in the development of cardiomyocyte hypertrophy and the interstitial fibrosis induced by salt, the present study attempted to evaluate the chronic effect of this diet on

the circulating and tissue RAS. In this study, the salt overload caused an increase in All content in the cardiac tissue of the HS, HS+HZ, HS+LOS and HS+NAC groups and a decrease in the serum aldosterone concentration in the animals from the same groups compared with the NS group, reinforcing the finding that there is a local myocardial RAS and that this is regulated independently of the circulating RAS (10,13). Furthermore, these results suggest that the circulating RAS may not be involved in the development of cardiac hypertrophy in this experimental model.

In an attempt to understand the effect of the increased myocardial AT1 gene and protein expression in both ventricles of the HS and HS+HZ groups, a functional study was performed using anti-AT1 and anti-AT2 conformation-specific antibodies that preferentially recognize the activated form of the receptor. The binding of the conformation-specific antibody anti-AT1 was increased in the left ventricle of the animals in the HS and HS+HZ groups compared with the other experimental groups. When considering these findings together with the increased All content in the groups that were fed a high-salt diet, it can be stated that the CH in this experimental model was at least partially due to the AT1 receptor activation by All. The complete prevention of myocardial hypertrophy and fibrosis by losartan treatment is likely not due to the stimulation of the local AT1 receptor because the gene and protein expression as well as the activation of the AT1 receptor were similar to those of the NS group. The increase in the AT1 receptor gene and protein expressions can be explained through several studies of Zou et al. (32) that showed that mechanical stress can induce CH *in vivo* by the activation and increased expression of the AT1 receptor without the involvement of All; however, this did

not appear to occur in the experimental model of this study. This is because, in addition to the All increase in the groups fed a high-salt diet, the HS+HZ group did now demonstrate an increased mechanical stress (normal blood pressure); instead, the HS+HZ group had an increased AT1 expression. The opposite occurred with the HS+NAC group: despite showing an increase in cardiac mechanical stress, the animals of this group showed no increase in the expression of this receptor.

Interestingly, the HS+NAC group presented a conformation-specific antibody (anti-AT1) similar to that of the control group; a possible explanation for this finding is that some antioxidants such as NAC may have an important action as reducers of disulfide bonds. These antioxidants have free sulfhydryl groups that may interact with the disulfide bonds of the AT1 receptor, altering its tertiary structure and resulting in the inhibition of the interaction between All and its AT1 receptor (33).

This finding suggests that the AT2 receptor is not linked to salt-induced CH because the gene and protein expression as well as the binding of the conformation-specific anti-AT2 did not differ between groups.

We have no explanation for the higher myocardial chymase protein expression in the LV but not in the RV in the HS+HZ group. Further studies are required to understand this phenomenon.

The results of this study suggest a cardiotropic effect of sodium overload that is independent of blood pressure increases. Furthermore, it can be stated that the CH in this experimental model developed via the AT1 receptor because the transverse diameter of the cardiomyocytes, the gene and

protein expression and the activation of the AT1 receptor in both ventricles were not higher in the HS+LOS group compared with the NS group, indicating that the blockading of this receptor can prevent the development of CH.

Another important observation was the involvement of oxidative stress in the development of cardiac hypertrophy in this experimental model; the treatment with NAC could improve the degree of hypertrophy (likely due to its ability to alter the structure of the AT1 receptor (33)) to prevent the binding of Angiotensin II without reducing blood pressure levels.

Limitations of the study

In addition to evaluating the cardiomyocyte transverse diameter, it would have been informative to measure myocardial hypertrophy markers, such as protein turnover, ANF, β -MHC and SKA. The determination of the cardiomyocyte volume is potentially a better indicator of hypertrophy than the transverse diameter. Therefore, hypertrophy could be measured via stereology.

An additional experimental group fed HS and treated with NAC and paired with the other groups would provide more precise information on the effect of this drug.

