Ellen Priscila Brito Dopona

**Hipertrofia miocárdica induzida por consumo elevado
de sal é prevenida por agonista de receptor AT2 da
angiotensina II**

SÃO PAULO

2017

Ellen Priscila Brito Dopona

**Hipertrofia miocárdica induzida por consumo elevado
de sal é prevenida por agonista de receptor AT2 da
angiotensina II**

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

2017

DEDICATÓRIA

À minha família,

Obrigada por sempre me apoiarem e incentivarem meus sonhos. Á vocês toda minha gratidão e amor.

Ao Lim 16

Ao meu orientador Prof. Dr. Joel C. Heimann, Dra. Luzia Naoko Shinohara Furukawa, Ms. Ivone Braga de Oliveira e a todos os alunos e funcionários. Vocês são parte dessa conquista. Minha eterna gratidão a vocês, por me ajudarem a chegar até o final.

AGRADECIMENTOS

Ao *Prof. Dr. Joel C. Heimann*, a quem admiro muito pela inteligência e caráter. Obrigada pela confiança, pela oportunidade e por ter acreditado em mim. Pela paciência em me ensinar. Por todo aprendizado que me proporcionou durante esses anos que fiquei no laboratório, pela orientação exemplar e todo incentivo. O senhor foi essencial para minha formação profissional e pessoal. Ao senhor minha gratidão eterna.

Dra. Luzia Naoko Shinohara Furukawa obrigada pela disposição em ajudar com os experimentos, com o congresso, obrigada pelo apoio emocional, pelos conselhos e incentivo. Sua ajuda foi fundamental na conclusão da minha formação. Sentirei saudades!

À *Ivone Braga de Oliveira* pela disposição em me ajudar no dia-a-dia com os experimentos, pela amizade, pelo apoio emocional, pelos conselhos, pela paciência e parceria. Vou sentir saudades!

Aos colaboradores *Dra. Élia Tamaso, Marcelo Alves e Joyce Tiyeko*, pelo esforço e tentativas de fazer a técnica de microscopia dar certo e por todo aprendizado.

Aos amigos *Carolina Romão e Rafael Canavel* pelos bons momentos que compartilhamos no laboratório, pelas risadas, conselhos e ajuda.

Ao *Wagner* pela disposição em sempre me ajudar com a formatação do artigo e da tese, por sempre salvar meus arquivos e computadores e por ter me acrescentado tanto com seu conhecimento.

À *Veronica Favoni Rocha* pela ajuda no desenvolvimento no projeto. Sua ajuda foi importante.

À *Isis Akemi Katayama Rangel* quem me ensinou tanto durante a iniciação científica e despertou em mim a vontade de ser pesquisadora. Obrigada pela orientação e aprendizado.

À amiga *Thayse*, sempre disposta a me ouvir, a me incentivar e me acalmar nos meus piores dias, quem me acompanhou do começo até o final desse ciclo. Você é meu exemplo de amizade. Obrigada!!! Amo você.

Às amigas *Kecyane, Franciely, Susã, Cristiane, Lúcia, Suziley*, pela amizade, pela diversão, pelos conselhos e parceria. Dividir minha jornada com vocês a tornou mais leve. Amo vocês.

À todos os amigos do Laboratório de Hipertensão Experimental, *Flávia, Priscila, Sônia e Maria Angélica* pela ajuda e apoio.

Ao Prof. Dr. *Emmanuel Burdmann* por ter me aceitado no programa de pós-graduação da Nefrologia.

À todos do LIM 16 e da FMUSP pela contribuição no meu projeto e por todo aprendizado.

Ao meu pai *Ivan*, por ter me dado toda a base necessária para eu realizar meus sonhos e por ter me dado o melhor que pode. Te amo!

À minha mãe *Anaide*, pelas lutas travadas para me dar o melhor, por sempre fazer o possível e o impossível pelos meus sonhos e pelo amor incondicional. Você é meu exemplo de determinação, força e amor. A você minha gratidão eterna. Te amo!

Aos meus irmãos *Nádia e Alisson* pelo apoio, pelas palavras de incentivo, por ouvirem meus desabafos sempre. Vocês são meus exemplos de superação e amor. Obrigada por sempre estarem ao meu lado. Amo muito vocês.

Ao meu cunhado *Edson*, irmão que a vida me trouxe, obrigado por toda ajuda e apoio sempre e por fazer minha irmã feliz.

Aos meus sobrinhos *Kailani e Noah*, que vieram acrescentar amor e felicidade à mim e à nossa família. Amo vocês.

Aos *ratinhos*, os verdadeiros heróis da ciência.

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

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

À *Deus* por ter me dado condições e chances de aprender tanto e concluir mais um ciclo importante na minha vida. Por me dar oportunidades diariamente, por ter me dado força nas lutas que travei com meus fantasmas. Por ter colocado anjos em forma de pessoas no meu caminho, que tanto me ajudam e colaboram para eu me tornar uma pessoa melhor.

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 figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas e siglas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	11
3	MÉTODOS	12
3.1	Animais e dieta	12
3.2	Protocolo experimental	12
3.3	Composto 21	13
3.4	Evolução ponderal	13
3.5	Pressão arterial caudal	13
3.6	Avaliação do consumo de ração, ingestão hídrica e coleta de urina para dosagem de sódio e potássio urinário e plasmático	14
3.7	Coleta de tecidos e medida das massas cardíaca total, ventricular esquerda e direita	15
3.8	Medida do diâmetro transverso do cardiomiócito e da porcentagem de fibrose intersticial	15
3.8.1	Preparação do tecido cardíaco para análises histológicas	15

3.8.1.1	Processo de parafinização do tecido cardíaco	15
3.8.1.2	Desparafinização para coloração histológica	16
3.8.1.3	Coloração com ácido Periódico de Schiff (PAS)	16
3.8.1.4	Coloração com Tricrômio de Masson	17
3.9.	Avaliação da expressão gênica dos componentes do SRA	17
3.9.1.1	Extração de RNA total dos ventrículos esquerdo e direito	17
3.9.1.2	Reação da transcriptase reversa (RT)	18
3.9.1.3	Reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR)	19
3.10	Avaliação da expressão proteica dos componentes do SRAA	21
3.11	Quantificação de angiotensina II tecidual	22
3.12	Imunolocalização do receptor AT1 e AT2 mitocondrial	23
3.12.1	Preparação do tecido cardíaco para o processo de desidratação, filtração e inclusão em resina	23
3.12.1.1	Desidratação, filtração e inclusão em resina de araldite.	23
3.12.2	Protocolo 1: Reação de imunogold	23
3.12.3	Contrastação das telas com citrato de chumbo	25
3.12.4	Contrastação das telas com acetato de uranila	27
3.12.5	Controle Positivo	29
3.12.6	Protocolo 2: Imunomarcação com ouro coloidal.	30
3.13	Análise estatística	33
4	RESULTADOS	34
4.1	Peso corpóreo	34
4.2	Pressão arterial caudal	35

4.3	Consumo de ração, ingestão hídrica e volume urinário	36
4.4	Excreção de sódio e potássio urinário de 24 horas, sódio e potássio sérico e hematócrito	38
4.5	Massas cardíaca total, ventricular esquerda e ventricular direita sem correção e corrigidas pelo comprimento da tíbia	39
4.6	Diâmetro transverso do cardiomiócito	41
4.7	Área de fibrose intersticial nos ventrículos esquerdo e direito	42
4.8	Expressão gênica e proteica dos componentes do SRA nos ventrículos esquerdo e direito	43
4.9	Conteúdo de angiotensina II nos ventrículos esquerdo e direito	54
5	DISCUSSÃO	55
6	CONCLUSÕES	59
7	ANEXOS	60
8	REFERÊNCIAS	61
9	APÊNDICES	68

LISTA DE FIGURAS

1	Padrões de hipertrofia ventricular cardíaca	2
2	Tipos de hipertrofia do cardiomiócito e arranjo dos sarcômeros	3
3	Imagem de microscopia eletrônica de mitocôndrias do ventrículo esquerdo de rato Wistar macho contrastada com citrato de chumbo	25
4	Imagem de microscopia eletrônica de mitocôndrias do ventrículo esquerdo de rato Wistar macho contrastada com chumbo	26
5	Imagem de microscopia eletrônica de mitocôndrias do ventrículo esquerdo de rato Wistar macho marcadas com anti-AT2 conjugado com partículas de ouro constrastada com citrato de chumbo	26
6	Imagem de microscopia eletrônica de mitocôndrias do ventrículo esquerdo de rato Wistar macho marcadas com anti-AT1 conjugado com partículas de ouro constrastado com citrato de chumbo	27
7	Imagem de microscopia eletrônica de mitocôndrias do ventrículo esquerdo de rato Wistar macho marcadas com anti-AT2 conjugado com partículas de ouro contrastada com acetato de uranila	25
8	Imagem de microscopia eletrônica de célula renal de rato Wistar macho marcadas com anti-AT2 conjugado com partículas de ouro constrastado com acetato de uranila	27
9	Imagem de microscopia eletrônica de mitocôndrias do ventrículo esquerdo de rato Wistar macho marcadas com anti-AT2 conjugado com partículas de ouro constrastado com citrato de chumbo	28
10	Peso corpóreo	34
11	Pressão arterial caudal	35

12	Consumo de ração, ingestão hídrica e volume urinário, excreção urinária de sódio, sódio sérico e	36
13	Excreção urinária de sódio e potássio, sódio e potássio sérico e hematócrito	38
14	Massa cardíaca total, massa ventricular esquerda e massa ventricular direita sem correção	39
15	Massa cardíaca total, massa ventricular esquerda e massa ventricular direita corrigidas pelo comprimento da tíbia	40
16	Diâmetro transverso do cardiomiócito nos ventrículos esquerdo e direito	41
17	Fibrose intersticial nos ventrículos esquerdo e direito	42
18	Expressão gênica e proteica do angiotensinogênio, renina, enzima conversora de angiotensina (ECA), AT2, AT1 no ventrículo esquerdo	43
19	Expressão gênica e proteica do angiotensinogênio, renina, enzima conversora de angiotensina (ECA), AT2, AT1 no ventrículo direito	49
20	Conteúdo de angiotensina II nos ventrículos esquerdo e direito	54

LISTA DE TABELAS

1	Quantidade de cDNA, temperatura de anelamento e número de ciclos utilizados em cada gene no tecido cardíaco.	21
2	Sequências dos primers	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANGII	Angiotensina II
AGTO	Angiotensinogênio
AT1	Receptor de angiotensina II do tipo 1
AT2	Receptor de angiotensina II do tipo 2
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
bpm	Batimentos por minuto
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisas
CT	Comprimento da tíbia
C21	Composto 21
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAase	Enzima que degrada DNA
dNTP	2'-Deoxinucleotídeo 5'-trifosfato
DTC	Diâmetro transversal do cardiomiócito
ECA	Enzima conversora de angiotensina I
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EUA	Estados Unidos da América
FI	Fibrose intersticial
FM-USP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HA	Hipertensão arterial
HC	Hipertrofia cardíaca
HS	Dieta hipersódica 8%
MDA	Malonaldeído
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
NS	Dieta normossódica
PA	Pressão arterial
PAC	Pressão arterial caudal
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>

RNA	Ácido ribonucléico
RNAase	Enzima que degrada RNA
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RT-PCR	Transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SRA	Sistema renina-angiotensina
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCA	Ácido tricloroacético
T(dT)	Oligodeoxirribonucleotídeo
VE	Ventrículo esquerdo
VD	Ventrículo direito
UA	Unidade arbitrária

Resumo

Dopona EPB. Hipertrofia miocárdica induzida por consumo elevado de sal é prevenida por agonista de receptor AT2 da angiotensina II [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina: Universidade de São Paulo; 2017.

O alto consumo de sódio é o principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardíacas. A sobrecarga de sal na dieta aumenta o conteúdo de angiotensina II no coração. Muitos estudos tem avaliado o papel da angiotensina II no desenvolvimento da hipertrofia e fibrose cardíaca. A angiotensina II age através de dois receptores: o receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1) e o receptor de angiotensina tipo 2 (AT2). Embora muitos estudos têm elucidado o papel do receptor AT1 e sobrecarga de sal na dieta no desenvolvimento da hipertrofia, os estudos envolvendo o receptor AT2 ainda são controversos. Com o objetivo de entender melhor o papel do AT2 em modelos de sobrecarga de sal na dieta no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, ratos Wistars machos foram alimentados com uma dieta normal ou hipersódica desde o desmame até a décima oitava semana de idade. Ambos os grupos foram subdivididos em dois subgrupos. A partir da sétima semana de idade cada um dos subgrupos recebeu o tratamento com composto 21 (3mg/kg por dia, n=16), um agonista do AT2. Peso corporal, pressão arterial caudal, consumo de ração, ingestão hídrica, volume urinário, hematócrito, massas ventriculares, diâmetro transverso do cardiomiócito, porcentagem de fibrose intersticial, expressão gênica e proteica dos componentes do sistema renina-angiotensina foram avaliados. O C21 preveniu o desenvolvimento da hipertrofia e fibrose cardíaca em ratos alimentados com dieta hipersódica. O C21 preveniu o incremento da pressão arterial dos ratos alimentados com dieta hipersódica.

