Cintia Taniguti Lima

**Participação do sistema renina angiotensina na lesão
vascular em camundongos submetidos a sobrecarga
salina**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Lacchini

São Paulo
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Lima, Cintia Taniguti

Participação do sistema renina angiotensina na lesão vascular em camundongos submetidos a sobrecarga salina / Cintia Taniguti Lima. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Silvia Lacchini.

Descritores: 1.Lesões do sistema vascular 2.Sistema renina-angiotensina 3.Angiotensina II 4.Cloreto de sódio na dieta 5.Neointima 6.Colágeno 7. Camundongos

USP/FM/DBD-136/13

Agradecimentos

A minha orientadora **Profª Drª Silvia Lacchini**, por confiar em minha capacidade de desenvolver esse trabalho, por ser minha amiga e mãe científica me entendendo e ajudando nos momentos mais difíceis e felizes da minha vida.

A **Profª Drª Elia Tamaso Espin Garcia Caldini** por ser minha orientadora inicialmente e pela oportunidade de cursar o Mestrado neste programa.

Os professores que participaram de minha qualificação: **Profª VERA DE MOURA AZEVEDO FARAH**, **Prof. Edson Aparecido Liberti** e **Profª Drª Ivana Cinthya de Moraes da Silva** por aceitarem a fazer parte desta banca e pelas contribuições dadas na qualificação que permitiram melhorar meu trabalho.

A **Profª Maria Claudia Irigoyen** que me deu a oportunidade de continuar meu trabalho.

Ao meu marido **Rodrigo Costa Lima** por compreender os momentos de minha ausência, devido aos estudos e congressos e por estar sempre ao meu lado me apoiando, que acreditou em mim em momentos que nem eu poderia acreditar e me incentivou a continuar.

A minha mãe **Maria Taniguti** que apesar da distancia nunca me desamparou. Me ensinou tudo o que sei, tudo o que eu sou.

O **Ricardo Bandeira** por ser meu amigo-irmão e ter me apresentado a **Profª Silvia Lacchini**.

A **Kátia Aparecida da Silva Viegas**, **Thaís Cristina de Souza-Oliveira** por me ensinarem as técnicas de laboratório com paciência e a amizade.

A **Juliane Cristina S. Silva** e a **Nara Baptistella Rabechi** pela amizade infinita e a ajuda em meu trabalho.

Aos meus amigos de laboratório, **Camila de Jesus Piva, Álvaro Júnior Martins, Tatiane Evelyn Barboza, Tatiana Alves, André Santana e Bárbara Lobo** pela amizade e por contribuírem em meus experimentos em alguns momentos.

Aos técnicos do Biotério **Fábio França Lucas, Renivaldo Souza** pela amizade que fizemos e por cuidarem dos meus animais.

Aos amigos do departamento de anatomia, **Kelly Palombit, Marcos Vinicius da Silva, Aline Marosti Bobna, Cristina Eusébio Mendes, Márcia Mizuno** pelas conversas e amizade.

A todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente deste trabalho e por falha na memória não foram citados aqui.

A FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (processo nº 2008/56192-7) pelo subsídio dado na forma de bolsa de Mestrado e Reserva Técnica.

Sumário

	Lista de figuras.....	v
	Lista de tabelas.....	viii
	Lista de abreviaturas.....	ix
	Resumo.....	xi
	Abstract.....	xii
1	INTRODUÇÃO.....	01
1.1	Relação entre pressão arterial e ingestão de sal.....	01
1.2	A importância da redução de sódio na dieta.....	02
1.3	Influências da sobrecarga salina sobre a parede arterial.....	03
1.4	Fatores encontrados em patologias cardiovasculares.....	07
1.5	Justificativa.....	13
2	OBJETIVOS.....	14
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1	Animais	15
3.2	Tratamentos.....	15
3.3	Experimentos executados.....	16
3.4	Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca.....	17
3.5	Indução da lesão vascular por implante do catéter perivascular.....	18
3.6	Coleta dos tecidos.....	20
3.7	Processamento histológico e morfometria.....	21
3.8	Avaliação da lesão vascular.....	22
3.9	Avaliação da rede colágena vascular por Picrossírius.....	26
3.10	Análise das lamelas elásticas.....	30
3.11	Avaliação do sistema Renina- Angiotensina por imunohistoquímica	31
3.12	Quantificação dos níveis de Angiotensinas.....	34

