



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

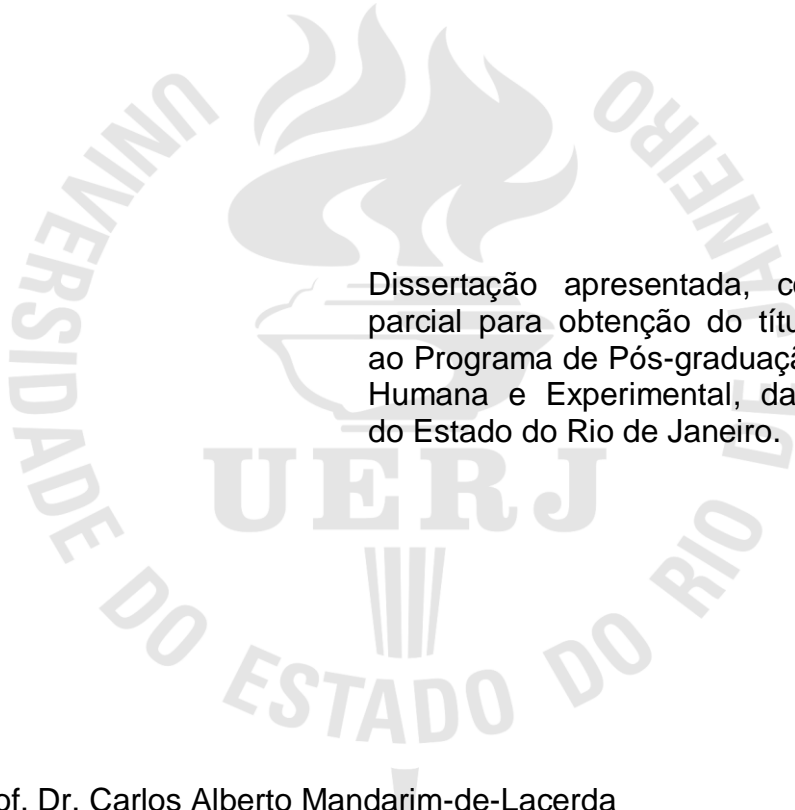
Milton Vieira Costa

**Dieta hiperlipídica com ou sem adição de sal modula  
diferentemente a produção de peptídeo natriurético atrial e a  
expressão de renina em camundongos**

Rio de Janeiro  
2011

Milton Vieira Costa

**Dieta hiperlipídica com ou sem adição de sal modula diferentemente a produção de peptídeo natriurético atrial e a expressão de renina em camundongos**



-Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CB/A

C837 Costa, Milton Vieira.  
Dieta hiperlipídica com ou sem adição de sal modula  
diferentemente a produção de peptídeo natriurético atrial e a  
expressão de renina em camundongos / Milton Vieira Costa. – 2011.  
72 f. : il.

Orientador: Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de  
Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Peptídeo natriurético – Teses. 2. Hipertensão – Teses. 3.  
Dieta – Teses. 4. Estereologia – Teses. I. Mandarim-de-Lacerda,  
Carlos Alberto. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.  
Instituto de biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU: 612.398.192

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou  
parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Milton Vieira Costa

**Dieta hiperlipídica com ou sem adição de sal modula diferentemente a produção de peptídeo natriurético atrial e a expressão de renina em camundongos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Avaliada em 16 de Fevereiro de 2011.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréa Araújo Brandão  
Centro Biomédico, Departamento de Especialidades Médicas -  
UERJ

---

Prof. Dr. Aníbal Gil Lopes  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ

Rio de Janeiro

2011

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais.

## AGRADECIMENTOS

Neste longo caminho que tenho percorrido as dificuldades, longe de obscurecerem o trajeto, aumentaram-lhe o brilho. E, ao invés de me deterem, impulsionaram-me com mais força. Tenho muito a agradecer.

Aos meus pais, que como sopro se foram... meus olhos quiseram perder o brilho. Foi aí que olhei para dentro de mim e ouvi seus conselhos, orientação e consolo. Neste momento muito importante, desejo tanto a presença de vocês que quase posso senti-los ao meu lado.

Aos meus irmãos, meu referencial de família, que mesmo distante me acompanham diariamente, sempre acreditando em mim e me motivando na busca de meus ideais.

Aos meus padrinhos (Maria Guerra Costa e Theodorico Fernandes da Costa), pelos conselhos, orientações, substituindo às vezes meus pais. Vocês confiaram em mim quando até eu mesmo pensei em duvidar.

Aos primos alagoanos sempre presentes (Wilson Sobrinho e Marcos Guerra Costa) e as duas primas-irmãs (Ana Guerra Costa e Helena Guerra Costa). Aninha, nunca esquecerei o porto seguro que você e seu esposo tem sido para mim no Rio.

À minha sobrinha e afilhada Sílvia Lígia, pelo carinho e orgulho que tem me dado.

À Carla Sabrine Rodrigues, minha namorada e companheira, sempre me dando apoio, tão compreensiva nos meus momentos estressantes, faltam-me palavras para lhe falar o quanto você foi importante nessa jornada. Você me mostrou que eu não estava sozinho, me proporcionou os meus melhores momentos nesses dois anos. Obrigado!

Ao meu amigo-irmão José Cavalcante e família, que tantas vezes fez questão de me receber em sua casa, evitando que eu me sentisse sozinho no Rio de Janeiro.

Aos meus amigos do peito (Régia Ribeiro, Felipe Cavalcante, Saulo Moura e Padre Vanderley) que me deram tanta força nesta jornada.

À Eliete Dalla Corte Frantz, minha amiga-irmã, companheira, competência em pessoa! Em todos os meus momentos difíceis você esteve do meu lado.

Ao amigo Thiago da Silva Torres, que me recebeu em seu lar e sempre esteve ao meu lado nesses dois anos.

À Vanessa de Sousa Melo, sempre minha amiga, sempre me socorrendo nas correções do inglês, sobretudo minha parceira na dança de salão.

Ao alagoano Geraldo de Oliveira Júnior e a baiana Sandra Barbosa da Silva, sempre amigos e pacientes, com vocês eu sempre pude contar!

À Caroline Fernandes dos Santos e à Tatiane da Silva Faria, pela parceria na árdua confecção do artigo. Foi uma satisfação tê-las como coautoras.

Ao meu amigo Victor Faria Motta, tão solícito e inteligente, sobretudo meu padrinho na informática.

Aos amigos do LMMC: Júlio Cesar Fraulob, Leonardo de Souza Mendonça, Isabele Bringhenti Sarmento, Alessandra da Rocha Pinheiro, Antônio Ludjero Júnior, Diana de Freitas Moraes, Bianca Martins Gregório, Nayara da Silva Peixoto, Jéssica Moraes Texeira, Marcela Anjos Martins, Fernanda Ornelas Cruz, Thereza Cristina Bargut, D'angelo Carlo Magliano, Débora Cristina Silva, Ana Maria Volpato, Fernanda Amorim Nascimento, Mariana Catta-Preta e Aline Schultz.

Aos meus ICs e amigos (Nemesis e Eduardo) por terem participado efetivamente deste trabalho.

Aos técnicos que tanto me ajudaram: Thatiany de Souza Marinho, Angélica Alves Figueiredo, Ana Lúcia Rosa Nascimento e Alan César Nunes. Eu não teria conseguido sem vocês.

Às agências de fomento (CAPES, FAPERJ e CNPQ) que custearam esta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Euclides Maurício Trindade Filho, que me orientou nos quatro anos de iniciação científica, viu em mim um potencial e me estimulou a perseguir a carreira da ciência.

Ao Prof. Dr. Célio Fernando Sousa-Rodrigues, que confiou em mim e me indicou para um serviço de excelência. Continuarei trabalhando arduamente para nunca decepcioná-lo. MUITÍSSIMO OBRIGADO!

Ao Prof. Dr. Jorge José de Carvalho, pela amizade, confiança e acolhimento no doutorado.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Barbosa Águila Mandarin-de-Lacerda, pelas orientações nutricionais e pelo incentivo nas aulas de anatomia.

Por fim, ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda, por ter confiado em mim, ter me dado total e irrestrito subsídio para que eu fizesse o melhor mestrado possível! Pela paciência de ter me ensinado tanto, por sempre ter me oferecido amizade e amparo e, sobretudo, por ser exemplo de cientista e de ser humano.



Você não sabe o quanto eu caminhei  
Pra chegar até aqui  
Percorri milhas e milhas antes de dormir  
Eu não cochilei...

*Bino Farias, Lazão, Da Gama e Toni Garrido*

## RESUMO

COSTA, Milton Vieira. *Dieta hiperlipídica com ou sem adição de sal modula diferentemente a produção de peptídeo natriurético atrial e a expressão de renina em camundongos*. 2011. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Estudo dos efeitos de uma dieta rica em sal e / ou gordura saturada em grânulos de peptídeo natriurético atrial (ANP), hipertensão, expressão da renina e ultraestrutura cardíaca em camundongos C57Bl / 6. Camundongos machos adultos jovens foram separados em quatro grupos (n = 12) e alimentados com uma das seguintes dietas por 9 semanas: dieta padrão para roedores (Grupo P), dieta hiperlipídica (Grupo HL), dieta hipersódica (Grupo HS) e dieta hiperlipídica e hipersódica simultaneamente (HL-HS). Foram examinados: alterações no ANP sérico, ultra-estrutura dos cardiomiócitos produtores de ANP, estrutura do ventrículo esquerdo, pressão arterial sanguínea, expressão da renina no rim, taxa de filtração glomerular (TFG), eficiência alimentar, parâmetros lipídicos e glicídicos. Os animais alimentados com dieta hiperlipídica mostraram um pequeno aumento na produção de ANP, discreta hipertrofia ventricular esquerda, aumento da eficiência alimentar, dislipidemia e hiperglicemia. Animais alimentados com dieta hipersódica tiveram um grande aumento na produção de grânulos de ANP e correspondente elevação do seu nível sérico, hipertrofia ventricular esquerda, hipertensão arterial, diminuição dos níveis de renina e aumento da TFG. A combinação das duas dietas (HL-HS) teve um efeito aditivo. A ingestão de uma dieta com alto teor de sal e lipídeos induz alterações ultraestruturais dos cardiomiócitos, aumento da produção de ANP e elevação de seu nível sérico e reduz a quantidade de renina no rim.

Palavras-chave: Peptídeo natriurético atrial. Hipertensão. Dieta hipersódica e hiperlipídica. Estereologia.

## ABSTRACT

To study the effects of a diet rich in salt and/or saturated fat on atrial natriuretic peptide (ANP)-granules, hypertension, renin expression and cardiac structure in C57Bl/6 mice. Young adult male mice were separated into four groups (n=12) and fed one of the following for 9 weeks: standard chow/normal-salt (SC-NS), high-fat chow/normal salt (HF-NS), standard chow/high-salt (SC-HS) and high-fat chow/high-salt (HF-HS). Alterations in the serum ANP, ultrastructural analysis of cardiomyocytes that produce ANP, structural analysis of the left ventricle, blood pressure, renin expression, glomerular filtration rate (GFR), feed efficiency and lipid and glucose parameters were examined. The HF-NS diet showed a small increase in ANP production and left ventricular hypertrophy, increased food efficiency and abnormal lipid and glucose parameters. The SC-HS diet showed a large increase in ANP granules in myocytes and corresponding elevation in ANP serum levels, left ventricular hypertrophy, hypertension, decrease of renin levels and increase in GFR. The combination of the two diets (HF-HS) had an additive effect. The incorporation of a high-fat high-salt diet induced ultrastructural changes in cardiomyocytes, increased the production of ANP and increased its serum level, and reduced the amount of renin in the kidney.

Keywords: Atrial natriuretic peptide, hypertension, high-fat high-salt diet, stereology, rennin.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sequências de aminoácidos (ANP) .....	22
Figura 2 – (Modificada) Análise de western blotting mostrando catepsina-B no átrio direito e no ventrículo esquerdo .....	24
Figura 3 – Dupla marcação imunocitoquímica de peptídeo natriurético atrial e catepsina-B .....	24
Figura 4 – Esquema com ações fisiológicas do ANP .....	26
Figura 5 – Evolução da Pressão Arterial (PA) .....	42
Figura 6 – Fotomicrografias exibindo secção transversa de ventrículo esquerdo .....	54
Figura 7 – Gráfico com a densidade numérica por área de grânulos de ANP .....	56
Figura 8 – Eletromicrografias mostrando cardiomiócitos da aurícula do átrio direito .....	57
Figura 9 – Gráfico com a expressão de renina no rim .....	58
Figura 10 – Microscopia confocal de varredura a laser de secções de rim imunomarcadas para renina .....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação de algumas das definições mais amplamente utilizada para a síndrome metabólica .....	37
Tabela 2 – Ganho de massa corporal, comportamento alimentar, bioquímica sanguínea e estimativa da área dos cardiomiócitos	52
Tabela 3 – Função Renal .....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C –	Graus Célsius
$A_{[cmv, VE]}$ –	Área média dos cardiomiócitos ventriculares
ADH –	Vasopressina ou hormônio antidiurético
AGS –	Ácidos graxos saturados
AIN –	Instituto americano de recomendação nutricional
AMP –	Monofosfato de adenosina
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
ANP –	Peptídeo natriurético atrial
$A_T$ –	Área teste
$AT_1$	Receptor tipo 1 de Angiotensina II
$AT_2$ –	Receptor tipo 2 de Angiotensina II
BCA –	Albumina de soro bovino
BNP –	Peptídeo natriurético cerebral
CEA –	Comitê de ética em pesquisa
cGMP –	Guanosina monofosfato cíclico
CNP –	Peptídeo natriurético tipo C
CT –	Colesterol total
DCV –	Doenças cardiovasculares
ECA –	Enzima conversora de angiotensina
ECL –	Sistema de detecção para Western blot
ELISA –	Ensaio imunoenzimático (exame)
ENaC	Canais de sódio epteliais
g –	Grama
$H^+$ –	Cátion hidrogênio
HAS –	Hipertensão arterial sistêmica
HL –	Hiperlipídico
HL-HS –	Hiperlipídico e Hipersódico
HOMA-IR –	Modelo de avaliação da homeostase

HS –	Hipersódico
IP3 –	Inusitol trifosfato
J –	Joule
K –	Quilo
K <sup>+</sup> –	Cátion potássio
kDa –	KiloDalton
Kg –	Kilograma
M –	Molar
mg –	Miligrama
min –	Minuto
mL –	Mililitro
mmHg –	Milímetro de mercúrio
Mmol/L –	Milimol por litro
mol/L –	Mol por litro
N <sub>[cmy]</sub> –	Núcleos de cardiomiócitos
Na <sup>+</sup> –	Cátion sódio
NaCl –	Cloreto de sódio
ng/mL –	Nanograma por mililitro
NO –	Óxido nítrico
NPR-A –	Receptor tipo A de peptídeos natriuréticos
NPR-B –	Receptor tipo B de peptídeos natriuréticos
NPR-C –	Receptor tipo C de peptídeos natriuréticos
NT –	Fragmento terminal
P –	Padrão
PA –	Pressão arterial
pH –	Potencial hidrogeniônico
Q <sub>A[cmy, VE]</sub> –	Densidade numérica por área de núcleos de cardiomiócitos
SNC –	Sistema nervoso central
SRA –	Sistema renina angiotensina
TBM –	Termo científico para o reagente usado em ELISA
TFG –	Taxa de filtração glomerular
TG –	Triglicerídeos
TOTG –	Teste oral de tolerância a glicose

$Vv_{[cmv, VE]}$  – Densidade de volume dos cardiomiócitos ventriculares  
 $\mu\text{g}$  – Micrograma  
 $\mu\text{L}$  – Microlitro



## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	20
1.1	<b>Peptídeo natriurético atrial</b> .....	20
1.1.1	<u>Descoberta</u> .....	20
1.1.2	<u>Estrutura</u> .....	21
1.1.3	<u>Síntese</u> .....	23
1.1.4	<u>Receptores</u> .....	25
1.1.5	<u>Efeitos fisiológicos</u> .....	26
1.1.5.1	Rim .....	27
1.1.5.2	Vasos .....	27
1.1.5.3	Coração .....	27
1.1.5.4	Tecido adiposo .....	28
1.1.6	<u>Manipulação farmacológica</u> .....	28
1.2	<b>Sistema renina-angiotensina</b> .....	28
1.2.1	<u>Renina</u> .....	30
1.3	<b>Síndrome metabólica</b> .....	31
1.3.1	<u>Dieta hiperlipídica</u> .....	32
1.4	<b>Hipertensão arterial sistêmica</b> .....	33
1.4.1	<u>Dieta hipersódica</u> .....	34
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	36
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	37
3.1	<b>Animais e dieta</b> .....	37
3.2	<b>Pressão arterial sistólica</b> .....	38

3.3	<b>Análise de sangue e de urina</b> .....	38
3.4	<b>Eutanásia</b> .....	39
3.5	<b>Radioimunoensaio de insulina plasmática</b> .....	39
3.6	<b>ELISA</b> .....	39
3.7	<b>Microscopia de luz e eletrônica de transmissão</b> .....	40
3.7.1	<u>O ventrículo esquerdo</u> .....	40
3.7.2	<u>Aurícula direita</u> .....	41
3.8	<b>Microscopia confocal com varrimento a laser</b> .....	41
3.9	<b>Análise de western blot</b> .....	42
3.10	<b>Análise dos dados</b> .....	43
4	<b>RESULTADOS</b> .....	43
4.1	<b>Ganho de massa corporal e comportamento alimentar</b> .....	43
4.2	<b>Metabolismo</b> .....	44
4.3	<b>Pressão arterial</b> .....	44
4.4	<b>A hipertrofia cardíaca</b> .....	45
4.5	<b>Peptídeo natriurético atrial</b> .....	49
4.5.1	<u>Os níveis séricos de ANP</u> .....	49
4.5.2	<u>ANP nos cardiomiócitos</u> .....	49
4.6	<b>Expressão da renina no rim</b> .....	49
4.7	<b>Função renal</b> .....	54
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	56
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	59
7	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	60
8	<b>ANEXO – Comitê de ética em pesquisa</b> .....	71

## INTRODUÇÃO

Peptídeo natriurético atrial (ANP) é um hormônio proteico (polipeptídeo) produzido, armazenado e liberado pelas células musculares das câmaras superiores (átrios) do coração (miócitos atriais) em resposta ao estiramento atrial induzido por hipervolemia ou aumento da pressão arterial (Nicholls, Espiner et al. 1987) ou do retorno venoso (Klar, Haver et al. 2009). O efeito global do ANP sobre o corpo é conter a elevação da pressão e do volume sanguíneo por aumentar a taxa de filtração glomerular, diminuir a reabsorção de sódio no túbulo contorcido distal e no ducto coletor do néfron e inibir a secreção de renina (Zhao, Pandey et al. 2010).

