

Marcelo Diarcadia Mariano Cezar

**Efeitos do Bloqueio Precoce da Aldosterona na
Estrutura e Função Cardíaca e na Composição
da Matriz Colágena Miocárdica de Ratos
Espontaneamente Hipertensos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
“Fisiopatologia em Clínica Médica” da Faculdade de
Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho - UNESP, para obtenção de título
de Doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica –
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Adjunto *Katashi Okoshi*

**Botucatu – São Paulo
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Cezar, Marcelo Diarcadia Mariano.

Efeitos do bloqueio precoce da aldosterona na estrutura e função cardíaca e na composição da matriz colágena miocárdica de ratos espontaneamente hipertensos / Marcelo Diarcadia Mariano Cezar. - Botucatu: [s.n.], 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Katashi Okoshi

Capes: 40101100

1. Insuficiência cardíaca. 2. Hipertensão arterial - Tratamento. 3. Colágeno. 4. Diuréticos – Uso terapêutico. 5. Hormônios esteroidianos.

Palavras-chave: Colágeno; Espironolactona; Experimental; Hipertensão arterial; Insuficiência cardíaca; Remodelamento cardíaco.

“Hoje é sempre o dia de fazer o melhor que pudermos.
Amanhã, invariavelmente, é o dia de resultado de nossas
próprias ações”.

(Agar)

DEDICATÓRIA

A minha vó ELVIRA!

A meus pais, DAGOBERTO e MARIA ADORAÇÃO.

AGRADECIMENTOS

A DELIS por oportunizar o convívio com pessoas maravilhosas durante a realização deste estudo.

Ao meu orientador Prof. Adjunto Dr. KATASHI OKOSHI, por todos os ensinamentos, pela confiança na minha capacidade, pelo respeito e humildade, pela amizade e paciência. “O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes” (Cora Coralina).

À Prof.^a Adjunta Dr.^a. MARINA POLITI OKOSHI, pela grande contribuição e persistência durante todas as etapas do trabalho, pelo respeito e pela amizade.

Ao Prof. Titular Dr. LUIZ SHIGUERO MATSUBARA, pela prontidão e paciência nos esclarecimentos de minhas dúvidas.

Ao Prof. Titular Dr. ANTONIO CARLOS CICOGNA por contribuir para a realização deste estudo e sempre disponibilizar oportunidades de aprendizado.

Ao Prof. Dr. LUIS CUADRADO MARTIN e a Prof.^a Dr.^a. MELIZA GOI ROSCANI, pela atenção e valiosas sugestões prestadas no exame de qualificação.

Aos Professores: Prof. Adjunto Dr. LEONARDO ANTÔNIO MAMEDE ZORNOFF, Prof. Dr. MARCOS FERREIRA MINICUCCI, Prof. Adjunto Dr. SERGIO ALBERTO RUPP DE PAIVA, Prof.^a Titular Dr.^a. BEATRIZ BOJIKIAN MATSUBARA, Prof. Titular CARLOS ROBERTO PADOVANI pela colaboração profissional.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica ALEXANDRE LUIS LOUREIRO, ANA MARIA MENGUE, BRUNO JOSÉ FAJIOLLI, ELISÂNGELA APARECIDA DA SILVA, LAURA ANDRADE CÂMARA, MÁRIO

AUGUSTO DALLAQUA, RENATO BORGES PEREIRA, pela atenção e pela gentileza com que sempre me ajudaram.

A todos os funcionários do Laboratório Experimental, JOSÉ CARLOS, MÁRIO BRUNO, CORINA, CAMILA, ELENIZE, LALLA, JOSÉ APARECIDO, ROGÉRIO, ÂNGELO, SUELI C, VÍTOR, por colaborarem efetivamente para a realização deste trabalho.

Aos FUNCIONÁRIOS DA SEÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO, pela disponibilidade e eficiência para resolver problemas.

Aos meus queridos amigos e grandes companheiros ALINE, BERTHA, CAMILA BONOMO, CAMILINHA, DANIELE, DIJON, LUANA, MARIA TERESA, PAULA, PRISCILA, RICARDO, RODRIGO, SANDRO, SÍLVIO, pessoas que caminharam juntos comigo durante toda jornada e tornaram possível a execução deste trabalho.

Aos PÓS-GRADUANDOS DO LABORATÓRIO EXPERIMENTAL do Departamento de Clínica Médica e aos alunos de iniciação científica, pela boa convivência e pelo respeito.

Aos meus amigos DIEGO, GUSTAVO, FELIPE, ANDERSON, que, mesmo estando longe, me passaram confiança para continuação dos estudos.

A EQUIPE DE ATLETISMO DA MEDICINA UNESP por fazer parte dos meus dias.

Ao meu tio EDSON RAMOS DE SIQUEIRA pelo incentivo no início dos estudos.

As minhas famílias, D'ARCÁDIA e MARIANO, por todo o carinho em todos os momentos, em especial, a minha vó ELVIRA, as minhas tias

ANA CLAUDIA, ANA MARIA, ANA RITA, MARIA AMÉLIA, meu tio ANDRÉ e todos os PRIMOS e PRIMAS.

A minha namorada MARIANA, por todo amor, carinho e incentivo a cada dia.

Aos meus PAIS e IRMÃOS, por todo amor e confiança durante toda minha vida, não importando a distância física que nos separe, pois estaremos sempre ligados.

À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP), pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	4
Introdução	7
Objetivo	12
Material e Métodos	14
Resultados	25
Discussão	47
Conclusão	53
Referências	55

LISTA DE ABREVIATURAS

AE: diâmetro do átrio esquerdo
ANOVA: análise de variância
AO: diâmetro da aorta
AST: área seccional transversa do cardiomiócito
CaCl₂: cloreto de cálcio
DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
DEPC: dietilpirocarbonato
DNA: ácido desoxirribonucleico
DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
EDPP: espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo
EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular
ESP: espirolactona
Esp. Rel. VE: espessura relativa do ventrículo esquerdo
ESPP: espessura sistólica da parede posterior do ventrículo esquerdo
ESSIV: espessura sistólica do septo interventricular
E/A: razão entre as ondas E e A do fluxo diastólico transmitral
FCI: fração de colágeno intersticial
GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HAS: hipertensão arterial sistêmica
HCl: ácido clorídrico
HOP VE: concentração de hidroxiprolina no miocárdio do ventrículo esquerdo
IC: insuficiência cardíaca
ISO: isoproterenol
KCl: cloreto de potássio
Lmax: comprimento do músculo
LOX: lisil oxidase
MgSO₄: sulfato de magnésio
mRNA: ácido ribonucleico mensageiro
MVE: massa do ventrículo esquerdo
NaCl: cloreto de sódio
NaHCO₃: bicarbonato de sódio
NYHA: New York Heart Association
Onda A: pico de velocidade do fluxo transmitral decorrente da contração atrial
Onda E: pico de velocidade do fluxo transmitral na fase de enchimento inicial

PAS: pressão arterial sistólica

PP: pós-pausa

Rpm: rotações por minuto

RT-PCR: reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa

SHR: ratos espontaneamente hipertensos

SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona

TD: tensão desenvolvida máxima

TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico

VD: ventrículo direito

VE: ventrículo esquerdo

VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do ventrículo esquerdo

WKY: Wistar-Kyoto

[Ca⁺²]_o: concentração extracelular de cálcio

+dT/dt: derivada positiva máxima da tensão desenvolvida

-dT/dt: derivada negativa máxima da tensão desenvolvida

%Δ endo: porcentagem de encurtamento endocárdico

%Δ meso: porcentagem de encurtamento mesocárdico

RESUMO

Introdução: A hipertensão arterial sistêmica é uma das principais causas de insuficiência cardíaca (IC). Durante o desenvolvimento de hipertrofia miocárdica e a evolução para IC, ocorre ativação dos sistemas nervoso simpático e renina-angiotensina-aldosterona. Estudos clínicos e experimentais mostraram que a aldosterona exerce diversos efeitos deletérios sobre o sistema cardiovascular e que o bloqueio de sua ação melhora a sobrevida e atenua o remodelamento ventricular na IC avançada. Entretanto, poucos estudos avaliaram as consequências de seu bloqueio na hipertensão arterial, antes do surgimento de sinais de IC. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da administração precoce de espironolactona sobre variáveis estruturais e funcionais cardíacas de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e, adicionalmente, investigar os componentes responsáveis pela remodelação da matriz extracelular. **Métodos:** Ratos SHR com 13 meses de idade foram divididos em dois grupos: um grupo SHR controle (SHR-C, n=20) e outro grupo SHR tratado com espironolactona (20 mg/kg/dia) (SHR-ESP, n=24) por seis meses. Ratos Wistar-Kyoto (WKY-C, n=15) de mesma idade foram utilizados como controle. A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida no início e no final do experimento. A avaliação estrutural e funcional *in vivo* do coração foi realizada por meio de ecocardiograma. A função miocárdica *in vitro* foi avaliada em preparações de músculo papilar isolado do ventrículo esquerdo (VE). As análises séricas de eletrólitos e creatinina foram realizadas por kits bioquímicos específicos. Para análise de variáveis anatômicas foram medidos os pesos úmidos e secos do VE, ventrículo direito (VD), átrios e amostras de fígado e pulmão. Amostras de tecido do VE foram obtidas para análises histológicas, quantificação de hidroxiprolina e das concentrações de colágeno total e solúvel, e avaliação das expressões gênica e proteica dos colágenos tipo I e III, e da lisil oxidase. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via complementada com teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis de uma via complementado com teste de Dunn (WKY-C vs. SHR-C e SHR-C vs. SHR-ESP) e ANOVA de duas vias para modelo de medidas repetidas complementada com teste de Bonferroni para as variáveis peso corporal e PAS. O teste de Goodman foi utilizado nas análises de mortalidade e de sinais de IC. Os resultados foram discutidos no nível de significância de 5%. **Resultados:** Os animais do grupo SHR-

ESP apresentaram menor porcentagem de animais com IC e mortalidade intermediária entre os outros dois grupos. Os valores de PAS inicial e final foram semelhantes entre os grupos hipertensos. Não houve diferença entre os grupos SHR em relação às variáveis estruturais e funcionais avaliadas por ecocardiografia. A avaliação *in vitro* mostrou melhora da contratilidade e do relaxamento miocárdico no SHR-ESP, bem como menor valor das variáveis anatômicas pesos do VD e átrios. A área seccional do cardiomiócito e a concentração miocárdica de colágeno total foram menores no grupo SHR-ESP. O conteúdo de hidroxiprolina, colágeno solúvel e da fração colágena miocárdica não foram estatisticamente diferentes entre os grupos hipertensos. As expressões gênica e proteica dos colágenos tipo I e III, e da lisil oxidase não foram diferentes entre os grupos SHR. **Conclusão:** A introdução de espironolactona em ratos hipertensos não controlados, antes do surgimento de sinais clínicos de insuficiência cardíaca, reduz a hipertrofia e o colágeno miocárdico, melhora a função contrátil e o relaxamento miocárdico e atenua a taxa de mortalidade.

Palavras-chave: aldosterona, colágeno, espironolactona, insuficiência cardíaca, ratos espontaneamente hipertensos, remodelamento cardíaco.

ABSTRACT

Introduction: Hypertension is a leading cause of heart failure (HF). During the development of myocardial hypertrophy and progression to heart failure there is activation of sympathetic nervous and renin-angiotensin-aldosterone systems. Clinical and experimental studies have shown that aldosterone exerts several deleterious effects on cardiovascular system and that blocking its action improves survival and attenuates ventricular remodeling in advanced HF. However, few studies have evaluated the consequences of aldosterone blockade in hypertensive cardiopathy before clinical evidence of HF. The purpose of this study was to evaluate the effects of early spironolactone (SPR) administration on cardiac structure and function in spontaneously hypertensive rats (SHR) and to investigate extracellular matrix remodeling. **Methods:** Forty-four 13 month old SHR were divided into two groups: control SHR (SHR-C, n=20) and SHR treated with SPR 20 mg/kg/day (SHR-SPR, n=24) for six months. Age-matched Wistar-Kyoto rats (WKY-C, n=15) were used as controls. Systolic blood pressure (SBP) was measured at the beginning and end of the experiment. Echocardiogram was performed to evaluate *in vivo* cardiac structures and left ventricular (LV) function. Myocardial function was analyzed in LV papillary muscle preparations. Serum electrolytes and creatinine levels were determined by specific biochemical kits. Wet and dry weights of LV, right ventricle, atria, and liver and lung samples were measured. LV tissue samples were obtained for histological analysis, determination of hydroxyproline and total and soluble collagen concentration, and evaluation of types I and III collagen, and lysyl oxidase gene and protein expressions. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA and Bonferroni's test or one-way Kruskal-Wallis and Dunn's test (WKY-C vs. SHR-C and SHR-C vs. SHR-SPR), and two-way repeated measures ANOVA with Bonferroni's test for body weight and SBP. Goodman's test was used to analyze mortality and HF features. The results were discussed at a significance level of 5%. **Results:** The SHR-SPR group showed lower percentage of HF and mortality rate intermediate between SHR-C and WKY-C. SBP was similar at the beginning and end of the experiment between hypertensive groups. Structure and function variables assessed by echocardiography were not different between SHR groups. *In vitro* myocardial function was improved in SHR-SPR. Right ventricular and atrial

weights, cardiomyocyte cross sectional area, and total myocardial collagen concentration were lower in SHR-SPR than SHR-C. Myocardial hydroxyproline concentration, soluble collagen, interstitial collagen fraction, types I and III collagen, and lysyl oxidase gene and protein expression was not different between SHR groups. **Conclusion:** Aldosterone blockade initiated before clinical evidence of heart failure decreases myocardial hypertrophy and collagen content, ameliorates myocardial contraction and relaxation, and attenuates mortality rate in spontaneously hypertensive rats.

Key Words: aldosterone, cardiac remodeling, collagen, heart failure, spironolactone, spontaneously hypertensive rats.

INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) acomete cerca de 600 milhões de pessoas no mundo, segundo a Organização Mundial de Saúde. Estima-se que 1,56 bilhão de pessoas poderão apresentar HAS em 2025, o que provocaria uma epidemia global de doenças cardiovasculares (www.sbh.org.br).

No Brasil, a prevalência de HAS na população geral é de aproximadamente 30%, chegando a mais de 50% na terceira idade, o que representa a principal doença cardiovascular em nosso meio. O número anual de mortalidade brasileira, por doenças cardiovasculares, se aproxima de trezentas mil pessoas, sendo que mais da metade ocorre devido às complicações da HAS (www.sbh.org.br).

Além dos efeitos deletérios aos vários órgãos como cérebro, rins e sistema vascular, a HAS causa alterações cardíacas que irão comprometer a função do coração e, mais tardiamente, levar ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca (IC). A elevação da pressão arterial induz hipertrofia miocárdica, que é uma resposta adaptativa do coração, e promove a manutenção do débito cardíaco em valores normais. Evolutivamente, a hipertrofia leva à IC, inicialmente decorrente de disfunção diastólica isolada do ventrículo esquerdo (VE). Com a persistência da pressão arterial elevada e a incapacidade do miocárdio de continuar se hipertrofiando, estabelece-se o comprometimento adicional e predominante da função sistólica, com piora acentuada do quadro clínico da IC e do prognóstico do paciente (Cicogna *et al.*, 2000). A presença de hipertrofia miocárdica, por si só, representa fator de risco independente para morbidade e mortalidade cardíaca (Frey *et al.*, 2004).

Sobrecargas hemodinâmicas crônicas, como a HAS, induzem alterações na geometria, volume, massa, constituição e função do coração. Esse processo é denominado remodelamento cardíaco. Esse processo envolve, além de hipertrofia dos miócitos, alterações na quantidade e qualidade do colágeno na matriz extracelular (Cohn *et al.*, 2000; Spinale, 2002).