Descritores: Sal, sistema renina-angiotensina, receptor de angiotensina tipo 2, composto 21, hipertrofia cardíaca, fibrose cardíaca.

Abstract

Dopona EPB. Myocardial hypertrophy induced by high salt consumption is prevented by angiotensin II type 2 receptor agonist. [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina: Universidade de São Paulo; 2017.

High salt intake is one of the main risk factors for the development of cardiovascular diseases. Dietary salt overload was found to increase cardiac angiotensin II content. Many studies have evaluated the role of angiotensin II on the development of cardiac hypertrophy and fibrosis. Angiotensin II acts through two main receptors: angiotensin II type 1 (AT1) and type 2 (AT2) receptors. Though there are many studies pointing to the effects of the AT1 and high salt diet, the role of AT2 and its effects in dietary salt overload model is still not elucidated. Aiming to better understand the role of AT2 receptor in models of salt overload on cardiac hypertrophy and fibrosis, male Wistar rats were fed normal or high salt diet from weaning up to 18 weeks of age. Both groups were divided into two subgroups. Starting at 7 weeks of age they were treated or not with compound 21 (3mg/kg per day, n=16), an AT2 receptor agonist. Body weight, blood pressure, food intake, water intake, urine volume, plasma and urinary sodium and potassium, cardiomyocyte transverse diameter, percentage of cardiac fibrosis, gene and protein expression of renin, angiotensinogen, angiotensin converting enzyme, AT1 and AT2 were measured. Compound 21 prevented the development of cardiac hypertrophy and fibrosis in rats that received high salt diet. Compound 21 also reduced the increased blood pressure, prevented the lower weight gain in animals fed with high salt diet.

Keywords: salt, renin-angiotensin system, AT2 receptor, compound 21, cardiac hypertrophy, cardiac fibrosis.

1. INTRODUÇÃO

O sódio é um importante componente da dieta humana (Penner et. al., 2007). Anteriormente ao desenvolvimento da indústria de alimentos, o homem ingeria pequenas quantidades de sal, encontrado naturalmente nos alimentos. Após a implantação da indústria alimentícia o homem passou a ingerir altas quantidades de sal e esse perfil é mantido até hoje (Denton, 1997). Já é bem estabelecida a relação entre o alto consumo de sal e a hipertensão arterial (HA) (Ahn et. al., 2004; Beauchamp et. al., 1991; Berkin et. al., 2001).

A HA é a principal causa de doenças cardiovasculares no mundo (He et al., 2002). Um estudo de Lim et al., 2012 observou que a HA estava presente em 69% dos pacientes norte-americanos com infarto no miocárdio e 75% dos pacientes com insuficiência cardíaca. No Brasil, a HA atinge 35.5% dos indivíduos adultos sendo responsável por 50% das mortes por doenças cardiovasculares.

Em 2010, um estudo que correlacionou mortalidade por doença cardiovascular (DCV) associada a hipertensão arterial e alto consumo de sal constatou que 1.65 milhões de mortes no mundo por doença cardíaca foram atribuídas a sobrecarga de sal na dieta (Mozaffarian et al., 2014).

Aumentar a pressão arterial (PA) não é a única consequência da sobrecarga de sal na dieta. Além dos efeitos hemodinâmicos, o sal está associado com doenças cardiovasculares independentemente do incremento da pressão arterial (Dhingra et. al., 1987; Fröhlich et. al., 1993; Schmieder et. al., 1995). Sua ação direta sobre o coração está associada com mudanças estruturais e contráteis nos cardiomiócitos, como a hipertrofia além de fibrose cardíaca (Ferreira et al., 2010; Katayama et al., 2014; Gu et al., 2014). A hipertrofia cardíaca é uma das principais causas da HA (Schmieder et al., 1996). Levy e colaboradores (1990) verificaram que pacientes com hipertrofia cardíaca tinham um risco de morte seis vezes maior que a população em geral. A hipertrofia cardíaca constitui um dos maiores fatores de riscos de morbidade e mortalidade cardiovascular e entender os mecanismos envolvidos merecem especial atenção (He et. al., 2002).

1.1 Hipertrofia cardíaca

A hipertrofia cardíaca (HC) é um mecanismo adaptativo do miocárdio decorrente a algum tipo de estímulo com o objetivo de preservar a função cardíaca. Durante esse processo ocorrem alterações moleculares, celulares e intersticiais cardíacas, manifestadas como modificações de tamanho, massa, geometria e função do coração que podem ser desencadeados por agentes mecânicos ou humorais sobre o tecido cardíaco (Álvarez et. al., 2008; Gu et. al., 2014; Lijnem et. al., 2012).

No entanto, conforme o estímulo persiste a hipertrofia atinge seu limite máximo, resultando em morte celular, desencadeamento de processo inflamatório e consequente formação de fibrose cardíaca (Weber et. al., 1994).

A HC pode ser classificadas em dois tipos: hipertrofia excêntrica e hipertrofia concêntrica.

Na hipertrofia excêntrica ocorre um aumento da massa ventricular com o aumento do diâmetro cavitário. Esse tipo de hipertrofia é causada por um estímulo de sobrecarga de volume, como por exemplo, durante o exercício físico ou gravidez (Kempf e Wollert, 2004).

Já na hipertrofia concêntrica há um aumento na espessura da parede ventricular e redução do diâmetro cavitário. Essa condição surge em virtude de um aumento da resistência à ejeção ou à sobrecarga de pressão, como é o caso da HA.

Figura 1. Padrões de hipertrofia ventricular esquerda.

O crescimento dos cardiomiócitos nesses tipos de hipertrofia pode se fazer de duas maneiras: Pela adição de sarcômeros em paralelo, resultando na hipertrofia concêntrica ou pela adição de sarcômeros em série resultando na hipertrofia excêntrica (Bernado et al., 2010; Lorell et. al., 2000).

Figura 2. Tipos de hipertrofia do cardiomiócito e arranjo dos sarcômeros.

Fonte modificado de Garcia e Incerpe, 2008

A eficiência mecânica do miocárdio depende das propriedades contráteis dos cardiomiócitos associados a matriz extracelular que por sua vez, possui características próprias.

1.2 Matriz extracelular

A matriz extracelular (ME) está presente em todos os órgãos e sua composição varia de acordo com o tecido. Ela fornece suporte estrutural para o tecido, facilita e regula vários processos como morfogênese, diferenciação, crescimento e migração celular, modula respostas a algum tipo de estímulo e

está envolvida em processo de reparo tecidual e remodelamento (Wilson e Spilnale, 2001; Frantz et al., 2010; Clause e Barker, 2013).

A ME é composta por uma ampla variedade de macromoléculas. No coração os componentes da ME são: proteínas estruturais como o colágeno I e III, elastina e fribilina, proteínas adesivas como o colágeno IV e VI e proteoglicanos.

Os fibroblastos são as células do tecido conjuntivo responsáveis pela síntese e manutenção da matriz extracelular.

A dinâmica da matriz extracelular é alterada num contexto de hipertensão e hipertrofia cardíaca, onde é desencadeado um processo de reparo tecidual, devido a morte celular causada pela hipertrofia cardíaca em longo prazo, levando a consequente instalação de cicatriz no coração.

Neste processo, ocorre aumento da síntese e deposição de colágeno na rede fibrosa cardíaca, o qual enrijece a parede do miocárdio prejudicando a contratilidade dos cardiomiócitos, levando a uma possível insuficiência cardíaca.

1.3 Fibrose cardíaca

A fibrose intersticial (FI), caracterizada como um aumento de cicatriz tecidual, é um processo inflamatório em resposta à morte celular, fenômeno que acompanha condições patológicas como a hipertensão arterial e a hipertrofia ventricular esquerda (Schultz et. al., 1999). Quando o coração, diante da sobrecarga de trabalho imposta ou excesso de estímulo hipertrófico, sofre apoptose ou necrose, miofibroblastos são ativados e iniciam um processo de reparação fibrótica. No entanto, quando o estímulo persiste, ocorre um acúmulo de cicatriz, o coração fica enrijecido e perde sua capacidade contrátil (Grimm et. al., 1998).

Durante o processo de reparação, há uma mudança no perfil de expressão de proteínas presente na matriz extracelular. A matriz extracelular é responsável pela organização, estrutura e regulação da composição tecidual. (Hein e Schaper, 2001). Os fibroblastos têm sido relatados como a maior fonte

de colágeno e outras proteínas do espaço extracelular. O desequilíbrio entre a síntese e degradação leva à excessiva deposição de colágeno na matriz extracelular. Isso é muito prejudicial ao tecido cardíaco, pois modifica a estrutura e função cardíaca, enrijece as paredes do coração, comprometendo a contratilidade do miocárdio (Laurent, 1987; Petrov et. al., 2002).

Vários elementos e sistema locais como o sistema renina-angiotensina, agem como fatores de crescimento, citocinas e hormônios que estimulam a produção de colágeno no coração e parecem serem responsáveis por iniciar e manter a resposta fibrótica. Entre eles, a angiotensina II tem se destacado pela sua ação no coração.

1.4 Sistema renina-angiotensina

O sistema renina angiotensina (SRA) está intimamente relacionado ao controle da pressão arterial e à regulação do equilíbrio hidroeletrolítico. Tradicionalmente conhecido por sua complexa cascata de enzimas e peptídeos é classicamente considerado um sistema circulante (Basso et. al., 2001; Fyhrquist et. al., 2008). A cascata é iniciada quando os rins liberam renina no sangue. Essa enzima proteolítica secretada em condições de hipotensão e hipovolemia, por sua vez, hidrolisa o angiotensinogênio, uma proteína plasmática liberada pelo fígado, formando um peptídeo de 10 aminoácidos, a angiotensina I. Quando a angiotensina I, presente no sangue, flui pelos os pulmões, a enzima de conversão da angiotensina I (ECA) remove dois aminoácidos, formando um octapeptídeo a angiotensina II (ANGII). A ANGI, peptídeo bioativo do SRA, que por sua vez exerce seu papel através dos seus receptores, denominados AT1 e AT2, causando vasoconstrição e reabsorção de sódio (Danser et al., 1999; de Gasparo et al., 2000; Chunhong et al., 2014).

Além da função endócrina, estudos experimentais indicam que o SRA possui função parácrina/autócrina e intrócrina (Lindpaintner, et. al, 1988; Cook et. al., 2001). Nas últimas três décadas, numerosos estudos demonstraram a existência de diversos componentes do SRA em diferentes órgãos, tecidos ou células, que deram suporte aos SRA locais, teciduais e intracelulares, dentre os

quais se destacam o coração, tecido adiposo e pâncreas (Kumar et al., 2012; De Mello, 2011; Jehle A. B, et al., 2012; de Gasparo et al., 2000; Chunhong Shao, Li Yu & Lie Gao 2014).

A ANGII no coração contribui para o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca, fibrose e estresse oxidativo (Keidar et. al., 2007). Muitos estudos têm enfatizado que o alto consumo de sal induz aumento de angiotensina II no miocárdio como ação direta do sal, independente de seu efeito hemodinâmico (Langenfeld et. al., 1995; Morgan et. al., 2001). Em um estudo realizado em nosso laboratório, Ferreira et.al., 2010, observou que a angiotensina II estava aumentada tanto no ventrículo esquerdo como no direito, sugerindo um efeito do sal sobre a síntese de angiotensina II no coração. Além disso, os ratos alimentados com dieta hipersódica e tratados com hidralazina, um vasodilatador direto, desenvolveram hipertrofia cardíaca, sugerindo ação cardioprotetora da angiotensina II tecidual miocárdica mesmo na ausência de hipertensão. Essa ação hipertrófica da angiotensina II no coração foi confirmada em um grupo de animais tratados com losartan, um bloqueador do receptor de angiotensina tipo I e alimentados com dieta hipersódica nos quais não houve desenvolvimento de HC.

A ANGII induz a expressão de genes fetais que estão relacionados com a hipertrofia cardíaca (c-fos, c-jun, jun-B, Egr-1 e c-myc), marcadores pró-hipertróficos (ANP) e fatores de crescimento que estão relacionados com o desenvolvimento da hipertrofia do miocárdio como o TGF- β e o FGF (Susic et. al., 1996; Harada et. al., 1998; Long et. al., 1991).

Concomitante com o processo hipertrófico existe um aumento da deposição de colágenos na matriz extracelular do tecido cardíaco, caracterizando a fibrose cardíaca. Várias citocinas e fatores de crescimento estão envolvidos neste processo. Entre esses, a angiotensina II age como um forte estimulador. Muitos estudos mostram que a ANGII influencia não somente a expressão de colágeno, mas também intensifica a proliferação de fibroblastos e diminui a eficiência do processo de degradação dessa proteína (Zhou et.al., 1996; Sadoshima et.al., 1993).