Evidências sugerem que o ANP pode ser necessário para o equilíbrio de fluidos durante uma ingestão elevada de sal. Aumentos na concentração de sal na dieta e conseqüente aumento na concentração de ANP plasmático potencializa o efeito relaxante do ANP sobre a vasculatura renal (Almeida, Suzuki et al. 1991). O ANP exerce efeito hipotensor crônico, enquanto que camundongos knockout com ruptura do gene homocigoto de pró-ANP, incapazes de produzir ANP, são hipertensos quando comparados aos seus controles (Melo, Veress et al. 1998).

Outrossim, o aumento mundial da obesidade leva a um aumento nas comorbidades associadas a hipertensão arterial (Aneja, El-Atat et al. 2004). Além disso, a ingestão crônica de uma dieta com alto teor de gordura é uma das principais causas de hipertensão arterial e alteração da estrutura renal (Aguila and Mandarim-De-Lacerda 2003; Aguila and Mandarim-de-Lacerda 2003). No entanto, as dietas ocidentais possuem alto teor de lipídeos e sal (Beilin 1999). Em um modelo de indução de obesidade em ratos por dieta hiperlipídica, a ingestão concomitante de uma dieta rica em sal acelerou o desenvolvimento da hipertensão, aumentando o estresse oxidativo e induzindo glomeruloesclerose renal e microalbuminúria, com hipertrofia dos adipócitos e aumento na produção de leptina (Dobrian, Schriver et al. 2003).

A hipertensão arterial é uma doença crônica altamente prevalente em humanos, de elevado custo econômico-social, principalmente em decorrência das suas complicações, e com grande impacto na morbi-mortalidade. De acordo com o Centro Norte-Americano de Controle e Prevenção de Doenças, os principais componentes de doenças cardiovasculares são a cardiopatia e o derrame.

Aproximadamente 61 milhões de americanos, ou 25% da população, vive com os efeitos do derrame ou da doença cardíaca, fazendo destas doenças a primeira e a terceira causa de mortes, respectivamente. O fator de risco cardiovascular e cerebrovascular mais comuns para morbi-mortalidade é a hipertensão. A prevalência mundial de hipertensão arterial é estimada na ordem de 1 bilhão de indivíduos, causando aproximadamente 7,1 milhões de óbitos por ano (Lenfant, Chobanian et al. 2003). A hipertensão clínica é definida como uma pressão sanguínea sistólica acima de 139 mmHg e uma pressão diastólica acima de 90 mmHg. Hipertensão é uma doença multi-fatorial influenciada por fatores genéticos e ambientais. Tem sido sugerido que a pressão sanguínea de muitos indivíduos é sensível ao sal, elevando-se a medida que aumenta o consumo de sal na dieta (Reeves, Nielsen et al. 1993). Uma elevada ingestão de sal está correlacionada com altos níveis pressóricos, disfunções cardíacas (Hartner, Cordasic et al. 2003; Kirchhoff, Krebs et al. 2008), alteração nos parâmetros hemodinâmicos e cardiomiopatia dilatada, o que aponta a longo prazo para insuficiência cardíaca congestiva (Yu, Larson et al. 2004). Em roedores, dieta com alto teor de sal é capaz de induzir hipertensão arterial sistêmica, com as conseqüentes alterações de hipertrofia e remodelamento cardiovascular adverso (Hartner, Cordasic et al. 2003; Van Huysse and Hou 2004).

Outro elemento que modula a pressão arterial é o sistema renina-angiotensina. Neste sistema, a renina é uma enzima envolvida na produção de angiotensina II, visto que esta protease catalisa a etapa limitante de conversão do angiotensinogênio em angiotensina I (Ang I). A renina circulante é sintetizada por células especializadas no músculo liso no aparelho justaglomerular (JG) do rim (Bader and Ganten 2000). Vários fatores influenciam a secreção de renina, incluindo a baixa perfusão renal e a depleção de sódio (Hackenthal, Paul et al. 1990; Wagner and Kurtz 1998). Pouco se sabe, entretanto, sobre o efeito de uma dieta rica em sal sobre a secreção de renina (Melo, Veress et al. 1999; Lantelme, Rohrwasser et al. 2002).

Camundongos C57BL/6 submetidos à ingestão crônica de uma dieta muito rica em gordura é um modelo utilizado para simular a síndrome metabólica em humanos (Gallou-Kabani, Vige et al. 2007; Fraulob, Ogg-Diamantino et al. 2010). Portanto, o presente estudo foi realizado para investigar a produção de ANP e as conseqüências metabólicas e estruturais de uma dieta rica em gordura, uma dieta

rica em sal, e uma combinação de dietas ricas em gordura e sal, em camundongos C57BL/6.

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Peptídeo natriurético atrial

O peptídeo natriurético atrial (ANP), fator natriurético atrial (FNP), hormônio natriurético atrial ou peptídeo atrial é um hormônio proteico (polipeptídeo) secretado pelas células musculares atriais. Está envolvido no controle homeostático de sódio, potássio e água corporal (de Bold, Borenstein et al. 1981). O ANP é liberado pelas células musculares da câmara superior direita (átrio direito) do coração (miócitos atriais) em resposta a elevação da pressão sanguínea ou hipervolemia (Zhao, Pandey et al. 2010). A principal função do ANP é reduzir sódio e água do organismo, e como consequência diminuir a pressão arterial sanguínea (Axelsson, Rippe et al. 2011).

#### 1.1.1 Descoberta

Em 1964, Jamieson e Palade (Jamieson and Palade 1964) publicaram seus estudos de caracterização morfológica de grânulos atriais específicos, concluindo que fibras musculares atriais “formam e armazenam uma população de grânulos”. Já havia sido postulado que o átrio estava envolvido na regulação de volume extracelular (Gauer, Henry et al. 1961). Desde então, trabalhando em diferentes linhas de evidência, vários pesquisadores foram procurando por um hormônio natriurético (De Wardener, Mills et al. 1961). Vinte anos se passaram até que De Bold *et al* (de Bold, Borenstein et al. 1981) relataram o experimento decisivo mostrando que o átrio de mamíferos realmente continham um fator natriurético. Neste experimento foi verificado que a administração intravenosa em *bolus* de extrato atrial leva a uma brusca natriurese, caliurese e diurese de início muito rápido (1 a 2 min) e de duração relativamente curta (10 a 20 min). O pico da excreção de sódio alcançado foi de 30 a 40 vezes o nível basal, uma magnitude de ação que imediatamente situou o peptídeo natriurético atrial como a mais poderosa substância

natriurética endógena descrita até a data. Além disso, um outro estudo (Garcia, Cantin et al. 1982) verificou que a administração de extrato atrial diminui a pressão sanguínea logo após ao efeito natriurético. Subseqüentemente, o ANP foi identificado no coração de diversos mamíferos, incluindo o homem. A descoberta de grânulos em células musculares cardíacas atriais que continham o peptídeo natriurético atrial deu ao coração a importância endócrina, além daquela de simples bomba propulsora de sangue (Yamada, Saito et al. 1988).

Nos anos seguintes a descoberta, os estudos se concentraram principalmente em identificação, função e propriedades do ANP. Num curto período de tempo de 3 anos, o ANP foi identificado como um peptídeo ou um grupo de peptídeos com ações vasculares diretas, bem como efeitos natriuréticos. Esses peptídeos foram purificados, sequenciados e sintetizados e a sequência inteira do precursor do ANP foi estabelecida (Maack, Camargo et al. 1985). Seguiram-se então pesquisas buscando identificar os efeitos do ANP no rim (Hamet and Tremblay 1989; Lieberthal 1991), musculatura lisa (Winqvist 1985; Baldini, De Vito et al. 2002) e até no tecido adiposo (Moro, Klimcakova et al. 2007). Os últimos estudos tem avaliado a ação molecular dos receptores do ANP (Dickey, Flora et al. 2007; Yuan, Kim et al. 2010), com uma busca incessante da produção de um fármaco que aumentem os níveis de ANP plasmático (Davidson, Coppey et al. 2011; Oltman, Davidson et al. 2011).

### 1.1.2 Estrutura

Depois que foi estabelecida a natureza peptídica do ANP, diversos laboratórios trabalharam independentemente para obter preparações altamente purificadas de peptídeos atriais com propriedades natriuréticas e vasoativas similares aquelas do extrato atrial. Diversos grupos purificaram peptídeos de humanos e ratos para obter um homogenado e determinar sua sequência de aminoácidos. Baseados na sequência de aminoácidos, peptídeos sintéticos foram obtidos, um desenvolvimento que teve um impacto considerável nos estudos da natureza química e funcional do ANP. O gene codificador do ANP está localizado no cromossomo 1 em humanos. O hormônio possui originalmente 151 aminoácidos,

sendo chamado de pré-pró-ANP. Após a retirada de 25 aminoácidos de sua sequência sinal, a cadeia passa a se chamar pró-ANP, que será levada ao complexo de Golgi. Antes de ser exocitada, o ANP é novamente clivado por proteínas de membrana, em uma cadeia funcional de ANP, com 28 aminoácidos e um fragmento aminoterminal de 58 aminoácidos, o NT-pró-ANP. Apenas o ANP na sua forma ativa, com 28 aminoácidos, é exocitado para a circulação. Esse hormônio, em fetos e neonatais, é produzido em grande parte pelos ventrículos, sendo essa atividade diminuída gradativamente após o nascimento, e os átrios assumindo esse papel (Maack, Camargo et al. 1985). A figura 1 mostra a sequência de diversos peptídeos atriais, vários nomes foram sugeridos para estes peptídeos, incluindo cardionitrina I (Flynn, de Bold et al. 1983), auriculina (Atlas, Kleinert et al. 1984) ou atriopentina (Currie, Geller et al. 1984). A porção superior da figura mostra a sequência inteira do precursor de ANP em ratos, enquanto que na parte inferior notam-se algumas sequências do peptídeo ativo. Os estudos tem então avançado a fim de mapear a estrutura do ANP em diversas espécies animais (Mifune, Suzuki et al. 1991; Mifune, Suzuki et al. 1991; Mifune, Suzuki et al. 1992) ou na busca de estruturas similares (Konno, Sumida et al. 2009).

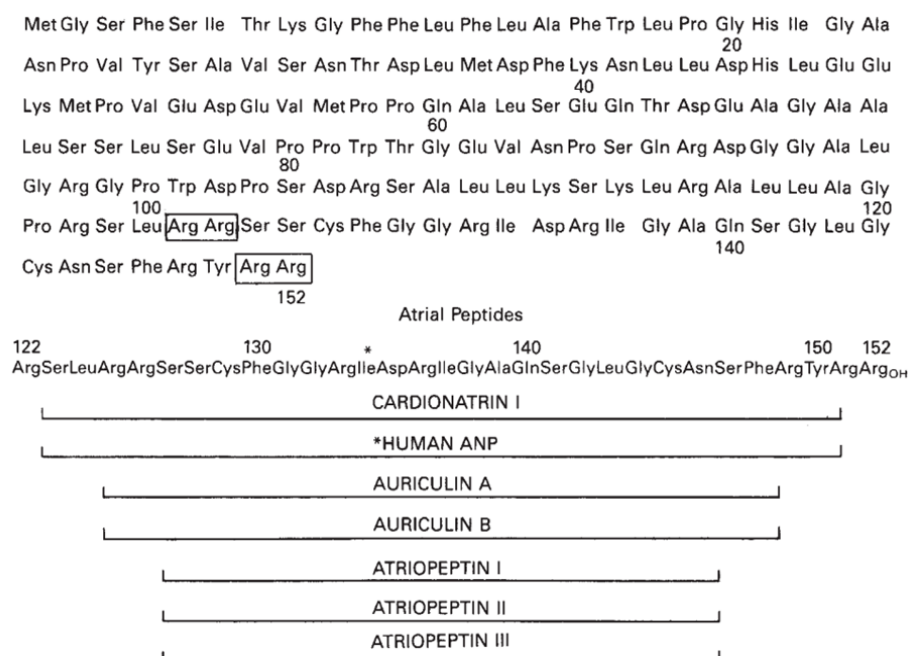


Figura 1. Sequências de aminoácidos (ANP). Precursor do peptídeo natriurético atrial (acima) e o peptídeo natriurético atrial isolado por diversos laboratórios (abaixo). Os retângulos indicam a segmentação que isola o ANP ativo e o asterisco mostra a possível substituição do aminoácido metionina pelo isoleucina no ANP humano (Maack, Camargo et al. 1985).



### 1.1.3 Síntese

Esse hormônio peptídico é produzido principalmente pelos átrios e aurículas do coração de uma variedade de espécies animais, incluindo homens, e é armazenado na forma de grânulos secretores. Os cardiomiócitos produtores são dotados de propriedades endócrinas e contráteis, sendo por isso caracterizadas como células mioendócrinas (Gama, Liberti et al. 2007). Está bem estabelecido que muitos hormônios proteicos e peptídicos são convertidos em suas formas maduras durante seu transporte intracelular, do sítio de síntese via complexo de Golgi para os grânulos secretores ou vesículas. Foi verificado que o tecido atrial de ratos possui principalmente o pré-pró-ANP, enquanto que o ANP propriamente é encontrado em menor quantidade neste tecido. Estudou-se a enzima que converte a pró-forma do ANP em sua molécula ativa, bem como o local preciso onde esse fenômeno ocorre. É sugerido que uma enzima lisossomal denominada de catepsina B seja a responsável pela clivagem da pró-forma de ANP, originando o ANP na sua forma ativa (Watanabe, Watanabe et al. 1989). A catepsina B é uma protease sistéina densamente localizada nas células mioendócrinas atriais (Figura 2). A evidência da participação dessa enzima protease na clivagem do ANP foi bem caracterizada através de dupla marcação imunocitoquímica onde as partículas de ouro indicaram coexistência de ANP e catepsina B nas células mioendócrinas atriais (Figura 3).

Além de produzido, o ANP também é armazenado e liberado pelos miócitos dos átrios cardíacos. É liberado em resposta ao estiramento atrial (Schiebinger and Greening 1992), à hipertensão (Cavallero, Gonzalez et al. 2010) e a uma variedade de outros sinais que induzem hipervolemia, como exercícios (Wisén, Ekberg et al. 2010) ou restrição calórica.

Topificadamente, podemos dizer que o ANP é produzido principalmente em resposta a:

- Distensão atrial (Schiebinger and Greening 1992);
- Hipóxia (Casserly, Pietras et al. 2010);
- Aumento da concentração de sódio (hipernatremia) (Widecka, Krzyzanowska-Swiniarska et al. 1993);
- Elevação dos níveis de Angiotensina II (Olsson, Eriksson et al. 1990);
- Endotelina, um importante vasoconstrictor (Kim, Lee et al. 2001).

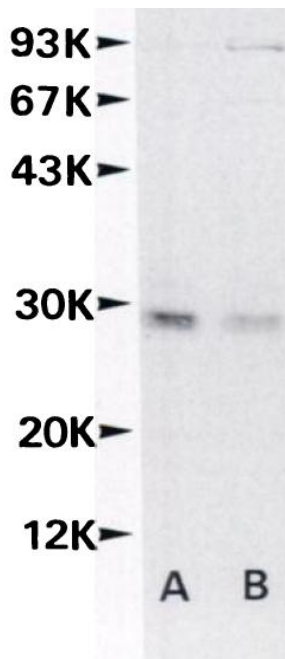


Figura 2. (Modificada) Análise de western blotting mostrando catepsina-B no átrio direito e no ventrículo esquerdo. O presente resultado mostrou que a atividade da catepsina-B (nmol/mg proteína/min) é três vezes maior no tecido atrial que no tecido ventricular (Watanabe, Watanabe et al. 1989).

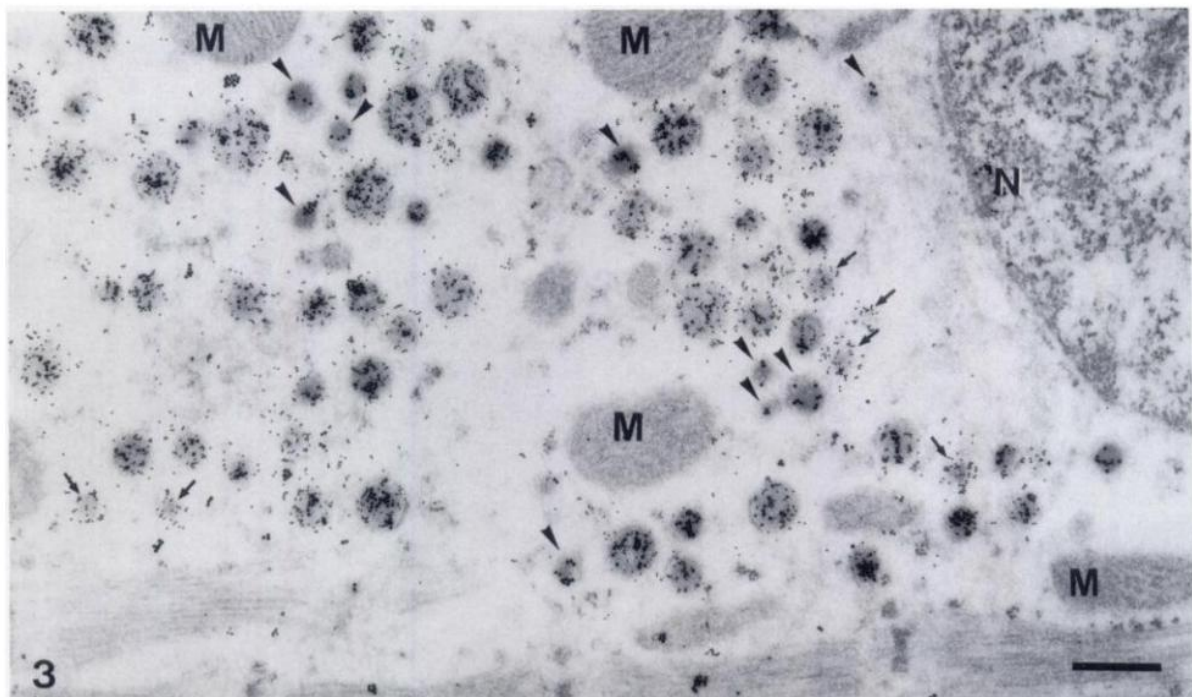


Figura 3. Dupla marcação imunocitoquímica de peptídeo natriurético atrial e catepsina-B, em cortes ultrafinos de tecido atrial incluídos em Epon 812. Pequenas partículas de ouro (8nm) indicam imunorreatividade ao ANP, enquanto que partículas maiores de ouro (15 nm) indicam imunorreatividade a catepsina B. A maioria dos grânulos estão imunomarcados com os dois tipos de partículas de ouro. Note que alguns grânulos são imunomarcados somente para ANP (seta) ou catepsina B (ponta de seta). N, núcleo; M, mitocôndria. Magnitude original = 26.000X. Barra de calibração = 500 nm (Watanabe, Watanabe et al. 1989).