A participação de sistemas neurohormonais no remodelamento cardíaco tem sido objeto de muito estudo nas últimas décadas. Atualmente, está bem estabelecido o papel maléfico da ativação do sistema nervoso adrenérgico e do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) no desenvolvimento de

hipertrofia cardíaca e em sua evolução para IC (Weinberg *et al.*, 1994; Weinberg *et al.*, 1997; Okoshi *et al.*, 2004a; Bregagnollo *et al.*, 2005; Gonçalves *et al.*, 2005). O bloqueio desses sistemas, utilizando os inibidores da enzima conversora da angiotensina, bloqueadores dos receptores da angiotensina e os betabloqueadores, têm consistentemente mostrado efeito favorável no tratamento da insuficiência cardíaca e na regressão do remodelamento cardíaco (Bristow *et al.*, 2005).

Somente mais recentemente, foi verificado também o papel deletério da ativação do mineralocorticóide aldosterona não dependente do sistema renina-angiotensina, sobre o sistema cardiovascular (Pitt *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 2000; Hayashi *et al.*, 2003; Pitt *et al.*, 2003; Mano *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2006). Em trabalhos experimentais, foi verificado que a aldosterona promove, entre vários efeitos, indução de fibrose intersticial, hipertrofia miocitária, apoptose de miócitos, lesão vascular, disfunção endotelial, perda de potássio e magnésio, arritmias ventriculares e retenção renal de sódio e água (Mano *et al.*, 2004; Okoshi *et al.*, 2004b; Struthers & MacDonald, 2004). Além disso, o bloqueio da ação da aldosterona com espironolactona ou eplerenona atenua as alterações cardíacas morfológicas e funcionais desencadeadas por diversos estímulos (Takeda *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2006). O aumento da reabsorção renal de sódio pode induzir elevação da pressão arterial sistêmica e, conseqüentemente, da carga hemodinâmica à qual o coração está submetido (Struthers & MacDonald, 2004). Entretanto, ainda não está definido se o bloqueio das ações da aldosterona tem papel em situação de sobrecarga pressórica crônica e persistente.

O estudo RALES, no qual foi utilizado o bloqueador da aldosterona espironolactona, foi o primeiro a mostrar redução da mortalidade e número de hospitalizações em pacientes com IC sistólica em classes funcionais III e IV da New York Heart Association (NYHA) (Pitt *et al.*, 1999). Posteriormente, o ensaio clínico EPHESUS mostrou benefício do bloqueador específico da aldosterona, eplerenona, também em pacientes com IC sistólica em classes II, III e IV pós-infarto do miocárdio (Pitt *et al.*, 2003). O recente estudo EMPHASIS-HF mostrou que a eplerenona reduz a mortalidade e hospitalizações em pacientes com IC de

qualquer causa em classe funcional II e fração de ejeção $\leq 0,35$ (Zannad *et al.*, 2011). Baseados nesses ensaios clínicos, a diretriz terapêutica atual recomenda o uso de espirolactona em portadores de IC de qualquer causa, com fração de ejeção reduzida, e em classes funcionais II, III ou IV. Além disso, recomenda-se também aos pacientes pós-infarto do miocárdio com fração de ejeção menor que 0,40, independente da classe funcional (Bocchi *et al.*, 2012).

Em relação ao remodelamento cardíaco, Chan *et al.* (2007) publicaram um ensaio clínico envolvendo pequeno número de pacientes com IC em classe funcional II que mostrou efeito benéfico da espirolactona na estrutura e função do VE. Portanto, é de fundamental importância que se determine o efeito do bloqueio dos receptores da aldosterona em fases precoces do desenvolvimento de IC.

Para estudos envolvendo a transição da fase de hipertrofia ventricular compensada secundária à HAS para a de IC descompensada, o modelo de rato geneticamente hipertenso tem sido muito utilizado. Os ratos espontaneamente hipertensos (SHR) foram introduzidos por Okamoto e Aoki (1963) como um modelo de hipertensão genética, muito semelhante à hipertensão arterial sistêmica em humanos. O SHR desenvolve hipertensão persistente após cerca de dois meses de idade e, aos três meses, já apresenta hipertrofia do VE (Bing *et al.*, 1995; Cicogna *et al.*, 1999). Após período relativamente longo de hipertensão estável e hipertrofia compensada com função cardíaca preservada, os animais desenvolvem disfunção ventricular e insuficiência cardíaca, em geral, entre 18 e 24 meses de idade (Pfeffer *et al.*, 1979; Trippodo & Frohlich, 1981; Bing *et al.*, 2002; McCrossan *et al.*, 2004). Semelhantemente ao que se observa em humanos, durante o processo de remodelação cardíaca nos SHR ocorre o desenvolvimento de fibrose miocárdica, com aumento do colágeno dos tipos I e III, alterando a quantidade e qualidade do colágeno miocárdico, que é particularmente acentuada na fase de IC (Bing *et al.*, 1995; Conrad *et al.*, 1995; Brower *et al.*, 2006).

Como referido anteriormente, já foi bem demonstrado o papel da aldosterona em induzir aumento da matriz colágena intersticial (Brilla *et al.*, 1993; Wahed *et al.*, 2005; Kalidindi *et al.*, 2007). Entretanto, ainda não está

definido se o antagonismo precoce da aldosterona pode impedir ou reverter alterações da quantidade e da composição da matriz colágena intersticial em SHR. Considerando os efeitos adversos da aldosterona na remodelação cardíaca e no desenvolvimento da IC, pode-se supor que o bloqueio dos receptores da aldosterona, em fase anterior ao desenvolvimento da IC, tem efeitos benéficos, atenuando a progressão da remodelação cardíaca. De fato, estudo prévio do nosso grupo mostrou que ratos espontaneamente hipertensos tratados com espironolactona por seis meses, a partir dos 16 meses de idade, apresentam redução significativa da mortalidade (Cezar, 2010). No entanto, não observamos efeitos benéficos sobre a remodelação cardíaca. Assim, levantamos duas hipóteses para explicar nossos achados: 1) a espironolactona reduz a ocorrência de morte súbita sem, no entanto, interferir na evolução natural da remodelação cardíaca decorrente da cardiopatia hipertensiva; e 2) efeitos benéficos da espironolactona sobre o coração não puderam ser demonstrados porque os ratos sem tratamento, com alterações estruturais e funcionais mais avançadas, não sobreviveram até o final do período experimental, quando a função cardíaca e miocárdica foi avaliada *in vivo* e *in vitro*. Assim, no presente estudo, testamos a hipótese que a administração precoce de espironolactona em SHR atenua alterações estruturais e funcionais cardíacas e da matriz colágena miocárdica quando os animais são avaliados em período experimental anterior àquele no qual apresentam grande mortalidade pela evolução natural da doença (Struthers & MacDonald, 2004; Weinberg *et al.*, 1997).

OBJETIVO

Avaliar o efeito da administração precoce de espironolactona sobre variáveis estruturais e funcionais cardíacas de ratos espontaneamente hipertensos. Adicionalmente, investigar os componentes responsáveis pela remodelação da matriz extracelular.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e Constituição dos Grupos

Foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e ratos normotensos Wistar-Kyoto (WKY), machos, com 13 meses de idade, provenientes do Biotério do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista, UNESP. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Os animais foram divididos em três grupos experimentais: 1) grupo SHR controle (SHR-C, n=15) que foi alimentado com ração comercial e água *ad libitum*; 2) grupo SHR espironolactona (SHR-ESP, n=21) que foi alimentado com ração comercial acrescida de espironolactona (20 mg/kg de peso corporal/dia) e água *ad libitum*; e 3) grupo WKY controle (WKY-C, n=15) que foi alimentado com ração comercial e água *ad libitum*. Os ratos permaneceram com esse tratamento por seis meses. Durante o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas (dois animais/gaiola), à temperatura ambiente de 23° C, com ciclos de luminosidade de 12 horas.

Ao final de seis meses de período experimental, os animais foram avaliados para verificação de sinal clínico de IC (taquipneia e/ou respiração laboriosa) e, a seguir, eutanasiados para coleta de sangue e obtenção de tecidos. No exame *post mortem*, foram pesquisados sinais patológicos para confirmação do diagnóstico de insuficiência cardíaca como ascite, congestão hepática, derrame pleural ou pericárdico, trombo em átrio esquerdo e hipertrofia do ventrículo direito (relação peso do ventrículo direito em mg/peso corporal em g maior que 0,8) (Boluyt *et al.*, 1994; Brooks *et al.*, 1997; Boluyt *et al.*, 2005). Os animais que morreram antes de completar o período experimental não tiveram o diagnóstico de IC confirmado por sinais patológicos.

Aferição da Pressão Arterial e Peso Corporal

A pressão arterial sistólica (PAS) foi aferida indiretamente na cauda, no início e ao término do período experimental. Os ratos foram previamente colocados em caixa de madeira (50 x 40 cm), à temperatura de 40° C por 5

minutos, com a finalidade de produzir vasodilatação da artéria caudal. A PAS foi aferida por plestimografia (Pfeffer *et al.*, 1971), utilizando-se o eletroesfigmomanômetro Narco Bio-System®, modelo 709-0610 (International Biomedical, Inc., USA). O manguito foi posicionado em torno da cauda do animal e conectado a transdutor de pressão. Em seguida, o manguito foi insuflado a valor superior à pressão arterial sistólica e desinsuflado. O registro das pulsações arteriais foi feito em polígrafo Gould, modelo RS 3200.

Os ratos foram pesados individualmente em balança digital (Mettler® modelo Spider 2).

Estudo Ecocardiográfico

O ecocardiograma foi realizado antes da introdução do tratamento e ao final do período experimental. Os ratos foram submetidos à anestesia com cloridrato de cetamina (50 mg/kg, i.p.) e cloridrato de xilidino (1 mg/kg, i.p.). Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para a realização do exame. Foi utilizado o equipamento modelo HDI-5000 da *Philips*, equipado com transdutor eletrônico multifrequencial de 12 MHz. Para avaliação estrutural do coração, foram obtidas imagens em modo monodimensional (modo-M) orientado pelas imagens em modo bidimensional, estando o transdutor em posição para-esternal eixo menor. A avaliação do VE foi realizada posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral no nível dos músculos papilares (Simone *et al.*, 1992; Litwin *et al.*, 1995). As imagens da aorta e do átrio esquerdo foram obtidas posicionando o cursor do modo-M ao nível do plano da valva aórtica. As imagens obtidas no modo-M foram registradas em impressora modelo UP-895 da Sony Co. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas, manualmente, com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo, Japan). As seguintes estruturas foram medidas: diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do VE; espessuras diastólica (EDPP) e sistólica (ESPP) da parede posterior do VE; espessuras diastólica (EDSIV) e sistólica (ESSIV) do septo interventricular; diâmetro da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE). A massa do VE (MVE) foi calculada pela fórmula

$[(DDVE + EDPP + EDSIV)^3 - (DDVE)^3] \times 1,04$, onde 1,04 representa a densidade específica do miocárdio (Litwin *et al.*, 1995; Paiva *et al.*, 2003). A função sistólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) porcentagem de encurtamento endocárdico $[(DDVE - DSVE) / DDVE]$; 2) porcentagem de encurtamento mesocárdico $[(DDVE + \frac{1}{2} EDPP + \frac{1}{2} EDSIV) - (DSVE + \frac{1}{2} ESPP + \frac{1}{2} ESSIV) / (DDVE + \frac{1}{2} EDPP + \frac{1}{2} EDSIV)]$; e 3) velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP), que é a tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior. A função diastólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: 1) razão entre os picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; 2) tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV).

Estudo do Músculo Isolado

A função miocárdica foi analisada por meio de preparações com músculos papilares isolados do VE. O desempenho mecânico do músculo papilar foi avaliado no dia seguinte à realização do último ecocardiograma, de acordo com a técnica utilizada rotineiramente em nosso laboratório (Cicogna *et al.*, 1997; Cicogna *et al.*, 2000; Gut *et al.*, 2008; Okoshi *et al.*, 2006). Após anestesia com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.), os animais foram submetidos a toracotomia mediana. O coração foi rapidamente removido e colocado em solução de Krebs-Henseleit com a seguinte composição em mM: 118,5 NaCl; 4,69 KCl; 1,25 CaCl₂; 1,16 MgSO₄; 1,18 KH₂PO₄; 5,50 glicose; e 24,88 NaCO₃. A solução foi mantida à temperatura de 28° C e oxigenada com 95% de oxigênio e 5% de dióxido de carbono. A seguir, o músculo papilar do VE foi dissecado, preso a anéis de aço inoxidável e transferido para câmara contendo solução de Krebs-Henseleit, com pH entre 7,38 a 7,42 e pressão parcial de oxigênio entre 550 a 600 mmHg. A extremidade inferior do músculo foi acoplada a transdutor de força (Kyowa 120T-20B) e a superior a sistema de alavanca isotônica que permite ajuste do comprimento de repouso do músculo e da pós-carga.

O músculo papilar foi estimulado 12 vezes por minuto por meio de eletrodos de platina (E8 - Grass), com voltagem de estímulo de 12 a 15 volts

correspondente a valor 10% acima do mínimo necessário para provocar resposta mecânica máxima do músculo.

Após período de 60 minutos, no qual o músculo contraiu sem desenvolver força (contração isotônica), este foi colocado em contração isométrica pela adição de pós-carga de 50 g. A seguir, o músculo foi progressivamente estirado, até a força desenvolvida atingir seu valor máximo. O comprimento de repouso da fibra muscular associado com a força ou tensão máxima desenvolvida, em contração isométrica, denomina-se L_{max} . O registro das variáveis foi iniciado após verificar-se que o músculo permaneceu estável em contração isométrica durante 15 minutos. Os seguintes parâmetros foram analisados: tensão desenvolvida (TD, g/mm^2), velocidade de variação da tensão desenvolvida ($+dT/dt$, $g/mm^2/s$) e velocidade de variação de decréscimo da tensão desenvolvida ($-dT/dt$, $g/mm^2/s$). As contrações isométricas foram registradas por meio de sistema computadorizado de aquisição de dados (AcqKnowledge® MP100, Biopac Systems Inc., Santa Barbara, CA, USA). Os valores de tensão foram normalizados pelas áreas seccionais dos músculos.

A reserva contrátil foi avaliada por meio dos seguintes estímulos inotrópicos: 1) contração pós-pausa; 2) aumento da concentração extracelular de cálcio de 1,25 mM para 2,5 mM e 5,0 mM; e 3) adição de isoproterenol à solução nutriente.

O comprimento do músculo (L_{max}) foi medido com auxílio de catetômetro Gartner (Gartner Scientific Corporation, Chicago, USA). Ao final do experimento, a porção muscular entre os anéis de aço foi cortada, submetida à secagem com papel filtro e pesada. A área seccional do músculo foi calculada dividindo-se o peso pelo comprimento.

Análise Histológica do Coração

Após a pesagem dos ventrículos direito e esquerdo, foram cortados fragmentos com 3 a 5 mm de espessura da parte central do VE. O material foi imerso em formalina 10% neutra e tamponada, durante 48 horas, a 4° C. A seguir, o tecido foi lavado, desidratado e incluído em parafina. Cortes histológicos

com 5 a 7 μm de espessura foram submetidos à coloração por hematoxilina e eosina, para avaliação morfológica geral e mensuração do diâmetro dos miócitos e à coloração por *picrosirius red* para quantificação do colágeno miocárdico.

A análise morfométrica foi realizada utilizando-se câmara de vídeo acoplada a microscópio Leica, com objetiva 40 X, conectado a computador equipado com programa analisador de imagem (Image-Pro Plus 3.0, Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Em secções transversas do VE, foram medidos os menores diâmetros transversos dos miócitos de, no mínimo, 50 fibras cardíacas nas quais o núcleo foi claramente identificado (Ahmet *et al.*, 2005). Para a quantificação da fração do colágeno intersticial miocárdico, foram analisados no mínimo 20 campos histológicos, sendo o colágeno perivascular excluído da análise.

Análise de Variáveis Anatômicas

O grau de hipertrofia ventricular foi avaliado pelos pesos dos ventrículos direito e esquerdo e pela relação entre o peso úmido dos ventrículos direito e esquerdo e normalizados pelo peso corporal e o comprimento da tíbia dos animais. Os ventrículos, átrios, pulmões e fragmento do fígado foram utilizados também para determinação do conteúdo de água nesses tecidos (relação peso úmido/seco).