A angiotensina II age através de dois tipos de receptores, o receptor AT1 e o receptor AT2. As respostas ao estímulo destes receptores têm diferentes papéis biológicos e distintas vias de sinalização com efeitos finais opostos.

Ainda no estudo de Ferreira et.al., 2010, em modelo de sobrecarga de sal, foi observado no ventrículo esquerdo a expressão gênica e proteica aumentada do receptor AT1.

O receptor AT1 pertence ao grupo de receptores de membrana, possuindo sete domínios transmembrana e acoplado a proteína G. É mediador da ação da angiotensina II estimulando reabsorção de sódio, vasoconstrição, homeostase eletrolítica, apoptose, hipertrofia, citocinas envolvidas com a hipertrofia de células cardíacas, proliferação celular, inflamação, estresse oxidativo e remodelação da matriz extracelular (Bunkenburg et. al., 1992; Nakagami et. al., 2003; Welch et. al., 2001).

Por muito tempo o receptor AT1 foi considerado o principal mediador dos efeitos da ANGII sobre o sistema cardiovascular. No entanto, nos últimos vinte anos, diversos trabalhos demonstraram que o receptor AT2 também é responsável por mediar diversas ações da ANGII no sistema cardiovascular (Jöhren et al, 2004). O receptor AT2, o qual também é um receptor acoplado à proteína G, induz vasodilatação, inibição do crescimento de cardiomiócitos, inibição da proliferação de fibroblastos e de síntese de matriz extracelular (Li et al., 2012; Cavalera et al., 2014).

O receptor AT2 também é um receptor de membrana com sete domínios transmembrana, no entanto o AT2 está envolvido com respostas protetoras do tecido cardíaco. Este receptor é altamente expresso no tecido fetal em humanos e em modelos animais e na fase adulta ele é re-expresso em condições patológicas como a hipertrofia e insuficiência cardíaca, dificilmente sendo detectado em condições fisiológicas (Lemarié et. al., 2010). Muitos estudos tem mostrado um efetivo benéfico da ativação do AT2 na reparação da estrutura vascular e cardíaca (Brede et al., 2001; Akishita et al., 2000; Wu et al., 2002). Estudos sugerem que, quando estimulado pela ANGII o receptor AT2 induz resposta anti-hipertrofica, anti-fibrótica, anti-inflamatória, antioxidante, estimulação da produção de óxido nítrico. Além da ANGII, outros peptídeos podem estar envolvidos com a ação benéfica do receptor AT2 (Jones et. al., 2008; Steckelings et. al., 2010).

Mais recentemente, diversos outros receptores, enzimas e peptídeos pertencentes ao SRA foram identificados com ação biológica. Dentre os quais se destacam principalmente a Ang 1-7, a Ang III, a Ang IV, a ECA2 e o receptor

MAS, os quais têm sido relacionados a eventos fisiológicos e patológicos (Kumar et al., 2012). A angiotensina 1-9 é um metabólito da angiotensina I liberado em resposta a ECA2 e que também pode ser convertida pela ECA em angiotensina (1-7) (Kumar et al., 2012). Flores-Munoz et. al., 2012 avaliou o efeito da angiotensina 1-9 sobre a estrutura do coração em ratos hipertensos e observou que o desenvolvimento da hipertrofia e fibrose cardíaca foi prevenido, sugerindo um papel protetor deste peptídeo. Neste mesmo estudo, ainda, quando o receptor AT2 foi bloqueado, a ação da angiotensina 1-9 foi revertida sugerindo que a ação da Ang 1-9 é mediada via receptor AT2.

O receptor AT2 está envolvido de várias formas com um papel benéfico e protetor no coração, podendo ser alvo para o tratamento de várias doenças cardiovasculares.

Recentemente, tem-se demonstrado que a estimulação do receptor AT2 exerce efeitos benéficos ao sistema cardiovascular. Nesse sentido, a estimulação do receptor AT2 com C21, um agonista específico para este receptor, diminui a inflamação e o estresse oxidativo, reduz a fibrose e melhora a função cardíaca após o infarto do miocárdio, de maneira mais eficiente do que o bloqueador do receptor AT1 (Kaschina et al., 2014). Ainda, há evidências de que a estimulação do receptor AT2 reduz os níveis de marcadores pró-apoptóticos e aumenta os níveis de proteínas anti-apoptóticas no coração (Kaschina et al., 2008), corroborando o papel cardioprotetor do receptor AT2.

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção e a retirada de espécies reativas de oxigênio (ROS) dentro da célula. Entre os fatores que induzem o estresse oxidativo, o aumento de ANGII tem se destacado. Em cultura de cardiomiócitos, além da hipertrofia cardíaca, a ANGII mostrou que está envolvida no aumento da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (Cave et.al., 2005).

Estudos demonstram que o tratamento com antioxidantes como a vitamina C, vitamina E ou glutamina possuem papel benéfico na prevenção ou reversão do estresse oxidativo (Goldfarb, et al., 1994; Walsh, et. al., 1998).

A maior fonte de ROS celular é a mitocôndria. Esta organela é a maior geradora de energia celular. Em cardiomiócitos infartados foi detectado excessiva produção de ROS derivados da mitocôndria (Ide et al., 2001).

Interessantemente, novos estudos descobriram a presença de receptores de angiotensina II na mitocôndria. Os receptores AT1 e AT2 foram localizados na membrana interna da mitocôndria junto com a ANGII. A ANGII parece regular a geração de óxido nítrico e a função mitocondrial (Inagami, 2011). Abadir et. al., 2011 investigou o sistema renina-angiotensina mitocondrial e identificou o receptor AT2 localizado na membrana interna da mitocôndria em monócitos humanos, células hepáticas de camundongo, células do túbulo renal, neurônios e miócitos cardíacos. Os efeitos da ANGII associados ao receptor AT1 e AT2 na mitocôndria ainda são controversos e dependentes do modelo experimental, porém, a descoberta desses receptores abre um leque para novas investigações.

1.5 Composto 21

O composto 21 (C21) é um agonista seletivo não peptídico do receptor AT2 com ação direta. Esse composto é um resultado de esforços em se obter um agonista, a partir do agonista parcial para o receptor AT1 e AT2, o L-162,313, com alta afinidade para o receptor AT2.

Um estudo clínico realizado pela Vicore Pharma publicado em 2016 na Vicore Pharma Annual Reports, onde foi aplicada uma dose única ou doses repetidas de C21 em pacientes saudáveis, verificou que não houve efeitos colaterais graves nesses pacientes e o C21 foi bem tolerado entre todos os indivíduos.

Em 2017, a Agência de Medicina Europeia concedeu o status de droga ao C21 para o tratamento de fibrose cística e muitos estudos têm sido realizados como esforço para desvendar os efeitos do C21 sobre o AT2 no coração.

Kaschina et al., 2008, Rehman et al., 2011 e Steckelings et al., 2010 mostraram que a administração do C21 diminuiu a hipertrofia e fibrose cardíaca em modelos animais de hipertensão arterial.

Um estudo realizado anteriormente em nosso laboratório observou que ratos Wistar machos alimentados com dieta hipersódica (8% NaCl) desenvolveram hipertrofia e fibrose cardíaca. Nesses mesmos ratos, a

expressão de angiotensina II estava aumentada no tecido cardíaco assim como a expressão gênica e proteica do receptor AT1. Esse estudo visou estudar o receptor AT2 nesse modelo experimental e observar se nesse modelo o C21 seria capaz de prevenir a hipertensão, a hipertrofia e fibrose cardíaca.

2. OBJETIVOS

Para entender melhor o papel do sistema renina-angiotensina local e seu envolvimento em processos patológicos cardíacos induzidos pela sobrecarga de sal na dieta, este projeto de pesquisa tem como objetivo:

- Avaliar o papel do receptor AT2 sobre a hipertrofia e fibrose cardíaca induzida pelo alto consumo de sal na dieta;
- Identificar o receptor AT1 e AT2 mitocondrial e entender melhor a influência do sistema renina-angiotensina da mitocôndria sobre o desenvolvimento de hipertrofia miocárdica.

3. MÉTODOS

Os experimentos propostos nesse projeto de pesquisa foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisas – CEP - da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP), protocolo de pesquisa nº 258/13.

3.1. Animais e dietas

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

Ao chegarem ao biotério setorial deste laboratório (LIM 16) os animais passaram por um período de adaptação de 3 dias antes do início do protocolo experimental. Os animais foram acondicionados em gaiolas de plástico (40x33cm) com quatro animais por gaiola e mantidos em ambiente com temperatura mantida entre 22 e 23°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

Após o período de adaptação, os animais foram divididos em quatro grupos de acordo com a concentração de sal na dieta (HarlanTekad, Madison-WI/ EUA) e o tratamento medicamentoso:

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

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

Dieta hipersódica + Composto 21 (HS+C21)

Dieta normossódica + Composto 21 (NS+C21)

O peso corporal dos animais foi avaliado semanalmente da 3ª até a 18ª semana de vida. Na 6ª semana de idade foi realizada a primeira medida da pressão arterial caudal e a partir da 7ª semana, a pressão arterial foi medida quinzenalmente até a 18ª semana de vida. Após este período, os ratos foram transferidos para gaiola metabólica e durante três dias foi avaliado o consumo de ração, ingestão hídrica e coleta de urina para dosagem de sódio e potássio. Em seguida, estes animais foram mortos para coleta de sangue e tecidos e as seguintes variáveis foram analisadas: massa cardíaca total, ventricular esquerda e direita, diâmetro transverso do cardiomiócito e porcentagem de fibrose miocárdica.

3.3. Composto 21

Para verificar se o efeito da estimulação do receptor AT2 tem ação preventiva e protetora sobre a hipertrofia e fibrose cardíaca induzida pela sobrecarga de sal na dieta, os animais dos grupos alimentados com dieta HS ou NS foram subdivididos em um grupo que recebeu composto 21 (0,3 mg/kg/dia) por gavagem e um grupo que recebeu salina. Quantidade preconizada na literatura para uso em ratos (Rehman et. al., 2012).

3.4. Evolução ponderal

Os ratos foram pesados semanalmente a partir do dia em 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 e os valores obtidos correspondem à pressão arterial sistólica. A pressão caudal é medida por meio de um equipamento acoplado a um transdutor de pressão (RTBP 2000 - Kent Scientific Corporation, Torrington, 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, Amherst, New Hampshire, EUA). A pressão de cada animal foi verificada quinzenalmente a partir da 6^a até a 18^a 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 sangue e urina para dosagem de sódio e potássio urinário e plasmático

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 (50 g/ dia/ gaiola) e água (100 mL/ dia/ gaiola). Durante três dias e no mesmo horário, foi pesado o que sobrou da ração e água fornecida, quantificando o consumo de ração, a ingestão hídrica e o volume urinário. A amostra de urina dos animais coletada foi armazenada em *freezer* -20°C para posterior dosagem da concentração de sódio e potássio.

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

O sódio e o potássio urinário e plasmático foram determinados utilizando o espectrofotômetro de chama (modelo FC 280, CELM – São Paulo, Brasil).

3.7. Coleta de tecidos e medida das massas ventricular esquerda, direita e total

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 14 mM (para induzir a despolarização concomitante das fibras cardíacas), solução fisiológica (para retirada do cloreto de potássio) e Dubosq-Brasil (para a fixação do tecido). Após a perfusão, o coração foi retirado e pesado. Os ventrículos foram separados e também pesados, seccionados em corte transversal e incluídos em parafina para análise histológica.

3.8. Medida do diâmetro transverso do cardiomiócito e porcentagem de fibrose miocárdica

3.8.1. Preparação do tecido cardíaco para análises histológicas

3.8.1.1. 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 colocado em caixeta perfurada e identificada, para inclusão do tecido. Este processo de inclusão foi realizado por um processador automático de tecido (Jung-Histokinette 2000 Leica, Nussloch, Alemanha) por um período de 14 horas, descrito a seguir.

O processo de inclusão iniciou pela desidratação, com álcool em concentrações progressivas [imerso no álcool 50% por uma vez, no álcool 70% (1 vez), no álcool 96% (2 vezes) e no álcool absoluto (2 vezes)], seguida da diafanização [álcool absoluto + xilol (v/v)] e xilol (3 vezes). Em seguida, os

tecidos foram imersos em parafina fundida a 60°C. O material parafinado foi incluído em blocos e após solidificação, permaneceu em temperatura ambiente.

Antes de ser cortado, o tecido cardíaco incluso nos blocos de parafina permaneceu por 30 minutos a -20°C. Os blocos foram cortados em micrótomo (Reichert Yung Supercut 2065 Leica, Nussloch, Alemanha) com navalhas descartáveis. Os cortes com espessura de 3 a 4µm foram aderidos em lâminas previamente revestidas por gelatina a 2% (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA). 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.