#### 1.1.4 Receptores

Três receptores de superfície de membrana foram relacionados com os peptídeos natriuréticos (ANP, BNP e CNP). Estes receptores são: NPR-A, NPR-B e NPR-C. Tratando-se do ANP em específico, os dois receptores que atuam neste peptídeo são o NPR-A e o NPR-C (Vives, Farage et al. 2010).

A ação fisiológica do ANP é exercida por ação do receptor NPR-A. Este foi localizado principalmente na vasculatura, no coração, nos rins, nas glândulas adrenais e nos pulmões (Woodard and Rosado 2007). Como outros peptídeos, o ANP liga-se a sítios estereoespecíficos da superfície celular para evocar respostas fisiológicas nas células alvo. Essa interação hormônio-receptor, por sua vez, ativa a guanilato ciclase associada à membrana celular, convertendo o MgGMP em GMP cíclico. O GMP cíclico por sua vez estimula “proteínas kinases” dependentes de GMP cíclico, que são as responsáveis pela fosforilação de um grande número de proteínas intracelulares, evento bioquímico que é essencial para a expressão das ações fisiológicas do ANP. Além disso, o ANP também inibe a atividade da adenilato ciclase em alguns tecidos, o que indica a possibilidade que alguns efeitos fisiológicos do ANP sejam devidos à interação com agonistas estimuladores de AMP cíclico (Levin, Gardner et al. 1998).

A degradação do ANP se dá por intermédio do NPR-C. Este tem a função de sequestrar o peptídeo da circulação, reduzindo sua taxa séria. O NPR-C é uma enzima de superfície de membrana que internaliza o ANP e depois o degrada (Yuan, Kim et al. 2010). A endopeptidase neutra também faz parte da inativação dos peptídeos natriuréticos. O conhecimento do mecanismo de ação desse receptor ainda é limitado e uma enorme atenção tem sido dada a este tema, visto que um grande investimento vem sendo feito na indústria farmacêutica na tentativa de inibir a ação desse receptor (Oltman, Davidson et al. 2011).

### 1.1.5 Efeitos fisiológicos

O ANP se liga a seus receptores e causa redução do volume sanguíneo, redução do débito cardíaco e, portanto, da pressão arterial sanguínea. A lipólise é aumentada e a reabsorção renal de sódio é diminuída. Os efeitos gerais do ANP sobre o corpo tendem a conter o aumento do volume e da pressão sanguínea causados pelo sistema renina-angiotensina.

Montamos um esquema para ilustrar as ações fisiológicas do ANP (Fig 4 ). Tal esquema pode ser comparado com o texto que segue, além dos conhecimentos abordados até então.

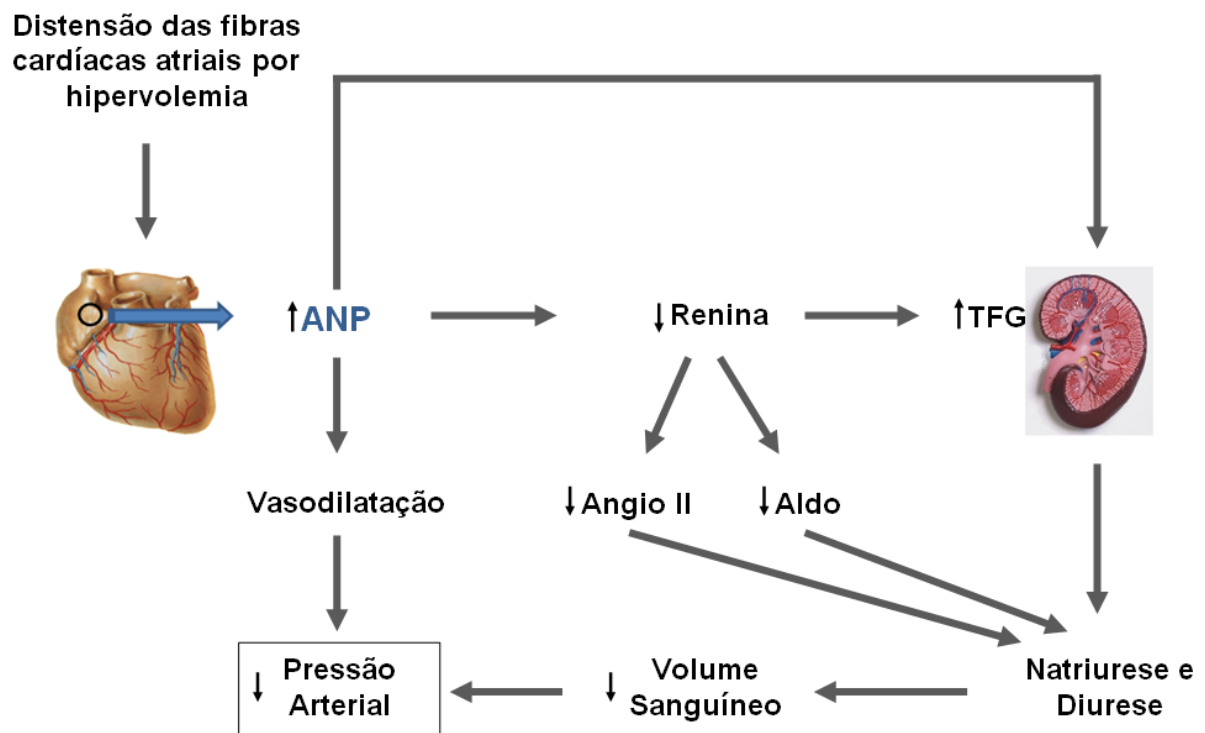


Figura 4. Esquema com ações fisiológicas do ANP. O ANP pode ter sua produção estimulada por mecanismos que distendem suas fibras produtoras. A elevação sérica atua de diversos modos, na maioria deles aumentando a natriurese e a diurese. Todos os sentidos apresentam um fim comum, a diminuição da Pressão Arterial.

Vamos discriminar as ações fisiológicas do ANP sobre os principais órgãos-alvo:

#### 1.1.5.1 Rim

- ✓ Aumento da taxa de filtração glomerular (TFG) – através da dilatação da arteríola glomerular aferente, constrição da arteríola glomerular eferente e relaxamento das células mesangiais. Isto aumenta a pressão dos capilares glomerulares e a TFG, resultando em grande excreção de sódio e água;
- ✓ Diminuição da reabsorção de sódio – diminuição da reabsorção de sódio pelo túbulo contorcido distal e ducto coletor do néfron via cGMP. Verifica-se uma elevação na excreção renal de  $\text{Na}^+$  e água, através da inibição da bomba de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  e dos canais de sódio epteliais (ENaC);
- ✓ Inibição da secreção de renina – o que inibe o sistema renina-angiotensina;
- ✓ Redução da secreção de aldosterona – inibição diretamente no córtex da adrenal (Silver 2006).

#### 1.1.5.2 Vasos

Relaxamento da musculatura lisa vascular das arteríolas e vênulas por:

- ✓ Elevação do cGMP da musculatura lisa vascular mediado pelo receptor de membrana;
- ✓ Inibição do efeito das catecolaminas (Woodard and Rosado 2007).

#### 1.1.5.3 Coração

- ✓ Inibição da hipertrofia adaptativa – animais destituídos de receptores para ANP (NPR-A) apresentaram aumento da massa cardíaca, fibrose severa e morte

súbita. A reexpressão deste do gene que viabiliza NPR-A reduziu esse fenótipo (Munagala, Burnett et al. 2004).

#### 1.1.5.4 Tecido adiposo

- ✓ Aumento da liberação de ácidos graxos livres do tecido adiposo – a concentração de glicerol e ácidos graxos são aumentados por infusão endovenosa de ANP em humanos;
- ✓ Aumento dos níveis de cGMP intracelular – isto induz a fosforilação da lipase sensível ao hormônio (Garruti, Giusti et al. 2007).

#### 1.1.6 Manipulação farmacológica

A endopeptidase neutra é uma enzima que metaboliza os peptídeos natriuréticos (Maguer-Satta, Besancon et al. 2011). A associação de uma droga capaz de inibir simultaneamente ECA e NEP parece ser uma alternativa a curto prazo, visto que os experimentos com modelos animais já estão bem avançados, sendo indicados para tratar uma série de manifestações clínicas, desde hipertensão (Sansoe, Aragno et al. 2005; Tabrizchi 2008; Dai, Hsieh et al. 2010), insuficiência cardíaca (Maki, Nasa et al. 2003; Wang and Hung 2003), a obesidade e neuropatia diabética (Coppey, Davidson et al. 2011; Davidson, Coppey et al. 2011). Mais estudos são necessários para o emprego seguro em humanos.

## 1.2 **Sistema Renina-angiotensina**

O Sistema Renina-Angiotensina (SRA) corresponde a um complexo sistema hormonal e parácrino cujo principal componente, a Angiotensina II (Ang II), é um potente vasoconstrictor que desempenha papel importante na manutenção da

homeostasia hidroeletrolítica do organismo e no controle da pressão arterial. O SRA é considerado sistema endócrino cuja substância ativa, o Ang II, é produzida por clivagem sequencial enzimática dupla a partir do substrato angiotensinogênio de origem hepática. A produção de renina, uma protease altamente específica, se dá no aparelho justaglomerular renal e sua liberação faz-se, principalmente, em resposta a reduções de pressão arterial na circulação renal, alterações de sal na dieta (queda da concentração de NaCl nas células da mácula densa) e variações da intensidade da estimulação simpática no rim. Na circulação sanguínea a renina converte o angiotensinogênio circulante no decapeptídeo Angiotensina I (Ang I). A conversão de Ang I em Ang II (octapeptídeo) ocorre pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) presente, principalmente, nas membranas das células endoteliais da circulação pulmonar (Ames 2002; Hirata, Fukuda et al. 2011).

Estão identificados no corpo humano dois diferentes tipos de sistemas renina-angiotensina: o circulante, descrito há já bastante tempo, e o local, descrito mais recentemente, que parece desempenhar papel crucial na manutenção da homeostase circulatória.

No SRA circulante, o angiotensinogênio é produzido pelo fígado, que requer glicocorticóides do córtex adrenal e estrógeno das gônadas; a renina é liberada pelos rins, enquanto que a enzima de conversão de angiotensina I em angiotensina II (ECA) é encontrada no endotélio vascular de vários órgãos. Uma vez ativada a cascata, surgem a angiotensina I e a angiotensina II, que circulam pelo sangue ativando suas estruturas-alvo: vasos sanguíneos (sobretudo arteríolas e veias sistêmicas), rins, coração, adrenais e o sistema nervoso simpático. O SRA responde a uma instabilidade hemodinâmica e evita redução na perfusão tecidual sistêmica. Atua de modo a reverter a tendência à hipotensão arterial através indução de vasoconstrição arteriolar periférica e aumento na volemia por meio de retenção renal de sódio (através da aldosterona) e água – através da liberação de vasopressina (ADH). Portanto, o sistema renina-angiotensina-aldosterona se soma ao sistema simpático e ao ADH, compondo o trio de sistemas neuro-hormonais de compensação cardiovascular (Cleland and Reid 1996; Berl 2009).

### 1.2.1 Renina

A renina merece uma atenção especial por ser responsável pela etapa limitante da síntese de angiotensinas. É a enzima proteolítica que converte angiotensinogênio em angiotensina I (transformando uma molécula de 411 aminoácidos em outra de 10 aminoácidos) (Carey and Siragy 2003). A pró-renina é o precursor inativo da renina, que usualmente é encontrado em baixas concentrações plasmáticas mas, em diabéticos (tipo I e II) têm sido encontrados níveis elevados a ponto de ter sido proposto como marcador de nefropatia diabética (Campbell 2008; Eyileten, Sonmez et al. 2010; Fegan, Davis et al. 2011).

A quantidade de renina liberada pelos rins é o principal determinante da taxa de produção de Ang II. A renina é sintetizada, armazenada e secretada na circulação arterial renal pelas células justaglomerulares granulares situadas nas paredes das arteríolas aferentes. Vale à pena salientar que outros órgãos como cérebro, coração e útero podem produzir renina. A forma ativa da renina é uma glicoproteína que contém 340 aminoácidos (Meade 2010).

A secreção de renina pelas células justaglomerulares é controlada por três mecanismos, dois que agem predominantemente no rim, e o terceiro, que age através do SNC e é mediado pela liberação de noradrenalina pelos nervos noradrenérgicos renais.

O primeiro mecanismo intra-renal que controla a liberação de renina é denominado mecanismo da mácula densa. Aumentos do fluxo de NaCl através da mácula densa inibem a liberação de renina, e reduções do fluxo de NaCl estimulam a liberação de renina (Jackson, Branch et al. 1982).

O segundo mecanismo intra-renal que controla a liberação de renina é denominado mecanismo barorreceptor intra-renal. Aumentos e reduções da pressão sanguínea nos vasos pré-ganglionares inibem e estimulam a liberação de renina, respectivamente. Acredita-se que o estímulo imediato para a secreção seja uma redução da tensão da parede da arteríola aferente o que, talvez, controle, em parte, o mecanismo barorreceptor intra-renal (Beierwaltes, Potter et al. 2002).

O terceiro mecanismo, denominado mecanismo do receptor  $\beta$ -adrenérgico, é mediado pela liberação de noradrenalina das terminações dos nervos simpáticos pós-ganglionares. Ativação dos receptores  $\beta_1$  adrenérgicos por esta catecolamina,



nas células justaglomerulares, aumenta a secreção de renina. Vale a pena salientar que receptores  $\alpha$ -adrenérgicos renais também podem mediar a secreção de renina (Desaulles, Forler et al. 1975).

Os três mecanismos que regulam a secreção de renina estão interligados constituindo uma rede fisiológica. Elevações na secreção de renina aumentam a formação de Ang II que, interagindo com seus receptores renais, inibe, nas células justaglomerulares, a liberação de renina. Este sistema foi denominado mecanismo de *feedback* negativo de alça curta. Além disso, aumentos da pressão sanguínea inibem a liberação de renina: (1) ativando os barorreceptores carotídeos e aórticos, portanto reduzindo o tônus simpático renal; (2) aumentando a pressão nos vasos pré-ganglionares; e (3) reduzindo a absorção de NaCl no túbulo proximal (natriurese pressórica), o que aumenta a liberação tubular de NaCl pela mácula densa. A inibição da liberação de renina devido a aumentos da pressão sanguínea induzidos pela Ang II foi denominado de mecanismo de *feedback* negativo de alça longa (Sadjadi, Kramer et al. 2005).

### 1.3 Síndrome metabólica

Há atualmente importantes confusões conceituais entre a definição da síndrome metabólica e dos parâmetros clínicos para o rastreio e dos valores de corte propostos por diferentes organizações (Isezuo 2006). Em 1988, com a constatação da frequente associação entre resistência à insulina, intolerância à glicose, hipertensão arterial, dislipidemia e doença aterosclerótica, Gerald Reaven descreveu uma síndrome que denominou síndrome X. Posteriormente, uma série de anormalidades metabólicas foi sendo acrescentada ao espectro da síndrome, contribuindo para a compreensão de sua etiopatogenia e do impacto nos risco cardiovasculares. Hoje, a terminologia mais empregada pelas sociedades científicas internacionais é a de síndrome metabólica (Reaven 1988).

Apesar das características comuns entre as definições, existem parâmetros específicos em que se diferem. A *World Health Organization* (WHO) e a *The European Group for the Study of Insulin Resistance* (EGIR) exigem inicialmente classificações como a medição da resistência à insulina, que são parâmetros

utilizados principalmente no campo da pesquisa, com o uso de mecanismos para a determinação da resistência à insulina como o teste oral de tolerância à glicose e o teste de hiperinsulinemia, com clamp euglicêmico. As principais características utilizadas para o diagnóstico de síndrome metabólica podem ser resumidas na tabela 1.

WHO (1999)	EGIR (1999)	ATPIII (2001)	IDF (2005)
Diabetes, glicose jejum alterada, intolerância à glicose ou resistência à insulina (hiperinsulinemia definida pelo mecanismo do clamp euglicêmico), acrescido de dois ou mais dos fatores seguintes: IMC >30 kg/m <sup>2</sup> ou relação cintura/quadril >0.9 (H) ou >0.85 (M)	Resistência à insulina considerando os valores de insulina em jejum, além de dois ou mais dos seguintes fatores:  Obesidade central com CC ≥94 cm (H) ou ≥80 cm (M)	Três ou mais dos seguintes fatores:  CC ≥102 cm (H) ou ≥88 cm (M)	Obesidade central (valores étnicos específicos), bem como quaisquer de duas dos seguintes fatores:  TG >150 mg/dl ou sob tratamento específico
TG >150 mg/dl ou HDL-c <35 (H) ou <38 mg/dl (M)	TG >176 mg/dl ou HDL-c <38 mg/dl	TG >150 mg/dl	HDL-c <40 (H) ou <50 mg/dl (M) ou sob tratamento específico
PAS >130/90 mmHg	PAS ≥140/90 mmHg ou sob uso de medicação anti-hipertensiva	PAS ≥135/85 mmHg ou sob uso de medicação anti-hipertensiva	PAS ≥130/85 mmHg ou sob uso de medicação anti-hipertensiva
Excreção de albumina >20µg/min	GPJ ≥110 mg/dl	GPJ ≥110 mg/dl	GPJ ≥ 90 mg/dl ou diagnóstico prévio de diabetes tipo 2

IMC, índice de massa corporal; PAS, pressão arterial sistêmica; H, homens; M, Mulher; GPJ, glicose plasmática de jejum; TG, triglicérideo; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; CC, circunferência da cintura.