Avaliação Colorimétrica do Colágeno Miocárdico

Para avaliação do colágeno total e solúvel do tecido cardíaco foram utilizados dois ensaios colorimétricos. A análise do colágeno solúvel foi realizada com a extração do tecido por ácido acético e pepsina utilizando-se o método de coloração por *sirius red* e leitura por espectrofotometria a 540 nm. A análise do colágeno total foi realizada por hidrólise ácida mediante adição de HCl 6 N em cada um dos tubos da amostra e, posteriormente, foi adicionado a solução cloramina T/P-dimetilamina-benzaldeído para obtenção de cor, e a leitura foi realizada por espectrofotometria a 570 nm (Prockop & Udenfriend, 1960).

Perfil Bioquímico

Para as dosagens bioquímicas foram utilizados *kits* comerciais da Celm® (sódio, potássio e magnésio) e Laborlab® (creatinina). Para dosagens de sódio, potássio e magnésio, foi utilizado o método de fotometria de chama por meio do aparelho FC-280. A dosagem de creatinina foi realizada por meio do aparelho Celm SB-190 e com atividade enzimática a 37° C.

Quantificação de Hidroxiprolina

A hidroxiprolina é um aminoácido presente exclusivamente no colágeno e, portanto, a determinação de sua concentração é utilizada para quantificar o colágeno miocárdico.

A concentração miocárdica de hidroxiprolina foi mensurada em tecido miocárdico obtido da ponta do VE, de acordo com o método descrito por Switzer (1991) e padronizado em nosso laboratório (Matsubara *et al.*, 2000; Epifanio *et al.*, 2005).

Inicialmente foram obtidas as soluções-padrão de trabalho de hidroxiprolina (diluição 60 µl HOP / 2940 µl HCl) e a solução branca (água destilada). Previamente à execução do processamento bioquímico, foi necessária a preparação dos seguintes reagentes químicos: tampão borato 0,2 M (pH 8,7), tiosulfato de sódio 3,6 M e o reagente de Ehrlich. O processamento bioquímico para determinação da concentração de hidroxiprolina foi iniciado por secagem das soluções-padrão e das amostras no concentrador de amostras (*Speed Vac*). A hidrólise ácida foi realizada mediante adição de HCl 6 N em cada um dos tubos das amostras, que foram aquecidas em estufa a 100° C por 8 horas. A oxidação foi realizada após retirada e resfriamento dos tubos da estufa. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por 10 minutos e colocadas novamente no concentrador de amostras (*Speed Vac*) por 3 horas. Retirada as amostras, adicionou-se 1 mL de água destilada e tamponada com solução tampão borato 0,2 M pH 8,7; após 20 minutos, a reação foi inibida com solução

tiosulfato de sódio 3,6 M e as amostras agitadas. Posteriormente, a solução foi saturada com KCl e colocada em banho-maria a 90° C.

Os tubos foram resfriados e adicionados 2,5 mL de tolueno e agitados por 5 minutos para separação das fases água e tolueno. Retirou-se 1,5 mL de tolueno da solução, que foi colocado em tubos de hemólise e acrescentado 0,6 mL de solução de Ehrlich. As amostras foram mantidas em repouso por 30 minutos a fim de se alcançar a estabilidade do cromógeno. A leitura foi realizada por espectrofotometria com filtro de 565 nm.

Avaliação da Expressão Gênica por RT-PCR em Tempo Real

A análise de mRNAs dos colágenos tipo I $\alpha 1$, tipo III $\alpha 1$ e a de lisil oxidase (LOX), que é a enzima responsável pelo “cross-linking” do colágeno, e do gene constitutivo ciclofilina foi realizada por reação em cadeia da polimerase em tempo real após transcrição reversa (RT-PCR).

Após a eutanásia, amostra de miocárdio do VE foi imediatamente congelada em nitrogênio e, a seguir, transferida para freezer a -80° C, onde permaneceu até o momento do estudo molecular.

A extração de RNA total do miocárdio foi realizada utilizando-se TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), de acordo com método previamente descrito (Carvalho *et al.*, 2006; Martinez *et al.*, 2010).

Resumidamente, o fragmento muscular congelado foi mecanicamente homogeneizado em gelo com TRIzol (1 mL de TRIzol/50-100 mg de tecido) e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. A seguir, foram acrescentados 0,2 mL de clorofórmio por mL de TRIzol utilizado, homogeneizado vigorosamente e incubado por 3 minutos à temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 12.000 g por 15 minutos a 4° C. A fase aquosa formada após a centrifugação foi separada, acrescida de 0,5 mL de isopropanol (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente para precipitação do RNA. Após esse período, o material foi novamente centrifugado a 12.000 g por 10 minutos a 4° C. O sedimento formado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) e centrifugado a 7.500 g

por 5 minutos a 4° C. O sedimento de RNA foi submetido a secagem por 10 minutos à temperatura ambiente e ressuspensão em solução 0,01% de dietilpirocarbonato (DEPC) e incubado a 60° C por 10 minutos. Para remover qualquer contaminação de DNA, as amostras foram incubadas com DNase I (#18068-015, Invitrogen Life Technologies, CA, USA). Posteriormente, foi realizada a quantificação de RNA por espectrofotometria a 260 nm, utilizando-se o fator de correção próprio para o RNA (40). A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão entre as densidades ópticas a 260 e 280 nm foi de aproximadamente 2,0.

Um micrograma de RNA foi submetido a RT utilizando-se o *High Capacity RNA-to-cDNA Kit* (#4387406, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para volume total de reação de 20 µL, de acordo com método recomendado pelo fabricante. Alíquotas de 2,5 µL (10-100 ng) do produto da RT, contendo DNA complementar (cDNA), foram submetidas à PCR em tempo real utilizando-se 10 µL *2X TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) e 1 µL de ensaio (20X) contendo oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) senso e antisenso e sonda *TaqMan* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) específicos para cada gene: colágeno tipo I α1 (*Taqman assay* Rn01463848_m1; Ref. Seq. Genbank NM_053304.1), colágeno tipo III α1 (*Taqman assay* Rn01437681_m1; Ref. Seq. Genbank NM_032085.1), lisil oxidase (*Taqman assay* Rn01491829_m1; Ref. Seq. Genbank NM_017061.2). A amplificação e análise foram realizadas utilizando o *Step One Plus™ Real Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Os dados de expressão gênica dos genes alvo foram normalizados pela expressão dos genes de referência ciclofilina (*Taqman assay* Rn00690933_m1; Ref. Seq. Genbank NM_017101.1). As reações foram feitas em triplicata e a expressão gênica foi calculada pelo método C_T (*critical threshold cycle*) comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (Livak & Schmittgen, 2001).

Western Blotting

A expressão proteica dos colágenos tipo I (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e tipo III e da lisil oxidase (Abcam, Cambridge, UK) foram avaliadas por Western blot.

Resumidamente, fragmento do miocárdio do VE (80-100 mg) foi homogeneizado com 800 µL de tampão Tris-Triton, contendo inibidores de protease e fosfatase. A seguir, o homogenato foi centrifugado por 20 minutos a 12.000 rpm, a 4° C, para eliminação de material insolúvel. O sobrenadante foi coletado e separado em alíquotas, as quais foram armazenadas a -80° C. Uma das alíquotas foi utilizada para quantificação de proteína pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Para cada proteína alvo, foi realizada eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida a 4° C (30 minutos a 50 V e 2 horas a 120 V). Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em sistema de transferência úmida por 90 minutos a 120 V, a 4° C. A seguir, a membrana foi incubada em solução de leite desnatado 5% em temperatura ambiente por 2 horas (bloqueio) para prevenir ligações inespecíficas com os anticorpos primário e secundário. Posteriormente, a membrana foi lavada com TBST (tampão contendo Tris, NaCl e Tween 20) e incubada durante a noite, a 4° C, com anticorpo primário específico para cada proteína. No dia subsequente, a membrana foi lavada com TBST e incubada à temperatura ambiente por 90 minutos com anticorpo secundário (conjugado a peroxidase) adequado para ligação com o anticorpo primário utilizado, de acordo com recomendação do fabricante. A seguir, após incubação da membrana com *Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce Protein Research Products, Rockford, USA) para detecção do anticorpo ligado à membrana, foi obtida a autorradiografia.

Após obtenção da radiografia com as bandas referentes à proteína alvo, a membrana foi incubada com *Restore Western Blot Stripping Buffer* (Pierce Protein Research Products, Rockford, USA) para remoção dos anticorpos ligados à membrana. A seguir, foi realizado novamente o processo de bloqueio e a membrana foi incubada durante a noite, a 4° C, com anticorpo primário para a

proteína constitutiva GAPDH. O procedimento prosseguiu da mesma forma como descrito anteriormente até a detecção do sinal e obtenção da autorradiografia.

Os filmes foram digitalizados e as bandas quantificadas por densitometria utilizando-se o programa Gel Pro 3.1. Os resultados obtidos para as proteínas alvo foram normalizados pelos resultados da proteína constitutiva GAPDH.

- Anticorpos primários da Santa Cruz Biotechnology Inc. (California, USA): col1a1 (sc-8784-r) e GAPDH (sc-32233).
- Anticorpos primários da Abcam (Cambridge, UK): col3a1 (ab6310) e LOX1 (ab60178).
- Anticorpos secundários da Santa Cruz Biotechnology Inc. (California, USA): anti-mouse (sc-2005) e anti-rabbit (sc-2004).

Análise Estatística

Os dados numéricos são expostos como média e desvio padrão ou mediana e percentis 25 e 75 de acordo com a distribuição normal ou não normal. A comparação entre os grupos foi realizada por análise de variância (ANOVA) de uma via complementada pelo teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis de uma via complementado com teste de Dunn (comparações efetuadas: WKY-C versus SHR-C, SHR-C versus SHR-ESP). Para comparar valores de peso corporal e de pressão arterial foi utilizada ANOVA de duas vias para modelo de medidas repetidas complementadas pelo teste de Bonferroni. A análise de frequência de sinais de insuficiência cardíaca e de mortalidade entre os grupos foi realizada pelo teste de Goodman. O nível de significância considerado foi de 5%.

RESULTADOS

Caracterização dos grupos experimentais e variáveis anatômicas

Neste estudo foram utilizados 15 animais WKY controle (WKY-C) e 44 animais SHR que foram divididos em 20 para o grupo controle (SHR-C) e 24 para o grupo que recebeu espironolactona (SHR-ESP). Ao final do período experimental, os grupos foram constituídos por 15 animais no grupo WKY-C, 15 animais no grupo SHR-C e 21 animais no grupo SHR-ESP.

Dentre os animais sobreviventes de cada grupo, houve diferença significativa entre os grupos quanto à presença de sinais de IC: WKY-C 0,0%, SHR-C 86,7% e SHR-ESP 47,6% ($p < 0,05$), como mostrado na Figura 1. A espironolactona mostrou ser benéfica em reduzir a ocorrência de sinais de IC.

Em relação à mortalidade, todos os animais do grupo WKY-C sobreviveram até o final do experimento. A mortalidade do grupo SHR-C foi maior quando comparado ao WKY-C (25,0% vs. 0,0%, $p < 0,05$). O grupo SHR-ESP apresentou taxa de mortalidade intermediária entre os outros dois grupos (12,5%), não sendo estatisticamente diferente desses. Assim, a espironolactona atenuou a taxa de mortalidade nos animais SHR-ESP.

Peso Corporal

Na Tabela 1 e Figura 2 estão expostos os valores de peso corporal dos animais. O PC foi semelhante nos grupos SHR-C e SHR-ESP quando comparados entre si no mesmo momento (inicial ou final). O grupo WKY-C apresentou PC final maior quando comparado ao grupo SHR-C. Na comparação entre os momentos inicial e final em cada grupo, os grupos SHR apresentaram redução significativa do PC, enquanto que no grupo WKY-C ocorreu aumento.

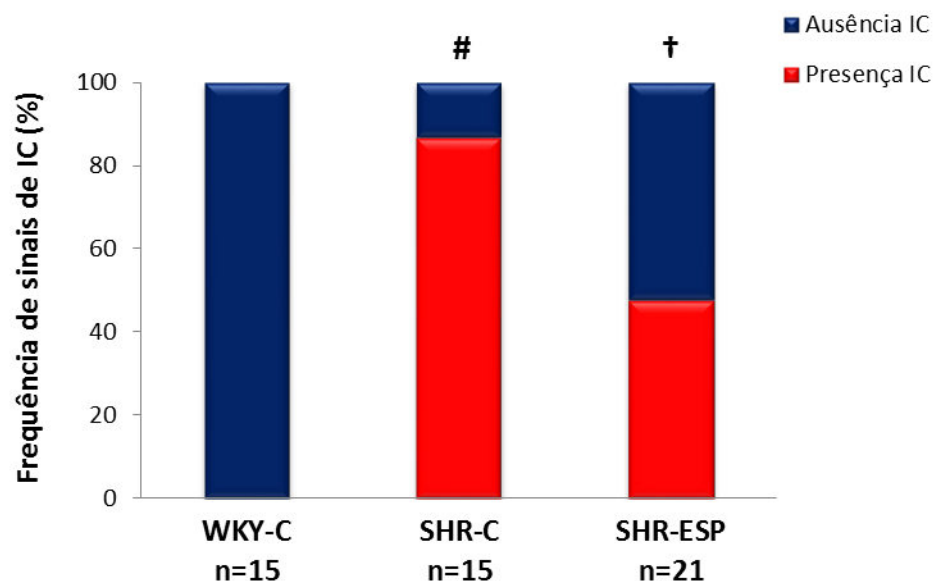


Figura 1: Frequência de sinais de insuficiência cardíaca. WKY-C: ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: ratos espontaneamente hipertensos tratados com espirolactona. #: $p < 0,05$ vs. WKY-C; † $p < 0,05$ vs. SHR-C (teste de Goodman).

Tabela 1. Peso corporal dos animais

Variáveis	WKY-C (n=15)	SHR-C (n=15)	SHR-ESP (n=21)
PC inicial (g)	381 ± 19	390 ± 21	383 ± 20
PC final (g)	400 ± 27*	356 ± 40*#	366 ± 40*

Dados expressos em média e desvio padrão. WKY-C: grupo de ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: grupo de ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: grupo de ratos espontaneamente hipertensos tratados com espirolactona; PC: peso corporal. *: $p < 0,05$ vs. PC inicial dentro do mesmo grupo; #: $p < 0,05$ vs. WKY-C (ANOVA de duas vias para modelo de medidas repetidas complementada com teste de Bonferroni).

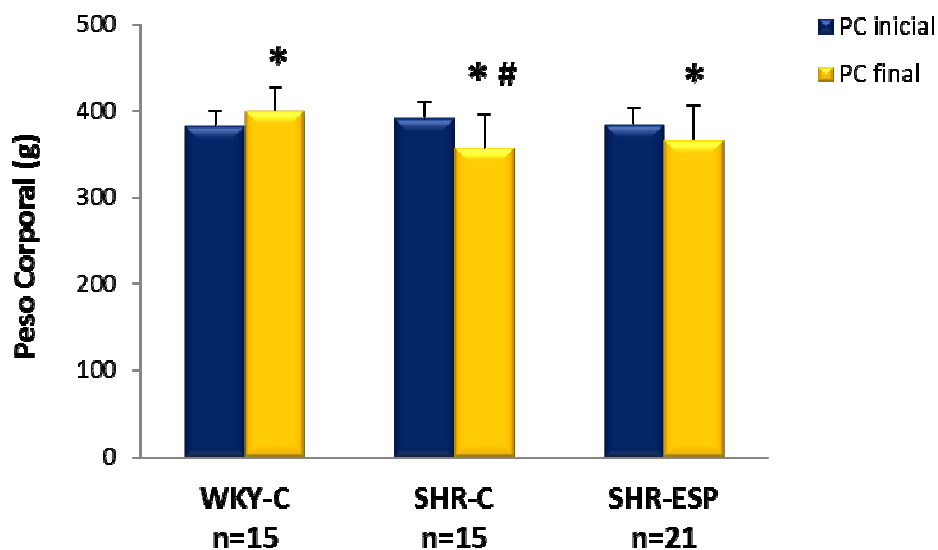


Figura 2: Peso corporal dos animais. WKY-C: ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: ratos espontaneamente hipertensos tratados com espironolactona; PC: peso corporal. *: $p < 0,05$ vs. PC inicial dentro do mesmo grupo; #: $p < 0,05$ vs. WKY-C (ANOVA de duas vias para modelo de medidas repetidas complementada com teste de Bonferroni).