References

1. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Casteli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*. 1990;322:1561-6.
2. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Judd SE, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Mackey RH, Magid DJ, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER 3rd, Moy CS, Mussolino ME, Neumar RW, Nichol G, Pandey DK, Paynter NP, Reeves MJ, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014;129:e28-e292.
3. Devereux RB, Pickering TG, Harshfield GA, Kleinert HD, Denby L, Clark L, Pregibon D, Jason M, Kleiner B, Borer JS, Laragh JH. Left ventricular hypertrophy in patients with hypertension: importance of blood pressure response to regularly recurring stress. *Circulation*. 1983;68:470-6.
4. Frey N, Katys HA, Olson EN Hill JA. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation*. 2004;109:1580-9.
5. Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol*. 1997;59:551-71.
6. Fröhlich 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.

7. Beauchamp GK, Engelman K. High salt intake. Sensory and behavioral factors. *Hypertension*. 1991;17:1176-81.
8. He J, Whelton PK. Salt intake, hypertension and risk of cardiovascular disease: an important public health challenge. *Int J Epidemiol*. 2002;31:327-31.
9. Ferreira DN, Katayama IA, Oliveira IB, Rosa KT, 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.
10. Baker KM, Booz GW, Dostal DE. Cardiac actions of angiotensin II. Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Ann Rev Physiol*. 1992;54:227-41.
11. Dzau VJ. Implications of local angiotensin production in cardiovascular physiology and pharmacology. *Am J Cardiol*. 1987;59:59A-65A.
12. Re RN. Implications of intracrine hormone action for physiology and medicine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284:H751-57.
13. de Mello WC, Danser AH. Angiotensin II and the heart. On the intracrine renin-angiotensin system. *Hypertension*. 2000;35:1183-88.
14. Dostal DE, Baker KM. The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circ Res*. 1999;85:643-50.
15. Yamazaki T, Komuro I, Shiojima I, Yazaki Y. The renin-angiotensin system and cardiac hypertrophy. *Heart*. 1996;76:33-5.
16. Janicki JS, Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Stewart JA Jr, Murray DB, Chancey AL. Cardiac mast cell regulation of matrix

- metalloproteinase-related ventricular remodeling in chronic pressure or volume overload. *Cardiovasc Res.* 2006;69:657-65.
- 17.Xu J, Carretero OA, Liu YH, Shesely EG, Yang F, Kapke A, Yang XP. Role of AT2 receptors in the cardioprotective effect of AT1 antagonists in mice. *Hypertension.* 2000;40:244-50.
- 18.D'Amore A, Black MJ, Thomas WG. The angiotensin II type 2 receptor causes constitutive growth of cardiomyocytes and does not antagonize angiotensin II type 1 receptor-mediated hypertrophy. *Hypertension.* 2005;46:1347-54.
- 19.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.
- 20.Balcells E, Meng QC, Johnson WH Jr, Oparil S, Dell'Italia LJ. Angiotensin II formation from ACE and chymase in human and animal hearts: methods and species considerations. *Am J Physiol.* 1997;273:H1769-74.
- 21.Lang D, Mosfer SI, Shakesby A, Donaldson F, Lewis MJ. Coronary microvascular endothelial cell redox state in left ventricular hypertrophy: the role of angiotensin II. *Circ Res.* 2000;86:463-9.
- 22.Aikawa R, Nagai T, Tanaka M, Zou Y, Ishihara T, Takano H, Hasegawa H, Akazawa H, Mizukami M, Nagai R, Komuro I. Reactive oxygen species in mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;289:901-7.
- 23.Yao EH, Yu Y, Fukuda N. Oxidative stress on progenitor and stem cells in cardiovascular diseases. *Curr Pharm Biotechnol.* 2006;7:101-8.