Tabela 1. Comparação de algumas das definições mais amplamente utilizada para a síndrome metabólica (Ritchie and Connell 2007).

### 1.3.1 Dieta hiperlipídica

O crescente aumento da prevalência de obesidade no mundo vem sendo atribuído principalmente as modificações do estilo de vida, com predominância das dietas hiperenergéticas e sedentarismo na maior parte dos países. Nesse contexto, o impacto metabólico de dietas ricas em lipídios vem sendo estudado

frequentemente e já é aceita internacionalmente a forte correlação entre consumo exagerado de ácidos graxos saturados (AGS) e incidência de doenças cardiovasculares (DCV) (Ritchie and Connell 2007), hiperglicemia e hiperinsulinemia compensatória (Morrison, Glueck et al. 2011), dislipidemia (Martha, Ramreddy et al. 2011) e hiperleptinemia (Yun, Kimm et al. 2010).

Estudos recentes demonstraram que a ingestão elevada de gordura está associada com estresse oxidativo e ativação do fator nuclear kappa-B (NF-kB), um fator de transcrição pró-inflamatório (Mohanty, Ghanim et al. 2002).

Desta forma, o estado pró-inflamatório da obesidade e da síndrome metabólica é originado pela excessiva ingestão calórica. Esse estado pró-inflamatório induz resistência à insulina, levando às manifestações clínicas e bioquímicas da síndrome metabólica (Dandona, Aljada et al. 2005).

#### 1.4 Hipertensão arterial sistêmica

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma doença crônica, altamente prevalente em humanos, de elevado custo econômico social, principalmente em decorrência de suas complicações, e com grande impacto na morbi-mortalidade (Kamath and Cappuzzo 2010). O maior fator de risco de doenças cardiovasculares, a HAS acomete aproximadamente 50 milhões de indivíduos nos Estados Unidos e aproximadamente um bilhão de pessoas pelo mundo inteiro (FitzGerald, Murray et al. 2004). A HAS é diagnosticada em 50% dos indivíduos acima de 55 anos de idade nos países industrializados (Modan, Or et al. 1992).

As consequências das HAS são as principais causas de morte no mundo, tendo a causa identificável em apenas 5% dos casos (Mayet and Hughes 2003).

A HAS pode provocar ruptura dos vasos sanguíneos cerebrais, dos vasos renais ou dos vasos de outros órgãos vitais, acidentes vasculares cerebrais, insuficiência renal, cegueira, ataques cardíacos. Por outro lado, também pode representar carga excessiva para o coração, levando a sua insuficiência. Por essas razões, um dos mais importantes problemas da fisiopatologia humana é determinar as causas da HAS e seu tratamento eficaz (Jones and Hall 2004).

Estudos clínicos e experimentais demonstram que a HAS provoca alterações adversas na estrutura cardíaca como, dilatação do átrio esquerdo, hipertrofia do ventrículo esquerdo, fibrose miocárdica e alterações funcionais do ventrículo esquerdo, induzidas por fatores hemodinâmicos e não hemodinâmicos (Kenchiah and Pfeffer 2004).

Quanto a sua patogenia, a HAS é resultante principalmente da elevação da resistência periférica. Isso ocorre pela redução do calibre das arteríolas ou pelo aumento do volume circulante. A redução do diâmetro arteriolar é determinado pela combinação, em grau variado, de fatores funcionais e fatores estruturais. A vasoconstrição pode ser causada pela produção excessiva de fatores pressores (angiotensina, vasopressina, endotelina e sistema nervoso simpático etc), ou pela deficiência dos fatores depressores (óxido nítrico, prostaciclina e peptídeo natriurético atrial) (Zheng, Shi et al. 2010).

O componente estrutural é, geralmente, representado pela hipertrofia da camada média que passa a ocupar parte do espaço intravascular. Importante ressaltar que os fatores que, ativamente, contraem ou dilatam os vasos têm, também, efeitos tróficos sobre a camada muscular, estimulando ou inibindo o seu espessamento. A redução da luz das arteríolas pode resultar, igualmente, de “remodelagem”, quando ocorre redução tanto do diâmetro interno como externo, sem modificações da massa. O componente genético é responsável pela produção dos complexos fatores pressores e depressores que regulam a pressão arterial (Zhang, Chen et al. 2011).

Alguns fatores ambientais também podem gerar um desequilíbrio e causar a HAS, modulados pela carga genética individual. Os principais fatores ambientais são o sal e o estresse.

#### 1.4.1 Dieta hipersódica

O alto consumo de sal, atualmente, é utilizado como preditor de doenças cardiovasculares. Em países ocidentais, o consumo de sal é elevado, não só na preparação como na conservação de alimentos, além da grande utilização de outras substâncias, como o glutamato monossódico. Esse condimento parece ter grande

aceitação entre os mais jovens e tornou-se indispensável na alimentação à base de massas. Apesar de poucos estudos sobre a mudança de padrões alimentares no Brasil, um estudo de Barreto & Cyrillo (Barreto 2001), na cidade de São Paulo, mostrou uma diminuição de 35% nos gastos domésticos com hortaliças e frutas no orçamento familiar. Situação inversa foi encontrada nos gastos com alimentos industrializados. Essa modificação parece não estar somente relacionada aos preços do mercado, mas também ao marketing e à própria dinâmica de vida, os quais exercem papel importante nas decisões de consumo.

Populações ocidentais e com alto consumo de sal apareceram como tendo os maiores percentuais de hipertensão, enquanto as populações rurais ou primitivas que não faziam uso da adição de sal apresentaram menores prevalências ou nenhum caso de hipertensão arterial (Alderman 2000).

Uma elevada ingestão de sal está correlacionada com altos níveis pressóricos e disfunções cardíacas (Kirchhoff, Krebs et al. 2008). A dieta hipersódica vem sendo apresentada como um bom modelo de indução de HAS em roedores (Haque and Majid 2011). Nestes animais, a dieta hipersódica revelou alteração nos parâmetros hemodinâmicos (aumento do volume ventricular dinâmico, diminuição da fração de ejeção), miocardiopatia dilatada, o que aponta a longo prazo para insuficiência cardíaca congestiva. Apresentou ainda disfunção vascular, HAS com hipertrofia compensatória e remodelamento cardiovascular adverso (Yu, Larson et al. 2004).

## 2 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo avaliar agressões cardíacas e renais induzidas por dietas hipersódica, hiperlipídica, ou pela associação de ambas. Associar essas agressões com a produção de ANP e com o sistema renina-angiotensina.

Especificamente, objetivou-se a comparação destas dietas abordando os seguintes parâmetros:

- Induzir e comparar a hipertensão arterial sanguínea;
- Avaliar alterações morfológicas cardiovasculares como o remodelamento cardiovascular adverso;
- Identificar modificações ultra-estruturais nos cardiomiócitos produtores de ANP;
- Verificar ultra-estruturalmente o número dos grânulos de ANP nos cardiomiócitos atriais da aurícula direita;
- Analisar o comportamento sérico do ANP;
- Mensurar e comparar a produção de renina pela mácula densa;
- Avaliar e comparar a função renal por exames séricos e urinários.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais e dieta

Camundongos C57Bl/6, machos, com oito semanas de idade foram mantidos sob condições normais (ciclo claro/escuro de 12 horas,  $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e teve livre acesso à água e alimento. Os animais foram estudados por nove semanas. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética Local para Cuidados e Uso de animais de Laboratório [CEA/254/2008]. O estudo foi realizado em conformidade com as diretrizes de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório (EUA, Institutos Nacionais de Saúde 85-23, revisado em 1996).

Os animais foram separados aleatoriamente em quatro grupos baseados nas diferentes dietas oferecidas: ração padrão para roedores (Grupo P, 76% de carboidratos, 14% de proteínas, 10% de gordura do óleo de soja, 0,25% de NaCl, g/g, a energia total é de 16,71 kJ/g); dieta com alto teor de lipídeos e teor de sal normal (Grupo HL, 26% de carboidratos, 14% de proteína, 60% de gordura – 50% de banha de porco e 10% de óleo de soja – 0,25% de NaCl, g/g ; total de energia 23,38 kJ/g); dieta com teor normal de lipídeos e alto teor de sal (Grupo HS, 76% de carboidratos, 14% de proteína, 10% de gordura do óleo de soja, 7,25% de NaCl, g/g, a energia total de 16,71 kJ / g) e dieta com alto teor de gordura e sal (Grupo HL-HS, 26% de carboidratos, 14% de proteína, 60% de gordura – 50% de gordura e 10% de óleo de soja – 7,25% NaCl, g/g; energia total de 23,38 kJ/g).

As dietas foram produzidas por PragSolucoes (Jaú, SP, Brasil, [www.pragsolucoes.com.br](http://www.pragsolucoes.com.br)). A composição da dieta está de acordo com o Instituto Americano de Recomendação Nutricional (AIN-93M) (Reeves, Nielsen et al. 1993). O consumo alimentar foi multiplicado pelo conteúdo energético da dieta (quilojoules por grama de ração) para obter o consumo diário de energia por camundongo. A massa corporal e a ingestão de água foram monitorados semanalmente. A relação entre o ganho de massa corporal (g) / consumo diário calórico total (kJ) foi utilizado para determinar a eficiência alimentar.

### 3.2 Pressão arterial sistólica

A pressão arterial (PA) foi aferida semanalmente em camundongos conscientes através de pletismografia de artéria da cauda (Letica LE 5100; Panlab, Barcelona, Espanha). A média de três medições em cada momento foi utilizada. Duas semanas antes do experimento, os animais foram colocados no pletismógrafo para minimizar o estresse causado pelo procedimento.

### 3.3 Análise de sangue e de urina

Um teste oral de tolerância à glicose (TOTG) foi realizado na primeira e na nona semana de experimento. Depois de um período de jejum de seis horas, foi administrado glicose a 25% em solução salina estéril (NaCl 0,9%) com 1 g/kg de peso corporal por sonda gástrica. Amostras de sangue foram obtidas por uma pequena incisão na ponta da cauda e a concentração de glicose plasmática foi medida antes da gavagem de glicose e depois aos 15, 30, 60 e 120 minutos após administração de glicose (glucosímetro Accu-Chek Go, Roche Diagnostic, Mannheim, Alemanha).

Na nona semana, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas e a urina foi coletada durante 24 horas. Foram medidas as concentrações de creatinina e uréia, tanto do sangue como da urina, através de um teste colorimétrico (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil). Foram avaliados os seguintes parâmetros: clearance da creatinina =  $1000 \times [\text{volume da urina (mL)}] \times [\text{concentração de creatinina na urina (mmol/L)}] / [\text{concentração de creatinina sérica (mmol/L)}]$ ; clearance da uréia =  $[\text{volume da urina (mL)}] \times [\text{concentração de uréia na urina (mmol/L)}] / [\text{concentração de uréia no plasma (mmol/L)}]$  e a taxa de filtração glomerular (TFG) = média aritmética entre clearance de creatinina e clearance da uréia (Pestel, Krzykalla et al. 2007).



### 3.4 Eutanásia

Um dia antes da eutanásia, os animais foram privados de alimentos por 6 h, e em seguida anestesiados (pentobarbital sódico intraperitoneal, 150 mg/kg). Uma amostra de sangue foi coletada por punção cardíaca. O plasma foi obtido por centrifugação (120 g por 15 min) à temperatura ambiente e armazenado a -20°C até o momento da realização do exame. O colesterol total, triglicerídios, creatinina e uréia foram medidos por um teste colorimétrico (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil). O coração e os rins foram imediatamente dissecados.

### 3.5 Radioimunoensaio de insulina plasmática

A concentração de insulina em jejum foi medida utilizando um kit de radioimunoensaio para insulina (Kit de radioimunoensaio dotados de tubos com revestimento ImmuChem para insulina, MP Biomedicals, Solon, OH, EUA) com uma avaliação intra-coeficiente de variação de 1,4%. A resistência à insulina (RI) foi estimada pelo índice de avaliação da homeostase como  $HOMA-IR = (glicose \times insulina) / 22.5$  (Matthews, Hosker et al. 1985). O colesterol total (CT) e triglicérides (TG) foram medidos por um teste colorimétrico (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil).

### 3.6 ELISA

O ANP foi dosado pelo método ELISA (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA, EUA). Rapidamente, 50 µL de plasma foi adicionado a 25 µL de anti-soro primário reidratado com 25 µL de peptídeo biotilado. Após a incubação por 2 horas em temperatura ambiente, a placa foi lavada três vezes, e 100 µL de solução SA-HRP foi adicionado em cada amostra, seguido de incubação por 1 hora em temperatura ambiente. A placa foi lavada três vezes, e 100 µL de solução TMB foi adicionado em cada amostra. Após 30 min, 100 µL de solução com propriedade de

parar a reação foi adicionado em cada amostra e a absorvância a 450 nm foi determinada.

### 3.7 Microscopia de luz e eletrônica de transmissão

#### 3.7.1 O ventrículo esquerdo

Os átrios foram separados dos ventrículos. Os ventrículos foram colocados rapidamente numa solução de 1,27 mol/L de formaldeído (0,1 M de tampão fosfato, pH 7,2) por 48 horas. Fragmentos aleatórios do ventrículo esquerdo (VE) foram incluídos em paraplast plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), cortados (5  $\mu\text{m}$ ) e corados com hematoxilina e eosina. Os cortes foram analisados por videomicroscopia (DMRBE microscópio Leica, Wetzlar, Alemanha, câmera de vídeo Infinity, uma Media cibernética, Silver Spring, MD, EUA). A área média de secção transversal dos cardiomiócitos ( $A_{[\text{cmy}, \text{LV}]}$ ) foi estimada como:

$$A_{[\text{cmy}, \text{VE}]} = Vv_{[\text{cmy}, \text{VE}]} / 2Q_{A[\text{cmy}, \text{VE}]} \mu\text{m}^2.$$

A densidade de volume dos cardiomiócitos ( $Vv_{[\text{cmy}]}$ ) foi estimada por contagem de pontos:

$Vv_{[\text{cmy}, \text{VE}]} = Pp_{[\text{cmy}, \text{VE}]} / P_T$ , onde  $Pp$  é o número de pontos que tocam nos cardiomiócitos e  $P_T$  é o número total de pontos da área teste.

A densidade numérica por área de núcleos de cardiomiócitos ( $Q_{A[\text{cmy}]}$ ) foi estimada:

$Q_{A[cmv]} = N_{[cmv]} / A_T$ , onde N é o número de perfis (núcleos) contados dentro da área teste (considerando a linha proibida e suas extensões) e  $A_T$  é a área teste (Mandarim-de-Lacerda, Fernandes-Santos et al. 2010).

### 3.7.2 Aurícula direita

Fragmentos da aurícula do átrio direito, contendo músculo pectíneo foram cortados e fixados em glutaraldeído 2,5%, tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 por 2 horas em temperatura ambiente e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão, por 2 horas, em temperatura ambiente. Em seguida, os fragmentos foram desidratados por uma série crescente de acetona e incluídos em Epon. Cortes ultrafinos foram obtidos utilizando um ultramicrotomo Leica ULTRACUT e coletados em uma grade de cobre. Todos os fragmentos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscópio Zeiss EM 906.

A densidade numérica de grânulos de ANP por área ( $Q_{A[ANP]}$ ) foi estimada como o número de perfis (grânulos de ANP) dentro de uma área teste com dimensões conhecidas (expresso como número de grânulos/ $\mu\text{m}^2$ ), como mencionado anteriormente, em 25 eletromicrografias por grupo.

## 3.8 **Microscopia confocal com varrimento a laser**

O rim foi analisado por imunofluorescência com marcação para renina. A recuperação antigênica foi realizada utilizando tampão citrato, pH 6,0 a 60°C e em seguida bloqueado com cloreto de amônio, glicina, 2% e tampão fosfato, pH 7,4 (PBS). Os cortes foram incubados com um anticorpo primário específico para renina em camundongo, na concentração de 1:100 (38 kDa; sc-3806, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) durante toda a noite a 4°C. Em seguida, as amostras foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com um anticorpo secundário de burro anti-camundongo conjugado com fluoróforo anti-IgG-Alexa 488,

na concentração de 1:100 (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA). Após lavagem em PBS, as lâminas foram montadas com DAPI a fim de corar ácidos nucléicos e com um Antifade SlowFade que evita ou lentifica o decaimento (Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, CA, EUA). A imunofluorescência indireta foi observada com o microscópio confocal com varrimento a laser – LSM 510 Meta, Alemanha.

### 3.9 Análise de western blot

Proteínas totais foram extraídas dos rins e homogeneizadas em tampão com inibidores de protease. O homogenato foi centrifugado a 5000 g por 20 min a 4°C, e o sobrenadante foi coletado. A quantidade total de proteína na amostra foi quantificada através do kit de avaliação BCA (Thermo Scientific, #23225, Rockford, IL, USA). As proteínas foram desnaturadas em tampão contendo SDS (5 min a 100°C) e 10 µg de proteína de cada amostra foram separadas por SDS/PAGE. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Hybond-P, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), e a membrana foi bloqueada pela incubação em 6% (g/ml) de leite em pó desnatado em solução tampão salina Tris contendo 0,05% de Tween 20. Em seguida, a membrana foi incubada com um anticorpo monoclonal anti-renina para camundongo (38 kDa; sc-3806; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) durante toda a noite a 4°C, seguido pelo anticorpo secundário de cabra anti-camundongo IgG-HRP (sc-2031; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Finalmente, a membrana foi exposta ao ECL por 5 minutos, a sinalização foi visualizada por autoradiografia e quantificada utilizando o software Image Pro versão Plus 7.0 (Media cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

### 3.10 Análise dos dados

As diferenças entre os grupos foram testadas por meio da análise de variância e pos-teste de Tukey (Statistica versão 7.0, Statsoft, Tulsa, OK, EUA). Um valor de  $P \leq 0,05$  foi considerado significativo estatisticamente.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Ganho de massa corporal e comportamento alimentar (Tabela 2)

No início do experimento, os animais tinham massa corporal semelhante ( $23,8 \pm 0,1$  g, média e erro padrão da média). O consumo excessivo de lipídeos induziu ganho de massa corporal nos grupos HL e HL-HS, terminando o experimento com um ganho de massa corporal aproximadamente três vezes maior do que os grupos P e a HS ( $P < 0,01$ ).