Pressão Arterial Sistólica

Na Tabela 2 e Figura 3 são mostrados os resultados da pressão arterial sistólica, segundo tratamento e momento de avaliação. Pode-se observar que houve diferença significativa entre os grupos WKY-C e SHR-C nos momentos inicial e final. Não houve diferença nos valores da PAS dentro do mesmo grupo em diferentes momentos.

Tabela 2. Pressão arterial sistólica (PAS) no início e no final do experimento

Variáveis	WKY-C (n=15)	SHR-C (n=15)	SHR-ESP (n=21)
PAS inicial (mmHg)	111 ± 09	199 ± 13 [#]	190 ± 21
PAS final (mmHg)	113 ± 12	184 ± 24 [#]	197 ± 22

Dados expressos em média e desvio padrão. WKY-C: grupo de ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: grupo de ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: grupo de ratos espontaneamente hipertensos tratados com espironolactona; PAS: pressão arterial sistólica. #: $p < 0,05$ vs. WKY-C (ANOVA de duas vias para modelo de medidas repetidas complementada com teste de Bonferroni).

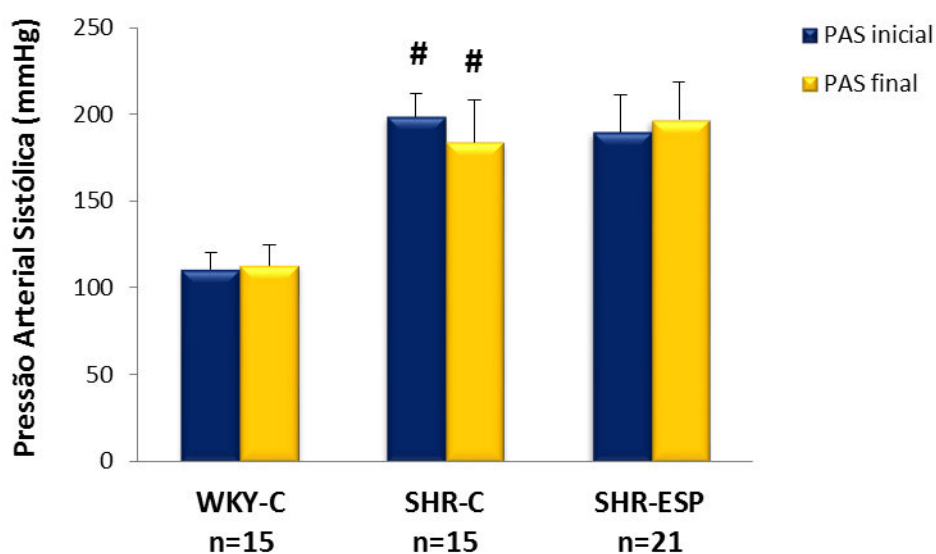


Figura 3: Pressão arterial sistólica dos animais. WKY-C: ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: ratos espontaneamente hipertensos tratados com espironolactona; PAS: pressão arterial sistólica. #: $p < 0,05$ vs. WKY-C (ANOVA de duas vias para modelo de medidas repetidas complementada com teste de Bonferroni).

Avaliação Ecocardiográfica

O ecocardiograma transtorácico foi realizado no início e no final do período experimental. No período inicial, não observamos diferenças estatisticamente significantes nas variáveis estruturais e funcionais entre os

animais utilizados para compor os dois grupos SHR. A comparação entre os grupos SHR e WKY-C mostrou que as variáveis DDVE, DDVE/PC, E/A foram menores no grupo SHR, e as variáveis EDPP, EDSIV, AO, AE, AE/PC, MVE, onde A e a espessura relativa do VE foram maiores no grupo SHR.

Na Tabela 3 e Figuras 4, 5, 6 estão apresentadas as variáveis estruturais avaliadas no final do experimento. As variáveis estruturais espessura da parede do VE, espessura relativa do VE, AO, AE, AE/PC, MVE e índice de MVE foram maiores no grupo SHR-C em relação ao WKY-C. Não houve diferença entre os grupos SHR.

Os resultados da avaliação funcional do coração por meio do ecocardiograma ao final do experimento estão expostos nas Tabelas 4 e 5 e Figura 7. Em relação às variáveis de função sistólica, observamos menor porcentagem de encurtamento mesocárdico no SHR-C vs. WKY-C. Os dados de função diastólica mostraram prolongamento do TRIV no grupo SHR-ESP quando comparado ao grupo SHR-C.

Estudo do Músculo Isolado

O desempenho mecânico do músculo papilar foi avaliado no dia seguinte à realização do último ecocardiograma. Na Tabela 6 e Figuras 8 e 9 estão apresentadas as variáveis funcionais na condição basal. Todas as variáveis funcionais mostraram-se aumentadas estatisticamente no grupo SHR-ESP quando comparadas ao grupo SHR-C. As Tabelas 7, 8 e 9 apresentam as variáveis funcionais obtidas em contrações isométricas após manobras inotrópicas: contração pós-pausa, elevação da concentração extracelular de cálcio e adição de isoproterenol, respectivamente. O comportamento dos grupos manteve-se semelhante ao observado na condição basal.

Tabela 3. Análise ecocardiográfica dos parâmetros estruturais do coração

Variáveis	WKY-C (n=15)	SHR-C (n=15)	SHR-ESP (n=21)
DDVE (mm)	7,77 ± 0,54	7,63 ± 0,97	7,87 ± 0,79
DDVE/PC (mm/kg)	19,6 (18,8–20,9)	19,9 (19,2–22,7)	21,2 (20,1–24,3)
DSVE (mm)	3,03 ± 0,65	3,33 ± 1,39	3,16 ± 1,00
EDPP (mm)	1,46 ± 0,13	1,76 ± 0,14 [#]	1,81 ± 0,17
ESPP (mm)	3,14 ± 0,47	3,56 ± 0,58 [#]	3,91 ± 0,37
EDSIV (mm)	1,51 ± 0,12	1,78 ± 0,13 [#]	1,84 ± 0,18
AO (mm)	4,07 ± 0,25	4,54 ± 0,33 [#]	4,53 ± 0,43
AE (mm)	5,81 (5,46–6,04)	6,11(5,67–8,11) [#]	6,94 (6,64–7,27)
AE/PC (mm/g)	14,9 ± 2,17	19,0 ± 4,48 [#]	19,2 ± 2,56
Massa VE (g)	0,81 ± 0,14	1,00 ± 0,25 [#]	1,10 ± 0,27
Índice MVE (g/kg)	2,07 ± 0,30	2,79 ± 0,76 [#]	3,07 ± 0,75
Esp. Rel. VE	0,38 ± 0,03	0,47 ± 0,06 [#]	0,46 ± 0,05

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. WKY-C: grupo de ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: grupo de ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: grupo de ratos espontaneamente hipertensos tratados com espironolactona; PC: peso corporal; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VE); DSVE: diâmetro sistólico do VE; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE; ESPP: espessura sistólica da parede posterior do VE; EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular; AO: diâmetro de aorta; AE: diâmetro de átrio esquerdo; MVE: massa do VE; Esp. Rel. VE: espessura relativa do VE. #: $p < 0,05$ vs. WKY-C (ANOVA de uma via complementada com teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis de uma via complementado com teste de Dunn).

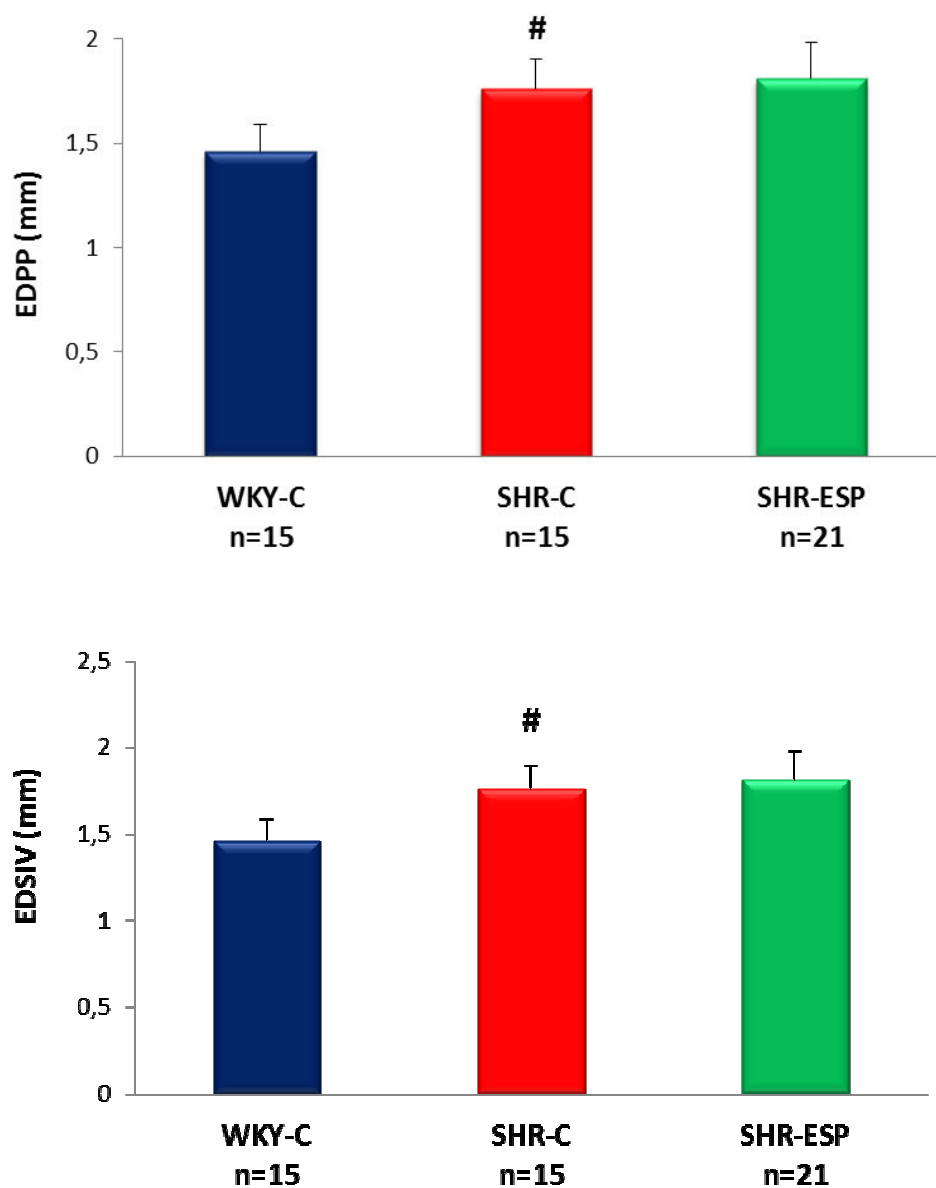


Figura 4: Espessuras diastólica da parede posterior (EDPP) e do septo interventricular (EDSIV). WKY-C: ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: ratos espontaneamente hipertensos tratados com espironolactona. #: $p < 0,05$ vs. WKY-C (ANOVA de uma via complementada com teste de Bonferroni).

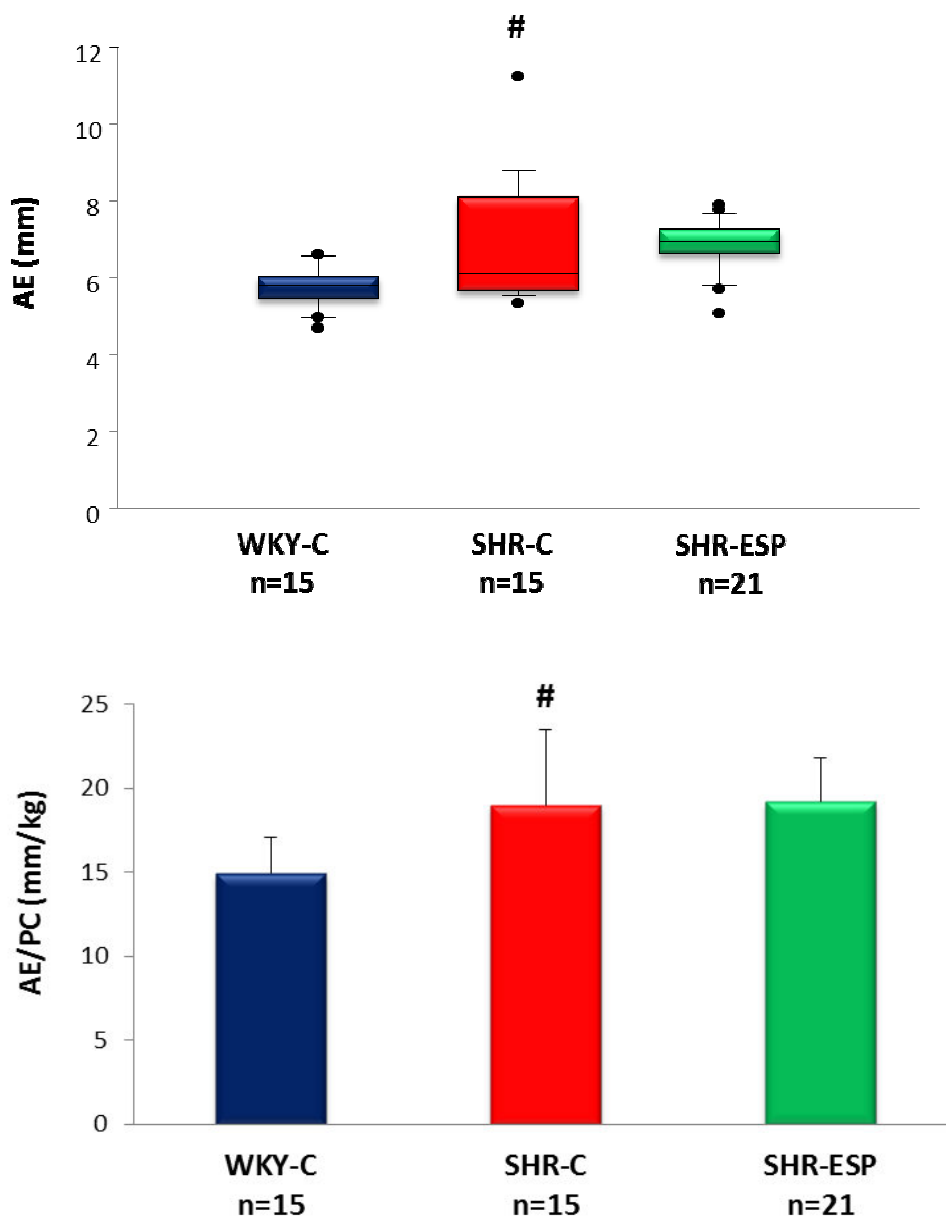


Figura 5: Diâmetro do átrio esquerdo (AE). WKY-C: ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: ratos espontaneamente hipertensos tratados com espironolactona; PC: peso corporal. #: $p < 0,05$ vs. WKY-C (ANOVA de uma via complementada com teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis de uma via complementado com teste de Dunn).