3.8.1.2. Desparafinização para coloração histológica

Para a realização das colorações dos cortes de tecidos, as lâminas passaram por um processo de desparafinização, ou seja, permaneceram 9 minutos em xilol. Em seguida, as lâminas foram desidratadas, por meio de banho de álcool absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 5 minutos, 2 vezes e seguida de álcool 96% por 3 minutos, 2 vezes. Para finalizar este processo, as lâminas foram imersas em água destilada e processadas para as colorações ou hidratadas em solução salina fosfato-tamponada-PBS 1x, pH 7,4 para a realização de imuno-histoquímica.

3.8.1.3. 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, Permount.

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 11,53 nanômetros de tecido. Foram analisadas aproximadamente 30 fibras, sempre na altura do núcleo. Esta medida foi realizada sob o aumento de 400X e em campos aleatórios.

3.8.1.4. Coloração com tricrômio de Masson

Após o processo de desparafinização, diafanização e hidratação, as lâminas foram coradas com tricrômio de 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. Todo o ventrículo esquerdo e direito foi analisado sob um aumento de 100X. Os resultados foram apresentados em porcentagem de área ocupada pela fibrose.

3.9. Avaliação da expressão gênica dos componentes do SRA

3.9.1 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 nucleoproteicos. Este homogenato foi centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo *Eppendorff* onde foram adicionados 200µL 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 x g. A fase incolor da solução foi transferida para outro tubo ao qual foram acrescentados 500µL 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 x 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 x g, 5 minutos, 4°C) e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi ressuspendido com 100µL de água tratada com 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. Eletroforese em gel de agarose a 1% foi realizada para verificar visualmente a integridade das bandas 28S e 18S do RNA.

3.9.2. 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 4µL tampão de reação 5X + 1µL dNTP mix (10 mM). 2,4µL MgCl₂ (25mM), 6,6µL água Milli-Q autoclavada e 1µL ImProm II. Para cada amostra foi adicionado 15µL 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.

3.9.3. Reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR)

Uma alíquota de 1µL de cDNA foi transferido para tubo livre de RNase e DNase. Foi preparado uma solução mix de reação contendo, para cada amostra, 12.5µL de 2x Rotor-Gene SYBER Green PCR master Mix (Quiagen), primer sense e anti-sense de cada gene avaliado (valor variado), água livre de RNase (Milli-Q). O mix de reação foi homogeneizado em vórtex e para cada tubo contendo amostra de cDNA foi adicionado 24µL desta solução e levado ao Rotor-Gene termociclador (Quiagen).

A seguir mostramos passos do termociclador, o tempo de cada passo, as temperaturas de anelamento (tabela 1) e a sequência dos primers utilizados (tabela 2).

Tabela 1. Etapas RT-PCR, tempo de cada etapa e temperatura de anelamento utilizados em cada gene no tecido cardíaco.

Etapas RT-PCR	Tempo	Temperatura de anelamento
Ativação inicial da reação de PCR	5 min	95 °C
Denaturação	5 s	95 °C
Anelamento	10 s	60 °C
Número de ciclos	35-40	

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'
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'

3.10. Avaliação da expressão proteica dos componentes do SRAA

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

As amostras de tecidos foram pesadas e depois homogeneizadas em tampão de extração proteica (100 mM KCl, 10 mM HEPES, 3 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 10% glicerol, 1 mM DTT, 10 % SDS, 0,1 mL inibidor de proteinase [SIGMA]). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de

Bradford (BIO-RAD, CA, EUA) . Quantidades iguais de proteína para todas as amostras (100µg) foram misturadas a um tampão para SDS e aplicadas nos *slots* do gel SDS – PAGE (sódio duodecilsulfatopoliacrilamida) 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. No passo seguinte, as membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado a 5% misturados a TBS e incubadas durante a noite. Após este procedimento, as membranas foram lavadas com TBST e posteriormente incubadas com anticorpos primários durante a noite. A seguir as membranas foram lavadas com TBST e incubadas com anticorpos secundários ligados a peroxidase (HRP) por 2 horas. O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado com o substrato quimioluminescente ECL (Amersham Biosciences Corp., UK).

Os resultados foram analisados comparando as bandas obtidas entre os diferentes grupos de dieta e tratamento estudados.

Os anticorpos anti-ECA, anti-AT₁ e anti-AT₂ foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (CA–EUA) e os anticorpos anti-angiotensinogênio e anti-renina foram adquiridos da Fitzgerald Industries International (MA-EUA).

3.11 Expressão de angiotensina II tecidual

Após desparafinização, as lâminas foram levadas à uma panela de vapor com tampão citrato por 30 minutos para exposição dos epítomos. Os tecidos foram circutados 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 biotinilado 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 ANGII em ambos os ventrículos foi realizada em microscópio óptico com aumento de 200x, sendo a positividade contada por porcentagem de área.

3.12 Imunolocalização do receptor AT1 e AT2 mitocondrial

3.12.1. Preparação do tecido cardíaco para o processo de desidratação, filtração e inclusão em resina

Após duas horas no paraformol em temperatura ambiente, o material foi submetido a três lavagens em solução de lavagem (NaCl, sacarose e água destilada) durante um tempo total de um minuto. Em seguida os tecidos foram tratados com 2 mL de acetato de uranila 1% *overnight* para reduzir a extração de ácidos nucleicos, fosfolipídios, proteínas e glicogênio do tecido. Após essa etapa o material foi lavado três vezes em solução de lavagem.

3.12.2. Desidratação, filtração e inclusão em resina de araldite

O processo de inclusão começou pela desidratação através de progressivos banhos de acetona por dez minutos em diferentes temperaturas: 30°, 70°, 95° C. Em seguida, o material foi submetido a dois banhos de acetona 100° C por dez minutos finalizando com dois banhos de óxido de propileno por quinze minutos.

Para o processo de infiltração, uma solução resina de araldite foi diluída em óxido de propileno na proporção de 1:2. Foi adicionado 2 mL dessa solução em frascos contendo o material e deixado no agitador por trinta minutos. Após trinta minutos, a solução foi descartada e uma solução de resina de araldite foi diluída em óxido de propileno na proporção de 1:1, colocada nos frascos

contendo o material e permaneceu no agitador durante duas horas. Para finalizar, após as duas horas, a solução foi descartada e 2 mL de resina pura foi colocada em cada frasco com o material e colocados na estufa a 58° C por quarenta minutos.

Os tecidos foram inclusos em resina de araldite e mantidos na estufa 58°/60° C por setenta e duas horas.

Os blocos foram cortados em micrótomo com facas de vidro e aderidos em telas de níquel com películas de parlódio.

3.12.3. Protocolo 1: Reação de imunogold

As telas foram lavadas com água destilada durante dez minutos. Em seguida foram pré-incubadas com TBS 0,05M de pH 7,6 contendo glicina 0,05% e BSA 1,0% durante dez minutos à temperatura ambiente. O material foi lavado três vezes em TBS 0,05M de pH 7,6 durante cinco minutos à temperatura ambiente. Após a lavagem o bloqueio dos sítios inespecíficos foi feito com tampão TBS 0,05M contendo BSA 1% e Tween 20 0,05% durante trinta minutos à temperatura ambiente. Logo em seguida as telas contendo o material foram incubadas com o anticorpo primário anti-AT1 (Proteimax, São Paulo, Brasil) ou anti-AT2 (Proteimax, São Paulo, Brasil) dissolvidos em TBS 0,05M contendo BSA 1% *overnight*.

Após o período de incubação com o anticorpo primário, as telas foram lavadas em três séries durante cinco minutos cada com tampão TBS 0,05M contendo BSA 0,5%. As telas foram incubadas por trinta minutos com anticorpo secundário conjugado com partículas de ouro (6nm ou 12nm) dissolvidos em TBS 0,05M contendo BSA 1%. Após essa etapa as telas foram lavadas em três séries durante cinco minutos cada com TBS 0,05M e água destilada, respectivamente. O excesso de água foi retirado com papel filtro e as telas submetidas a contrastação.

3.12.4. Contrastação das telas com citrato de chumbo

As telas foram coradas com citrato de chumbo (Reynolds), durante 60 segundos.

Usando um software de imagem (Image J) as telas foram analisadas.

As imagens obtidas com a contração de chumbo mostraram falta de nitidez e muito ruído na imagem, impossibilitando a análise e investigação da marcação. Uma segunda opção de constratação foi testada e descrita abaixo. A seguir estão duas ilustrações de fotos da tela sem imunomarcacão e duas com imunomarcacão.

Figura 3. Imagem de microscopia eletrônica de mitocôndrias do ventrículo esquerdo de rato Wistar macho contrastada com citrato de chumbo.

Figura 4. Imagem de microscopia eletrônica de mitocôndrias do ventrículo esquerdo de rato Wistar macho contrastada com chumbo.

Figura 5. Imagem de microscopia eletrônica de mitocôndrias do ventrículo esquerdo de rato Wistar macho marcadas com anti-AT2 conjugado com partículas de ouro contrastada com citrato de chumbo.

Figura 6. Imagem de microscopia eletrônica de mitocôndrias do ventrículo esquerdo de rato Wistar macho marcadas com anti-AT1 conjugado com partículas de ouro constratado com citrato de chumbo.

3.12.5. Contrastação das telas com acetato de uranila

Como alternativa, as telas submetidas ao protocolo 1 foram contrastadas com acetato de uranila durante 5 minutos. Após 30 minutos secando foram analisadas no microscópio eletrônico.

As imagens ficaram com menos resíduos, porém não foi encontrada nenhuma marcação no ventrículo direito e esquerdo.

A seguir está uma ilustração da tela contrastada com acetato de uranila.

Figura 7. Imagem de microscopia eletrônica de mitocôndrias do ventrículo esquerdo de rato Wistar macho marcadas com anti-AT2 conjugado com partículas de ouro contrastada com acetato de uranila.

3.12.6. Controle positivo

Como controle positivo, rins direito e esquerdo de ratos Wistar após 2 horas no paraformol foram submetidos ao processo de desidratação, filtração e inclusão de resina descritos acima.

As telas foram coradas com acetato de uranila e analisadas no microscópio eletrônico.

Apesar de não termos encontrado marcação nas mitocôndrias, partículas de ouro foram localizadas em outras regiões do tecido (vide figuras a seguir).

Figura 8. Imagem de microscopia eletrônica de célula renal de rato Wistar macho marcadas com anti-AT2 conjugado com partículas de ouro constratado com acetato de uranila.

3.12.7. Protocolo 2: Imuno marcação com ouro coloidal

1º dia: As telas foram hidratadas com uma gota de água filtrada. Em seguida, incubadas por 1 minuto a temperatura ambiente, em solução de metaperiodato de sódio filtrado em filtro de 0,22μm e diluída 1/5 em água destilada. As telas foram lavadas 4 vezes em água ultrafiltrada por 5 minutos cada sob agitação constante. O material foi incubado com uma pré-gota de ProteinBlock para bloqueio dos sítios inespecíficos por 5 minutos a temperatura ambiente e em seguida incubado em ProteinBlock por 1 hora a temperatura ambiente. As telas foram incubadas em câmara úmida com anticorpo primário

anti-AT1 (Proteimax, São Paulo, Brasil) ou anti-AT2 (Proteimax, São Paulo, Brasil) por 16 horas a 4°C. Para as telas controle negativo foi sempre omitido o anticorpo primário.

2º dia: As telas foram lavadas com as seguintes soluções: PBS pH 7,3 + 1% BSA por 5 minutos sob agitação constante, 4 vezes em PBS pH 7,3 por 5 minutos sob agitação constante, 4 vezes em PBS pH 8,2 + 1% BSA por 5 minutos sob agitação constante. Após as lavagens, as telas foram incubadas no anticorpo secundário marcado com ouro de diferentes tamanhos (6nm ou 12nm) por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida as telas foram lavadas 4 vezes em PBS+BSA 1% pH 7,3 por 5 minutos sob agitação constante. As telas foram deixadas secando em placas de Petri revestidas com papel filtro de um dia para o outro.

As telas foram coradas com solução de nitrato de chumbo por 5 minutos.

Não foi possível identificar marcação com este protocolo no ventrículo direito e esquerdo. A seguir está uma figura ilustrativa de cortes submetidos a marcação com anticorpo anti-AT2, respectivamente.

Figura 9. Imagem de microscopia eletrônica de mitocôndrias do ventrículo esquerdo de rato Wistar macho marcadas com anti-AT2 conjugado com partículas de ouro constraçado com citrato de chumbo.

A falta de marcação de receptores AT1 e AT2 através de microscopia eletrônica no miocárdio, possivelmente não foi um problema de protocolo já que em rins de ratos Wistar machos a marcação foi localizada, sugerindo uma irreprodutibilidade de resultados descritos por Abadir et. al., 2011. O problema da irreprodutibilidade de resultados é um assunto amplamente discutido na literatura atualmente (Bolli, 2015).