O grupo HL consumiu 14% a menos de alimentos por dia que o grupo P, mas com um maior consumo de energia (21% a mais) e maior eficiência alimentar (210%) ( $P < 0,01$ ). Da mesma forma, o grupo HL-HS consumiu 9% a menos de alimentos por dia que o grupo P, mas com um maior consumo de energia (19% a mais) e maior eficiência alimentar (161%) ( $P < 0,01$ ). Curiosamente, o consumo de sal foi acompanhado por um aumento de 18% no consumo diário de alimentos e de 10% no consumo de energia, enquanto a eficiência alimentar foi reduzida em 24%, comparando o grupo HS com o grupo P ( $P < 0,05$ ). A ingestão de água (Tabela 2) foi maior nos grupos com elevado consumo de sal, em comparação com o seu correspondente com baixo teor de sal (aumento de 182% entre os grupos normolipídicos e de 105% entre os grupos hiperlipídicos) ( $P < 0,0001$ ).

## 4.2 Metabolismo (Tabela 2)

A ingestão excessiva de gordura foi acompanhada por um aumento proporcional no CT e TG. O CT foi 25% maior no grupo HL e 27% maior no grupo HL-HS, em comparação com os seus grupos controles correspondentes (P e HS, respectivamente) ( $P < 0,05$ ). Não foi observada diferença entre os grupos P e HS nem entre os grupos HL e HL-HS. O TG foi 54% maior no grupo HL e 31% maior no grupo HL-HS do que seus controles correspondentes (P e HS, respectivamente) ( $P < 0,05$ ). Não foi observada diferença entre os grupos P e HS nem entre os grupos HL e HL-HS.

Quanto ao TOTG, a área sob a curva foi 24% maior no grupo HL e 32% maior no grupo HL-HS, quando comparados com os seus grupos controles correspondentes (P e HS, respectivamente) ( $P < 0,05$ ), indicando intolerância à glicose nos animais alimentados com dieta rica em lipídeos.

A ingestão excessiva de lipídeos aumentou a insulina de jejum. Esta foi 39% maior no grupo HL e 70% maior no grupo HL-HS, quando comparados com os seus grupos controles correspondentes (P e HS, respectivamente), com o consequente aumento no HOMA-IR ( $P < 0,05$ ). Não foi observada diferença nos níveis de insulina em jejum ou HOMA-IR entre os grupos P e HS.

## 4.3 Pressão arterial (figura 5)

Os animais iniciaram o experimento com PA similares ( $119,9 \pm 1,4$  mmHg, pressão arterial sistólica). Depois de nove semanas de experimento, não foi observada diferença entre os grupos P e HL, ou entre os grupos HS e HL-HS. No entanto, a PA foi aproximadamente 40% maior em ambos os que receberam dieta hipersódica (HS e HL-HS), quando comparados com seus controles correspondentes (P e HL, respectivamente) ( $P < 0,05$ ).

#### 4.4 A hipertrofia cardíaca (figura 6 e tabela 2)

A hipertrofia cardíaca foi analisada através espessura da parede do VE e da área de secção transversa dos cardiomiócitos (A[cm<sup>2</sup>]). A hipertrofia cardíaca nos animais alimentados com excesso de gordura ou excesso de sal pode ser facilmente confirmado na figura 6 e na tabela 2. A A [cm<sup>2</sup>] mostrou um aumento de 29% no grupo HL, de 93%e no grupo HS e um aumento de 98% no grupo HL-HS, em relação ao grupo P ( $P<0,0001$ ). Não foi observada diferença na A [cm<sup>2</sup>] entre a os grupos HS e HL-HS (Tabela 2).

Tabela 2. Ganho de massa corporal, comportamento alimentar, bioquímica sanguínea e estimativa da área dos cardiomiócitos. Os dados são apresentados em média e erro padrão da média. As diferenças foram avaliadas com one-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Nos casos assinalados,  $P < 0.05$ , [a] quando comparado com o grupo P; [b] comparado com HL; [c] comparado com HS. Grupos: P: dieta padrão com conteúdo de sal normal; HL: dieta hiperlipídica com conteúdo de sal normal; HS: dieta padrão com elevado conteúdo de sal; HL-HS: dieta hiperlipídica com elevado conteúdo de sal.

Abreviações: ANP (peptídeo natriurético atrial), u.a. (unidade arbitrária), ASC (area sob a curva),  $\Delta$ MC (ganho de massa corporal), EA (Eficiência alimentar), HOMA-IR (modelo de índice de avaliação homeostática de resistência a insulina), TOTG (teste oral de tolerância a glicose), CT (colesterol total), TG (triglicerídeo).

Dados	Grupos			
	P	HL	HS	HL-HS
$\Delta$ MC (g)	1.0±0.2	3.8±0.3 <sup>[a]</sup>	0.8±0.2 <sup>[b]</sup>	3.3±0.3 <sup>[a][c]</sup>
Consumo alimentar, g/dia/camundongo	2.7±0.03	2.3±0.05 <sup>[a]</sup>	3.2±0.07 <sup>[a][b]</sup>	2.5±0.02 <sup>[c]</sup>
Energia, KJ/dia/ camundongo	45.3±0.5	54.6±1.2 <sup>[a]</sup>	49.8±1.1	54.4±0.5 <sup>[a]</sup>
EA, g/KJ/ camundongo ( $10^{-2}$ )	0.6±0.1	2.0±0.1 <sup>[a]</sup>	0.5±0.1 <sup>[b]</sup>	1.7±0.2 <sup>[a][c]</sup>
CT, mg/Dl	71.2 ±1.6	89.2±1.2 <sup>[a]</sup>	71.5±1.7 <sup>[b]</sup>	90.2±1.0 <sup>[a][c]</sup>
TG, mg/dL	40.3 ±1.8	62.3 ±1.9 <sup>[a]</sup>	41.0 ±1.8 <sup>[b]</sup>	52.5 ±2.4 <sup>[a][b][c]</sup>
TOTG, ASC u.a.	1125.8±27.2	1370.0±48.6 <sup>[a]</sup>	920.1±56.0 <sup>[b]</sup>	1176.8±47.1 <sup>[c]</sup>
Insulina, $\mu$ UI/L)	15.1±0.9	21.0±0.7 <sup>[a]</sup>	14.7±1.7 <sup>[b]</sup>	25.1±1.3 <sup>[a][c]</sup>
HOMA-IR	5.0±0.4	7.2±0.5 <sup>[a]</sup>	3.5±0.4 <sup>[b]</sup>	7.7±0.5 <sup>[a][c]</sup>
Área dos cardiomiócitos, $\mu$ m <sup>2</sup>	612.8±13.2	793.3±9.3 <sup>[a]</sup>	1180.6±39.1 <sup>[a][b]</sup>	1216.0±73.6 <sup>[a][b]</sup>
ANP, ng/mL	0.5±0.03	0.8±0.02 <sup>[a]</sup>	0.9±0.05 <sup>[a]</sup>	0.9±0.03 <sup>[a]</sup>



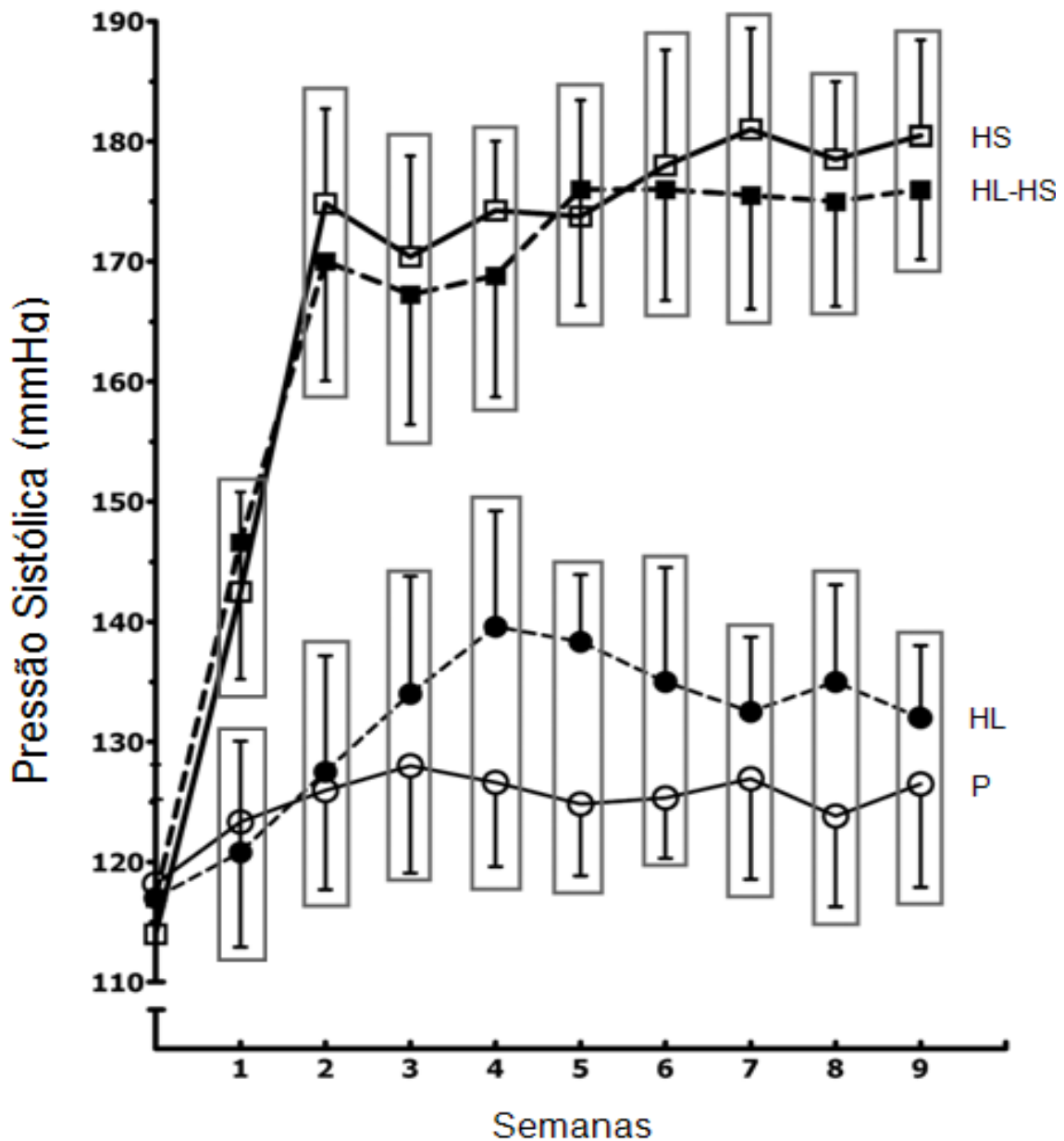


Figura 5. Evolução da Pressão Arterial (PA). Grupos: (a) P: dieta padrão com conteúdo de sal normal; (b) HL: dieta hiperlipídica com conteúdo de sal normal; (c) HS: dieta padrão com elevado conteúdo de sal; (d) HL-HS: dieta hiperlipídica com elevado conteúdo de sal. Os animais iniciaram o experimento sem diferença na PA. Uma semana depois eles foram divididos em dois grandes grupos (indicados por retângulos). Os grupos com consumo excessivo de sal tiveram a PA significativamente mais elevada que os grupos com consumo de sal normal. Essa diferença persistiu durante todo o experimento (One-way ANOVA e pos-teste de Tukey,  $n = 12$  por grupo).

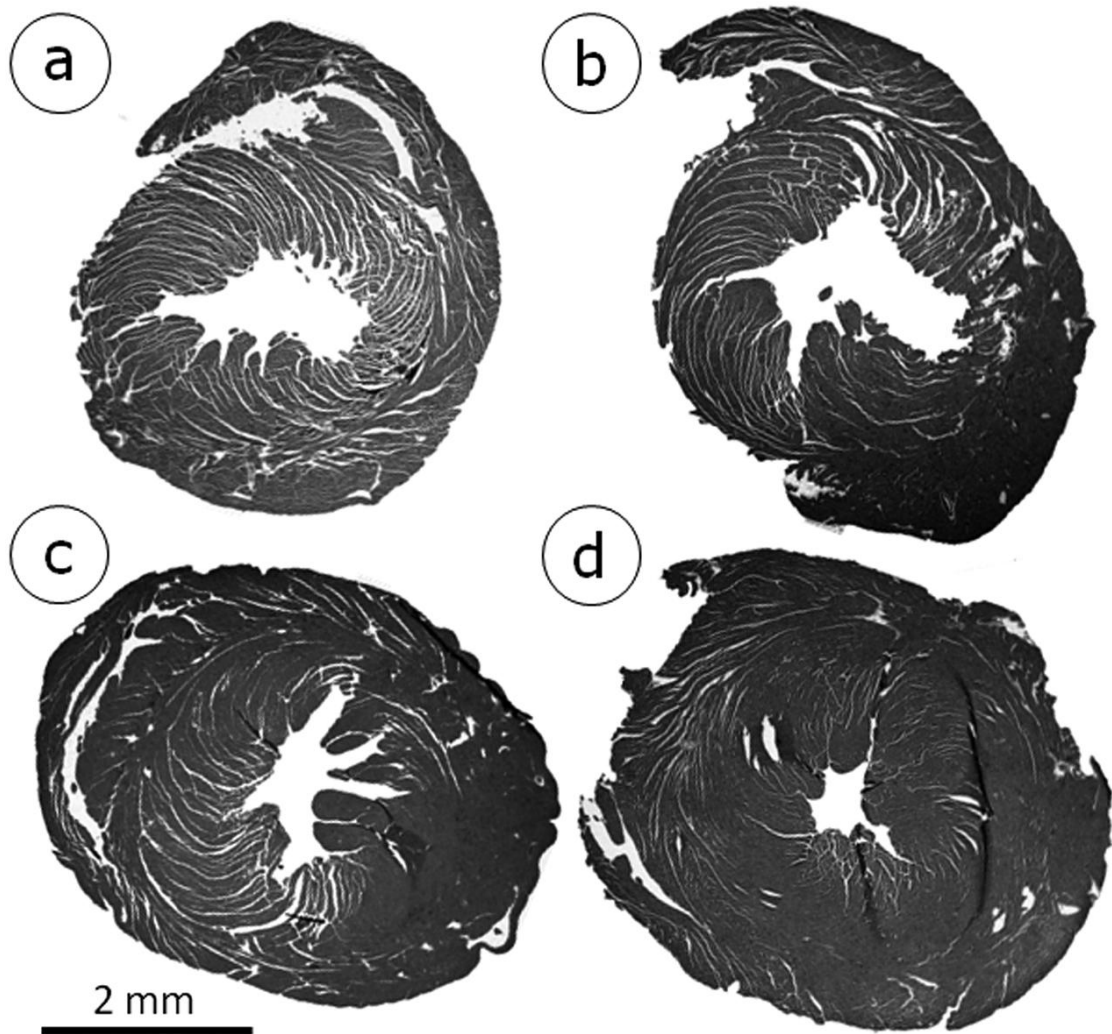


Figura 6. Fotomicrografias exibindo secção transversa de ventrículo esquerdo. Grupos: (a) P: dieta padrão com conteúdo de sal normal; (b) HL: dieta hiperlipídica com conteúdo de sal normal; (c) HS: dieta padrão com elevado conteúdo de sal; (d) HL-HS: dieta hiperlipídica com elevado conteúdo de sal. A espessura da parede do ventrículo esquerdo aumentou do grupo P para o grupo HL-HS, indicando hipertrofia cardíaca.

## 4.5 Peptídeo natriurético atrial

### 4.5.1 Os níveis séricos de ANP (tabela 2)

A ingestão de sal aumentou os níveis séricos de ANP. Foi 100% maior no grupo HS e 90% maior no grupo HL-HS, em comparação com o grupo P ( $P<0,01$ ). A ingestão de dieta hiperlipídica também aumentou os níveis séricos de ANP em 70% no grupo HL, comparado ao grupo P ( $P<0,03$ ). No entanto, não houve diferença nos níveis séricos de ANP entre os grupos HS e HL-HS.

### 4.5.2 ANP nos cardiomiócitos (figuras 7 e 8)

A densidade numérica de grânulos de ANP por área nos cardiomiócitos da aurícula direita, comparada com o grupo P, foi 124% maior no grupo HL, 351% maior no grupo HS e 340% maior no grupo HL-HS ( $P<0,01$ ) (Fig. 3). A Figura 4 mostra a aparência ultraestructural de grânulos de ANP em cada grupo e as características de hipertrofia cardíaca no grupo HL-HS.

## 4.6 Expressão da renina no rim (figuras 9 e 10)

Não foi observada diferença na expressão de renina entre os grupos P e HL. No entanto, tanto o grupo HS quanto o grupo HL-HS apresentaram uma redução na expressão de renina quando comparados com o grupo P (menos 23% e menos 29%, respectivamente) ( $P<0,0001$ ) (Fig. 9). A imunofluorescência para renina no rim confirmou estes resultados, conforme observado por microscopia confocal a laser (Fig. 10).