3.13	Análise Estatística.....	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1	Avaliação de peso corporal e medidas hemodinâmicas.....	36
4.2	Análise da lesão vascular.....	38
4.3	Análise das lamelas elásticas.....	40
4.4	Análise de Fibras Colágenas.....	41
4.5	Estudo dos componentes do Sistema Renina-Angiotensina.....	45
5	DISCUSSÃO	49
6	CONCLUSÃO.....	54
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
8	ANEXO.....	59

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema da via clássica do Sistema Renina-Angiotensina atuando sobre os receptores AT1 e AT2	10
Figura 2 – Representação esquemática dos grupos preparados e dos tratamentos procedimentos experimentais realizados em cada grupo.	16
Figura 3 – Esquema do sistema de medida de pressão caudal utilizado nos experimentos	18
Figura 4 – Artéria carótida esquerda isolada (notar região da bifurcação). Aumento de 10 x 1.	19
Figura 5 – Implantação do cateter na artéria femoral. A – visualização e isolamento da artéria femoral (aumento: 10 x 1,0); B – inserção do cateter em torno da artéria (aumento: 10 x 1,5); C – fixação do cateter em torno da artéria por meio do fio de algodão (aumento: 10 x 1,5).	20
Figura 6 – Esquema de procedimentos histológicos e análises microscópicas: A) colocação do tecido em cassete após processo de processamento; B) inclusão em bloco de parafina; C) corte de blocos realizados em micrótomo e colocados em lâminas histológicas; D) análise microscópica e fotografia das lâminas; e E) Análise das imagens fotografadas.	22
Figura 7 – Na fotomicrografia à esquerda: corte de uma artéria femoral controle, na disposição de coleta, com os tecidos adjacentes. À direita: artéria femoral com o cateter de polietileno em volta e os tecidos adjacentes. Pode-se observar que não há interferência hemodinâmica induzida pelo cateter em torno da artéria.	24
Figura 8 – Fotomicrografias representativas de detalhes das artérias sem lesão (à esquerda) e com lesão (à direita). A: túnica íntima; B: lâmina elástica interna e C: lâmina elástica externa.	25

Figura 9: Esquema de corte e avaliação da artéria para fibras colágenas. A = Adventícia; B = Lâmina Elástica Externa; C = Lâmina Elástica Interna; D = Maior medida do menor eixo. Figura de Nara B Rabechi, 2010	27
Figura 10 – Fotomicrografia representativa de artéria carótida corada com picrossirius. A artéria visualizada em campo claro (A) mostra a fibrose perivascular em vermelho; quando a mesma artéria é visualizada em luz polarizada (B) pode-se observar a apresentação das diversas fibras colágenas. Aumento 400X.	29
Figura 11 – Fotomicrografia representativa de artéria carótida corada para Weigert, onde ressaltam-se as lamelas elásticas (setas). Aumento: 200x.	30
Figura 12: Valores dos pesos corporais medidos durante os tratamentos	36
Figura 13: medida indireta de pressão arterial sistólica por pletismografia de cauda	37
Figura 14: medida de frequência cardíaca por pletismografia de cauda	37
Figura 15 – Relação percentual entre íntima e média nas artérias carótidas sem lesão (A) e com lesão (B). * $p \leq 0,05$, comparado com grupo controle; # $p \leq 0,05$, comparado com os demais grupos. CD Carótida Direita, CE Carótida Esquerda, FD Femoral Direita, FE Femoral Esquerda, Cont controle, sal2 tratamento salina 2 semanas, sal12 tratamento salina 12 semanas.	39
Figura 16 – Contagem média das lamelas elásticas nas artérias carótidas (A) e femorais (B).	40
Figura 17 – Porcentagem de fibras colágenas espessas (ve), finas (vd) e intermediárias (am) observadas nas artérias carótidas sem lesão (A) e com lesão (B). * $p \leq 0,05$, comparado com grupo controle; # $p \leq 0,05$, comparado com os demais grupos.	42