- 24.Siwik DA, Tzortzis JD, Pimental DR, Chang DL, Pagano PJ, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS. Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase induces cell growth, hypertrophic phenotype, and apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes in vivo. *Circ Res.* 1999;85:147-53.
- 25.Nakamura K, Fushimi K, Kouchi H, Mihara K, Miyazaki M, Ohe T, Namba M. Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II. *Circulation.* 1998;98:794-9.
- 26.Shimizu MH, Coimbra TM, de Araujo M, Menezes LF, Seguro AC. N-acetylcysteine attenuates the progression of chronic renal failure. *Kidney Int.* 2005;68:2208-17.
- 27.Shimizu MH, Volpini RA, de Bragança AC, Campos R, Canale D, Sanches TR, Andrade L, Seguro AC. N-acetylcysteine attenuates renal alterations induced by senescence in the rat. *Exp Gerontol.* 2013;48:298-303.
- 28.Oliveira IB, Ramos DR, Lopes KL, Souza RM, Heimann JC, Furukawa LN. Isolated total RNA and protein are preserved after thawing for more than twenty-four hours. *Clinics.* 2012;67:255-9.
- 29.Coelho MS, Passadore MD, Gasparetti AL, Bibancos T, Prada PO, Furukawa LL, Furukawa LN, Fukui RT, Casarini DE, Saad MJ, Luz J, Chiavegatto S, Dolnikoff MS, Heimann JC. High- or low-salt diet from weaning to adulthood: effect on body weight, food intake and energy balance in rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006;16:148-55.
- 30.Krämer C, Sunkomat J, Witte J, Luchtefeld M, Walden M, Schmidt B, Tsikas D, Böger RH, Forssmann WG, Drexler H, Schieffer B. Angiotensin

- II receptor-independent anti-inflammatory and antiaggregatory properties of losartan: role of the active metabolite EXP3179. *Circ Res.* 2002;90:770-6.
31. Neves MF, Amiri F, Viridis A, Diep QN, Schiffrin EL. Role of aldosterone in angiotensin II-induced cardiac and aortic inflammation, fibrosis and hypertrophy. *Can J Physiol Pharmacol.* 2005;83:999-1006.
32. Zou Y, Akazawa H, Qin Y, Sano M, Takano H, Minamino T, Makita N, Iwanaga K, Zhu W, Kudoh S, Toko H, Tamura K, Kihara M, Nagai T, Fukamizu A, Umemura S, Iiri T, Fujita T, Komuro I. Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nat Cell Biol.* 2004;6:499-506.
33. Ullian ME, Gelasco AK, Fitzgibbon WR, Beck CN, Morinelli TA. Acetylcysteine decreases angiotensin II receptor binding in vascular smooth muscle cells. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:2346-53.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Walter Campestre for the competent animal care.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

The author's responsibilities were as follows: I.A.K. and J.C.H. were responsible for the conception and design of the study and the interpretation of the data; I.A.K., R.C.P., E.P.B.D., I.B.O. and L.N.S.F. conducted the research; I.A.K. analyzed the data; I.A.K. drafted the manuscript and J.C.H supervised this activity. M.H.M.S. performed the TBARS assessment and J.C.H. supervised this work; I.A.K. was primarily responsible for the final content. All authors read and approved the final manuscript.

TABLES

Table 1. RT-PCR primers.

<i>Rattus norvegicus</i> primers	
GAPDH	5' TGA TGC TGG TGC TGA GAT TGT CGT -3' 5' TTG TCA TTG AGA GCA ATG CCA GCC -3'
Angiotensinogen	5' AGC ACG ACT TCC TGA CTT GG -3' 5' TAG ATG GCG AAC AGG AAC GG -3'
Renin	5' CAT TAC CAG GGC AAC TTT CAC -3' 5' TCA TCG TTC CTG AAG GAA TTC -3'
ACE	5' ACA GCT ATA ACT CGA GTG -3' 5' ATG TCG TAA ATG TTC TCC -3'
ACE2	5' CAA AGT TCA CTT GCT TCT TGG -3' 5' TAC TGT AAA TGG TGC TCA TGG -3'
AT1	5' TCG AAT TCC ACC TAT GTA AGA TCG CTT C -3' 5' TCG GAT CCG CAC AAT CGC CAT AAT TAT CC -3'
AT2	5' GCA TGA GTG TTG ATA GGT ACC AAT CGG -3' 5' CCC ATA GCT ATT GGT CTT CAG CAG ATG -3'

Table 2. Hemodynamic variables, food and water intake, urinary volume, urinary and serum sodium and hematocrit in 18-week-old Wistar rats in the NS, HS, HS+HZ, HS+LOS or HS+NAC groups