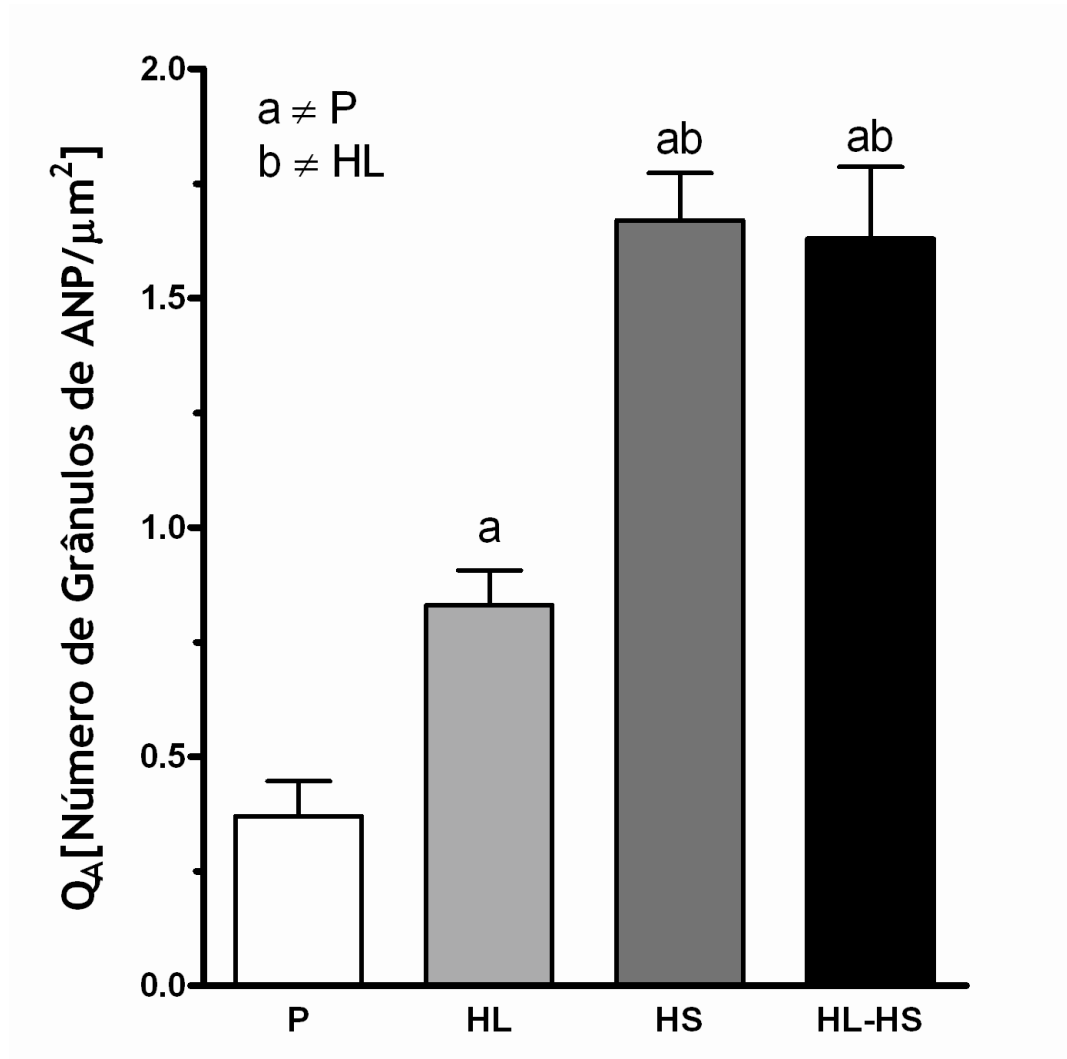


Figura 7. Gráfico com a densidade numérica por área de grânulos de ANP. Os dados são apresentados como média e erro padrão da média ( $n = 5$  por grupo). As diferenças foram analisadas com one-way ANOVA e pos-teste de Tukey. Nos casos sinalizados,  $P < 0,05$ , [a] quando comparado ao P; ou [b] em relação ao HL. Grupos: (a) P: dieta padrão com conteúdo de sal normal; (b) HL: dieta hiperlipídica com conteúdo de sal normal; (c) HS: dieta padrão com elevado conteúdo de sal; (d) HL-HS: dieta hiperlipídica com elevado conteúdo de sal.

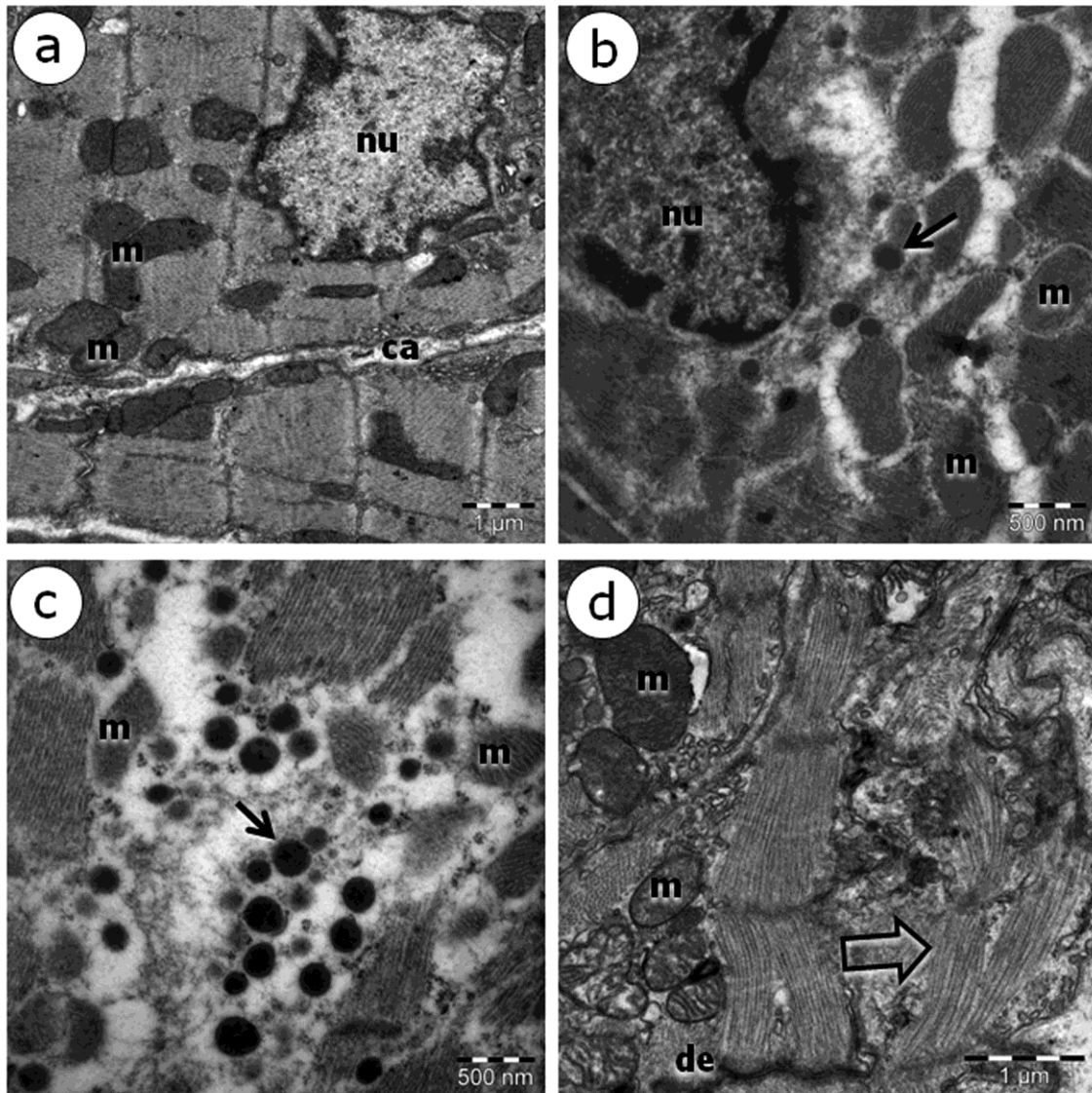


Figura 8. Eletromicrografias mostrando cardiomiócitos da aurícula do átrio direito: (a) P: dieta padrão com conteúdo de sal normal; (b) HL: dieta hiperlipídica com conteúdo de sal normal; (c) HS: dieta padrão com elevado conteúdo de sal; (d) HL-HS: dieta hiperlipídica com elevado conteúdo de sal. Um aumento na densidade por área de grânulos de ANP (setas) foi observado do grupo P para o grupo HL-HS. Os animais que receberam dieta com conteúdo de sal normal apresentaram miofilamentos regulares e mitocôndrias com cristas organizadas, enquanto que os animais alimentados com dieta hipersódica revelaram cardiomiócitos com miofilamentos irregulares (seta aberta) e mitocôndrias polimórficas e com cristas desorganizadas. Abreviaturas: de (desmossomos), ca (capilar), m (mitocôndrias), nu (núcleo de cardiomiócitos).

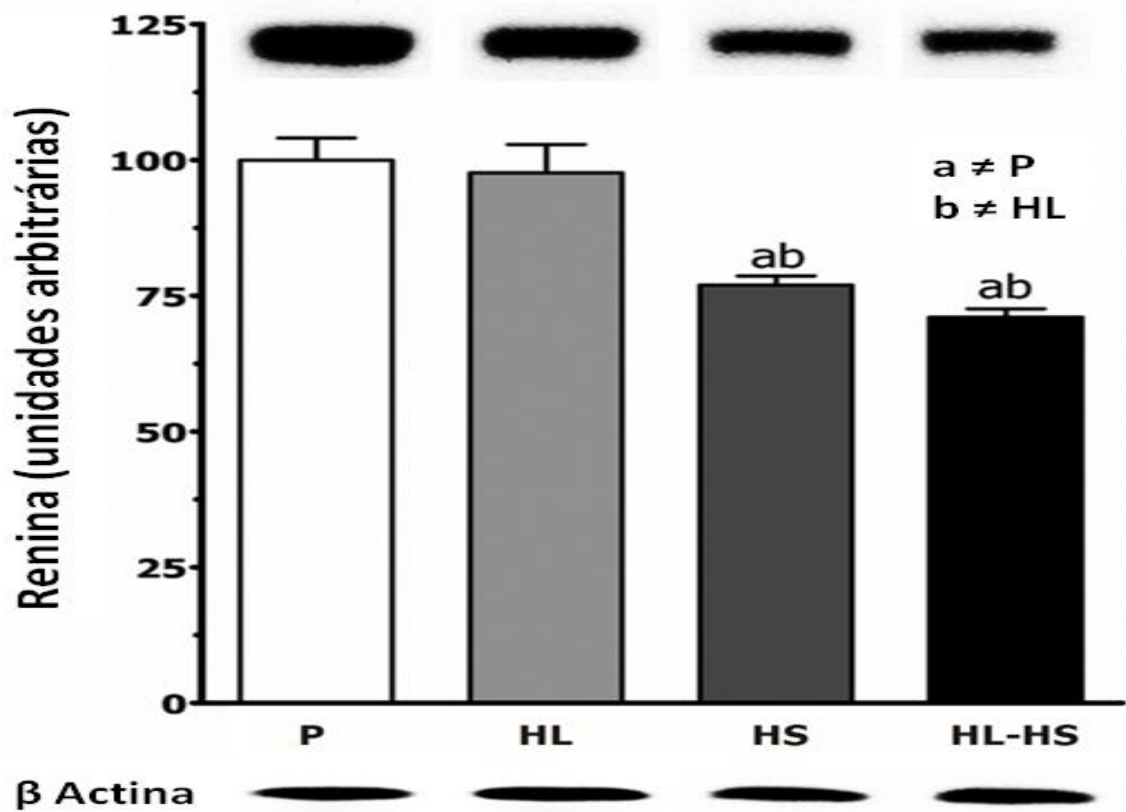


Figura 9. Gráfico com a expressão de renina no rim. Um representante immunoblot é mostrado acima, com a quantificação das bandas em um gráfico de barras. Os dados foram padronizados pela expressão de beta-actina (bandas abaixo) (média e erro padrão da média,  $n = 5$  cada grupo). As diferenças foram analisadas com one-way ANOVA e pos-teste de Tukey. Nos casos sinalizados,  $P < 0,05$ , [a] quando comparado ao P; [b] em relação ao HL. Grupos: P: dieta padrão com conteúdo de sal normal; HL: dieta hiperlipídica com conteúdo de sal normal; HS: dieta padrão com elevado conteúdo de sal; HL-HS: dieta hiperlipídica com elevado conteúdo de sal.

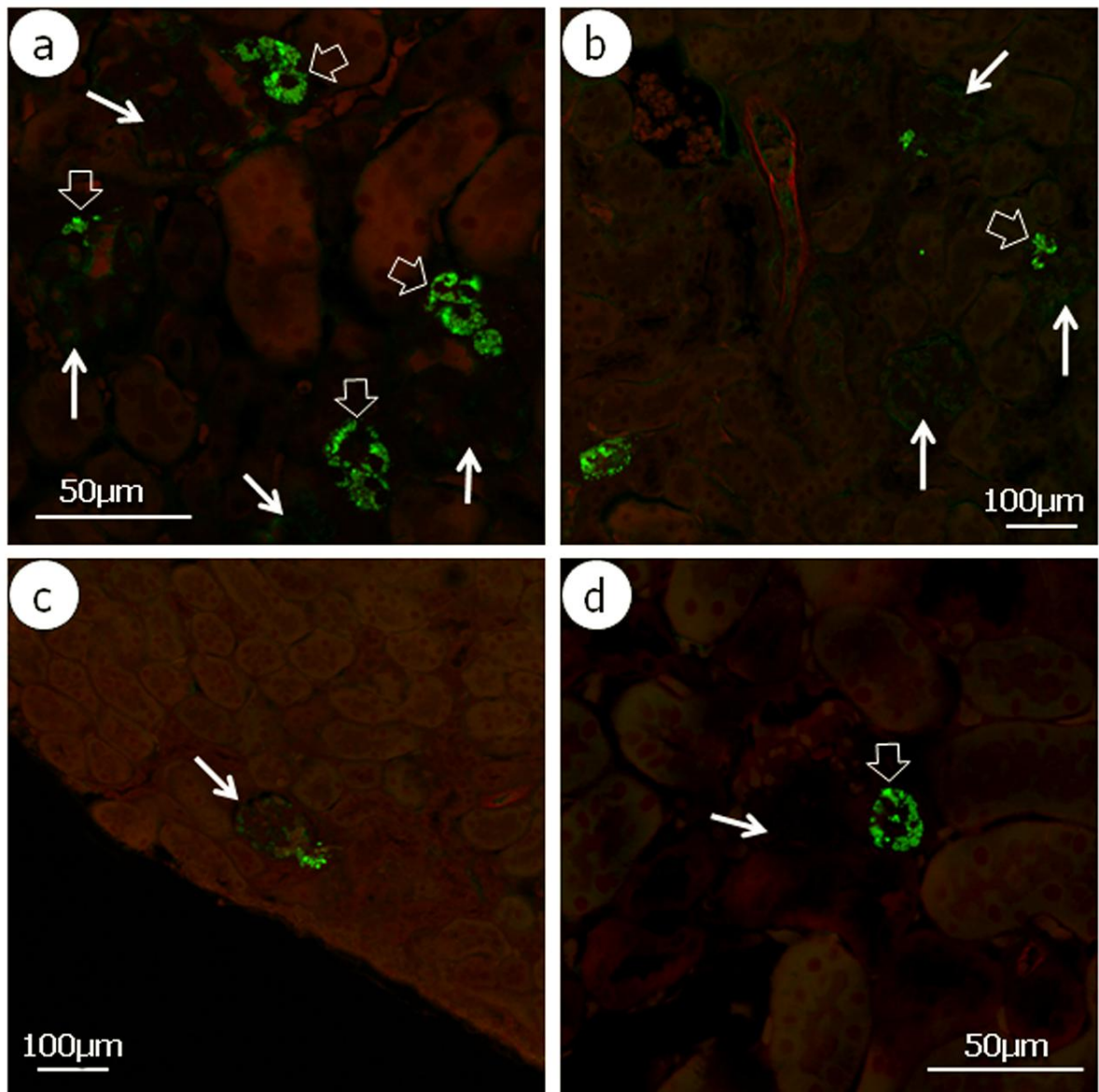


Figura 10. Microscopia confocal de varredura a laser de secções de rim imunomarcadas para renina. Os glomérulos estão marcados com setas. A expressão de renina (setas abertas) foi observada próximo à mácula densa. Grupos: (a) P: dieta padrão com conteúdo de sal normal; (b) HL: dieta hiperlipídica com conteúdo de sal normal; (c) HS: dieta padrão com elevado conteúdo de sal; (d) HL-HS: dieta hiperlipídica com elevado conteúdo de sal. A expressão de renina decresceu nos grupos que consumiram dieta hipersódica em relação aos grupos que consumiram dieta com conteúdo de sal normal.

#### 4.7 Função renal (tabela 3)

As principais alterações na função renal foram decorrentes da ingestão da dieta hipersódica. A ingestão excessiva de sal aumentou a diurese em 180% no grupo HS e 108% no grupo HL-HS, quando comparados com seus controles correspondentes (P e HL, respectivamente) ( $P < 0,01$ ). A creatinina urinária foi 38% maior no grupo HS e 58% maior no grupo HL-HS, quando comparados com seus controles correspondentes (P e HL, respectivamente) ( $P < 0,01$ ). A creatinina sérica diminuiu cerca de 10% nos grupos que consumiram dieta hipersódica (HS e HLHS), em comparação ao grupo P ( $P < 0,05$ ), resultando em um clearance de creatinina aproximadamente 65% maior em ambos os grupos (HS e HLHS), em relação aos seus controles correspondentes (P e HL, respectivamente) ( $P < 0,05$ ).

A dieta hipersódica induziu um aumento superior a 60% na uréia urinária nos grupos HS e HL-HS, quando comparados com seus controles correspondentes (P e HL, respectivamente) ( $P < 0,05$ ). No entanto, a uréia sérica apresentou uma redução de 13% no grupo HS e de 9% no grupo HL-HS, quando comparados com seus controles correspondentes (P e HL, respectivamente) ( $P < 0,05$ ). Por conseguinte, o clearance da uréia aumentou mais de 90% e a TFG mais de 80% em ambos os grupos (HS e HL-HS), quando comparados com seus controles correspondentes (P e HL, respectivamente) ( $P < 0,01$ ).