Figura 18 – Fotomicrografias representativas da porcentagem de fibras colágenas observadas nas artérias carótidas com lesão observadas som luz polarizada. A: grupo controle; B: grupo salina 2 semanas; e C: grupo salina 12 semanas. Aumento: 200x. 43

Figura 19 – Porcentagem de fibras colágenas espessas (ve), finas (vd) e intermediárias (am) observadas nas artérias femorais sem lesão (A) e com lesão (B). * $p \leq 0,05$, comparado com grupo controle. 44

Figura 20 – Escore de marcação para ECA nas artérias carótidas (A) e femorais (B). * $p \leq 0,05$, comparado com grupo controle; # $p \leq 0,05$, comparado com os demais grupos. 46

Figura 21: Quantificação da angiotensina I (A), e angiotensinas II e (1-7) (B) nas artérias carótidas sem lesão (gráficos à esquerda) e da angiotensina I (C), e angiotensinas II e 1-7 (D) nas artérias com lesão (gráficos à direita), conforme os grupos estudados. * $p \leq 0,05$ quando comparado aos demais grupos. 47

Figura 22: Quantificação da angiotensina I (A), e angiotensinas II e (1-7) (B) nas artérias femorais sem lesão (gráficos à esquerda) e da angiotensina I (C), e angiotensinas II e 1-7 (D) nas artérias com lesão (gráficos à direita), conforme os grupos estudados. * $p \leq 0,05$ quando comparado aos demais grupos. 48

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Escore de intensidade de marcação para a análise semi- 33
quantitativa da IHQ

Lista de Abreviaturas

ABC = Sistema secundário Estreptoavidina – Biotina – Peroxidase

Ac = Anticorpo

Ang I = Angiotensina I

Ang II = Angiotensina II

Ang (1-7) = Angiotensina (1-7)

ANOVA = Análise de Variância

AT1 = receptor de angiotensina II do tipo 1

AT2 = receptor de angiotensina II do tipo 2

°C = Graus Celcius

Ca = Cálcio

CD = Artéria carótida direita

CE = Artéria carótida esquerda

Cl = Cloro

Cont = Grupo Controle tratado com água filtrada por 12 semanas

DAB = 3,3 Diaminobenzidina

ECA = ACE = Enzima Conversora de Angiotenina

EDTA =

FC = Frequencia cardíaca

FD = Artéria femoral direita

FE = Artéria femoral esquerda

FGF = Fator de crescimento de fibroblasto

HE = Hematoxilina–Eosina

HPLC = Cromatografia líquida de alta performance

Hz = Hertz

H₂O₂ = Peróxido de Hidrogênio

IHQ = Imunohistoquímica

LDL = Lipoproteína de baixa densidade

M = Molaridade

mEq/dia = miliequivalentes/dia

mmHg = milímetro de mercúrio

Na = Sódio

NaCl = Cloreto de sódio

NO = Óxido nítrico

PA = Pressão arterial

PBS = Tampão fosfato de sódio

PDGF = Fator de crescimento derivado de plaquetas

pH = Potencial de hidrogênio

RNA_m = ácido ribonucleico, mensageiro

rpm = Rotação por minuto

Sal 2 = Grupo tratado com 2 semanas de ingestão Salina 1%.

Sal 12 = Grupo tratado com 12 semanas de ingestão Salina 1%.

SRA = Sistema renina-angiotensina

TGF α 1 = Fator de necrose tumoral tipo α 1

VD = Verde

VE = Vermelho

Resumo

Estudamos se a sobrecarga salina leva ao aumento de neoíntima em vasos submetidos à lesão e avaliamos a participação do sistema renina-angiotensina neste processo. Usamos camundongos C57Bl6 machos tratados por 2 ou 12 semanas com NaCl 1% para beber ou água (grupos cont, sal2 e sal12), submetidos à lesão vascular. O grupo sal12 aumentou a lesão vascular e alterou a relação de fibras colágenas, com exacerbação de deposição colágena na lesão vascular, e a relação entre as angiotensinas II e (1-7) vasculares, com aumento de Ang (1-7) e sem redução de ang II após a lesão. Os resultados obtidos permitem concluir que a sobrecarga salina aumenta a neoíntima nas artérias com lesão e altera a relação entre angiotensinas II e (1-7) de forma possivelmente propiciar o aumento de relação íntima/média observado.