3.13. 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 adequado pós-teste. Também foi utilizada a análise de variância de dois fatores (two-way-ANOVA) com pós-teste de Bonferroni. Erro α menor do que 5% foi considerado para aceitar diferenças como sendo significantes.

4. RESULTADOS

4.1 Evolução ponderal

A evolução ponderal dos animais do grupo NS, HS, HS+C21 e NS+C21 está representada na **figura 10**.

O peso corpóreo do grupo HS foi menor quando comparado ao grupo NS na 8ª semana de vida e esse perfil se manteve até a 18ª semana de idade. Da 14ª a 18ª semana de idade, o peso corpóreo do grupo HS+C21 foi maior quando comparado com o grupo HS. Não houve diferença entre os grupos NS e HS+C21. Na 7ª semana o peso corpóreo do grupo NS+C21 foi maior quando comparado com o grupo NS e essa diferença se manteve até a 18ª semana.

Evolução ponderal

Figura 10. Evolução ponderal de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=15), hipersódica (HS, n=15), hipersódica + composto 21 (HS+C21, n=14) ou normossódica + composto 21 (NS+C21, n=16) 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 vs. NS; #P<0.05 NS+C21 vs. NS; &P<0.05 HS+C21 vs. NS.

4.2 Pressão arterial caudal

Na 6ª semana de vida, não houve diferença na pressão arterial caudal (PAC) entre os quatro grupos experimentais. Porém, a PAC foi maior no grupo HS e HS+C21 a partir da 7ª semana de idade quando comparada com o grupo NS e esse perfil foi mantido até a 18ª semana de idade. A PAC do grupo HS+C21 foi menor quando comparado com o grupo HS, exceto na décima primeira e na décima terceira semana de idade. Não houve diferença entre os grupos NS e NS+C21 até a 17ª semana de idade dos ratos e na 18ª a PAC do grupo tratado com o C21 foi maior em relação aos animais do grupo NS (Figura 11).

Figura 11. Pressão arterial caudal (mmHg) de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=15), hipersódica (HS, n=15), hipersódica + composto 21 (HS+C21, n=14) ou normossódica + composto 21 (NS+C21, n=16) desde o desmame até a 18ª semana de idade. Variável medida na 6ª semana e quinzenalmente a partir da 7ª até a 18ª semana de idade. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. *P<0.05 vs. NS; #P<0.05 vs. HS.

4.3 Consumos de ração, ingestão hídrica e volume urinário

Os resultados a seguir foram avaliados, durante 24 horas, na 17ª semana de idade dos ratos mantidos em gaiolas metabólicas individuais.

O consumo de ração dos grupos HS e HS+C21 foram maiores quando comparado ao grupo NS e NS+C21. Não houve diferença entre o grupo NS e NS+C21. A ingestão hídrica e volume urinário também foram maiores nos animais dos grupos HS e HS+C21 quando comparado como grupo NS e também não houve diferença entre os grupos NS e NS+C21 (**Figura 12**).

A - Consumo de ração (24h)

Figura 12. Consumo de ração **(A)**, Ingestão hídrica **(B)** e Volume urinário **(C)** de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=7), hipersódica (HS, n=8), hipersódica + composto 21 (HS+C21, n=6) ou normossódica +composto 21 (NS+C21, n=8), avaliados na 17ª semana de idade. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. *P<0.05 vs. NS; #P<0.05 vs. NS+C21.

4.4. Excreção de sódio e potássio urinário de 24 horas, sódio e potássio plasmático e hematócrito

A excreção de sódio urinário foi maior nos grupos HS e HS+C21 comparado com os grupos NS e NS+C21. O sódio plasmático não foi diferente entre os grupos experimentais.

O hematócrito foi avaliado na 18ª semana de vida e não foi diferente entre os quatros grupos experimentais estudados (**Figura 13**).

Figura 13. Sódio urinário (**A**), sódio plasmático (**B**), hematócrito (**C**) potássio urinário (**D**) sódio plasmático (**E**) de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=8), hipersódica (HS, n=7), hipersódica+composto 21 (HS+C2, n=6) u normossódica+composto 21 (NS+C21, n=8) desde o desmame até a 18ª semana de idade. Variável medida na 18ª semana de idade. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. *P<0.05 vs. NS.

4.5 Massa cardíaca total, ventricular esquerda e ventricular direita, corrigidas pelo comprimento da tíbia.

A massa cardíaca total, do ventrículo esquerdo e do ventrículo direito não diferiu entre os quatro grupos (**Figura 14**). Quando corrigida pelo comprimento da tíbia (**Figura 15**) as massas também não foram diferentes entre os grupos.

Figura 14. Massa cardíaca total (**A**), Massa ventricular esquerda (**B**) e Massa ventricular direita (**C**) de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=15), hipersódica (HS, n=15), hipersódica + composto 21 (HS+C21, n=13) ou normossódica + composto 21 (NS+C21, n=16) desde o desmame até a 18^a semana de idade. Variável medida na 18^a semana de idade. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

Figura 15. Massa cardíaca total **(A)**, Massa ventricular esquerda **(B)** e Massa ventricular direita **(C)** corrigida pelo comprimento da tibia (g/cm) de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=15), hipersódica (HS, n=15), hipersódica + composto 21 (HS+C21, n=13) ou normossodica + composto 21 (NS+C21, n=16) desde o desmame até a 18^a semana de idade. Variável medida na 18^a semana de idade. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

4.6 Diâmetro transverso do cardiomiócito

Os resultados a seguir foram obtidos através da análise do ventrículo direito e esquerdo de cada animal.

O diâmetro transverso do cardiomiócito foi maior no grupo HS quando comparado com o grupo NS em ambos os ventrículos. Não houve diferença entre os grupos NS e HS+C21 tanto no ventrículo esquerdo como no direito (Figura 16).

Figura 16. Diâmetro transverso do cardiomiócito do ventrículo esquerdo **(A)** e, diâmetro transverso do cardiomiócito do ventrículo direito **(B)**, de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=3), hipersódica (HS, n=4) ou hipersódica + composto 21 (HS+C21, n=3), desde o desmame até a 18^a semana de idade. Variável medida na 18^a semana de idade. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. *P<0.05 vs. NS; #P<0.05 vs. NS+C21; &P<0.05 vs. HS.

4.7 Porcentagens de fibrose intersticial

A quantificação da fibrose foi realizada em ambos os ventrículos. A área de porcentagem de fibrose foi maior no grupo HS no ventrículo esquerdo quando comparado com o grupo NS. No entanto, no ventrículo direito, não houve diferença entre os grupos (**Figura 17**).

Figura 17. Quantificação da fibrose intersticial do ventrículo esquerdo **(A)** e, quantificação da fibrose intersticial do ventrículo direito **(B)**, de ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n=7), hipersódica (HS, n=7), hipersódica + composto 21 (HS+C21, n=6) ou normossódica + composto 21 (NS+C21, n=8) desde o desmame até a 18^a semana de idade. Variável medida na 18^a semana de idade. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. *P<0.05 vs. NS; #P<0.05 vs. NS+C21.

4.8 Expressão gênica e proteica dos componentes do SRA nos ventrículos esquerdo.

A expressão gênica do angiotensinogênio, da renina, ECA, dos receptores AT_1 e AT_2 no ventrículo esquerdo foram avaliados na 18ª semana de idade dos animais dos grupos NS, NS+C21, HS e HS+C21. GAPDH foi quantificado e usado como gene controle e os seus resultados não variaram entre os grupos experimentais. (Figuras 18 e 19).

A

B

D

Figura 18. Expressão gênica e proteica do angiotensinogênio **(A)**, renina **(B)**, enzima conversora de angiotensina (ECA) **(C)**, AT2 **(D)**, AT1 **(E)**, no ventrículo esquerdo em ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n= 7), normossódica + composto 21 (NS+C21, n=8), hipersódica (HS, n=7) ou hipersódica + composto 21 (HS+C21, n= 6) desde o desmame até a 18^a semana de idade. Variável avaliada na 18^a semana de idade. Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média. * $p < 0,05$ vs. NS.

A expressão proteica do angiotensinogênio, da renina, ECA, dos receptores AT₁ e AT₂ no ventrículo direito foi avaliada na 18ª semana de idade dos animais dos grupos NS, NS+C21, HS e HS+C21. GAPDH foi a proteína controle e os seus resultados não variaram entre os grupos experimentais.

No ventrículo direito a expressão gênica da ECA foi influenciada pelo C21 nos grupos alimentados com as dietas NS e HS. A expressão gênica do receptor AT₂ foi menor em todos os grupos comparado com os ratos do grupo controle.

A expressão gênica do receptor AT₁ no ventrículo direito foi maior no grupo NS+C21 quando comparado com o grupo HS. Entre os grupos NS, HS+C21 e NS+C21 não houve diferença significativa.

A expressão proteica não foi diferente entre os grupos. A expressão gênica da renina e do AGT também não foram diferentes (**Figura 19**).

B

C

D

Figura 19. Expressão gênica e proteica do angiotensinogênio (**A**) renina (**B**), enzima conversora de angiotensina (ECA) (**C**) AT2 (**D**) AT1 (**E**) no ventrículo direito em ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n= 7), normossódica + composto 21 (NS+C21, n=8), hipersódica (HS, n=7) ou hipersódica + composto 21 (HS+C21, n= 6) desde o desmame até a 18^a semana de idade. Variável avaliada na 18^a semana de idade. Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média. *P<0.05 vs. NS; #P<0.05 vs. NS+C21.

4.9. Conteúdo de angiotensina II no ventrículo esquerdo e direito

O conteúdo de angiotensina II foi maior no grupo NS+C21 e HS comparado com os outros grupos no ventrículo esquerdo.

A angiotensina II tecidual não foi diferente entre os grupos no ventrículo direito (**Figura 20**).

Figura 20. Conteúdo de angiotensina II no ventrículo esquerdo (**A**) e ventrículo direito (**B**) em ratos Wistar alimentados com dieta normossódica (NS, n= 7), normossódica + composto 21 (NS+C21, n=8), hipersódica (HS, n=7) ou hipersódica + composto 21 (HS+C21, n= 6) desde o desmame até a 18^a semana de idade. Variável avaliada na 18^a semana de idade. Os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média. *P<0.05 vs. NS.

5. DISCUSSÃO

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 e pelo tratamento com o composto 21. Um estudo anterior realizado neste laboratório por Coelho et al., 2006, com o mesmo modelo experimental, observou que o peso corpóreo dos animais alimentados com dieta hipersódica apesar de consumirem maior quantidade de ração foi menor quando comparado com o grupo de animais alimentados com dieta hipossódica ou normossódica. Este estudo constatou que o gasto energético de ratos alimentados com dieta pobre em sal foi menor e o inverso foi verificado nos ratos alimentados com dieta rica em sal. No presente estudo, o peso corpóreo dos animais do grupo HS foi menor na sétima semana de idade quando comparado com o grupo que recebeu dieta normossódica e se manteve até a décima oitava semana confirmando resultados obtidos no estudo de Coelho et al., 2006. Na décima quarta semana, o peso dos animais que receberam dieta hipersódica e o tratamento com o C21 foi maior quando comparado com o grupo HS, e esse perfil se manteve até a décima oitava semana. O Composto 21 preveniu o menor ganho de peso na fase adulta observado nos animais alimentados com dieta hipersódica. Os animais do grupo NS+C21 engordaram mais quando comparado com o grupo NS, indicando uma ação do composto 21 no ganho de peso desses animais. Um estudo de Benjamin et. al., 2015 mostrou um efeito supressor da dieta rica em sal sobre o ganho de peso em camundongos e observou que a dieta rica em sal modula a evolução ponderal através do receptor AT2. Eles observaram que em camundongos o alto consumo de sal na dieta suprimiu o ganho de peso quando comparado com o grupo controle mesmo os grupos experimentais consumindo mais ração, corroborando com resultados deste trabalho.

O consumo de ração dos animais do grupo HS e HS+C21 foi maior quando comparado com os ratos do grupo NS e NS+C21, corroborando os resultados de Coelho et al., 2006 e Ferreira et. al. 2010, estudos desenvolvidos

neste laboratório, onde os ratos que receberam dieta hipersódica também consumiram maior quantidade de ração quando comparado com os animais que se alimentaram com dieta normossódica.

A ingestão hídrica foi maior nos grupos que se alimentaram com dieta rica em sal e consequentemente maior volume urinário quando comparado com o grupo que recebeu dieta normossódica. Este achado confirma resultados anteriores deste laboratório (da Costa Lima et al., 1997).

O sódio plasmático e o hematócrito não foram diferentes entre os grupos experimentais estudados indicando que a hipertrofia cardíaca desenvolvida pelos animais não é efeito de uma expansão volêmica.