Tabela 3. Função Renal. Os dados são apresentados em média e erro padrão da média. As diferenças foram avaliadas com one-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Nos casos assinalados,  $P < 0.05$ , [a] quando comparado com o grupo P; [b] comparado com HL; [c] comparado com HS. Grupos: P: dieta padrão com conteúdo de sal normal; HL: dieta hiperlipídica com conteúdo de sal normal; HS: dieta padrão com elevado conteúdo de sal; HL-HS: dieta hiperlipídica com elevado conteúdo de sal. Abreviações: MC (massa corporal), BUN (uréia sérica nitrogenada), TFG (taxa de filtração glomerular).

Dados	Grupos			
	P	HL	HS	HL-HS
Consumo hídrico (ml/dia/camundongo)	4.7 ± 0.1	3.8 ± 0.1	13.2 ± 0.3 <sup>[a][b]</sup>	7.9 ± 0.2 <sup>[a][b][c]</sup>
Diurese (ml/dia/camundongo)	2.0 ± 0.3	1.4 ± 0.3	8.8 ± 1.4 <sup>[a][b]</sup>	4.5 ± 0.3 <sup>[a][b][c]</sup>
Creatinina urinária (µmol/Kg MC/h)	31.0 ± 0.5	24.3 ± 2.5 <sup>[a]</sup>	42.7 ± 2.2 <sup>[a][b]</sup>	38.5 ± 4.3 <sup>[a][b]</sup>
Creatinina sérica (µmol/L)	53.0 ± 2.5	49.5 ± 3.2	46.0 ± 3.0 <sup>[a]</sup>	47.7 ± 1.9 <sup>[a]</sup>
Clearence de creatinina (mL/h)	167.1 ± 9.4	149.7 ± 12.3	281.0 ± 26.1 <sup>[a][b]</sup>	251.1 ± 33.7 <sup>[a][b]</sup>
BUN urinária (mmol/Kg MC/h)	38.5 ± 3.2	33.2 ± 2.1	63.1 ± 3.4 <sup>[a][b]</sup>	62.0 ± 3.5 <sup>[a][b]</sup>
BUN sérico (mmol/L)	8.2 ± 0.2	8.1 ± 0.4	7.1 ± 0.5 <sup>[a][b]</sup>	7.4 ± 0.2 <sup>[a][b]</sup>
Clearance de BUN (mL/h)	117.7 ± 8.0	113.1 ± 11.3	234.9 ± 12.4 <sup>[a][b]</sup>	225.5 ± 11.9 <sup>[a][b]</sup>
TFG (mL/h)	142.4 ± 6.3	131.4 ± 11.1	257.9 ± 16.0 <sup>[a][b]</sup>	238.3 ± 17.8 <sup>[a][b]</sup>

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo, a dieta rica em sal aumentou a TFG e induziu hipertrofia cardíaca, mas esta não foi agravada ou minimizada pela ingestão excessiva de lipídeos. A dieta hipersódica induziu alterações ultraestruturais nos cardiomiócitos, compatíveis com hipertrofia cardíaca e acompanhadas de aumento da produção de ANP. Concomitantemente, a dieta hipersódica diminuiu a expressão de renina no rim, indicando que o SRA está envolvido neste protocolo alimentar.

A dieta hiperlipídica no presente estudo induziu obesidade no camundongo, concordando com estudos recentes (Atshaves, McIntosh et al. 2010; Gregorio, Souza-Mello et al. 2010). A obesidade é um importante fator de risco metabólico e cardiovascular que não deve ser negligenciado, ainda que as alterações hemodinâmicas e de função renal nesse estudo estejam mais diretamente relacionadas à dieta hipersódica.

A dieta hiperlipídica aumentou os níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol, que são importantes fatores de risco para o desenvolvimento de aterosclerose e doença arterial coronariana, especialmente em pacientes sofrendo de síndrome metabólica (Lakka, Laaksonen et al. 2002; McDonald, Hertz et al. 2009). Além disso, a grande liberação de ácidos graxos na circulação portal e sistêmica reduz a absorção de glicose no fígado, músculo esquelético e outros tecidos, devido à alta atividade lipolítica da gordura visceral, o que induz a produção de citocinas pró-inflamatórias e de fatores pró-aterogênicos, causando uma condição de risco cardiometabólico elevado (Despres, Lemieux et al. 2008). A presença de resistência à insulina e hiperinsulinemia compensatória predispõem os indivíduos a diversas doenças metabólicas e hemodinâmicas (Reaven 2005). Em ratos Dahl, um modelo animal que desenvolve hipertensão por sensibilidade ao sal, a resistência à insulina precede a elevação da PA e a sobrecarga de sódio antecipa o aparecimento de hipertensão arterial (Shehata 2008). No presente estudo, a resistência à insulina causada por dieta hiperlipídica pode ser associada à sobrecarga cardíaca e a um pequeno aumento na síntese ANP, embora a PA não tenha alterado significativamente.

A hipertrofia do VE foi observada principalmente nos camundongos alimentados com a dieta de alto teor de sal, enquanto a dieta hiperlipídica induziu um ligeiro aumento no tamanho do VE. Infelizmente, o mecanismo que causa hipertrofia cardíaca em animais com uma dieta elevada de sal não é totalmente compreendido. Tem sido sugerido que a hipertrofia cardíaca poderia ser simplesmente a consequência da hipertensão com aumento da aldosterona sérica ou a ativação do SRA local (Bayorh, Ganafa et al. 2005; Le Corvoisier, Adamy et al. 2010). Além disso, a obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos é conhecida por produzir aumento da volemia sanguínea e do débito cardíaco em virtude da elevada atividade metabólica da gordura excessiva. Em casos moderados a graves de obesidade, isto pode levar a dilatação do ventrículo esquerdo, aumento do estresse da parede ventricular esquerda e hipertrofia ventricular esquerda compensatória (Alpert 2001; Singh and Krishan 2010).

Nós não observamos um aumento ou diminuição da hipertrofia cardíaca causada por excesso de sal nos animais que consumiram dieta hiperlipídica, embora tenha sido observado o contrário num estudo anterior em outro modelo animal. Ratos Dahl, sensíveis ao sal, alimentados tanto com dieta com escassez quanto com excesso de lipídeos, com carência ou com excesso de sal, por 12 semanas, mostraram que uma ingestão aumentada de lipídeos na dieta reduziu o crescimento cardíaco, o remodelamento ventricular esquerdo, a disfunção contrátil e as alterações na expressão gênica em resposta à hipertensão arterial (Okere, Young et al. 2006). No presente estudo, o mecanismo normal de compensação para conter o aumento da pressão arterial, aumento da secreção de ANP, foi superada pela ingestão de dieta hipersódica.

A densidade dos grânulos de ANP aumentou nos camundongos com uma dieta rica em sal e lipídeos. Estudos anteriores já haviam associado aumento na síntese de ANP com elevação da PA e hipertrofia cardíaca (Yuan, Kim et al. 2010), corroborando os dados presentes. Além disso, os níveis circulantes ANP aumentaram de forma correlata com a densidade de grânulos de ANP nos cardiomiócitos produtores da aurícula direita. Nos casos de restrição protéica perinatal, a densidade numérica de grânulos de ANP nos cardiomiócitos não foi afetada, mas houve uma redução significante no tamanho desses grânulos (Gama, Liberti et al. 2007).

A expressão de renina no rim diminuiu nos camundongos alimentados com uma dieta rica em sal. Isto sugere que a hipervolemia induzida por uma dieta HS poderia induzir o rim a produzir menos renina. Além disso, o aumento no clearance de creatinina, uréia e, conseqüentemente, na TFG, sugere uma hiperfiltração, comparável a um estado pré-clínico em humanos, por exposição às dietas ricas em sal. Este assunto parece ser complexo, visto que os elementos do SRA são expressos ao longo de todo o néfron, incluindo angiotensinogênio secretado pelo túbulo proximal e renina expressa no túbulo coletor, e podem participar na regulação da reabsorção de sódio em vários locais do néfron. As respostas para entender as mudanças de mecanismo no SRA tubular diante de uma dieta rica em sódio tem sido pesquisadas em duas linhagens de camundongos (C57BL/6 sensíveis ao sal e CD1 resistentes ao sal), resultando em ausência de alteração no angiotensinogênio plasmático por um regime de sódio, enquanto a renina plasmática revelou aumento de duas vezes diante de dieta com baixo teor de sódio. A excreção tanto de angiotensinogênio quanto de renina foi significativamente maior mediante dieta hipersódica do que em condições de baixo teor de sódio. A excreção urinária de angiotensinogênio foi significativamente maior nos camundongos C57BL/6 do que nos camundongos CD1 sob quaisquer condições de ingestão de sódio. A medida em que esses parâmetros urinários refletem respostas sistêmicas ou tubulares para os desafios da homeostase de sódio tais achados podem depender da contribuição relativa de restrição de sódio e depleção de volume (Lantelme, Rohrwasser et al. 2002).

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados atuais sugerem que a associação de dieta hipersódica e hiperlipídica pode induzir a pressão arterial elevada e concomitantes alterações ultra-estruturais dos cardiomiócitos, aumentar a produção de ANP, alterar o perfil lipídico e o metabolismo de carboidratos e diminuir a expressão de renina renal. Portanto, a ingestão de uma dieta hiperlipídica rica em sal pelos camundongos mimetiza o consumo alimentar humano ocidental e hoje pode ser considerado um modelo real de um conjunto de sintomas da chamada "síndrome metabólica" nos seres humanos.

## REFERÊNCIAS

- Aguila, M. B. and C. A. Mandarim-De-Lacerda (2003). "Effects of chronic high fat diets on renal function and cortical structure in rats." Exp Toxicol Pathol **55**(2-3): 187-95.
- Aguila, M. B. and C. A. Mandarim-de-Lacerda (2003). "Heart and blood pressure adaptations in Wistar rats fed with different high-fat diets for 18 months." Nutrition **19**(4): 347-52.
- Alderman, M. H. (2000). "Salt, blood pressure, and human health." Hypertension **36**(5): 890-3.
- Almeida, F. A., M. Suzuki, et al. (1991). "High salt intake increases the vasorelaxant effect of ANF on the isolated perfused rat kidney." Braz J Med Biol Res **24**(11): 1149-57.
- Alpert, M. A. (2001). "Obesity cardiomyopathy: pathophysiology and evolution of the clinical syndrome." Am J Med Sci **321**(4): 225-36.
- Ames, R. P. (2002). "Insights from Laragh's review course: the role of the renin-angiotensin system in blood pressure regulation." Am J Hypertens **15**(7 Pt 1): 653-4.
- Aneja, A., F. El-Atat, et al. (2004). "Hypertension and obesity." Recent Prog Horm Res **59**: 169-205.
- Ascencao, R., P. Fortuna, et al. (2008). "Drug therapy for chronic heart failure due to left ventricular systolic dysfunction: a review. III. Angiotensin-converting enzyme inhibitors." Rev Port Cardiol **27**(9): 1169-87.
- Atlas, S. A., H. D. Kleinert, et al. (1984). "Purification, sequencing and synthesis of natriuretic and vasoactive rat atrial peptide." Nature **309**(5970): 717-9.
- Atshaves, B. P., A. L. McIntosh, et al. (2010). "High dietary fat exacerbates weight gain and obesity in female liver fatty acid binding protein gene-ablated mice." Lipids **45**(2): 97-110.
- Axelsson, J., A. Rippe, et al. (2011). "Transient and sustained increases in glomerular permeability following ANP infusion in rats." Am J Physiol Renal Physiol **300**(1): F24-30.
- Bader, M. and D. Ganten (2000). "Regulation of renin: new evidence from cultured cells and genetically modified mice." J Mol Med **78**(3): 130-9.
- Baldini, P. M., P. De Vito, et al. (2002). "Atrial natriuretic factor inhibits mitogen-induced growth in aortic smooth muscle cells." J Cell Physiol **193**(1): 103-9.

Barretto, S. A. J., Cyrillo, D.C. (2001). "Análise da composição dos gastos com alimentação no Município de São Paulo (Brasil) na década de 1990." Rev Saúde Pública, 35.

Bayorh, M. A., A. A. Ganafa, et al. (2005). "Alterations in aldosterone and angiotensin II levels in salt-induced hypertension." Clin Exp Hypertens 27(4): 355-67.

Beierwaltes, W. H., D. L. Potter, et al. (2002). "Renal baroreceptor-stimulated renin in the eNOS knockout mouse." Am J Physiol Renal Physiol 282(1): F59-64.

Beilin, L. J. (1999). "Lifestyle and hypertension--an overview." Clin Exp Hypertens 21(5-6): 749-62.

Ben-Ari, E. T. and J. C. Garrison (1988). "Regulation of angiotensinogen mRNA accumulation in rat hepatocytes." Am J Physiol 255(1 Pt 1): E70-9.

Benoit, C., Y. Gu, et al. (2008). "Contractility of placental vascular smooth muscle cells in response to stimuli produced by the placenta: roles of ACE vs. non-ACE and AT1 vs. AT2 in placental vessel cells." Placenta 29(6): 503-9.

Berl, T. (2009). "Review: renal protection by inhibition of the renin-angiotensin-aldosterone system." J Renin Angiotensin Aldosterone Syst 10(1): 1-8.

Burns, W. C. and M. C. Thomas (2011). "Angiotensin II and its role in tubular epithelial to mesenchymal transition associated with chronic kidney disease." Cells Tissues Organs 193(1-2): 74-84.

Campbell, D. J. (2008). "Critical review of prorenin and (pro)renin receptor research." Hypertension 51(5): 1259-64.

Campbell, D. J. and J. F. Habener (1986). "Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat." J Clin Invest 78(1): 31-9.

Carey, R. M. and H. M. Siragy (2003). "Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation." Endocr Rev 24(3): 261-71.

Casserly, B., L. Pietras, et al. (2010). "Cardiac atria are the primary source of ANP release in hypoxia-adapted rats." Life Sci 87(11-12): 382-9.

Cavallero, S., G. E. Gonzalez, et al. (2010). "Ventricular function and natriuretic peptides in sequentially combined models of hypertension." Am J Physiol Heart Circ Physiol 298(4): H1290-9.

Cleland, S. J. and J. L. Reid (1996). "The renin-angiotensin system and the heart: a historical review." Heart 76(3 Suppl 3): 7-12.

Coppey, L., E. Davidson, et al. (2011). "Vasopeptidase inhibitor ilepatril (AVE7688) prevents obesity- and diabetes-induced neuropathy in C57Bl/6J mice." Neuropharmacology 60(2-3): 259-66.

Currie, M. G., D. M. Geller, et al. (1984). "Purification and sequence analysis of bioactive atrial peptides (atriopeptins)." Science **223**(4631): 67-9.

Dai, Z. K., C. C. Hsieh, et al. (2010). "Protective effects of a dual endothelin converting enzyme/neutral endopeptidase inhibitor on the development of pulmonary hypertension secondary to cardiac dysfunction in the rat." Pediatr Pulmonol **45**(11): 1076-85.

Dandona, P., A. Aljada, et al. (2005). "Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation." Circulation **111**(11): 1448-54.

Davidson, E. P., L. J. Coppey, et al. (2011). "Effect of Treatment of Sprague Dawley Rats with AVE7688, Enalapril, or Candoxatril on Diet-Induced Obesity." J Obes **2011**.

de Bold, A. J., H. B. Borenstein, et al. (1981). "A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats." Life Sci **28**(1): 89-94.

De Mello, W. C. (2011). "Novel aspects of angiotensin II action in the heart. Implications to myocardial ischemia and heart failure." Regul Pept **166**(1-3): 9-14.

De Wardener, H. E., I. H. Mills, et al. (1961). "Studies on the efferent mechanism of the sodium diuresis which follows the administration of intravenous saline in the dog." Clin Sci **21**: 249-58.

Desaulles, E., C. Forler, et al. (1975). "Effect of catecholamines on renin release in vitro." Biomedicine **22**(5): 433-9.

Despres, J. P., I. Lemieux, et al. (2008). "Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(6): 1039-49.

Dickey, D. M., D. R. Flora, et al. (2007). "Differential regulation of membrane guanylyl cyclases in congestive heart failure: natriuretic peptide receptor (NPR)-B, Not NPR-A, is the predominant natriuretic peptide receptor in the failing heart." Endocrinology **148**(7): 3518-22.

Dobrian, A. D., S. D. Schriver, et al. (2003). "Effect of salt on hypertension and oxidative stress in a rat model of diet-induced obesity." Am J Physiol Renal Physiol **285**(4): F619-28.

Eyileten, T., A. Sonmez, et al. (2010). "Effect of renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) blockade on visfatin levels in diabetic nephropathy." Nephrology (Carlton) **15**(2): 225-9.

Fegan, P. G., W. A. Davis, et al. (2011). "Renin-angiotensin-aldosterone system blockade and urinary albumin excretion in community-based patients with Type 2 diabetes: The Fremantle Diabetes Study." Diabet Med.



Ferrari, R., G. Guardigli, et al. (2010). "Secondary prevention of CAD with ACE inhibitors: a struggle between life and death of the endothelium." Cardiovasc Drugs Ther **24**(4): 331-9.

FitzGerald, R. J., B. A. Murray, et al. (2004). "Hypotensive peptides from milk proteins." J Nutr **134**(4): 980S-8S.

Flynn, T. G., M. L. de Bold, et al. (1983). "The amino acid sequence of an atrial peptide with potent diuretic and natriuretic properties." Biochem Biophys Res Commun **117**(3): 859-65.

Fraulob, J. C., R. Ogg-Diamantino, et al. (2010). "A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet." J Clin Biochem Nutr **46**(3): 212-23.

Gallou-Kabani, C., A. Vige, et al. (2007). "C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome." Obesity (Silver Spring) **15**(8): 1996-2005.

Gama, E. F., E. A. Liberti, et al. (2007). "Effects of pre- and postnatal protein deprivation on atrial natriuretic peptide- (ANP-) granules of the right auricular cardiocytes. An ultrastructural morphometric study." Eur J Nutr **46**(5): 245-50.

Garcia, R., M. Cantin, et al. (1982). "Relationship of specific granules to the natriuretic and diuretic activity of rat atria." Experientia **38**(9): 1071-3.

Garruti, G., V. Giusti, et al. (2007). "Expression and secretion of the atrial natriuretic peptide in human adipose tissue and preadipocytes." Obesity (Silver Spring) **15**(9): 2181-9.