Abstract

We studied if salt overload leads to an increase in neointima in injured arteries, and evaluate the involvement of the renin-angiotensin in this process. Were used C57Bl6 male mice treated for 2 or 12 weeks with 1% NaCl to drink or water (cont, sal2 sal12 groups) submitted to vascular injury. The group sal12 increased vascular injury and altered the relationship of collagen fibers, with exacerbation of collagen deposition in the vascular injury, and the relationship between vascular angiotensin II and (1-7), with an increase of Ang (1-7) and no reduction of Ang II after injury. The results indicate that salt overload increases neointima in injured arteries, and modifies the relationship between angiotensin II and (1-7), possibly providing the increase in intima/media ratio observed.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Relação entre pressão arterial e ingestão de sal

Os estudos da relação entre a ingestão de sal (NaCl – cloreto de sódio) e pressão arterial reforçam a idéia de que a ingestão excessiva de sódio eleva a pressão arterial (Grobbee e cols, 1986 e Umeda, 1988). No entanto, a intensidade da elevação da pressão arterial em resposta a essa ingestão excessiva de sal é variável, alterando em função do consumo sal na dieta ou se o indivíduo apresenta sensibilidade ao sal, e alternando também conforme o peso, raça e idade. Assim, os valores de pressão arterial aumentam muito em resposta a determinado incremento no consumo de sal, (em indivíduos sensíveis) enquanto em outros (indivíduos não sensíveis ao sal) a pressão arterial é pouco alterada ou não se modifica (Blackburn e Prineas, 1983; Simon, 1991).

Na população, a ingestão salina é um dos fatores envolvidos no aumento progressivo da pressão arterial que acontece com o envelhecimento, evidente no clássico estudo Intersalt (Intersalt, 1988). Esse estudo relatou a relação entre a quantidade de sal ingerida e a elevação da pressão arterial com a idade, havendo pouco aumento, ou mesmo ausência de elevação da pressão arterial nas comunidades com baixa ingestão salina. Por outro lado esse estudo mostrou que em populações com alto consumo de sal, 50% dos indivíduos acima de 60 anos terá hipertensão arterial sendo entre populações nas quais a ingestão de sal está acima de 100mEq/dia. Por outro lado esta condição, é rara nas comunidades que ingerem sal abaixo de 50mEq/dia (Carvalho e cols, 1989).

No Brasil, assim como nos demais países industrializados, a ingestão de cloreto de sódio se encontra muito acima do limite aceitável. Segundo Organização Mundial de Saúde (Janeiro 2013) ingere-se no Brasil cerca de 10g de NaCl por dia, Os adultos deveriam consumir menos de 2 gramas de sódio (ou menos de 5 gramas de sal) e pelo menos 3,51 gramas de potássio por dia.

1.2 *A importância da redução de sódio na dieta*

Pesquisas demonstram que a redução de ingestão de sal de 170 para 70 mEq/dia, leva uma queda na pressão arterial em indivíduos normotensos de aproximadamente 2 e 3 mmHg (Carvalho e cols, 1989 e Midgley e cols, 1996). Ao longo de mais de 30 anos, a diminuição da pressão arterial pode chegar a 10 mmHg ou mais. Isso se deve, em parte, porque a restrição salina minimiza o aumento da pressão arterial com a idade. Isto se associa com uma redução no risco cardiovascular de 10% a 25% (Irigoyen e cols., 2009)

A restrição salina é utilizada desde o início do século XX, mas pode acarretar em problemas como fadiga e distúrbios do sono, que podem ocorrer quando um diurético do grupo dos tiazídicos é prescrito a esses pacientes (Wassertheil Smoller e cols, 1991). Ainda, estudos tem demonstrado que restrição salina em torno de 20 mEq/dia pode causar uma elevação aproximada de 10% no LDL-colesterol (Sharma e cols, 1990). Assim, pode-se considerar que os efeitos colaterais ao uso de uma dieta hiper sódica são: o aumento de atividade do sistema nervoso simpático (Dichtchenian e cols, 1992); aumento da atividade do sistema renina-angiotensina, diminuição da sensibilidade a insulina (Prada e cols 2000), e aumento dos níveis circulantes da triacilglicerol (Catanozi e cols, 1998).