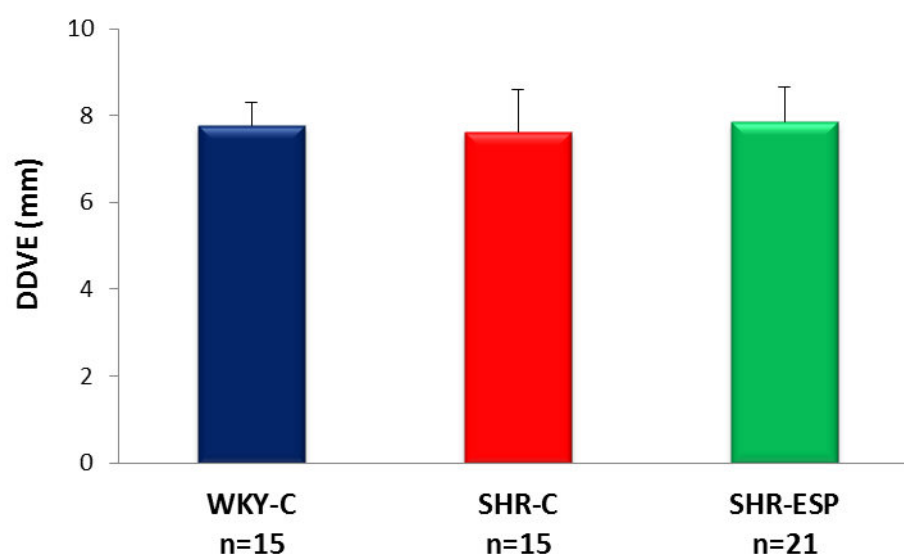


Figura 6: Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE). WKY-C: ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: ratos espontaneamente hipertensos tratados com espironolactona. ANOVA de uma via complementada com teste de Bonferroni.

Tabela 4. Avaliação da função sistólica do ventrículo esquerdo por ecocardiograma

Variáveis	WKY-C (n=15)	SHR-C (n=15)	SHR-ESP (n=21)
% enc. Endo	61,1 ± 7,98	57,4 ± 8,81	60,4 ± 10,12
% enc. Meso"	35,0 ± 4,10	29,2 ± 5,70 [#]	29,5 ± 4,99
VEPP (mm/s)	30,2 (26,7–34,1)	33,0 (31,1–37,1)	29,6 (28,5–32,2)

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. WKY-C: grupo de ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: grupo de ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: grupo de ratos espontaneamente hipertensos tratados com espironolactona; % enc. Endo: porcentagem de encurtamento endocárdico; % enc. Meso: porcentagem de encurtamento mesocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do VE. #: p<0,05 vs. WKY-C (ANOVA de uma via complementada com teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis de uma via complementado com teste de Dunn).

Tabela 5. Avaliação da função diastólica do ventrículo esquerdo por ecocardiograma

Variáveis	WKY-C (n=15)	SHR-C (n=15)	SHR-ESP (n=21)
Onda E (cm/s)	93,0 (84,5–95,5)	74,5 (56,0–84,0)	85,0 (70,0–98,7)
Onda A (cm/s)	46,0 (43,0–49,0)	63,5 (39,0–93,0)	64,5 (47,5–107)
E/A	2,06 (1,76–1'2,16)	0,81 (0,64–2,15)	1,27 (0,75–1,81)
TRIV (ms)	30,0 (27,0–33,0)	33,0 (30,0–35,0)	39,0 (34,0–45,0) [†]

Valores expressos em mediana e percentis 25% e 75%. WKY-C: grupo de ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: grupo de ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: grupo de ratos espontaneamente hipertensos tratados com espironolactona; E/A: razão entre picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico. †: $p < 0,05$ vs. SHR-C (Kruskal-Wallis de uma via complementado com teste de Dunn).

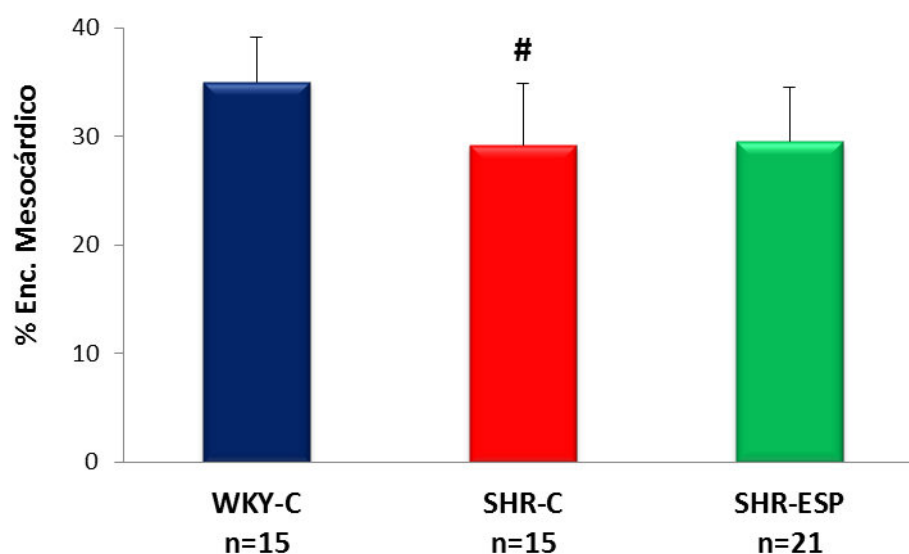


Figura 7: Porcentagem de encurtamento mesocárdico (% Enc. Mesocárdico) do ventrículo esquerdo. WKY-C: ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: ratos espontaneamente hipertensos tratados com espironolactona. #: $p < 0,05$ vs. WKY-C (ANOVA de uma via complementada com teste de Bonferroni).

Tabela 6. Variáveis funcionais obtidas em contrações isométricas na condição basal

Variáveis	WKY-C (n=11)	SHR-C (n=12)	SHR-ESP (n=19)
TD (g/mm ²)	4,85 ± 0,68	5,22±1,64	6,80±1,49 [†]
+dT/dt (g/mm ² /s)	44,7±6,82	46,9±17,4	61,0±17,4 [†]
-dT/dt (g/mm ² /s)	18,0 (16,0–19,0)	20,8 (18,4–25,1)	28,9 (24,2–34,6) [†]

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75%. WKY-C: grupo de ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: grupo de ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: grupo de ratos espontaneamente hipertensos tratados com espirolactona; TD: tensão desenvolvida; +dT/dt: velocidade máxima de elevação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de decréscimo da tensão desenvolvida. † p<0,05 vs. SHR-C (ANOVA de uma via complementada com teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis de uma via complementado com teste de Dunn).

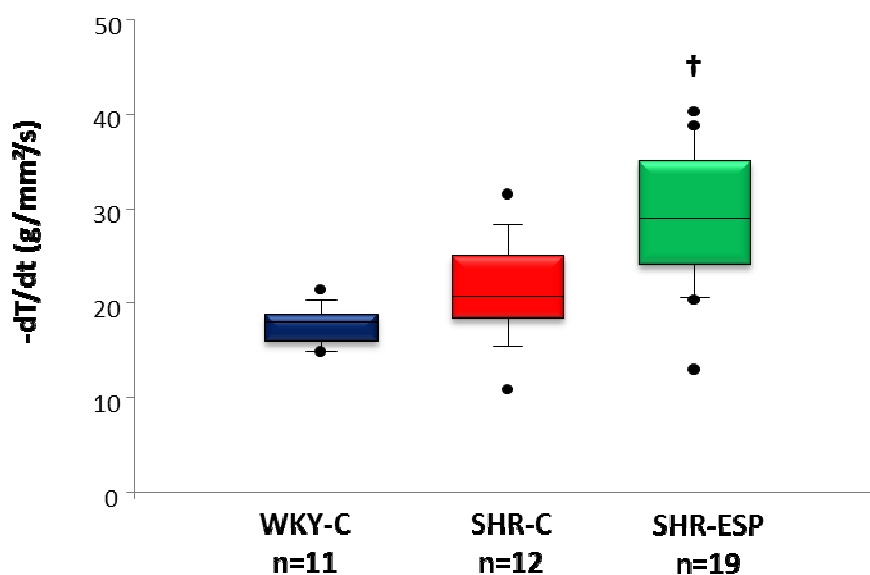


Figura 8: Velocidade máxima de decréscimo da tensão desenvolvida (-dT/dt) do músculo papilar do ventrículo esquerdo. WKY-C: ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: ratos espontaneamente hipertensos tratados com espirolactona. † p<0,05 vs. SHR-C (Kruskal-Wallis de uma via complementado com teste de Dunn).

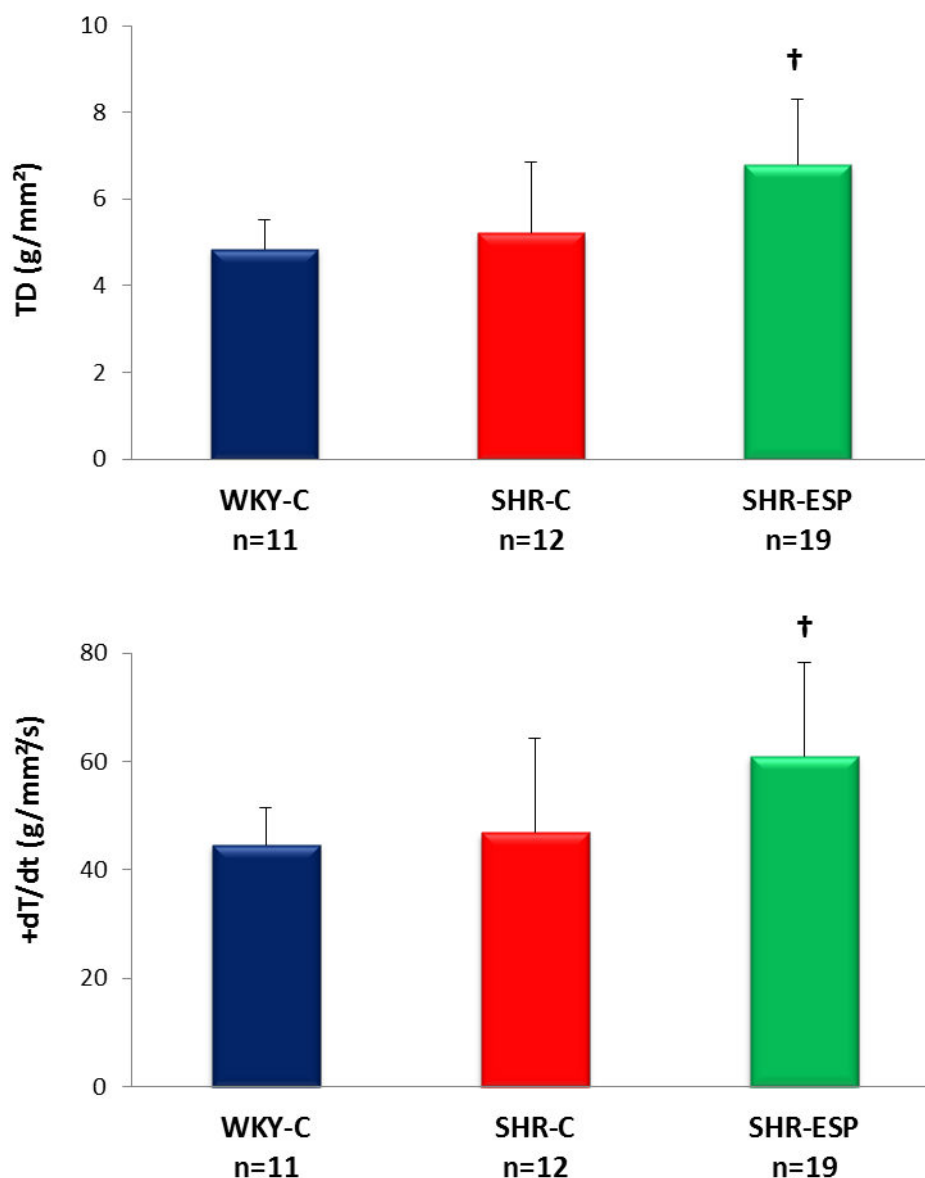


Figura 9: Função contrátil do músculo papilar do ventrículo esquerdo (TD: tensão desenvolvida; +dT/dt: velocidade máxima de elevação da tensão desenvolvida). WKY-C: ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: ratos espontaneamente hipertensos tratados com espironolactona. † p<0,05 vs. SHR-C (ANOVA de uma via complementada com teste de Bonferroni).

Tabela 7. Variáveis funcionais obtidas após manobras de pós- pausa

		PP 10s	PP 30s	PP 60s
TD (g/mm ²)	WKY-C	5,22±0,71	5,41±0,74	5,94±1,15
	SHR-C	5,64±1,68	5,84±1,69	5,83±1,73
	SHR-ESP	7,78±2,18 [†]	8,07±2,26 [†]	8,21±2,35 [†]
+dT/dt (g/mm ² /s)	WKY-C	47,6±7,20	49,9±7,37	53,0±8,31
	SHR-C	50,1±17,0	50,8±17,2	48,9±15,8
	SHR-ESP	66,0±19,1 [†]	68,9±20,7 [†]	69,0±21,1 [†]
-dT/dt (g/mm ² /s)	WKY-C	17,7±2,41	17,7±2,07	19,2±2,78
	SHR-C	22,2±5,07	21,5±4,64	21,0±4,70
	SHR-ESP	28,9±7,10 [†]	30,5±8,80 [†]	30,5±9,71 [†]

Valores expressos em média e desvio padrão. WKY-C: grupo de ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: grupo de ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: grupo de ratos espontaneamente hipertensos tratados com espirolactona; PP: contração após pausa de 10, 30 e 60 segundos; TD: tensão desenvolvida; +dT/dt: velocidade máxima de elevação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de decréscimo da tensão desenvolvida. † p<0,05 vs. SHR-C (ANOVA de uma via complementada com teste de Bonferroni).

Tabela 8. Variáveis funcionais obtidas após elevação da concentração de cálcio

		0,625 mM	1,25 mM	2,5 mM	5,0 mM
TD (g/mm ²)	WKY-C	3,74±0,76	4,77±0,72	4,93±0,64	4,65±0,58
	SHR-C	4,59±1,89	5,30±1,60	5,70±1,50	5,58±1,38
	SHR-ESP	6,02±1,93	7,10±2,21 [†]	7,79±2,20 [†]	7,54±2,12 [†]
+dT/dt (g/mm ² /s)	WKY-C	35,1±6,65	47,9±9,67	50,1±6,75	47,5±5,91
	SHR-C	40,4±18,6	47,9±16,5	53,1±15,4	52,7±14,7
	SHR-ESP	47,0±12,4	61,5±19,8	70,1±21,2 [†]	68,5±18,3 [†]
-dT/dt (g/mm ² /s)	WKY-C	16,5±3,47	19,6±2,49	20,1±2,53	18,7±2,77
	SHR-C	19,4±5,94	22,3±5,19	23,0±4,62	21,8±4,53
	SHR-ESP	26,1±6,36 [†]	30,6±8,03 [†]	32,8±9,66 [†]	29,3±7,41 [†]

Valores expressos em média e desvio padrão. WKY-C: grupo de ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: grupo de ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: grupo de ratos espontaneamente hipertensos tratados com espirolactona; TD: tensão desenvolvida; +dT/dt: velocidade máxima de elevação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de decréscimo da tensão desenvolvida. † p<0,05 vs. SHR-C (ANOVA de uma via complementada com teste de Bonferroni).

Tabela 9. Variáveis funcionais obtidas após adição de isoproterenol (ISO)

		Basal	ISO 10 ⁻⁸ M	ISO 10 ⁻⁷ M	ISO 10 ⁻⁶ M
TD (g/mm ²)	WKY-C	4,54±0,61	4,67±0,64	4,59±0,60	4,50±0,58
	SHR-C	5,34±1,53	5,12±1,55	4,69±1,41	4,51±1,33
	SHR-ESP	7,58±2,44 [†]	7,15±2,13 [†]	6,60±2,06 [†]	6,18±1,90 [†]
+dT/dt (g/mm ² /s)	WKY-C	45,0±5,81	48,4±6,59	50,5±6,85	53,4±7,61
	SHR-C	50,0±16,4	49,4±16,6	51,1±16,7	54,1±18,4
	SHR-ESP	64,7±19,5 [†]	66,3±20,8 [†]	67,0±20,7	67,1±20,7
-dT/dt (g/mm ² /s)	WKY-C	18,2±1,57	19,6±2,09	20,3±2,12	25,9±5,21
	SHR-C	23,0±5,81	22,6±5,51	27,7±8,57	35,7±11,7
	SHR-ESP	31,5±8,92 [†]	30,1±8,06 [†]	33,5±8,48	43,1±13,3

Valores expressos em média e desvio padrão. WKY-C: grupo de ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: grupo de ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: grupo de ratos espontaneamente hipertensos tratados com espironolactona; TD: tensão desenvolvida; +dT/dt: velocidade máxima de elevação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de decréscimo da tensão desenvolvida. † p<0,05 vs. SHR-C (ANOVA de uma via complementada com teste de Bonferroni).