	NS	<i>n</i>	HS	<i>n</i>	HS+HZ	<i>n</i>	HS+LOS	<i>n</i>	HS+NAC	<i>n</i>
TcBP, <i>mmHg</i> 6 weeks of age	120±1.3	14	125±3.0	12	125±3.9	12	128±4.1	11	118±2.0	14
TcBP, <i>mmHg</i> 7 weeks of age	120±2.3 ^a	14	139±2.8 ^b	12	116±2.2 ^a	12	120±1.4 ^a	11	163±3.5 ^c	14
TcBP, <i>mmHg</i> 18 weeks of age	110±1.6 ^a	14	143±4.0 ^b	12	116±1.8 ^a	12	116±1.6 ^a	11	166±1.6 ^c	14
Heart rate, <i>beats/min</i>	383±12.0	14	368±9.5	12	376±7.0	12	388±10.1	11	396±4.1	14
Food intake, <i>g/d</i>	16±1.8 ^a	8	15±0.9 ^a	7	14±0.5 ^a	8	16±0.9 ^a	7	23±0.6 ^b	8
Water intake, <i>mL/d</i>	25±2.5 ^a	8	57±3.6 ^b	7	56±7.2 ^b	8	56±3.2 ^b	7	93±1.8 ^c	8
Urinary volume, <i>mL/24 hrs</i>	11±1.5 ^a	8	48±2.9 ^{bc}	7	39±5.1 ^b	8	44±2.3 ^b	7	56±1.0 ^c	8
Urinary sodium, <i>mmol/24 hrs</i>	2±0.2 ^a	8	14±0.8 ^b	7	12±1.5 ^b	8	13±1.1 ^b	7	19±1.3 ^c	8
Serum sodium, <i>mmol/L</i>	152±3.4	8	152±2.3	8	148±2.1	8	149±2.6	8	148±1.9	8
Hematocrit, %	49±0.4	8	49±0.5	8	48±0.5	8	49±0.4	8	49±0.3	8

Data are reported as the means±SEM. *n*=number of measurements. Means in a row with superscripts without a common letter differ, *P*<0.05.

Table 3. Body weight, cardiac mass and index, left and right ventricular mass and left and right ventricular mass indexes in 18-week-old Wistar rats in the NS, HS, HS+HZ, HS+LOS or HS+NAC groups

	NS	<i>n</i>	HS	<i>n</i>	HS+HZ	<i>n</i>	HS+LOS	<i>n</i>	HS+NAC	<i>n</i>
Body weight, <i>g</i> 3 weeks of age	69.0±2.15	12	69.2±2.70	12	66.7±2.92	12	71.4±2.02	11	75.8±2.09	14
Body weight, <i>g</i> 8 weeks of age	338.9±5.53 ^a	12	306.3±5.33 ^{ab}	12	303.9±5.96 ^b	12	316.4±11.24 ^{ab}	11	342.5±5.24 ^a	14
Body weight, <i>g</i> 9 weeks of age	377.0±7.27 ^a	12	340.8±6.56 ^b	12	340.5±5.09 ^b	12	343.8±10.03 ^{ab}	11	384.9±6.96 ^a	14
Body weight, <i>g</i> 18 weeks of age	572.8±12.07 ^a	12	489.8±8.31 ^b	12	481.0±10.08 ^b	12	514.8±15.41 ^b	11	551.7±9.20 ^a	14
Cardiac index, <i>g/cm</i>	0.34±0.01 ^a	16	0.51±0.02 ^b	16	0.47±0.02 ^{bc}	15	0.38±0.01 ^{ac}	15	0.43±0.01 ^c	14
Cardiac mass, <i>g</i>	1.59±0.11 ^a	16	2.27±0.11 ^b	16	2.11±0.12 ^{bc}	15	1.74±0.05 ^{ac}	15	1.97±0.03 ^c	14
LV index, <i>g/cm</i>	0.25±0.007 ^a	16	0.35±0.01 ^b	16	0.31±0.01 ^c	15	0.26±0.009 ^a	15	0.29±0.003 ^{ac}	14
LV mass, <i>g</i>	1.18±0.02 ^a	16	1.59±0.07 ^b	16	1.43±0.06 ^{bc}	15	1.19±0.03 ^a	15	1.31±0.01 ^{ac}	14
RV index, <i>g/cm</i>	0.06±0.002 ^a	16	0.08±0.003 ^b	16	0.08±0.003 ^b	15	0.07±0.002 ^c	15	0.07±0.002 ^c	14
RV mass, <i>g</i>	0.29±0.008 ^a	16	0.39±0.01 ^b	16	0.39±0.01 ^b	15	0.34±0.01 ^c	15	0.35±0.0 ^{bc}	14