Guyton nas décadas de 60 e 70 mostrou o desenvolvimento da hipertensão (determinado pelo sal). Modelos usando infusão de angiotensina II em cães concomitantemente à sobrecarga salina demonstrou que a hipertensão se desenvolve em função de retenção de água, com consequente expansão do volume sanguíneo, aumentado o débito cardíaco e, gradualmente, a resistência periférica (Feng e MacGregor, 2012).

Como grande parte deste estudo focalizou os processos da manutenção da hipertensão, os mecanismos relacionados ao controle de pressão arterial em indivíduos normotensos com sobrecarga salina ainda não estão totalmente esclarecidos. Não se sabe ainda até que ponto os sistemas de regulação de pressão estão adaptados a sobrecarga salina.

1.3 *Influências da sobrecarga salina sobre a parede arterial*

As doenças vasculares acometem tanto artérias elásticas como de resistência e são a principal causa de morbidade e mortalidade na sociedade ocidental. Contudo, os mecanismos que levam ao desenvolvimento de tais doenças ainda não estão totalmente elucidados devido à grande complexidade das interações celulares tanto em situações fisiológicas como patológicas. Entre os diversos fatores envolvidos na fisiopatologia vascular, a ingestão de sódio é considerada um dos principais mecanismos de estresse cardiovascular, podendo ou não desencadear o desenvolvimento de patologias.

As artérias são órgãos complexos cuja parede é composta por células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos, ligados uns aos outros por uma

rede de interações autócrinas e parácrinas, e podendo se adaptar a múltiplas variações hemodinâmicas e mecânicas (Gimbrone e cols., 1997). Além dos componentes celulares, a parede vascular é composta de matriz extracelular, produzida pelas próprias células, essencial na regulação da homeostase e arquitetura tecidual (Stamenlovic, 2003). Assim, o vaso é capaz de modificar sua estrutura e função (Tulis e cols, 1998), desencadeando um processo complexo e dinâmico remodelamento vascular (Lusher e Noll, 1995).

A relação entre o sal e os mecanismos de controle vascular começam a ser melhor estudadas, sendo a sua ingestão considerada como um dos principais mecanismos de estresse cardiovascular. Diversos estudos tem demonstrado que a sobrecarga salina é capaz de modificar o funcionamento de mecanismos de controle cardiovascular, como o sistema renina-angiotensina, podendo ou não desencadear o desenvolvimento de patologias. Tendo em vista que a sobrecarga salina independentemente da pressão arterial, pode modificar a capacidade do sistema cardiovascular em responder e adaptar-se a diversas situações, temos a hipótese de que a sobrecarga salina modifica a capacidade vascular em responder a injúria em camundongos.

Embora muitos acreditem que a sobrecarga salina seja a responsável pelo aumento de pressão arterial, com consequente desenvolvimento de hipertensão e de outras patologias (Mac Gregor, 1997), sabe-se que os mecanismos envolvidos na regulação da pressão arterial (PA) durante a sobrecarga salina são complexos e de difícil explicação. Por isso, verifica-se o desenvolvimento de hipertensão determinada pela sobrecarga de sódio em alguns indivíduos e em outros não. Nas ultimas décadas numerosos estudos populacionais mostraram comparação de

diferentes populações sob vários graus de ingesta de sódio na dieta tornava-se confusa devido aos inúmeros fatores potencialmente relacionados aos níveis de PA e ao sódio (Grobbee, 1994).