Perfil Bioquímico

A determinação das concentrações séricas de sódio, potássio, magnésio e creatinina foram realizados através de *kits* específicos. Na Tabela 10 podemos observar que os valores não apresentaram diferença estatística.

Tabela 10. Análise bioquímica do soro dos animais

Variáveis	WKY-C (n=8)	SHR-C (n=8)	SHR-ESP (n=8)
Sódio (mmol/L)	152±3,58	155±4,55	155±1,96
Potássio (mmol/L)	5,94±0,23	5,93±0,46	6,13±0,46
Magnésio (mg/dL)	2,18±0,16	2,48±0,43	2,34±0,12
Creatinina (mg/dL)	0,55±0,01	0,61±0,08	0,60±0,06

Valores expressos em média e desvio padrão. WKY-C: grupo de ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: grupo de ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: grupo de ratos espontaneamente hipertensos tratados com espironolactona; ANOVA de uma via.

Características Morfológicas do Tecido Cardíaco

A Tabela 11 e as Figuras 10 e 11 apresentam os resultados dos parâmetros corporais e cardíacos dos animais, como pesos de VE, VD, átrios e os mesmos normalizados para PC e comprimento da tibia, e também as relações dos pesos úmido/seco de VE, VD, átrios, fígado e pulmão. Os animais do grupo SHR-ESP apresentaram menores valores das variáveis VD, VD/PC, VD/tibia, átrios, átrios/PC e átrios/tibia quando comparados ao grupo SHR-C. O grupo SHR-C apresentou maiores valores nas variáveis VE, VE/PC, VE/tibia, VD, VD/PC, VD/tibia, átrios, átrios/PC, átrios/tibia, átrios úmido/seco e pulmão úmido/seco quando comparados ao grupo WKY-C.

Tabela 11. Parâmetros corporais e cardíacos dos animais

Variáveis	WKY-C (n=15)	SHR-C (n=15)	SHR-ESP (n=21)
PC (g)	400±27	356±40 [#]	366±40
Tibia (cm)	4,09±0,07	4,25±0,09 [#]	4,29±0,08
VE (g)	0,76±0,04	1,22±0,18 [#]	1,18±0,15
VE/PC (g/kg)	1,92±0,09	3,42±0,35 [#]	3,26±0,34
VE/tibia (mg/cm)	187±10	286±41 [#]	274±37
VD (g)	0,25±0,04	0,31±0,08 [#]	0,24±0,03 [†]
VD/PC (g/kg)	0,58±0,16	0,82±0,33 [#]	0,65±0,08 [†]
VD/tibia (mg/cm)	60,5±8,99	73,1±19,4 [#]	54,9±6,36 [†]
Átrios (g)	0,09±0,01	0,15±0,05 [#]	0,12±0,02 [†]
Átrios/PC (g/kg)	0,20±0,06	0,41±0,16 [#]	0,33±0,05 [†]
Átrios/tibia (mg/cm)	21,0±15,0	36,2±11,0 [#]	26,9±4,38 [†]
VE úmido/seco	4,18±0,15	4,33±0,47	4,31±0,22
VD úmido/seco	4,38±0,09	4,54±0,41	4,46±0,10
Átrios úmido/seco	4,62±0,21	4,91±0,31 [#]	4,73±0,34
Pulmão úmido/seco	4,66±0,14	5,47±0,47 [#]	5,51±0,56
Fígado úmido/seco	3,30±0,10	3,25±0,54	3,02±0,28

Valores expressos em média e desvio padrão. WKY-C: grupo de ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: grupo de ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: grupo de ratos espontaneamente hipertensos tratados com espironolactona; PC: peso corporal; Tibia: comprimento da tibia; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito. #: p<0,05 vs. WKY-C; † p<0,05 vs. SHR-C (ANOVA de uma via complementada com teste de Bonferroni).

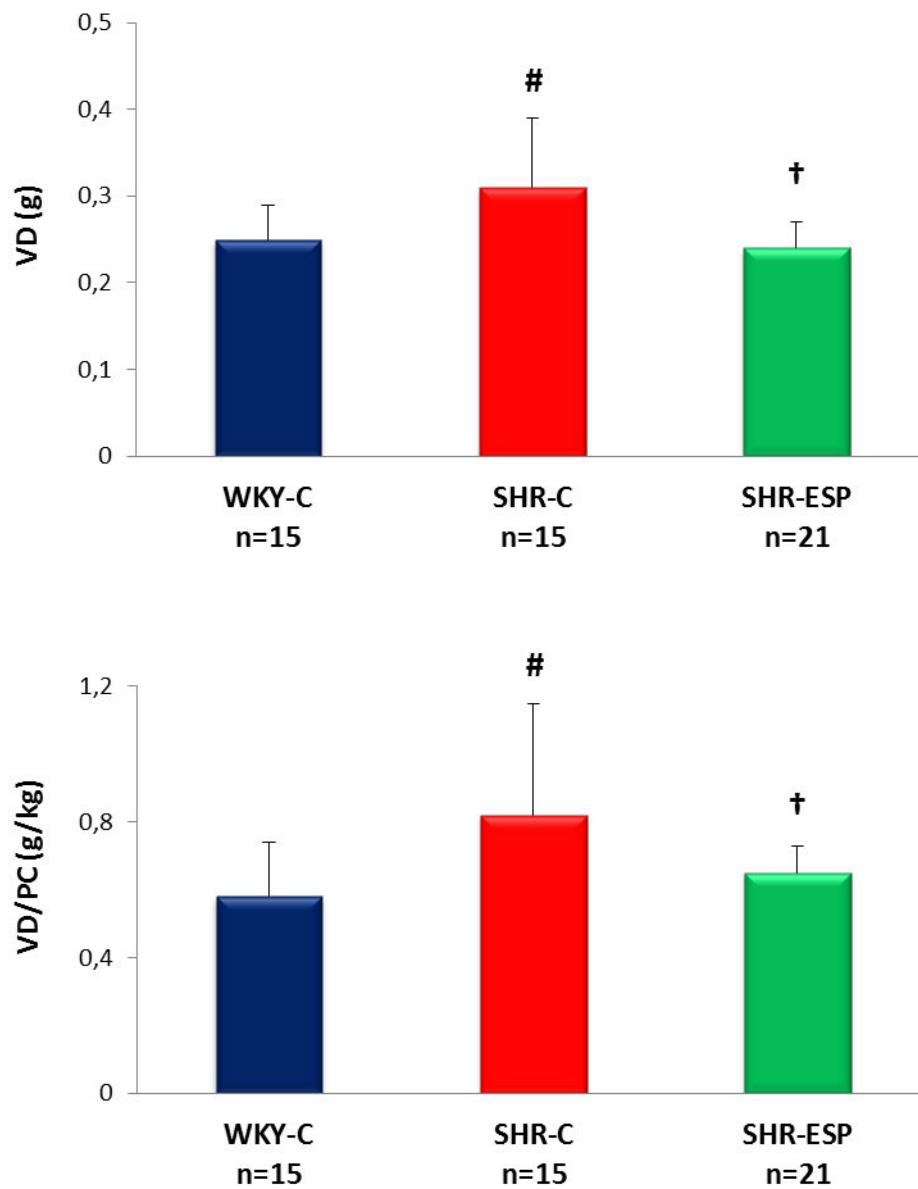


Figura 10: Peso do ventrículo direito (VD) *post mortem*. WKY-C: ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: ratos espontaneamente hipertensos tratados com espironolactona; PC: peso corporal. #: $p < 0,05$ vs. WKY-C; † $p < 0,05$ vs. SHR-C (ANOVA de uma via complementada com teste de Bonferroni).

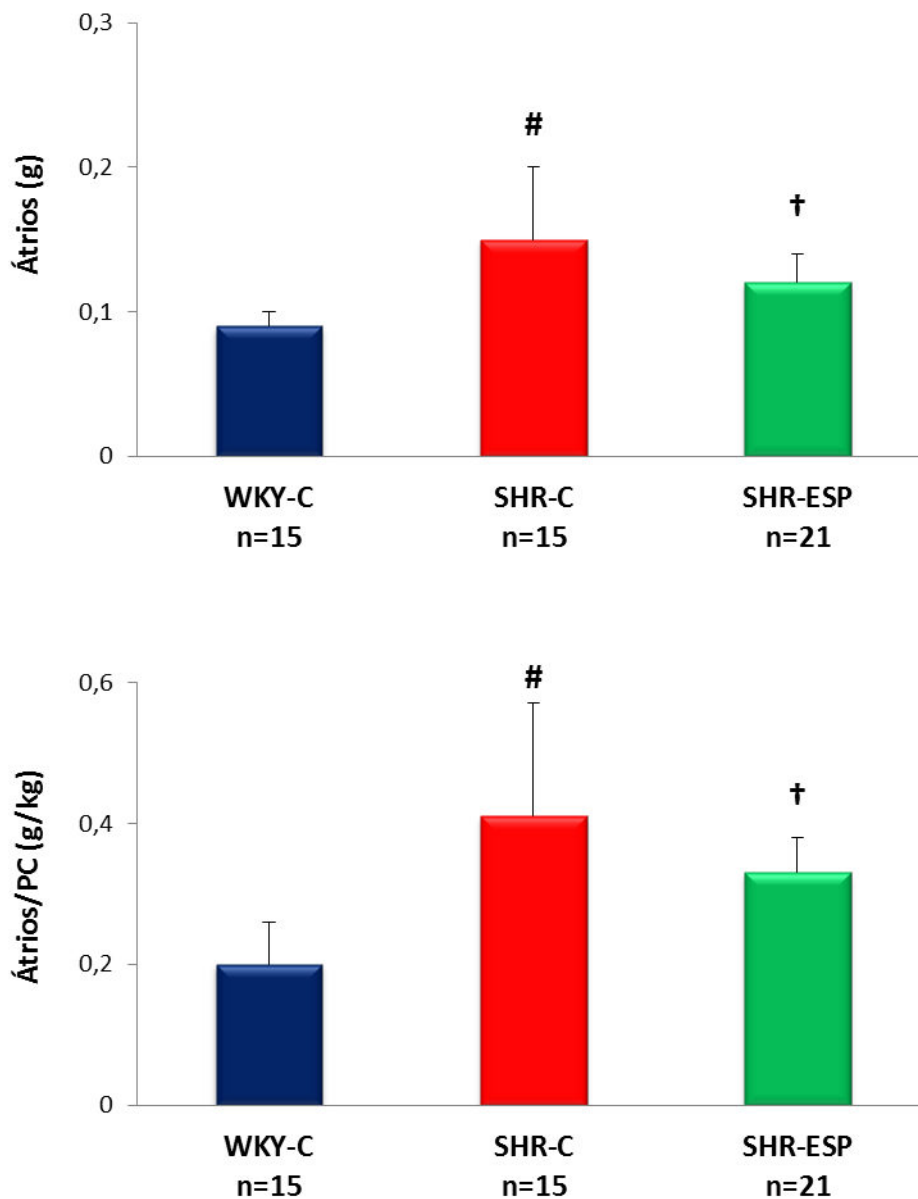


Figura 11: Peso dos átrios *post mortem*. WKY-C: ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: ratos espontaneamente hipertensos tratados com espironolactona; PC: peso corporal. #: $p < 0,05$ vs. WKY-C; † $p < 0,05$ vs. SHR-C (ANOVA de uma via complementada com teste de Bonferroni).

A Tabela 12 mostra os valores relativos à quantificação de hidroxiprolina, fração de colágeno intersticial miocárdico e área seccional transversa do cardiomiócito do VE. Os valores obtidos da quantificação de hidroxiprolina mostraram maior conteúdo no VE do grupo SHR-C vs. WKY-C, enquanto que a comparação entre os grupos SHR tratado e controle não foi diferente. A fração colágena miocárdica não foi diferente entre os grupos. A avaliação da área do miócito mostrou que os grupos SHR-ESP e WKY-C apresentam menor hipertrofia em relação ao grupo SHR-C (Figura 12).

Tabela 12. Avaliação bioquímica e morfométrica do miocárdio do ventrículo esquerdo

Variáveis	WKY-C	SHR-C	SHR-ESP
HOP VE (mg/g)	3,74±0,56	5,76±1,22 [#]	4,98±1,00
FCI (%)	3,80±0,89	4,47±3,08	4,28±2,45
AST (µm ²)	388±80	533±94 [#]	393±58 [†]

Valores expressos em média e desvio padrão. WKY-C: grupo de ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: grupo de ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: grupo de ratos espontaneamente hipertensos tratados com espirolactona; HOP: hidroxiprolina; VE: ventrículo esquerdo; FCI: fração de colágeno intersticial; AST: área seccional transversa do cardiomiócito. HOP VE (n=11); AST e FCI (n=6). #: p<0,05 vs. WKY-C; † p<0,05 vs. SHR-C (ANOVA de uma via complementada com teste de Bonferroni).

Análise da Expressão Gênica por RT-PCR

A Tabela 13 mostra os dados da avaliação da expressão gênica por RT-PCR em tempo real. A análise da expressão dos genes colágeno 1, colágeno 3 e lisil oxidase mostrou valores maiores no grupo SHR-C vs. WKY-C. A comparação entre os grupos SHR-ESP e SHR-C não apresentou diferença estatística.

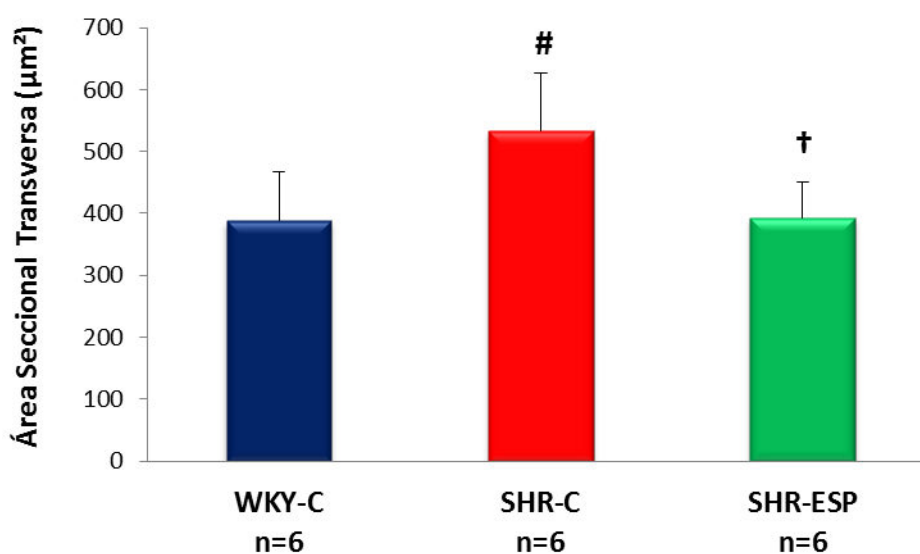


Figura 12: Área seccional transversa do cardiomiócito do ventrículo esquerdo. WKY-C: ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: ratos espontaneamente hipertensos tratados com espironolactona. #: $p < 0,05$ vs. WKY-C; † $p < 0,05$ vs. SHR-C (ANOVA de uma via complementada com teste de Bonferroni).

Tabela 13. Avaliação da expressão gênica por RT-PCR em tempo real

Variáveis	WKY-C (n=7)	SHR-C (n=8)	SHR-ESP (n=7)
Colágeno 1	0,28±0,09	0,80±0,26 [#]	0,61±0,26
Colágeno 3	0,24 (0,19–0,27)	0,76 (0,51–0,92) [#]	0,62 (0,39–0,72)
Lisil oxidase	0,47±0,11	0,98±0,39 [#]	0,71±0,31

Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana e percentis 25% e 75% (unidade arbitrária). WKY-C: grupo de ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: grupo de ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: grupo de ratos espontaneamente hipertensos tratados com espironolactona; #: $p < 0,05$ vs. WKY-C (ANOVA de uma via complementada com teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis de uma via complementado com teste de Dunn). Valores normalizados pela expressão da ciclofilina.