Data are reported as the means±SEM. *n*=number of measurements. Means in a row with superscripts without a common letter differ, *P*<0.05

Table 4. Serum aldosterone and LV and RV angiotensin II concentration in 18-week-old Wistar rats in the NS, HS, HS+HZ, HS+LOS or HS+NAC groups

	NS	<i>n</i>	HS	<i>n</i>	HS+HZ	<i>n</i>	HS+LOS	<i>n</i>	HS+NAC	<i>n</i>
Serum aldosterone, (pg/mL)	64.7±15.7 ^a	10	26.7±2.6 ^b	10	34.0±3.6 ^b	10	38.9±5.6 ^b	10	29.1±2.1 ^b	7
Angiotensin II - LV, (% area)	0.03±0.01 ^a	8	0.17±0.02 ^b	8	0.16±0.02 ^b	8	0.17±0.04 ^b	8	0.17±0.02 ^b	7
Angiotensin II - RV, (% area)	0.02±0.20 ^a	8	0.15±1.20 ^b	8	0.15±1.20 ^b	8	0.15±1.20 ^b	8	0.14±1.00 ^b	7

Data are reported as the means±SEM. *n*=number of measurements. Means in a row with superscripts without a common letter differ, *P*<0.05

Table 5. Angiotensinogen, renin, ACE, ACE2, AT1 and AT2 gene expression of the LV and RV in 18-week-old Wistar rats in the NS, HS, HS+HZ, HS+LOS or HS+NAC groups

	NS	<i>n</i>	HS	<i>n</i>	HS+HZ	<i>n</i>	HS+LOS	<i>n</i>	HS+NAC	<i>n</i>
Angiotensinogen - LV, (<i>IDV</i>)	0.35±2.87	8	0.37±0.01	8	0.41±0.02	7	0.35±0.01	8	0.40±0.01	7
Angiotensinogen - RV, (<i>IDV</i>)	0.61±0.05	5	0.54±0.05	6	0.58±0.04	8	0.47±0.04	8	0.62±0.04	7
Renin - LV, (<i>IDV</i>)	0.71±0.02	8	0.68±0.02	8	0.67±0.02	7	0.67±0.02	8	0.74±0.01	7
Renin - RV, (<i>IDV</i>)	0.59±0.05	5	0.71±0.06	6	0.62±0.01	8	0.57±0.02	8	0.58±0.02	7
ACE - LV, (<i>IDV</i>)	0.87±0.03	8	0.83±0.05	8	0.97±0.06	7	0.97±0.05	8	1.05±0.16	7
ACE - RV, (<i>IDV</i>)	0.46±0.02	5	0.47±0.02	6	0.48±0.01	8	0.43±0.02	8	0.52±0.01	6
ACE2 - LV, (<i>IDV</i>)	0.41±3.29	8	0.43±3.48	8	0.37±2.61	7	0.34±2.74	8	0.35±2.49	7
ACE2 - RV, (<i>IDV</i>)	0.38±0.03	5	0.40±0.03	6	0.44±0.02	8	0.39±0.02	8	0.35±0.01	7
AT1 - LV, (<i>IDV</i>)	0.39±0.03 ^a	8	0.53±0.04 ^b	8	0.57±0.03 ^b	7	0.32±0.01 ^a	8	0.36±0.02 ^a	7
AT1 - RV, (<i>IDV</i>)	0.34±0.03	8	0.40±0.03	6	0.37±0.009	8	0.33±0.01	8	0.32±0.01	7
AT2 - LV, (<i>IDV</i>)	0.52±0.04	8	0.51±0.03	8	0.45±0.03	7	0.44±0.02	8	0.48±0.03	7
AT2 - RV, (<i>IDV</i>)	0.41±0.01	5	0.42±0.01	6	0.36±0.01	8	0.45±0.01	8	0.44±0.04	7

Data are reported as the means±SEM. *n*=number of measurements. Means in a row with superscripts without a common letter differ, *P*<0.05

Table 6. Angiotensinogen, renin, ACE, ACE2, AT1, AT2 and chymase protein expression of LV and RV in 18-week-old Wistar rats in the NS, HS, HS+HZ, HS+LOS or HS+NAC groups