Existem vários modelos genéticos (Kurtz e cols, 1994; Rapp, 1994) ou experimentais (Thurston, 1994; Kenyon e cols, 1994) de hipertensão em ratos que apresentam sensibilidade aumentada ao sódio. A maioria destes experimentos tem estudado o efeito da sobrecarga salina sobre a PA de formas aguda por curtos períodos de tempo. Contudo, a sobrecarga crônica por longos períodos, que se encontraria mais próxima e situações encontradas nas populações humanas determinando o desenvolvimento de hipertensão arterial, é pouco estudada. Nesse sentido, estudos em populações migratórias mostram que é necessário um período inicial após o aumento da ingesta de sódio para se considerar que estava ocorrendo uma adaptação dos mecanismos regulatórios de PA na população como um todo (Poulter e Server, 1994).

Está bem esclarecido que a sobrecarga salina crônica reduz a atividade da renina plasmática e que sua redução aumenta a atividade da mesma. Esta relação inversa entre ingesta (ou excreção) de sal cronicamente e a atividade de renina plasmática foi descrita em humanos de forma quantitativa por Laragh (1992). Tais alterações na atividade da renina são acompanhadas por mudanças correspondentes no conteúdo de renina e na síntese de RNAm da renina no rim (Barret e cols, 1989), indicando que a secreção basal de renina é proporcionada a quantidade de renina estocada, e que posteriormente a sua síntese é suprimida pela sobrecarga de sal. Contudo, os mecanismos pelos quais estas mudanças ocorrem são ainda desconhecidos (Hackenthal e Nobiling, 1994).

A dependência de secreção de renina com a concentração luminal de NaCl foi sugerida pela primeira vez por Vander em 1967. Este propôs que animais recebendo sobrecarga salina no início de túbulo distal tem a variação de sódio detectada pela macula densa, que então sinalizaria para as células produtoras de renina reduzir a secreção desta, vice-versa (Hanckenthal e Nobiling, 1994; Shnermann, 1998). Embora tenha sido difícil provar que nos animais intactos, a existência desta relação foi estabelecida por preparações isoladas de aparelho justaglomerular de rim de coelho, descrevendo um método que permite avaliar a influencia de secreção de renina independentemente dos mecanismos pressorreceptores e adrenérgicos (Schnermann, 1998).

As concentrações de NaCl no fluido tubular passando pelas células da macula densa tem dois efeitos conhecidos: modificam o tônus vascular glomerular, e alteram a liberação de renina (Shnermann, 1998). A regulação do tônus vascular glomerular ocorre quando houver perturbações momentâneas (não relacionadas à concentração de sódio corpóreo) das concentrações de NaCl e se dá predominantemente na arteríola aferente, alternando o fluxo plasmático do capilar glomerular e a taxa de filtração glomerular, caracterizando o mecanismo conhecido por feedback túbulo glomerular (Shnermann e Briggs, 1999). Alterações mais prolongadas na concentração de sódio do filtrado levam a modificações inversamente proporcionais na liberação de renina, onde a redução da concentração de sódio aumenta a liberação de renina e a sobrecarga salina inibe a sua liberação (Lacchini, 1996; Shnermann, 1998).

1.4 Fatores encontrados em patologias cardiovasculares

A maior incidência de infarto do miocárdio havia ocorrido em pacientes com baixa ingestão de sal, o que poderia ter efeito deletério como o aumento dos níveis lipídicos.

Há benefícios da restrição salina além da redução da pressão arterial, na mortalidade por acidente vascular cerebral (Sasaki e cols, 1995) e na excreção urinária de cálcio, fato que pode proteger contra o desenvolvimento de osteoporose em idosos e a regressão da hipertrofia ventricular esquerda (Jula e cols, 1994; Heimann e cols, 1991). Tal fato é importante, quando se considera que a sobrecarga salina crônica desencadeia hipertrofia miocárdica na presença de um sistema renina-angiotensina pouco ativado (Jula e Karanlo, 1994).

Uma explicação é a de que os níveis de pressão elevados é somente uma manifestação que podem causar ou não com a presença de lesões em órgãos-alvos. Contudo, sabe-se que em hipertensos obesos o consumo de sal acarreta no aumento de acidentes cérebro-vasculares e na mortalidade por esses acidentes, bem como coronariopatia e doença vascular periférica (He e cols, 1999).