Análise da Expressão Proteica por Western Blotting

A Tabela 14 mostra os dados da avaliação da expressão proteica por Western blotting. A análise da expressão das proteínas colágeno 1, colágeno 3 e

lisil oxidase mostrou que houve menor expressão de colágeno 3 no grupo SHR-C quando comparado ao WKY-C. A comparação entre os grupos SHR-ESP e SHR-C não foi estatisticamente diferente.

Tabela 14. Avaliação da expressão proteica por Western Blotting

Variáveis	WKY-C (n=8)	SHR-C (n=8)	SHR-ESP (n=8)
Colágeno 1	0,71±0,21	1,00±0,48	0,63±0,20
Colágeno 3	1,69±0,46	1,00±0,28 [#]	1,02±0,40
Lisil oxidase	1,05±0,59	1,00±0,18	0,74±0,28

Valores expressos em média e desvio padrão (unidade arbitrária). WKY-C: grupo de ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: grupo de ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: grupo de ratos espontaneamente hipertensos tratados com espirolactona; #: p<0,05 vs. WKY-C (ANOVA de uma via complementada com teste de Bonferroni). Valores normalizados pela expressão do GAPDH.

Análise do Colágeno Total e Solúvel

A Tabela 15 e as Figuras 13 e 14 mostram os dados da análise colorimétrica do colágeno total e solúvel. A análise mostrou que houve menor concentração de colágeno total no grupo tratado com espirolactona. A comparação entre os grupos SHR-C vs. WKY-C mostrou maior conteúdo de colágeno total no grupo SHR-C.

Tabela 15. Avaliação do colágeno total e solúvel

Variáveis	WKY-C (n=9)	SHR-C (n=8)	SHR-ESP (n=10)
Colágeno Total	1,06±0,34	1,85±0,63 [#]	1,28±0,39 [†]
Colágeno Solúvel	1,59±0,16	1,51±0,15	1,61±0,19

Valores expressos em média e desvio padrão (unidade: µg/mg tecido úmido). WKY-C: grupo de ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: grupo de ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: grupo de ratos espontaneamente hipertensos tratados com espirolactona; #: p<0,05 vs. WKY-C; † p<0,05 vs. SHR-C (ANOVA de uma via complementada com teste de Bonferroni).

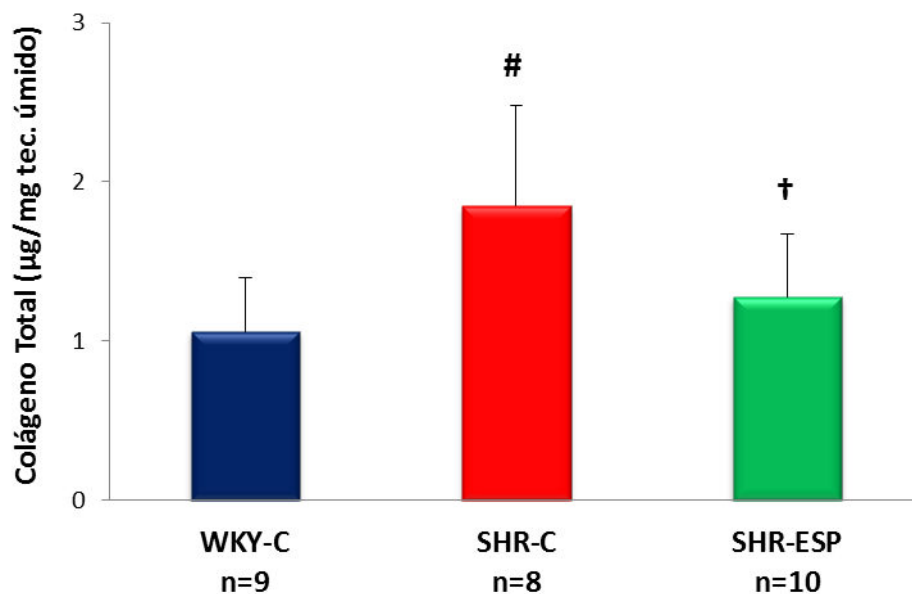


Figura 13: Colágeno total do ventrículo esquerdo. WKY-C: ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: ratos espontaneamente hipertensos tratados com espironolactona. #: $p < 0,05$ vs. WKY-C; † $p < 0,05$ vs. SHR-C (ANOVA de uma via complementada com teste de Bonferroni).

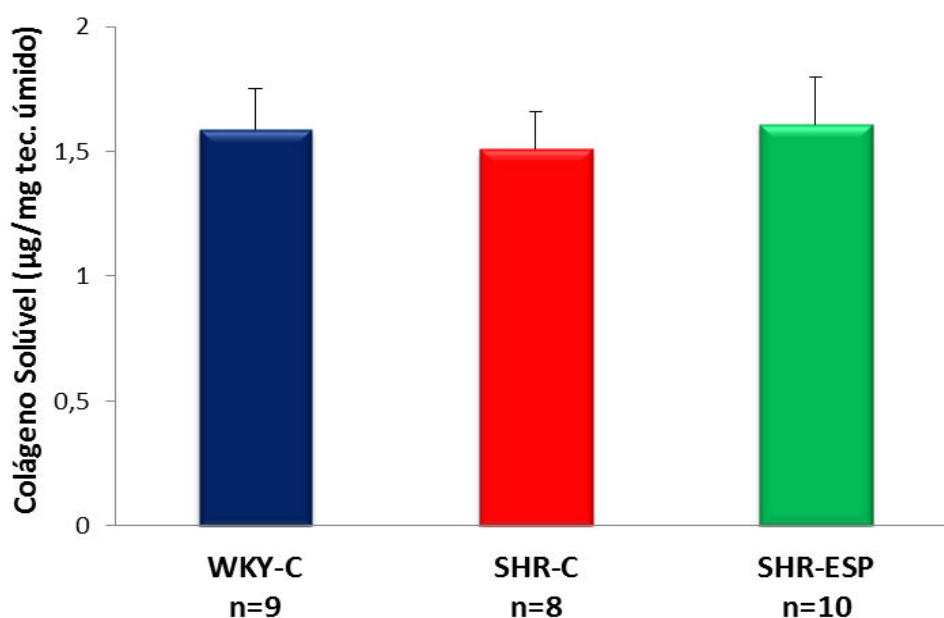


Figura 14: Colágeno solúvel do ventrículo esquerdo. WKY-C: ratos Wistar-Kyoto controle; SHR-C: ratos espontaneamente hipertensos controle; SHR-ESP: ratos espontaneamente hipertensos tratados com espironolactona (ANOVA de uma via).

DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos os efeitos do bloqueio precoce da aldosterona na estrutura e função cardíaca e na composição da matriz colágena miocárdica de ratos espontaneamente hipertensos.

Estudo prévio do nosso grupo mostrou que o tratamento de ratos espontaneamente hipertensos com bloqueador de aldosterona iniciado aos 16 meses de idade, por seis meses, não alterou a estrutura e função cardíaca; no entanto, reduziu significativamente a mortalidade do grupo tratado (Cezar, 2010). Assim, no presente estudo optamos por iniciar o tratamento com espironolactona a partir dos 13 meses de idade, e mantê-lo pelo mesmo período de tempo. Os animais SHR entram em descompensação cardíaca entre 18 e 22 meses de idade, portanto, com 13 meses de idade, nenhum animal do nosso estudo apresentou qualquer sinal que pudesse sugerir a presença de IC. Os ecocardiogramas realizados antes do início do tratamento tiveram como objetivo determinar a homogeneidade dos grupos quanto à estrutura e função cardíaca. Adicionalmente, avaliamos os animais semanalmente à procura de evidência de IC e determinamos a mortalidade durante todo o período experimental.

O rato SHR apresenta hipertrofia cardíaca compensada durante 50% da sua expectativa de vida, e próximo aos 18 meses de idade desenvolve sinais de IC. Nessa idade, todos os animais com taquipneia e/ou respiração laboriosa apresentam um ou mais sinais clínicos de IC, como efusão pleural, trombo no átrio esquerdo, hipertrofia do VD (Boluyt & Bing, 2000; Bing *et al.*, 2002). Neste estudo, o grupo tratado com espironolactona apresentou maior porcentagem de animais sem IC, mostrando efeito benéfico do bloqueio precoce da aldosterona.

Os resultados apresentados mostram que a mortalidade do grupo SHR-C foi maior quando comparado ao WKY-C. O grupo SHR-ESP apresentou taxa de mortalidade intermediária entre os outros dois grupos. Assim, a espironolactona atenuou a taxa de mortalidade nos animais SHR.

A avaliação do peso corporal dos animais SHR, ao final do período experimental, mostrou que a adição da droga à ração não alterou o seu consumo, uma vez que ambos os grupos apresentaram pesos corporais semelhantes, enquanto o grupo WKY-C apresentou um PC final maior. No entanto, houve diminuição do peso final nos animais dos grupos SHR em relação ao peso inicial

dentro do mesmo grupo, provavelmente porque grande parte dos animais entra na fase de desenvolvimento de IC no período correspondente ao final do experimento (Bing *et al.*, 1995; Boluyt & Bing, 2000; Okoshi *et al.*, 2001). A diminuição do peso corporal acompanha o processo de insuficiência cardíaca, sendo um importante preditor de mortalidade (Anker *et al.*, 1997). Em nosso estudo, a diminuição do PC é compatível com o desenvolvimento de IC.

O tratamento com espironolactona não alterou a pressão arterial, concordando com estudos que utilizaram a mesma concentração do fármaco na ração e não obtiveram alteração da pressão arterial (Kambara *et al.*, 2003; Veliotis *et al.*, 2010, Baldo *et al.*, 2011). Como a pressão arterial não foi alterada pelo tratamento, foi possível excluir a influência dos efeitos hemodinâmicos no processo de remodelação cardíaca e mortalidade. Conforme o esperado, o grupo WKY-C apresentou pressão arterial menor que os animais SHR.

Por meio do ecocardiograma foram analisadas variáveis estruturais do coração e parâmetros de função sistólica e diastólica. Após o período de 6 meses de tratamento, não foi possível observar diferenças entre os grupos SHR, exceto o TRIV que se prolongou no grupo tratado com espironolactona. As diferenças observadas entre os grupos SHR-C e WKY-C devem-se a remodelação cardíaca decorrente da hipertensão arterial sistêmica. Esses resultados estão em acordo com o estudo de Kambara (2003). Os autores avaliaram o efeito da mesma dose de espironolactona utilizada em nosso estudo, em ratos SHR com IC, por período de 12 semanas, e não observaram alterações ecocardiográficas em relação aos controles. Nos importantes ensaios clínicos RALES e EPHEBUS que utilizaram bloqueadores da aldosterona no tratamento da IC e que contribuíram para modificar o tratamento de pacientes com IC, a avaliação estrutural e funcional do coração não fez parte do estudo (Pitt *et al.*, 1999; Pitt *et al.*, 2003).

O estudo da função miocárdica ajuda a identificar os componentes que contribuem para a disfunção cardíaca e IC (Bing *et al.*, 2002). Sabe-se que a ativação dos receptores de aldosterona promovem alterações que podem reduzir a contratilidade miocárdica e comprometer a função diastólica, como a combinação de fibrose cardíaca e morte celular (Delcayre & Swynghendauw, 2002; Opie *et al.*, 2006; Veliotis *et al.*, 2010). Em nosso estudo, a análise do

músculo papilar mostrou melhor desempenho contrátil e relaxamento miocárdico no grupo tratado com espironolactona. Após a realização das três manobras inotrópicas, contração pós-pausa, aumento da concentração extracelular de cálcio e adição de isoproterenol à solução nutriente, os grupos experimentais mantiveram comportamento semelhante à condição basal. A avaliação *in vitro* mostrou que o tratamento precoce com espironolactona melhora a função contrátil e o relaxamento no miocárdio de ratos SHR.

Os parâmetros anatômicos do coração analisados mostraram menores valores nas variáveis do VD e átrios no grupo tratado. O grupo SHR-C apresentou maiores valores nas variáveis do VE, VD, átrios e pulmão úmido/seco quando comparados ao grupo WKY-C. Esses achados nos permitem afirmar que a espironolactona reduziu o grau de hipertrofia do ventrículo direito e átrios concordando com estudos realizados em ratos tratados com espironolactona (Tsybouleva *et al.*, 2004; Resende *et al.*, 2006; Zendaoui *et al.*, 2012).

Sabe-se que o aumento da ativação de aldosterona, independente da elevação da pressão arterial, pode estimular o remodelamento cardíaco e a progressão da IC (Takeda *et al.*, 2000; Burla *et al.*, 2007). A hipertrofia cardíaca representa uma característica importante no aparecimento dos sinais de IC, e há dados que sugerem ser um evento que precede o aumento da pressão arterial (Funck *et al.*, 1995; Delcayre & Swynghendauw, 2002). Em nossa avaliação histológica do tecido miocárdico corado por hematoxilina e eosina, o grupo tratado com espironolactona apresentou menor área seccional do cardiomiócito. Este achado está de acordo com estudo que mostra que a aldosterona estimula a hipertrofia miocitária em cultura de cardiomiócitos de ratos recém-nascidos (Okoshi *et al.*, 2004b). Outro estudo em ratos SHR com elevada susceptibilidade ao acidente vascular encefálico indicou que a aldosterona circulante tem maior efeito na hipertrofia cardíaca, enquanto a aldosterona cardíaca contribui mais no processo de fibrose miocárdica (Takeda *et al.*, 2000). O estudo de Veliotis *et al.* (2010) com SHR fornece evidências diretas que o mecanismo fundamental responsável pela transição da hipertrofia compensada do VE para disfunção e dilatação cardíaca depende do estímulo dos receptores de aldosterona. Em nosso estudo, o achado de menor área seccional do miócito no grupo SHR-ESP, concorda

com os achados anatômicos *post-mortem* de menor grau de hipertrofia nos animais tratados com espironolactona, mostrando que o bloqueio da aldosterona favoreceu a reversão da hipertrofia miocárdica.

Os miócitos cardíacos e os fibroblastos cardíacos são os dois principais tipos de célula no miocárdio. Geralmente, os miócitos cardíacos representam 50% e os fibroblastos cardíacos em torno de 40 a 60% do total de células do coração, embora essa proporção possa variar entre as diferentes espécies. O elemento chave para o desenvolvimento da fibrose miocárdica é o fibroblasto cardíaco que é responsável pela secreção da maioria dos componentes da matriz extracelular no coração, tais como os colágenos dos tipos I e III no coração (Brilla, 2000; Mann *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012). A síntese do tecido fibroso perivascular está associada com a elevação crônica dos hormônios efetores do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Takeda *et al.*, 2000). Fibrose miocárdica é caracterizada pelo aumento da concentração de colágeno e representa o principal fator prognóstico do remodelamento cardíaco, sendo responsável pelo aumento da rigidez miocárdica e heterogeneidade elétrica causando arritmias e disfunção diastólica, ambos contribuindo para a disfunção sistólica (Cittadini *et al.*, 2002). No nosso estudo, observamos redução da concentração de colágeno total no miocárdio ventricular no grupo tratado com espironolactona, mostrando o papel do bloqueador da aldosterona na redução da fibrose miocárdica. Este comportamento de redução do colágeno miocárdico após bloqueio da aldosterona já foi demonstrado por vários autores (MacFadyen *et al.*, 1997; Zannad *et al.*, 2000; Macdonald *et al.*, 2004; Mann *et al.*, 2008; Veliotes *et al.*, 2010). A diminuição da concentração do colágeno total no grupo SHR-ESP está de acordo com as alterações funcionais observadas no estudo do músculo isolado. Por outro lado, as avaliações de colágeno pelas técnicas de hidroxiprolina, por lâminas coradas por *picrosirius red* e colágeno solúvel não apresentaram diferença entre os grupos SHR.