	NS	<i>n</i>	HS	<i>n</i>	HS+HZ	<i>n</i>	HS+LOS	<i>n</i>	HS+NAC	<i>n</i>
Angiotensinogen - LV, (AU)	10.2±0.96	8	9.7±1.08	8	9.8±1.21	8	10.6±1.26	7	9.2±0.47	7
Angiotensinogen - RV, (AU)	17.2±3.68	8	19.4±2.33	8	18.3±2.01	8	19.0±2.58	8	18.6±2.88	7
Renin - LV, (AU)	0.9±0.10	8	0.9±0.07	8	1.1±0.16	8	0.9±0.08	6	1.0±0.16	6
Renin - RV, (AU)	11.2±2.27	8	11.9±1.58	8	11.7±2.20	8	9.9±0.93	7	11.9±2.89	6
ACE - LV, (AU)	10.1±3.72	8	9.5±2.16	8	7.2±1.99	6	8.8±1.79	5	6.3±0.77	7
ACE - RV, (AU)	3.2±0.33	8	3.4±0.19	8	3.0±0.19	8	3.2±0.41	8	3.6±0.32	6
ACE2 - LV, (AU)	3.8±0.43	8	4.4±0.57	8	3.6±0.56	8	3.6±0.52	8	3.3±0.51	7
ACE2 - RV, (AU)	2.2±0.10	8	2.2±0.15	7	2.2±0.14	8	2.1±0.25	5	2.0±0.17	7
AT1 - LV, (AU)	3.4±0.28 ^a	6	5.1±0.33 ^b	6	5.3±0.51 ^b	6	2.8±0.29 ^a	5	3.3±0.38 ^a	7
AT1 - RV, (AU)	0.4±0.05 ^a	8	0.8±0.06 ^b	8	0.9±0.09 ^b	8	0.4±0.07 ^a	8	0.4±0.08 ^a	7
AT2 - LV, (AU)	0.05±0.004	8	0.06±0.007	7	0.04±0.010	8	0.04±0.005	7	0.04±0.008	7
AT2 - RV, (AU)	0.03±0.004	8	0.03±0.004	7	0.02±0.003	8	0.02±0.004	6	0.02±0.002	7
Chymase - LV, (AU)	0.6±0.02 ^a	8	0.8±0.05 ^a	8	0.9±0.07 ^b	8	0.7±0.08 ^a	7	0.8±0.05 ^a	7
Chymase - RV, (AU)	0.3±0.06	8	0.5±0.05	8	0.5±0.07	8	0.4±0.05	7	0.4±0.06	7

Data are reported as the means±SEM. *n*=number of measurements. Means in a row with superscripts without a common letter differ, *P*<0.05

Figure 1. Cardiomyocyte diameter of LV **(A)** and RV **(B)** and interstitial fibrosis of LV **(C)** and RV **(D)** of 18-week-old rats fed diets of varying salt concentrations and untreated or treated with hydralazine (HZ), losartan (LOS) or N-acetylcysteine. Data are reported as means $\pm$ SEM, $n = 6-8$. Labeled means without a common letter differ, $P < 0.05$

Figure 2. AT1 gene expression in LV **(A)** and RV **(B)** and AT1 protein expression of LV **(C)** and RV **(D)** of 18 week-old-rats fed diets of varying salt concentrations and untreated or treated with hydralazine (HZ), losartan (LOS) or N-acetylcysteine (NAC). Data is reported as means $\pm$ SEM, n = 6–8. Labeled means without a common letter differ, $P < 0.05$

Figure 3. TBARS on myocardium of 18-week-old rats fed diets of varying salt concentrations and untreated or treated with hydralazine (HZ), losartan (LOS) or N-acetylcysteine. Data are reported as means $\pm$ SEM, n = 6/group. Labeled means without a common letter differ, $P < 0.05$

Figure 4. Affinity of the conformation-specific anti-AT1 receptor antibody in the LV (**A**) and RV (**B**), affinity of the conformation specific anti-AT2 receptor antibody in the LV (**C**) and RV (**D**) and representative images showing binding of conformation-specific anti-AT1 and anti-AT2 receptor antibody in LV and RV (**E**). Data are reported as means $\pm$ SEM, $n = 7-8$. Labeled means without a common letter differ, $P < 0.05$