Em um estudo anterior realizado em nosso laboratório, foi observado que a pressão arterial dos animais que receberam sobrecarga de sal na dieta, desde o desmame até 72ª semana de idade, foi maior a partir da 7ª semana de vida (da Costa Lima et al., 1997). Com base neste estudo, a medida da pressão arterial caudal já definido antes, de ratos Wistar tratados com dieta NS, HS e HS+C21 foi realizada na 6ª semana e após isso, quinzenalmente a partir da 7ª semana de idade.

Como verificado em estudos prévios em nosso laboratório, a PAC na 6ª semana de idade não foi diferente entre os grupos, porém na 7ª semana, a PAC nos grupos HS foi maior quando comparado com o grupo NS e este perfil se manteve até a 18ª semana de idade. No entanto, a pressão do grupo que foi alimentado com dieta hipersódica e que recebeu o tratamento com o composto 21 foi menor quando comparado com o grupo HS, exceto na décima primeira e décima terceira semana sugerindo uma ação do C21 na diminuição da pressão arterial, mas não o suficiente para se igualarem aos valores do grupo NS. A PAC do grupo NS+C21 não foi diferente quando comparado com o grupo NS. Embora muitos estudos envolvendo o composto 21 usam uma dose de 1mg/kg/dia pode ser que essa dose não seja suficiente para estimular o receptor AT2 ao máximo. Experimentos preliminares citado no estudo de Rehman et. al., 2012 observou que não houve ação do C21 na dose de 0.5mg/kg/dia e na dose de 3mg/kg/dia a ação não diferiu da quantidade de 1mg/kg/dia. No entanto, uma estudo de curva-resposta do C21 é necessário para elucidar sua ação em resposta a quantidade administrada.

A massa cardíaca total, ventricular esquerda e ventricular direita, corrigidas pelo comprimento da tíbia e pelo peso corpóreo não foi diferente entre os grupos. Quando corrigidas pelo comprimento da tíbia ou pelo peso corpóreo os valores entre os grupos também não foi diferente. Olivotto et al., 2008 mostraram em seu estudo que a massa do ventrículo esquerdo foi normal em aproximadamente 20% dos pacientes com cardiomiopatia hipertrófica. Esse estudo e os resultados do presente trabalho sugerem que a medida da massa cardíaca pode não ser o melhor indicador de hipertrofia cardíaca.

O diâmetro transversal do cardiomiócito foi menor nos grupos NS e HS+C21 quando comparado com o grupo HS tanto no ventrículo esquerdo quanto no ventrículo direito. O DTC é um indicador de hipertrofia miocárdica (Katayama et. al., 2014) e o C21 foi capaz de prevenir o aumento do diâmetro dos cardiomiócitos dos animais que receberam este tratamento. As análises do diâmetro transversal dos cardiomiócitos do grupo NS+C21 estão em andamento.

A porcentagem de fibrose intersticial foi maior no grupo HS e HS+C21 quando comparado com o grupo NS e NS+C21 no ventrículo esquerdo. Não houve diferença entre os grupos NS e NS+C21. No entanto, no ventrículo direito, a porcentagem de FI foi menor nos animais dos grupos HS+C21 e NS+C21, indicando uma possível prevenção de fibrose no grupo tratado com C21 no ventrículo direito.

A expressão gênica e proteica dos componentes do sistema renina-angiotensina não foi alterada pelo tratamento com o composto 21 no ventrículo esquerdo e direito. Possivelmente a ação preventiva do composto 21 sobre a hipertrofia e fibrose cardíaca induzida pelo alto consumo de sal na dieta é independente do estímulo do receptor AT2. Mais estudos adicionais são precisos para elucidar a ação do C21 sobre a expressão gênica dos componentes do SRA.

A sobrecarga de sal aumentou o conteúdo de angiotensina II tecidual no ventrículo esquerdo dos ratos alimentados com sobrecarga de sal na dieta confirmando achados Katayama et. al., 2014 de que a sobrecarga de sal aumenta a concentração de angiotensina II no coração. No presente trabalho o composto 21 preveniu a hipertrofia cardíaca induzida pelo alto consumo de sal na dieta. Esses resultados juntos permitem conjecturar que o composto 21

inibiu o efeito da angiotensina II local sobre o desenvolvimento da hipertrofia miocárdica.

6. CONCLUSÕES

- A hipertrofia e fibrose cardíaca foram prevenidas pelo composto 21.
- A pressão arterial induzida pela sobrecarga de sal na dieta foi atenuada pelo tratamento com o composto 21.

7. ANEXOS

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **31/07/2013**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **258/13** intitulado: **“AVALIAÇÃO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA INTRACELULAR CARDÍACO INDUZIDO PELO ALTO CONSUMO DE SAL.”** que utilizará **48** animais da espécie **Rattus norvegicus** - linhagem **Wistar**, apresentado pelo **Departamento de CLÍNICA MÉDICA**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Joel Claudio Heimann
Pesquisador (a) Executante: Ellen Priscila Brito Dopona

CEP-FMUSP, 01 de Agosto de 2013.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

8. REFERÊNCIAS

Abadir PM, Foster B, Crow M, Cooke CA, Rucker JJ, Jain A, Smith BJ, Burks TN, Cohn RD, Ferdako NS, Carey RM, O'Rourke B, Walston JD. Identification and characterization of a functional mitochondrial angiotensin system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011;108:14849 –14854.

Abel ED, Doest T. Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research*, 2011; 90: 234–242.

Álvarez MC, Caldiz C, Fantinelli JC, Garciarena CD, Console MG, Chiappe de Cingolani GE, Mosca SM. Is cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats the cause or the consequence of oxidative stress? *Hypertens Res*, 2008; 31:1465-1476.

Basso N, Terragno NA. History about the discovery of renin-angiotensin system. *Hypertension*, 2001;38:1246-1249.

Beauchamp GK, Engelman K. High salt intake. Sensory and behavioral factors. *Hypertension*, 1991; 17:1-176-81.

Benjamin JW, Voong S, Morales-Santiago FI, Kahn MZ, Ni J, Littlejohn NK, Claflin KE, Burnett CML, Pearson NA, Lutter ML, Grobe JL. Dietary sodium suppresses digestive efficiency via the Renin-angiotensin system. *Scientific Reports*, 2015; 5:11123.

Bolli R. Reflections of irreproducibility of Science papers. *Circ Res*, 2015; 117:665-666.

Bunkenburg B, van Amelsvoort T, Rogg H, Wood JM. Receptor-mediated effects of angiotensin II on growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 1992; 20:746-754.

Cavalera M, Wang J, Frangogiannis NG. Obesity, metabolic dysfunction, and cardiac fibrosis: pathophysiological pathways, molecular mechanisms, and therapeutic opportunities. *Translational Research*, 2014;164:323–335.

Cave AC, Grieve DJ, Johar S, et al. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in cardiac pathophysiology. *Philos Trans R Soc*, 2005;360:2327-34.

Chen JQ, Delannoy M, Cooke C, Yager JD. Mitochondrial localization of ER α and ER β in human MCF7 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004;286:E1011-E1022.

Chunhong Shao, Li Yu & Lie Gao. Activation of angiotensin type 2 receptors partially ameliorates streptozotocin-induced diabetes in male rats by islet protection. *Endocrinology*, 2014;155:793–804.

Clause KC, Barker TH. Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair. *Curr. Opin. Biotechnol*, 2013;24:830–833.

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.

Cook JL, Zhang Z, Re RN. In vitro evidence for an intracellular site of angiotensin action. *Circ Res*, 2001;89:1138-1146.

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.

Danser AHJ, Saris JJ, Schuitj MP, van Kats JP. Is there a local rennin-angiotensin system in the heart? *Cardiovascular research*, 1999; 44:252-265.

De Gasparo M, Katt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. *Pharmacol Rev*, 52:415–472, 2000.

De Mello WC, Frohlich ED. On the local cardiac renin angiotensin system. Basic and clinical implications. *Peptides*, 2011;32:1774-1779.

Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan, Breitbart RE, Acton S. Angiotensin I to angiotensin 1-9 related carboxypeptidase (ACE2) converts – a novel angiotensin-converting enzyme. *Circ Res*, 2000; 87:e1-e9.

Dostal DE, Rothblum KN, Chernin MI, Cooper GR, Baker KM. Intracardiac detection of angiotensinogen and renin: a localized renin–angiotensin system in neonatal rat heart. *Am J Physiol*, 1992;263:C838–C850.

Ferreira DN, Katayama IA, Oliveira IB, Rosa KT, Furukawa LNS, Casarini, DE, Coelho MS, Heimann JC. Salt induce cardiac hypertrophy and interstitial fibrosis are due to blood pressure-independent mechanism in rats Wistar. *J Nutrition*, 2010; 140:1742-1751.

Flores-Munoz M, Work LM, Douglas K, Denby L, Dominiczak AF, Graham D, Nicklin SA. Hypertensive rat via the angiotensin type 2 receptor angiotensin-(1-9) attenuates cardiac fibrosis in the stroke-prone spontaneously. *Hypertension*, 2012;59:300-307.

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.

Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*. 2010; 123:4195–4200.

Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med*, 2008; 264: 224–236.

Goldfarb AH, McIntosh MK, Boyer BT, Fatouros J. Vitamin E effects on indexes of lipid peroxidation in muscle from DHEA-treated and exercised rats. *J Appl Physiol*, 1994;76:1630-5.

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.

Harada K, Komuro I, Shiojima I, Hayashi D, Kudoh S, Mizuno T, Kijima K, Matsubara H, Sagaya T, Murakami K, Yazaki Y. Pressure overload induces cardiac hypertrophy in angiotensin II type I receptor knockout mice. *Circulation*, 1999; 97:1952-1959.

He FJ, Jiafu L, MacGregor GA. Effect of longer-term modest salt reduction on blood pressure. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2013;4 Art. No.: CD004937.

Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res*, 2001;88:529-35.

Inagami T. Mitochondrial angiotensin receptors and aging. *Circ Res*, 2011;109:1323-1324.

Jehle AB, et al. A Non-peptide Angiotensin II Type 2 Receptor Agonist Does Not Attenuate Post-Myocardial Infarction Left Ventricular Remodeling in Mice. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2012;59:363–368.

Jones ES, Vinh A, McCarthy AC, Gaspari TA, Widdop RE. AT2 receptors: functional relevance in cardiovascular disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 2008;120:292–316.

Jöhren O, Dendorfer A, Dominiak P. Cardiovascular and renal function of angiotensin II type-2 receptors. *Cardiovascular Research*, 2004;62:460–467.

Kaschina E, Grzesiak A, Li J, Foryst-Ludwig A, Timm M, Rompe F, Sommerfeld M, Kemnitz UR, Curato C, Namsolleck P, Tchope C, Hallberg A, Alterman M, Hucko T, Paetsch I, Dietrich T, Schnackenburg B, Graf K, Dahlof B, Kintscher U, Unger T, Steckelings UM. Angiotensin II type 2 receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction? *Circulation*, 2008;118:2523–32.

Kaschina E, Lauer D, Schmerler P, Unger T, Steckelings UM. AT2 receptors targeting cardiac protection post-myocardial infarction. *Curr Hypertens Rep*, 2014;16:441.

Keidar S, Kaplan M, Lazarovich AG. ACE2 of the heart: From angiotensin I to angiotensin (1-7). *Cardiovasc Research*, 2007;73:463–469.

Kempf T, Wollert KC. Nitric oxide and the enigma of cardiac hypertrophy. *Bioessays*. 2004; 6: 608-15.

Kim S, Ohta K, Hamaguchi A, Omura T, Yurimura T, Miura K, Iwao H. Angiotensin II induces cardiac phenotypic modulation and remodeling in vivo in rats. *Hypertension*, 1995;25:1252-1259.

Katayama IA, Pereira RC, Dopona EPB, Shimizu MHM, Furukawa LNS, Oliveira IB, Heimann, JC. High-salt diet induces cardiomyocyte hypertrophy in rats in response to local angiotensin II type 1 receptor activation. *J. Nutri*, 2014; 144:1571-1578.

Kumar R, Thomas CM, Yong QC, Chen W, Baker KM. The intracrine renin-angiotensin system. *Clin Sci (Lond)*, 2012;123:273-84.

Langenfeld MRW, Schmider RE. Salt and left ventricular hypertrophy: what are the links? *J Hum Hyper*, 1995;9:909-916.

Laurent GJ. Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation in mass. *Am J Physiol*, 1987;252:C1-C9.

Lemarié CA, Schiffrin EL. The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2012;11;19.

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.

Li Y, Li XH, Yuan H. Angiotensin II type-2 receptor-specific effects on the cardiovascular system. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2012;2:56–62.

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;2:117-22.

Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380:2224-60. Erratum in: *Lancet*. 2013;381:628.

Lindpaintner K, Jin M, Wilhelm MJ, Suzuki F, Linz W, Schoelkens BA, Ganten D. Intracardiac generation of angiotensin and its physiologic role. *Circulation*, 1988;77:1-18.