As análises da expressão gênica e proteica de colágeno I e III e lisil oxidase por RT-PCR e Western blotting, respectivamente, não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos SHR. A análise da expressão gênica de colágeno 1, colágeno 3 e lisil oxidase mostrou valores

maiores no grupo SHR-C quando comparado ao WKY-C. Enquanto a análise pela técnica de Western blot mostrou que houve menor expressão de colágeno 3 no grupo SHR-C quando comparado ao WKY-C.

Vários estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que a rigidez do VE é afetada por alterações na quantidade e qualidade do colágeno miocárdico, ou seja, dependente da proporção relativa dos tipos de colágeno, diâmetro das fibras colágenas, seu alinhamento espacial e do grau de “cross-linking”. Portanto, o tecido contendo predominantemente colágeno do tipo I, fibras colágenas de grande diâmetro, e/ou elevado grau de “cross-linking” será mais rígido que o tecido composto por maiores concentrações de fibras do tipo III, fibras colágenas de pequeno diâmetro, e essencialmente sem “cross-linking” (Brower *et al.*, 2006; López *et al.*, 2009; López *et al.*, 2010). Lisil oxidase (LOX) é sintetizada como uma pró-enzima, que após modificações pós-translacionais no retículo endoplasmático e aparelho de Golgi é secretada para o espaço extracelular, onde é processado para formar a enzima ativa. Portanto, LOX pode ser regulada em três níveis: síntese do precursor LOX por fibroblastos e miofibroblastos, conversão extracelular do precursor para a enzima ativa e estimulação direta da atividade enzimática. Desempenha papel fundamental no “cross-linking” das fibras colágenas, resultando na deposição de fibras insolúveis de colágeno (López *et al.*, 2009; López *et al.*, 2010).

CONCLUSÃO

A introdução de espironolactona em ratos hipertensos não controlados, antes do surgimento de sinais clínicos de insuficiência cardíaca, reduz a hipertrofia e o colágeno miocárdico, melhora a função contrátil e o relaxamento miocárdico e atenua a taxa de mortalidade.

Perspectivas

Esses resultados sugerem que o bloqueador de aldosterona pode ser útil também no tratamento de pacientes hipertensos que ainda não apresentam sinais ou sintomas de insuficiência cardíaca.

REFERÊNCIAS

Ahmet I, Wan R, Mattson MP, Lakatta EG, Talan M. Cardioprotection by intermittent fasting in rats. *Circulation* 2005;112:3115-21.

Anker SD, Ponikowski P, Varney S, Chua TP, Clark AL, Webb-Peploe KM, *et al.* Wasting as independent risk factor of mortality in chronic heart failure. *Lancet* 1997;349:1050-3.

Baldo MP, Forechi L, Morra EA, Zaniqueli D, Machado RC, Lunz W, *et al.* Long-term use of low-dose spironolactone in spontaneously hypertensive rats: effects on the left ventricular hypertrophy and stiffness. *Pharmacol Rep* 2011;63:975-82.

Bing OH, Brooks WW, Robinson KG, Slawsky MT, Hayes JA, Litwin SE, *et al.* The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:383-96.

Bing OH, Conrad CH, Boluyt MO, Robinson KG, Brooks WW. Studies of prevention, treatment and mechanisms of heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat. *Heart Fail Rev* 2002;7:71-88.

Bocchi EA, Marcondes-Braga FG, Bacal F, Ferraz AS, Albuquerque D, Rodrigues D, *et al.* Sociedade Brasileira de Cardiologia. Atualização da Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica - 2012. *Arq Bras Cardiol* 2012;98 supl 1:1-33.

Boluyt MO, Bing OH. Matrix gene expression and decompensated heart failure: the aged SHR model. *Cardiovasc Res* 2000;46:239-49.

Boluyt MO, O'Neill L, Meredith AL, Bing OHL, Brooks WW, Conrad CH, *et al.* Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. *Circ Res* 1994;75:23-32.

Boluyt MO, Robinson KG, Meredith AL, Sen S, Lakatta EG, Crow MT, *et al.* Heart failure after long-term supra-aortic constriction in rats. *Am J Hypertens* 2005;18:202-12.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.

Bregagnollo EA, Okoshi K, Bregagnollo IF, Padovani CR, Okoshi MP, Cicogna AC. Efeitos da inibição prolongada da enzima de conversão da angiotensina sobre as características morfológicas e funcionais da hipertrofia ventricular esquerda em ratos com sobrecarga pressórica persistente. *Arq Bras Cardiol* 2005;84:225-32.

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

Brilla CG. Aldosterone and myocardial fibrosis in heart failure. *Herz* 2000;25:299-306.

Bristow MR, Linas S, Port JD. Drugs in the treatment of heart failure. In: Zipe DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E, eds. *Braunwald's heart disease. A textbook of cardiovascular medicine*. 7th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier 2005:569-601.

Brooks WW, Bing OHL, Robinson KG, Slawsky MT, Chaletsky DM, Conrad CH. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on myocardial fibrosis and function in hypertrophied and failing myocardium from the spontaneously hypertensive rat. *Circulation* 1997;96:4002-10.

Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, Voloshenyuk T, Levick SP, *et al.* The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006;30:604-10.

Burla AK, Neves MF, Oigman W, Mandarim-de-Lacerda CA. Eplerenone offsets cardiac and aortic adverse remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Int J Cardiol* 2007;114:64-70.

Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GER, Lopes FS, Sugisaki MM, Nogueira CR, *et al.* Heart failure alters MyoD and MRF4 expressions in rat skeletal muscle. *Int J Exp Pathol* 2006;87:219-25.

Cezar MDM. Efeito do bloqueio da aldosterona na remodelação cardíaca de ratos espontaneamente hipertensos. [Dissertação de Mestrado]. Botucatu - SP: Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp; 2010.

Cittadini A, Casaburi C, Monti MG, Di Gianni A, Serpico R, Scherillo G, *et al.* Effects of canrenone on myocardial reactive fibrosis in a rat model of postinfarction heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002;16:195-201.

Chan AKY, Sanderson JE, Wang T, Lam W, Yip G, Wang M, *et al.* Aldosterone receptor antagonism induces reverse remodeling when added to angiotensin receptor blockade in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:591-6.

Cicogna AC, Padovani CR, Georgette JC, Aragon FF, Okoshi MP. Effects of protein-calorie restriction on mechanical function of hypertrophied cardiac muscle. *Arq Bras Cardiol* 1999;72:436-40.

Cicogna AC, Padovani CR, Okoshi K, Aragon FF, Okoshi MP. Myocardial function during chronic food restriction in isolated hypertrophied cardiac muscle. *Am J Med Sci* 2000;320:244-8.

Cicogna AC, Robinson KG, Conrad CH, Squire R, Okoshi MP, Bing OH. Role of myocardial contractile status and relaxation in ventricular dysfunction during the transition of the heart hypertrophy to failure. *Arq Bras Cardiol* 1997;69:381-4.

Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling - concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:569-82.

Conrad CH, Brooks WW, Hayes JA, Sen S, Robinson KG, Bing OHL. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation* 1995;91:161-70.

Delcayre C, Swynghendauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. The role of aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:1577-84.

Epifanio HB, Zornoff LA, Matsubara BB, de Paiva SA, Inoue RM, Matsubara LS. Myocardial remodeling after experimental acute myocardial infarction in rats. Effect of renin-angiotensin-aldosterone blockade. *Arq Bras Cardiol* 2005;84:10-4.

Fan D, Takawale A, Lee J, Kassiri Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2012;5:5-15.

Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* 2004;109:1580-9.

Funck RC, Wilke A, Rupp H, Maisch B, Brilla CG. Cardiac structure-function relationship and the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertensive heart disease. *Herz* 1995;20:330-9.

Gonçalves G, Zornoff AML, Ribeiro HB, Okoshi MP, Cordaro FRS, Okoshi K, *et al.* O bloqueio do sistema renina-angiotensina atenua a remodelação cardíaca de ratos submetidos à estenose aórtica. *Arq Bras Cardiol* 2005;84:304-8.

Gut AL, Sugizaki MM, Okoshi MP, Carvalho RF, Pai-Silva MD, Aragon FF, *et al.* Food restriction impairs myocardial inotropic response to calcium and beta-adrenergic stimulation in spontaneously hypertensive rats. *Nutr Res* 2008;28:722-7.

Hayashi M, Tsutamoto T, Wada A, Tsutsui T, Ishii C, Ohno K, *et al.* Immediate administration of mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone prevents post-infarct left ventricular remodeling associated with suppression of a marker of myocardial collagen synthesis in patients with first anterior acute myocardial infarction. *Circulation* 2003;107:2559-65.

Jessup M, Abraham WT, Casey DE, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, *et al.* ACCF/AHA guidelines for the diagnosis and management of heart failure in adults. A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 2009;119:1977-2016.

Kalidindi SR, Tang WH, Francis GS. Drug insight: aldosterone-receptor antagonists in heart failure - the journey continues. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007;4:368-78.

Kambara A, Holycross BJ, Wung P, Schanbacher B, Ghosh S, McCune SA, *et al.* Combined effects of low-dose oral spironolactone and captopril therapy in a rat model of spontaneous hypertension and heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;41:830-7.

Kobayashi N, Yoshida K, Nakano S, Ohno T, Honda T, Tsubokou Y, *et al.* Cardioprotective mechanisms of eplerenone on cardiac performance and remodeling in failing rat hearts. *Hypertension* 2006;47:671-9.

Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell BH, Aurigemma GP, Douglas PS. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation* 1995;91:2642-54.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001; 25:402-8.

López B, González A, Hermida N, Valencia F, de Teresa E, Díez J. Role of lysyl oxidase in myocardial fibrosis: from basic science to clinical aspects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;299:H1-9.

López B, Querejeta R, González A, Beaumont J, Larman M, Díez J. Impact of treatment on myocardial lysyl oxidase expression and collagen cross-linking in patients with heart failure. *Hypertension* 2009;53:236-42.

Mann DL. Pathophysiology of heart failure. In: Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Braunwald E, eds. *Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 9th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008:541-60.

Mano A, Tatsumi T, Shiraishi J, Keira N, Nomura T, Takeda M, *et al.* Aldosterone directly induces myocyte apoptosis through calcineurin-dependent pathways. *Circulation* 2004;110:317-23.

Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Carvalho RF, Oliveira Jr SA, Lima ARR, Campos DHS, Damatto RL, Nogueira CR, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Chronic heart

failure-induced skeletal muscle atrophy, necrosis, and myogenic regulatory factors changes. *Med Sci Monit* 2010;16:374-83.

Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H1534-9.

McCrossan ZA, Billeter R, White E. Transmural changes in size, contractile and electrical properties of SHR left ventricular myocytes during compensated hypertrophy. *Cardiovasc Res* 2004;63:283-92.

Macdonald JE, Kennedy N, Struthers AD. Effects of spironolactone on endothelial function, vascular angiotensin converting enzyme activity, and other prognostic markers in patients with mild heart failure already taking optimal treatment. *Heart* 2004;90:765-70.

MacFadyen RJ, Barr CS, Struthers AD. Aldosterone blockade reduces vascular collagen turnover, improves heart rate variability and reduces early morning rise in heart rate in heart failure patients. *Cardiovasc Res* 1997;35:30-4.

Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963;27:282-93.

Okoshi K, Nakayama M, Yan X, Okoshi MP, Schuldt AJT, Marchionni MA, *et al.* Neuregulins regulate cardiac parasympathetic activity: muscarinic modulation of beta-adrenergic activity in myocytes from mice with neuregulin-1 gene deletion. *Circulation* 2004a;110:713-7.

Okoshi MP, Okoshi K, Dal Pai V, Dal Pai-Silva M, Matsubara LS, Cicogna AC. Mechanical, biochemical, and morphological changes in the heart from chronic food restricted rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2001;79:754-60.

Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara LS, Dal Pai-Silva M, Gut AL, Padovani CR, *et al.* Myocardial remodeling and dysfunction are induced by chronic food restriction in spontaneously rats. *Nutr Res* 2006;26:567-72.

Okoshi MP, Yan X, Okoshi K, Nakayama M, Schuldt AJT, O'Connell TD, *et al.* Aldosterone directly stimulates cardiac myocyte hypertrophy. *J Card Fail* 2004b;10:511-8.

Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet* 2006;367:356-67.

Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara LS, Matsubara BB, *et al.* Ventricular remodeling induced by retinoic acid supplementation in adult rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H2242-6.

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fishbein MC, Frohlich ED. Cardiac function and morphology with aging in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol* 1979;237:H461-8.

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Frohlich ED. Validity of an indirect tail-cuff method for determining systolic arterial pressure in unanesthetized normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Lab Clin Med* 1971;78:957-62.

Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, *et al.* Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003;348:1309-21.

Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, *et al.* The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study (RALES) investigators. *N Engl J Med* 1999;341:709-17.

Prockop DJ, Udenfriend S. A specific method for the analysis of hydroxyproline in tissues and urine. *Anal Biochem* 1960;1:228-39.

Resende MM, Kriegel AJ, Greene AS. Combined effects of low-dose spironolactone and captopril therapy in a rat model of genetic hypertrophic cardiomyopathy. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;48:265-73.

Sbh.org.br [homepage on the Internet]. Sociedade Brasileira de Hipertensão. Disponível em: <http://www.sbh.org.br>. Acessado em 28/08/2012.

Simone G, Devereux RB, Camargo MJ, Volpe M, Wallerson DC, Atlas SA, *et al.* In vivo left ventricular anatomy in rats with two-kidney, one clip and one-kidney, one clip renovascular hypertension. *J Hypertens* 1992;10:725-32.

Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 2002;90:520-30.

Struthers AD, MacDonald TM. Review of aldosterone- and angiotensin II-induced target organ damage and prevention. *Cardiovasc Res* 2004;61:663-70.

Suzuki G, Morita H, Mishima T, Sharov VG, Todor A, Tanhehco EJ, *et al.* Effects of long-term monotherapy with eplerenone, a novel aldosterone blocker, on progression of left ventricular dysfunction and remodeling in dogs with heart failure. *Circulation* 2002;106:2967-72.

Switzer BR. Determination of hydroxyproline in tissue. *J Nutr Biochem* 1991;2:229-321.

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

Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circ Res* 1981;48:309-19.

Tsybouleva N, Zhang L, Chen S, Patel R, Lutucuta S, Nemoto S, *et al.* Aldosterone, through novel signaling proteins, is a fundamental molecular bridge between the genetic defect and the cardiac phenotype of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2004;109:1284-91.

Veliotes DG, Norton GR, Correia RJ, Strijdom H, Badenhorst D, Brooksbank R, *et al.* Impact of aldosterone receptor blockade on the deleterious cardiac effects of adrenergic activation in hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010;56:203-11.

Wahed MI, Watanabe K, Ma M, Yamaguchi K, Takahashi T, Tachikawa H, *et al.* Effects of eplerenone, a selective aldosterone blocker, on the progression of left

ventricular dysfunction and remodeling in rats with dilated cardiomyopathy. *Pharmacology* 2005;73:81-8.

Weinberg EO, Lee MA, Weigner M, Lindpaintner K, Bishop SP, Benedict CR, *et al.* Angiotensin AT1 receptor inhibition. Effects on hypertrophic remodeling and ACE expression in rats with pressure-overload hypertrophy due to ascending aortic stenosis. *Circulation* 1997;95:1592-600.

Weinberg EO, Schoen FJ, George D, Kagaya Y, Douglas PS, Litwin SE, *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibition prolongs survival and modifies the transition to heart failure in rats with pressure overload hypertrophy due to ascending aortic stenosis. *Circulation* 1994;90:1410-22.

Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A, Pitt B. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). Rales Investigators. *Circulation* 2000;102:2700-6.

Zannad F, McMurray JV, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, Shi H, *et al.* Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. EMPHASIS-HF study group. *N Engl J Med* 2011;364:11-21.

Zendaoui A, Lachance D, Roussel E, Couet J, Arsenault M. Effects of spironolactone treatment on an experimental model of chronic aortic valve regurgitation. *J Heart Valve Dis* 2012;21:478-86.

Zhang P, Su J, Mende U. Cross talk between cardiac myocytes and fibroblasts: from multiscale investigative approaches to mechanisms and functional consequences. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012;303:H1385-96.