Gauer, O. H., J. P. Henry, et al. (1961). "Cardiac receptors and fluid volume control." Prog Cardiovasc Dis **4**: 1-26.

Giani, J. F., M. C. Munoz, et al. (2011). "Angiotensin-(1-7) reduces proteinuria and diminishes structural damage in renal tissue of stroke-prone spontaneously hypertensive rats." Am J Physiol Renal Physiol **300**(1): F272-82.

Gregorio, B. M., V. Souza-Mello, et al. (2010). "Maternal high-fat intake predisposes nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 offspring." Am J Obstet Gynecol **203**(5): 495 e1-8.

Hackenthal, E., M. Paul, et al. (1990). "Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion." Physiol Rev **70**(4): 1067-116.

Hamet, P. and J. Tremblay (1989). "Atrial natriuretic factor, the kidney and high blood pressure." Clin Invest Med **12**(5): 329-35.

Haque, M. Z. and D. S. Majid (2011). "High salt intake delayed angiotensin II-induced hypertension in mice with a genetic variant of NADPH oxidase." Am J Hypertens **24**(1): 114-8.

Hartner, A., N. Cordasic, et al. (2003). "Strain differences in the development of hypertension and glomerular lesions induced by deoxycorticosterone acetate salt in mice." Nephrol Dial Transplant **18**(10): 1999-2004.

Hirata, Y., D. Fukuda, et al. (2011). "[Critical role of renin-angiotensin system in the pathogenesis of atherosclerosis]." Nippon Rinsho **69**(1): 55-9.

Ignjatovic, T., F. Tan, et al. (2002). "Activation of bradykinin B1 receptor by ACE inhibitors." Int Immunopharmacol **2**(13-14): 1787-93.

Isezuo, S. A. (2006). "The metabolic syndrome: Review of current concepts." Niger Postgrad Med J **13**(3): 247-55.

Jackson, E. K., R. A. Branch, et al. (1982). "Participation of prostaglandins in the control of renin release." Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res **10**: 255-76.

Jamieson, J. D. and G. E. Palade (1964). "Specific Granules in Atrial Muscle Cells." J Cell Biol **23**: 151-72.

Jones, D. W. and J. E. Hall (2004). "Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure and evidence from new hypertension trials." Hypertension **43**(1): 1-3.

Kamath, N. and K. A. Cappuzzo (2010). "Review of isolated systolic hypertension in older adults." Consult Pharm **25**(6): 374-8.

Kenchiah, S. and M. A. Pfeffer (2004). "Cardiac remodeling in systemic hypertension." Med Clin North Am **88**(1): 115-30.

Kim, S. H., K. S. Lee, et al. (2001). "Accentuation of ANP secretion to endothelin-1 in hypertrophied atria." Regul Pept **102**(1): 21-9.

Kirchhoff, F., C. Krebs, et al. (2008). "Rapid development of severe end-organ damage in C57BL/6 mice by combining DOCA salt and angiotensin II." Kidney Int **73**(5): 643-50.

Klar, A., E. Haver, et al. (2009). "Atrial natriuretic Peptide in young and elderly children with mild gastroenteritis." Gastroenterol Res Pract **2009**: 623871.

Konno, M., T. Sumida, et al. (2009). "Modeling of tRNA-assisted mechanism of Arg activation based on a structure of Arg-tRNA synthetase, tRNA, and an ATP analog (ANP)." FEBS J **276**(17): 4763-79.

Kono, T., A. Taniguchi, et al. (1986). "Biological activities of angiotensin II-(1-6)-hexapeptide and angiotensin II-(1-7)-heptapeptide in man." Life Sci **38**(16): 1515-9.

- Lakka, H. M., D. E. Laaksonen, et al. (2002). "The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men." JAMA **288**(21): 2709-16.
- Lantelme, P., A. Rohrwasser, et al. (2002). "Effects of dietary sodium and genetic background on angiotensinogen and Renin in mouse." Hypertension **39**(5): 1007-14.
- Le Corvoisier, P., C. Adamy, et al. (2010). "The cardiac renin-angiotensin system is responsible for high-salt diet-induced left ventricular hypertrophy in mice." Eur J Heart Fail **12**(11): 1171-8.
- Lenfant, C., A. V. Chobanian, et al. (2003). "Seventh report of the Joint National Committee on the Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC 7): resetting the hypertension sails." Hypertension **41**(6): 1178-9.
- Lenkei, Z., M. Palkovits, et al. (1997). "Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review." Front Neuroendocrinol **18**(4): 383-439.
- Levin, E. R., D. G. Gardner, et al. (1998). "Natriuretic peptides." N Engl J Med **339**(5): 321-8.
- Li, B. and X. Z. Lu (2008). "[Recent progress on angiotensin III]." Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi **36**(2): 184-6.
- Lieberthal, W. (1991). "Effects of atrial natriuretic factor in ischemic renal injury: studies in the isolated erythrocyte-perfused rat kidney." Clin Res **39**(2): 157-65.
- Luscher, T. F. and Z. Yang (1993). "Calcium antagonists and ACE inhibitors. Effect on endothelium and vascular smooth muscle." Drugs **46 Suppl 2**: 121-32.
- Maack, T., M. J. Camargo, et al. (1985). "Atrial natriuretic factor: structure and functional properties." Kidney Int **27**(4): 607-15.
- Maguer-Satta, V., R. Besancon, et al. (2011). "Concise Review: Neutral Endopeptidase (NEP/CD10): A Multifaceted Environment Actor in Stem Cells, Physiological Mechanisms and Cancer." Stem Cells.
- Maki, T., Y. Nasa, et al. (2003). "Direct inhibition of neutral endopeptidase in vasopeptidase inhibitor-mediated amelioration of cardiac remodeling in rats with chronic heart failure." Mol Cell Biochem **254**(1-2): 265-73.
- Mandarim-de-Lacerda, C. A., C. Fernandes-Santos, et al. (2010). "Image analysis and quantitative morphology." Methods Mol Biol **611**: 211-25.
- Martha, S., S. Ramreddy, et al. (2011). "Study of impaired glucose tolerance, dyslipidemia, metabolic syndrome, and cardiovascular risk in a south Indian population." J Postgrad Med.

Matthews, D. R., J. P. Hosker, et al. (1985). "Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man." Diabetologia **28**(7): 412-9.

Mayet, J. and A. Hughes (2003). "Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension." Heart **89**(9): 1104-9.

McDonald, M., R. P. Hertz, et al. (2009). "Prevalence, awareness, and management of hypertension, dyslipidemia, and diabetes among United States adults aged 65 and older." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **64**(2): 256-63.

Meade, T. (2010). "Review: Plasma renin and the incidence of cardiovascular disease." J Renin Angiotensin Aldosterone Syst **11**(2): 91-8.

Melo, L. G., A. T. Veress, et al. (1999). "Salt-sensitive hypertension in ANP knockout mice is prevented by AT1 receptor antagonist losartan." Am J Physiol **277**(3 Pt 2): R624-30.

Melo, L. G., A. T. Veress, et al. (1998). "Salt-sensitive hypertension in ANP knockout mice: potential role of abnormal plasma renin activity." Am J Physiol **274**(1 Pt 2): R255-61.

Meng, W. and D. W. Busija (1993). "Comparative effects of angiotensin-(1-7) and angiotensin II on piglet pial arterioles." Stroke **24**(12): 2041-4; discussion 2045.

Mifune, H., S. Suzuki, et al. (1992). "Fine structure of atrial natriuretic peptide (ANP)-granules in the atrial cardiocytes in the hamster, guinea pig, rabbit, cat and dog." Jikken Dobutsu **41**(3): 321-8.

Mifune, H., S. Suzuki, et al. (1991). "Fine structure of atrial natriuretic peptide (ANP)-granules in the atrial cardiocytes of the mouse, rat and Mongolian gerbil." Jikken Dobutsu **40**(2): 183-93.

Mifune, H., S. Suzuki, et al. (1991). "Fine structure of atrial natriuretic peptide(ANP)-granules in the atrial cardiocytes in the pig, cattle and horse." J Vet Med Sci **53**(4): 561-8.

Miners, J. S., Z. van Helmond, et al. (2010). "ACE variants and association with brain Abeta levels in Alzheimer's disease." Am J Transl Res **3**(1): 73-80.

Mizuiru, S., H. Hemmi, et al. (2008). "Expression of ACE and ACE2 in individuals with diabetic kidney disease and healthy controls." Am J Kidney Dis **51**(4): 613-23.

Modan, M., J. Or, et al. (1992). "Cardiovascular disease in men." Circulation **85**(3): 1220.

Mohanty, P., H. Ghanim, et al. (2002). "Both lipid and protein intakes stimulate increased generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells." Am J Clin Nutr **75**(4): 767-72.

- Moro, C., E. Klimcakova, et al. (2007). "Atrial natriuretic peptide inhibits the production of adipokines and cytokines linked to inflammation and insulin resistance in human subcutaneous adipose tissue." Diabetologia **50**(5): 1038-47.
- Morrison, J. A., C. J. Glueck, et al. (2011). "Hyperinsulinemia and metabolic syndrome at mean age of 10 years in black and white schoolgirls and development of impaired fasting glucose and type 2 diabetes mellitus by mean age of 24 years." Metabolism **60**(1): 24-31.
- Munagala, V. K., J. C. Burnett, Jr., et al. (2004). "The natriuretic peptides in cardiovascular medicine." Curr Probl Cardiol **29**(12): 707-69.
- Nicholls, M. G., E. A. Espiner, et al. (1987). "Atrial natriuretic peptide in human hypertension." Eur Heart J **8 Suppl B**: 123-8.
- Okere, I. C., M. E. Young, et al. (2006). "Low carbohydrate/high-fat diet attenuates cardiac hypertrophy, remodeling, and altered gene expression in hypertension." Hypertension **48**(6): 1116-23.
- Olsson, K., L. Eriksson, et al. (1990). "Angiotensin II-induced pressure natriuresis is exaggerated by ANP in conscious goats." Acta Physiol Scand **139**(1): 245-7.
- Oltman, C. L., E. P. Davidson, et al. (2011). "Role of the effect of inhibition of neutral endopeptidase on vascular and neural complications in streptozotocin-induced diabetic rats." Eur J Pharmacol **650**(2-3): 556-62.
- Osei, S. Y., R. S. Ahima, et al. (1993). "Differential responses to angiotensin-(1-7) in the feline mesenteric and hindquarters vascular beds." Eur J Pharmacol **234**(1): 35-42.
- Pestel, S., V. Krzykalla, et al. (2007). "Measurement of glomerular filtration rate in the conscious rat." J Pharmacol Toxicol Methods **56**(3): 277-89.
- Porsti, I., A. T. Bara, et al. (1994). "Release of nitric oxide by angiotensin-(1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor." Br J Pharmacol **111**(3): 652-4.
- Reaven, G. M. (1988). "Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease." Diabetes **37**(12): 1595-607.
- Reaven, G. M. (2005). "Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease." Panminerva Med **47**(4): 201-10.
- Reeves, P. G., F. H. Nielsen, et al. (1993). "AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet." J Nutr **123**(11): 1939-51.
- Ritchie, S. A. and J. M. Connell (2007). "The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease." Nutr Metab Cardiovasc Dis **17**(4): 319-26.

Sadjadi, J., G. L. Kramer, et al. (2005). "Angiotensin II exerts positive feedback on the intrarenal renin-angiotensin system by an angiotensin converting enzyme-dependent mechanism." J Surg Res **129**(2): 272-7.

Sansoe, G., M. Aragno, et al. (2005). "Neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in cirrhotic liver: a new target to treat portal hypertension?" J Hepatol **43**(5): 791-8.

Santos, R. A. and M. J. Campagnole-Santos (1994). "Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7)." Braz J Med Biol Res **27**(4): 1033-47.

Santos, R. A., A. J. Ferreira, et al. (2008). "Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis." Exp Physiol **93**(5): 519-27.

Schiebinger, R. J. and K. M. Greening (1992). "Interaction between stretch and hormonally stimulated atrial natriuretic peptide secretion." Am J Physiol **262**(1 Pt 2): H78-83.

Shahzad, G., M. A. Korsten, et al. (2006). "Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor-associated angioedema of the stomach and small intestine: a case report." Mt Sinai J Med **73**(8): 1123-5.

Shehata, M. F. (2008). "Genetic and dietary salt contributors to insulin resistance in Dahl salt-sensitive (S) rats." Cardiovasc Diabetol **7**: 7.

Silver, M. A. (2006). "The natriuretic peptide system: kidney and cardiovascular effects." Curr Opin Nephrol Hypertens **15**(1): 14-21.

Simoes e Silva, A. C., S. V. Pinheiro, et al. (2006). "The therapeutic potential of Angiotensin-(1-7) as a novel Renin-Angiotensin System mediator." Mini Rev Med Chem **6**(5): 603-9.

Singh, R. and P. Krishan (2010). "Modulation of impact of high fat diet in pathological and physiological left ventricular cardiac hypertrophy by fluvastatin." Biomed Pharmacother **64**(3): 147-53.

Siragy, H. M. (2010). "The angiotensin II type 2 receptor and the kidney." J Renin Angiotensin Aldosterone Syst **11**(1): 33-6.

Skeggs, L. T., Jr., J. R. Kahn, et al. (1956). "The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme." J Exp Med **103**(3): 295-9.

Tabrizchi, R. (2008). "Ilepatril (AVE-7688), a vasopeptidase inhibitor for the treatment of hypertension." Curr Opin Investig Drugs **9**(3): 301-9.

Tipnis, S. R., N. M. Hooper, et al. (2000). "A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase." J Biol Chem **275**(43): 33238-43.

Van Huysse, J. W. and X. Hou (2004). "Pressor response to CSF sodium in mice: mediation by a ouabain-like substance and renin-angiotensin system in the brain." Brain Res **1021**(2): 219-31.

Vives, D., S. Farage, et al. (2010). "Atrial natriuretic peptides and urodilatin modulate proximal tubule Na(+)-ATPase activity through activation of the NPR-A/cGMP/PKG pathway." Peptides **31**(5): 903-8.

Wagner, C. and A. Kurtz (1998). "Regulation of renal renin release." Curr Opin Nephrol Hypertens **7**(4): 437-41.

Wang, T. L. and C. R. Hung (2003). "Enhanced endothelin-1 degradation by intravenous morphine in patients with congestive heart failure: role of neutral endopeptidase 24.11." Heart **89**(2): 211-2.

Watanabe, T., M. Watanabe, et al. (1989). "An immunocytochemical study on co-localization of cathepsin B and atrial natriuretic peptides in secretory granules of atrial myoendocrine cells of rat heart." J Histochem Cytochem **37**(3): 347-51.

Whitebread, S., M. Mele, et al. (1989). "Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes." Biochem Biophys Res Commun **163**(1): 284-91.

Widecka, K., B. Krzyzanowska-Swiniarska, et al. (1993). "[Effect of intravenous sodium chloride load on levels of atrial natriuretic peptide (ANP) and 3'5' guanosine monophosphate (cGMP) in plasma of patients with uncomplicated sodium-sensitive arterial hypertension maintained on different dietary sodium intake]." Pol Arch Med Wewn **89**(2): 117-24.

Winqvist, R. J. (1985). "The relaxant effects of atrial natriuretic factor on vascular smooth muscle." Life Sci **37**(12): 1081-7.

Wiseman, W., J. M. Egan, et al. (2011). "Feeding blueberry diets inhibits angiotensin II-converting enzyme (ACE) activity in spontaneously hypertensive stroke-prone rats." Can J Physiol Pharmacol **89**(1): 67-71.

Wisn, A. G., K. Ekberg, et al. (2010). "Plasma ANP and BNP during exercise in patients with major depressive disorder and in healthy controls." J Affect Disord.

Woodard, G. E. and J. A. Rosado (2007). "Recent advances in natriuretic peptide research." J Cell Mol Med **11**(6): 1263-71.

Yamada, H., Y. Saito, et al. (1988). "Immunohistochemical localization of atrial natriuretic polypeptide (ANP) in human atrial and ventricular myocardiocytes." Histochemistry **89**(5): 411-3.

Yu, Q., D. F. Larson, et al. (2004). "Characterization of high-salt and high-fat diets on cardiac and vascular function in mice." Cardiovasc Toxicol **4**(1): 37-46.

Yuan, K., S. Y. Kim, et al. (2010). "Upregulation of ANP and NPR-C mRNA in the kidney and heart of eNOS knockout mice." Peptides **31**(7): 1319-25.

Yun, J. E., H. Kimm, et al. (2010). "Serum leptin is associated with metabolic syndrome in obese and nonobese Korean populations." Metabolism **59**(3): 424-9.

Zablocki, D. and J. Sadoshima (2011). "Knocking Out Angiotensin II in the Heart." Curr Hypertens Rep.

Zhang, K., Y. Chen, et al. (2011). "Catecholamine storage vesicles: role of core protein genetic polymorphisms in hypertension." Curr Hypertens Rep **13**(1): 36-45.

Zhao, D., K. N. Pandey, et al. (2010). "ANP-mediated inhibition of distal nephron fractional sodium reabsorption in wild-type and mice overexpressing natriuretic peptide receptor." Am J Physiol Renal Physiol **298**(1): F103-108.

Zhao, D., K. N. Pandey, et al. (2010). "ANP-mediated inhibition of distal nephron fractional sodium reabsorption in wild-type and mice overexpressing natriuretic peptide receptor." Am J Physiol Renal Physiol **298**(1): F103-8.

Zheng, Z., H. Shi, et al. (2010). "A systematic review and meta-analysis of aliskiren and angiotensin receptor blockers in the management of essential hypertension." J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.



## 8. ANEXO



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEA/254/2008** sobre "**Alteração de cardiomiócitos produtores do peptídeo natriurético atrial em camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica rica em sal**", sob a responsabilidade de **Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **10/11/2008**. Este certificado expira em **10/11/2012**.

Rio de Janeiro, 10 de Novembro de 2008.

Prof. Israel Felzenszwalb

CEA/IBRAG/UERJ

Israel Felzenszwalb  
Diretor  
IBRAG - UERJ  
Mat. 2887-8

Profa. Patricia Cristina Lisboa

CEA/IBRAG/UERJ

Prof<sup>a</sup> Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva  
Prof<sup>a</sup> Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ  
Matricula 34765-8

/ass