Long CS, Henrich CI, Simpson PC. A growth factor for cardiac myocytes is produced by cardiac nonmyocytes. *Cell Reg* 1991; 2:1081-1085.

Malhotra R, Sadoshima J, Izumo S. Mechanical stretch upregulates expression of the local renin–angiotensin system genes in cardiac myocytes in vitro. *Circulation*, 1994;90:I-194 (abstract).

Medugorac I. Characterization of intramural collagen in mammalian left ventricle. *Basic Res Cardiol*, 1982;77:589-598.

Morgan T, Aubert JF, Brunner H. Interaction between sodium intake, angiotensin II, and blood pressure as a cause of cardiac hypertrophy. *Am J Hypertens*, 2001;14:914-920.

Mozaffarian D, Fahimi S, Gitanjali M, Micha R, Khatibzadeh S, Engell RE, Lim S, Danaei G, Ezzati M, Powles J. Global sodium consumption and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med*, 2014;371:624-634.

Nakagami H, Takemoto M, Liao JK. NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 2003; 35:851-859.

Olivetto I, Maron MS, Lesser JR, Rega L, Casolo G, De Santis M, Quarta G, Nistri S, Cecchi F, Salton CJ, Udelson JE, Manning WJ, Maron BJ. Assessment and significance of left ventricular mass by cardiovascular magnetic resonance in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 2008;12;52:559-66.

Pandey A and Gaikwad. AT2 receptor agonist Compound 21: A silver lining for diabetic nephropathy. *Eur J Pharmacol*. 2017;815:251-257.

Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ. Stimulation of collagen production by transforming growth factors- β 1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension*, 2002;39:258-263.

Rehman A, Leibowitz A, Yamamoto N, Rautureau Y, Paradis P, Schiffrin EL. Angiotensin type 2 receptor agonist compound 21 reduces vascular injury and myocardial fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 2012;59:291-299.

Sadoshima JI, Xu Y, Slayter HS, Izumo S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced cardiac hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell*, 1993;95:977-984.

Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. *Circ Res*, 1993;73:413-423.

Savoia, C., Ebrahimian, T., He, Y., Gratton, J. P., Schiffrin, E. L., & Touyz, R. M. (2006). Angiotensin II/AT2 receptor-induced vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats involves nitric oxide and cGMP-dependent protein kinase. *J Hypertens*, 2006;24:2417-2422.

Savoia, C., Tabet, F., Yao, G., Schiffrin, E. L., & Touyz, R. M. Negative regulation of RhoA/Rho kinase by angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells: role in angiotensin II-induced vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 2005;23:1037-1045.

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; 94:1304-1309.

Shyu KG, Chen JJ, Shih NL, Chang H, Wang DL, Lien WP, Liew CC. Angiotensinogen gene expression is induced by cyclical mechanical stretch in cultured rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995;211:241-248.

Steckelings UM, Widdop RE, Paulis L, Unger T. The angiotensin AT2 receptor in left ventricular hypertrophy. *J Hypertens*, 2010;28:S50-S55.

Sun Y, Webber KT. Angiotensin converting enzyme and myofibroblasts during tissue repair in the rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, 1996;28:851-858.

Walsh NP, Blannin AK, Robson PJ, Gleeson M. Glutamine, exercise and immunefunction: links and possible mechanisms. *Sports Med*. 1998;26:177-91.

Welch WJ, Wilcox CS. AT1 receptor antagonist combats oxidative stress and restores nitric oxide signaling in the SHR. *Kidney International*, 2001;59:1257-1263.

Wilson EM, Spinale FG. Myocardial remodeling and matrix metalloproteinases in heart failure: turmoil within the interstitium. *Ann Med*. 2001;33: 623-34.

Zhang X, Dostal DE, Reiss K, Cheng W, Kajstura J, Li P, Huang H, Sonnenblick EH, Meggs LG, Baker KM, and et. al. Identification and activation of autocrine renin–angiotensin system in adult ventricular myocytes. *Am J Physiol*, 1995;269:H1791–H1802 (abstract).

Zhou G, Kandala JC, Tyagi SC, Katwa LC, Weber KT. Effects of angiotensin II and aldosterone on collagen gene expression and protein turnover in cardiac fibroblasts. *Mol Cell Biochem*, 1996;154:171-178.

9. APÊNDICES

Myocardial hypertrophy induced by high salt consumption is prevented by angiotensin II AT2 receptor stimulation

Running head: Myocardial hypertrophy prevention by AT2 stimulation

Ellen P.B. Dopona¹, Verônica F. Rocha¹, Luzia N. S. Furukawa¹, Ivone B. Oliveira¹,
Joel C. Heimann^{1*}

¹Laboratory of Renal Physiopatology of the Department of Internal Medicine of the University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

* Corresponding author

E-mail: jheimann@usp.br ([JCH](#))

Authors' names for PubMed indexing: Dopona EPB, Furukawa LN, Oliveira IB, Heimann JC

Word count for the entire manuscript: 5.060

Number of Figures: 6

Number of Tables: 2

Abstract

High salt intake is one of the main risk factors for the development of cardiovascular diseases. Dietary salt overload was found to increase cardiac angiotensin II content. Many studies have evaluated the role of angiotensin II on the development of cardiac hypertrophy and fibrosis. Angiotensin II acts through two main receptors: angiotensin II type 1 (AT1) and type 2 (AT2) receptors. Though there are many studies pointing to the effects of the AT1 and high salt diet, the role of AT2 and its effects in dietary salt overload model is still not elucidated. Aiming to better understand the role of AT2 receptor in models of salt overload on cardiac hypertrophy and fibrosis, male Wistar rats were fed normal or high salt diet from weaning up to 18 weeks of age. Both groups were divided into two groups. Starting at 7 weeks of age they were treated or not with compound 21 (3mg/kg per day, n=16), an AT2 receptor agonist. Weight, blood pressure, food intake, water intake, urine volume, plasma and urinary sodium and potassium, cardiomyocyte transverse diameter, percentage of cardiac fibrosis, gene and protein expression of renin, angiotensinogen, angiotensin converting enzyme, AT1 and AT2 were measured. Compound 21 prevented the development of cardiac hypertrophy and fibrosis in rats that received high salt diet. Compound 21 also reduced the increased blood pressure, prevented the lower weight gain in animals fed with high salt diet.

Introduction

Cardiovascular diseases (CVDs) are the main causes of mortality and morbidity around the world [1]. Hypertension is one of the largest contributor to CVDs development as well as cardiac hypertrophy and fibrosis cardiac and consequent heart failure [2]. A large number of evidences show an association between high dietary salt intake and cardiovascular disease [3,4]. Previous studies done in our laboratory observed an association between salt and myocardial hypertrophy and fibrosis in Wistar rats fed with high salt diet [5]. Also, higher cardiac angiotensin II (AngII) content was observed in all groups fed high salt diet [6]. The role of the renin-angiotensin system (RAS) in the development of cardiac hypertrophy and fibrosis induced by high salt diet is well established.

Many studies support that all components of the RAS are present in many organs including the heart making possible the synthesis of AngII, the biological effector peptide [7,8]. A previous study from our group demonstrated that AT1 receptor is increased in left and right ventricles of male Wistar rats fed with high salt diet that develop cardiac hypertrophy and fibrosis as well as increased oxidative stress [6]. A large amount of research pointing to the role of AT1 in the heart associated with dietary salt overload has been published [9,10]. On the other hand, many efforts to understand the role of the AT2 receptor in the heart has been made. Compound 21 is a direct stimulator of AT2 receptor and has a bioavailability of 20 to 30% after oral administration in rats and is the first selective nonpeptide AT2 receptor agonist reported [11]. A study stimulated the AT2 receptor with the Compound 21 in infarcted hearts of Wistar rats and demonstrated an improvement of systolic and diastolic ventricular function [12]. In the same study, the C21 decreased gene expression of inflammatory

markers like cardiac interleukin-6, interleukin-beta suggesting an anti-inflammatory effect [12]. Other study also demonstrated that C21 agonist protects heart after myocardium infarct from early left ventricular thinning and rupture [13]. Benefits were also observed in kidneys of a two-kidney one-clip hypertension rat model. It was observed that C21 reduced early inflammatory responses and decreased renal interstitial fibrosis [14].

As an effort to better understand the role of AT2 in the heart of rats fed with high salt diet, the purpose of this study was to analyze the effects of stimulation of AT2 by its agonist C21.

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. 258/13).

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%NaCl) or high- (HS: 8%NaCl) salt diet (HarlanTekad, Madison-WI/ EUA) 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 [5].

At 7 weeks of age, NS or HS subgroups received compound 21 (C21: 3 mg.kg⁻¹.day⁻¹), in their drinking water. Dosage was based on previous studies [15].

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, New York - EUA) during 3 day for 24-hr urine collection for volume, sodium and potassium determination. Blood was collected from the tail vein for measuring the sodium concentration, 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, Connecticut – EUA) 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 and urine concentrations

The serum and urinary sodium were evaluated using a flame spectrophotometer (model FC 280, CELM, Sao Paulo – Brazil).

Histological analysis

At 18 weeks of age, the rats were anesthetized with xilazine and ketamine (40 mg.kg⁻¹ body weight⁻¹ intraperitoneally). Cardiac arrest was induced 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-µm-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 40 left ventricle (LV) and 40 right ventricle (RV) cardiomyocytes were analyzed in each section with a magnification of 400X (Nikon, Tokyo, Japan).

For the quantification of interstitial fibrosis a point counting method was used and 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 slides precoated with 2% silane for AngII 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, California - EUA) to form a waterproof barrier and were preincubated with an Avidin/Biotin blocking kit (Vector Laboratories, California - EUA). 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, California - EUA) at 4°C. The sections were washed and followed by incubation with a LSAB-HRP kit (K0609) (DAKO North America, Inc. – California, USA) 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 was examined under a magnification of 200 X (Nikon, Tokyo - Japan).

RNA isolation and gene expression of RAS components in both ventricles

The gene expression was assessed via RT-PCR as previously described [16]. The primers used for RT-PCR are informed in Table 1.

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'
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'

Protein expression of RAS components 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., Massachusetts – EUA)).

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, Brazil) for 45 min at 20 V using a semidry transfer cell (Bio-Rad Laboratories Inc, Brazil). 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, Massachusetts – EUA), anti-renin (1:300, Fitzgerald Industries International, Massachusetts – EUA), anti-ACE (1:300, Santa Cruz Biotechnology, California - EUA), anti-AT1 (1:200, Santa Cruz Biotechnology, California - EUA), anti-AT2 (1:200, Santa Cruz Biotechnology, California - EUA), and anti-GAPDH (1:1.000, Santa Cruz Biotechnology, California - EUA).

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, California - EUA), anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase conjugate antibody at 1:5.000 (Santa Cruz), or anti-mouse IgG-horseradish peroxidase conjugate antibody at 1:3.000 (DAKO, California, EUA) 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.

Statistical analysis

Differences between the 4 groups were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) with followed by 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±SEM. The calculations were performed using Prism® 5.0 (GraphPad® Software). P<0.05 was considered significant.

Results

Tail-cuff blood pressure

In the sixth week of life, there was no difference in TcBP between the 4 experimental groups. However, the TcBP was higher in the HS group from the 7th week of age when compared with the NS, HS+C21 and NS+C21 groups, and this profile was maintained until the 18th week of age. Additionally, the TcBP was lower in the HS+C21 group compared with the HS group, except in the 11th and 13th week of age, indicating partial effect of an antihypertensive effect of Compound 21. TcBP did not differ between NS and NS+C21 until the 17th week of life and at the 18th week the TcBP was higher in the NS+C21 group compared with NS group (Fig 1).

Fig 1. Tail-Cuff Blood Pressure. 18-week-old rats fed diets of varying salt concentrations and untreated or treated with compound 21 (C21). Data are reported as means $\pm$ SEM, n = 14-16. *P<0.05 vs. NS; #P<0.05 vs. HS.

Food and water intake and 24-hour-urinary volume

The water intake and 24-hour-urinary volume was higher in the HS and HS+C21 groups compared with NS and NS+C21 groups. There was no difference between NS and NS+C21. The food intake was not difference between the groups (Fig 2).

Fig 2. Food and Water Intake and 24-Hour-Urinary Volume. Food intake (24h) (A) Water intake (24h) (B) and urinary volume (24) (C) of 18-week-old rats fed diets of varying salt concentrations and untreated or treated with compound 21 (C21). Data are reported as means $\pm$ SEM, n = 6-8. *P<0.05 vs. NS; #P<0.05 vs. NS+C21.

Body weight

The body weight starting at 8 weeks of age was higher in the HS group compared with NS group until the 18th week of age. At the 14th week of age the body weight in the HS+C21 was higher than in the HS group. There were no differences between NS and HS+C21 groups. At 7 week of age, the body weight was higher in the NS+C21 group compared with the NS group (Fig 3).

Fig 3. Body Weight. Rats fed diets of varying salt concentrations and untreated or treated with compound 21 (C21). Data are reported as means $\pm$ SEM, n = 14-16. *P<0.05 HS vs. NS; #P<0.05 NS+C21 vs. NS; &P<0.05 HS+C21 vs. NS.

Heart rate, cardiac index, 24-hour-urinary sodium, serum sodium, hematocrit and LV and RV angiotensin II content

The heart rate did not differ between any experimental groups. The urinary sodium was higher in the two groups that received a high-salt diet compared with the rats fed with normal salt diet. The serum sodium and hematocrit at 18 weeks of age did not differ between the four experimental groups. The heart rate did not differ between any experimental groups. The ratios between the cardiac mass (cardiac index), LV mass

(LV index), RV mass (RV index) corrected for tibia length measured in the 18-week-old Wistar rats were not different between groups. The angiotensin II content in the LV in NS+C21 and HS was higher compared with the NS group. There was no difference between HS+C21 and NS. In the RV there were no differences among all groups. (Table 2)

Table 2. Body Weight, Cardiac Mass and Index, LV and RV Mass and Index, Hematocrit, Urinary and Serum Sodium, LV and RV Angiotensin II Content. 18-Week-Old Wistar Rats in the NS, NS+C21, HS or HS+C21 Groups.

	NS	<i>n</i>	NS+C21	<i>n</i>	HS	<i>n</i>	HS+C21	<i>N</i>
Body weight, <i>g</i>	571±11.25	12	583±11.81	12	497±12.78*	12	542±12.13	11
Cardiac index, <i>g/cm</i>	0.53±0.04	15	0.51±0.02	15	0.51±0.03	16	0.52±0.05	13
LV index, <i>g/cm</i>	0.33±0.02	16	0.34±0.01	16	0.32±0.02	15	0.35±0.03	15
RV index, <i>g/cm</i>	0.08±0.01	16	0.07±0.007	16	0.08±0.007	15	0.08±0.007	15
Cardiac mass, <i>g</i>	2.42±0.16	16	2.35±0.10	16	2.40±0.14	15	2.41±0.18	15
LV mass, <i>g</i>	1.52±0.09	16	1.48±0.12	16	1.54±0.09	15	1.59±0.12	15
RV mass, <i>g</i>	0.40±0.03	16	0.35±0.03	16	0.37±0.03	15	0.37±0.03	15
Hematocrit %	45.7±0.49	8	50.1±0.88	8	46.5±0.46	6	45.2±0.42	7
Urinary sodium <i>mmol/24h</i>	3.01±0.44	8	2.49±0.25	8	11.5±1.41*	6	12.8±1.03*	7
Angiotensin II LV (% area)	0.35±0.09	8	1.00±0.43	8	1.56±0.22*	6	1.53±0.24*	7
Angiotensin II RV (% area)	0.44±0.16	8	0.33±0.13	8	0.70±0.29	6	0.66±0.28	7

Values are means ± SEMs.*P<0.05. vs. NS; HS, high salt (8% NaCl); HS+C21, HS+compound 21 (1 mg/kg/day); LV, left ventricle; NS, normal salt (1.27% NaCl); NS+C21; RV, right ventricle.

Cardiomyocyte transverse diameter and interstitial fibrosis in both ventricles

In the left ventricle, cardiomyocyte transverse diameter was higher in HS and HS+C21 compared respectively with NS and NS+C21 and HS+C21 was lower than in HS group. In the right ventricle, cardiomyocyte transverse diameter was higher in HS than in NS, NS+C21 and HS+C21 groups. Myocardium Masson's trichrome stain revealed that the interstitial fibrosis was higher in the left ventricle of the HS group than in the other experimental groups. In the right ventricle, the interstitial fibrosis was lower in NS+C21 group compared with the NS group and HS group was higher compared with NS+C21 group (Fig 4).

Fig 4. Cardiomyocyte Transverse Diameter and Interstitial Fibrosis in Both Ventricles. Cardiomyocyte diameter and interstitial fibrosis of (A,B) left ventricle and (C,D) right ventricle of 18-week-old rats fed diets of varying salt concentrations and untreated or treated with compound 21 (C21). Data are reported as means $\pm$ SEM, n = 6-8. *P<0.05 vs. NS; #P<0.05 vs. NS+C21; &P<0.05 vs. HS.

Gene and protein expression of cardiac RAS components

In VD, the AT1b gene expression in the NS+C21 group was higher than in NS. The gene expression of ACE was higher in the groups that received treatment with C21. The gene expression of AT2 was lower in all groups compared with the NS group. There were no differences in AGTO and renin gene expression among groups.

There were no differences in the gene expression of the RAS components in the left ventricle among the four groups, with the exception of the gene expression of the AT2 receptor. It was lower in HS group when compared with NS and NS+C21 groups.

There were no differences in the protein expression of the RAS components in right ventricle in the four groups.

In the left ventricle, protein expression of renin was higher in NS+C21 than in NS and HS+C21 groups. AT2 protein expression was higher in NS+C21 compared with all other groups. (Figs 5 and 6)

Fig 5. Gene and Protein Expression of Components of the Renin-Angiotensin System of the Left Ventricle. (A) angiotensinogen (AGTO), (B) renin, (C) AT2, (D) angiotensin converting enzyme (ACE), and (E) AT1 of 18-week-old rats fed diets of varying salt concentrations and untreated or treated with compound 21 (C21). Data are reported as means $\pm$ SEM, n = 6-8. *P<0.05 vs. NS; #P<0.05 vs. NS+C21.

Fig 6. Gene and Protein Expression of Components of Renin-Aangiotensin System of the Right Ventricle. (A) angiotensinogen (AGTO), (B) renin, (C), AT2 (D) angiotensin converting enzyme (ACE), and (E) AT1 of 18-week-old rats fed diets of varying salt concentrations and untreated or treated with compound 21 (C21). Data are reported as means $\pm$ SEM, n = 6-8. *P<0.05 vs. NS; #P<0.05 vs. NS+C21.

Discussion

One of the most interesting findings of the present study is the partial prevention by C21 of high salt intake increased blood pressure. An explanation for this effect may

be the vasorelaxation of resistance arteries in response to AT₂ receptor stimulation [17,18].

Though many studies use a dose of 1 mg/kg/day of C21, it may not be enough to fully stimulate AT₂. It was observed that there was no effect of 0.5 mg/kg/day of C21 in stroke-prone spontaneously hypertension rats and with 3mg/kg/day the effects were not different from 1 mg/kg/day [15]. However a dose-response curve-response study of the compound 21 is needed.

The higher food intake in both HS compared to NS groups is a confirmation of previous findings from our group. It was observed that high salt intake increases food intake despite no increase in body weight. This phenomenon is due to higher energy expenditure [19].

In the present study, the body weight of the animals fed with high salt diet was lower since nine weeks of age until the end of the study compared with animals fed with normal salt diet confirming previous findings from our laboratory [19]. C21 reverted the effect of high salt intake on body weight. This effect of C21 may be explained by a suppressor effect on digestive efficiency similar to what was find in the study of Weidemann et al. [20].

The cardiac index and mass were not different among all groups. A study showed that the left ventricle mass was normal in 20% of the patients with hypertrophic cardiomyopathy detected by magnetic resonance [21]. This study and the present results suggest that cardiac mass may not be the best indicator for cardiac hypertrophy, since cardiomyocyte transverse diameter was higher in the HS group. C21 protected left and right ventricles from cardiac hypertrophy development in Wistar rats fed with high salt diet. Many studies demonstrated an improve in cardiac structure elicited by AT₂

stimulation. The present study is the first one to demonstrate a protective role of compound 21 on cardiac hypertrophy induced by high salt intake.

Interstitial fibrosis was higher in HS group than in all groups in the left ventricle. C21 protected hearts from animals fed with high salt diet from fibrosis. Similar effect was found by other studies by stimulus of the AT₂, showing improvement in cardiac fibrosis by reduction of fibronectin expression as well as collagen I and III in the heart. Compared to the NS group, high salt intake did not increase fibrosis in the right ventricle. The decrease in the fibrosis in the right ventricle in response to C21 was unexpected. Nevertheless, more study would be required to clarify this finding.

Similarly to what was already shown before [5,6], in the present study cardiac angiotensin II was increased in both groups submitted to dietary salt overload. Nevertheless, cardiac hypertrophy in response to high salt intake was prevented by C21. Taking these results together with previously reported findings [5,6], it can be stated that C21 inhibited the effect of local angiotensin II on cardiomyocyte hypertrophy development.

Since treatment with C21 did not alter both gene and protein expression of all components of RAS, it is possible that the preventive effect of C21 on cardiomyocyte salt induced hypertrophy is independent of AT₂ stimulation.

In conclusion, salt induced cardiac hypertrophy and fibrosis were prevented by C21. In addition, C21 improved effect of salt overload on blood pressure. These results indicate that C21 may be a therapeutic alternative in the context of salt-induced hypertension.

Acknowledgments

We thank Vicore Pharma for providing compound 21 used in this study.

We thank Wagner Vasques Domingues for edition of the figures.

References

1. Eyles H, Shields E, Webster J, Mhurchu CN. Achieving the WHO sodium target: estimation of reductions required in the sodium content of packaged foods and other sources of dietary sodium. *Am J Clin Nutr.* 2016;104: 470-479.
2. O'Donnell M, Mente A, Yusuf S. Sodium intake and cardiovascular health. *Circ Res.* 2015;116: 1046-1057.
3. Smyth A, O'Donnell M, Mente A, Yusuf S. Dietary sodium and cardiovascular disease. *Curr Hypertens Rep.* 2015;17: 559.
4. Cappuccio FP. Cardiovascular and other effects of salt consumption. *Kidney Int Suppl.* 2013;3: 312-315.
5. Ferreira DN, Katayama IA, Oliveira IB, Rosa KT, Furukawa LN, Coelho MS, et al. Salt-induced cardiac hypertrophy and interstitial fibrosis are due to a blood pressure-independent mechanism in Wistar rats. *J Nutr.* 2010;140: 1742-1751.
6. Katayama IA, Pereira RC, Dopona EP, Shimizu MH, Furukawa LN, Oliveira IB, et al. High-salt intake induces cardiomyocyte hypertrophy in rats in response to local angiotensin II type 1 receptor activation. *J Nutr.* 2014;144: 1571-1578.
7. Baker KM, Booz GW, Dostal DE. Cardiac actions of angiotensin II: role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol.* 1992;54: 227-241.
8. Dzau VJ. Implications of local angiotensin production in cardiovascular physiology and pharmacology. *Am J Cardiol.* 1987;59: 59A-65A.
9. 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: 117-122.
10. De Mello WC, Frohlich ED. On the local cardiac renin angiotensin system. Basic and clinical implications. *Peptides.* 2011;32: 1774-1779.
 11. Wan Y, Wallinder C, Plouffe B, Beaudry H, Mahalingam AK, Wu X, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT₂ receptor agonist. *J Med Chem.* 2004;47: 5995-6008.
 12. Kaschina E, Grzesiak A, Li J, Foryst-Ludwig A, Timm M, Rompe F, et al. Angiotensin II type 2 receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction? *Circulation.* 2008;118: 2523-2532.
 13. Kaschina E, Lauer D, Schmerler P, Unger T, Steckelings UM. AT₂ receptors targeting cardiac protection post-myocardial infarction. *Curr Hypertens Rep.* 2014;16: 441.
 14. Matavelli LC, Huang J, Siragy HM. Angiotensin AT(2) receptor stimulation inhibits early renal inflammation in renovascular hypertension. *Hypertension.* 2011;57: 308-313.
 15. Rehman A, Leibowitz A, Yamamoto N, Rautureau Y, Paradis P, Schiffrin EL. Angiotensin type 2 receptor agonist compound 21 reduces vascular injury and myocardial fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2012;59: 291-299.
 16. Oliveira IB, Ramos DR, Lopes KL, de Souza RM, Heimann JC, Furukawa LNS. Isolated total RNA and protein are preserved after thawing for more than twenty-four hours. *Clinics.* 2012;67: 255-259.

17. Lemarie CA, Schiffrin EL. The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2010;11: 19-31.
18. Savoia C, Touyz RM, Volpe M, Schiffrin EL. Angiotensin type 2 receptor in resistance arteries of type 2 diabetic hypertensive patients. *Hypertension.* 2007;49: 341-346.
19. Coelho MS, Passadore MD, Gasparetti AL, Bibancos T, Prada PO, Furukawa LL, et al. 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: 148-155.
20. Benjamin JW, Voong S, Morales-Santiago FI, Kahn MZ, Ni J, Littlejohn NK, et al. Dietary sodium suppresses digestive efficiency via the renin-angiotensin system. *Sci Rep.* 2015;5: 11123.
21. Olivotto I, Maron MS, Autore C, Lesser JR, Rega L, Casolo G, et al. Assessment and significance of left ventricular mass by cardiovascular magnetic resonance in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52: 559-566.

FIGURES.