Além dos componentes celulares, a parede vascular é composta de matriz extracelular, produzida pelas próprias células, essencial na regulação da homeostase e arquitetura tecidual (Stamenkovic, 2003). Assim, o vaso é capaz de modificar sua estrutura e função (Tulis e col., 1998), desencadeando um processo complexo e dinâmico denominado remodelamento vascular (Lüscher e Noll, 1995). Os mecanismos que determinam ou levam ao desenvolvimento de tais doenças

ainda não foram completamente esclarecidos devido à grande complexidade das interações celulares tanto em situações fisiológicas quanto patológicas. As artérias são órgãos complexos cuja parede é um conjunto ativo e integrado compostos por células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos, interligados uns aos outros por uma rede de interações autócrinas e parácrinas, podendo se adaptar a múltiplas variações hemodinâmicas e mecânicas (Gimbrone et al.,1997).

Os processos que envolvem o remodelamento da matriz extracelular estão relacionados a situações de reparo, inflamação, desenvolvimento ou crescimento (Stamenkovic, 2003). A matriz extracelular é constituída por numerosas proteínas, sendo as colágenas seu principal componente, além de diversas outras proteínas como proteoglicanas, glicosaminoglicanas, elastina, laminina e metaloproteases de matriz (Viegas e Lacchini, 2008). Em conjunto, estas constituem um arcabouço que auxilia na manutenção da integridade do tecido, regula a migração de células e funciona como um reservatório de citocinas e fatores de crescimento (Stamenkovic, 2003).

Estas células têm papel essencial em doenças como aterosclerose e restenose seguida à injúria da parede arterial, formando a chamada neoíntima ou mioíntima (Ross, 1999). No vaso intacto, a interação da musculatura lisa com os outros componentes é complexa, havendo a ação do sistema renina-angiotensina (SRA), além de outros fatores mitogênicos. Dessa forma, a angiotensina II leva as células da musculatura lisa a crescer por indução de fatores de crescimento autócrinos como PDGF, FGF e TGF- β 1 (Gibbons e Dzau, 1994), a migrar para a íntima e proliferar novamente (Lüscher e Noll, 1995). A relação entre o sal e os mecanismos de controle vascular começou a ser estudada recentemente e diversos estudos têm

mostrado que a sobrecarga salina é capaz de modificar o funcionamento de mecanismos do controle cardiovascular, como o Sistema Renina-Angiotensina, podendo ou não desencadear o desenvolvimento de patologias.

O papel do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) nas fisiopatologias cardiovasculares vem sendo bastante pesquisado. Este sistema é reconhecido como um importante determinante da homeostase e da hemodinâmica cardiovascular (Oigman e Neves, 2000), sendo que ativação anormal do SRA está associada com a patogênese de doenças cardiovasculares e doenças renais, hipertensão e infarto do miocárdio (Imai e cols., 2010).

Classicamente a Angiotensina I é liberada pela clivagem do Angiotensinogênio pela Renina, preferencialmente produzida no aparelho justaglomerular renal. A Angiotensina I (decapeptídeo) é então rapidamente convertida pela Enzima Conversora de Angiotensina I (ECA) para Angiotensina II (octapeptídeo) principal componente ativo deste sistema (Figura 1) (HarrisonBernard, 2009).

A Ang II exerce seus efeitos a longo prazo sobre o Sistema Cardiovascular por meio de vasoconstrição, modulação do tônus autonômico e retenção de água e sal pelo rim. Recentemente, a literatura tem apontado para efeitos tróficos sobre a parede vascular como um dos mais importantes mecanismos de ação da Ang II, como esquematizado na Figura1.

Sistema renina-angiotensina

Figura 1: Esquema da via clássica do Sistema Renina-Angiotensina atuando sobre os receptores AT1 e AT2

As inúmeras funções do SRA têm sido muito estudadas nos últimos anos, especialmente em modelos relacionados à regulação de pressão arterial. A rápida expansão das técnicas de biologia molecular permitiu que os componentes do SRA fossem clonados e seqüenciados (Dzau e cols., 1995), [referencia de Ferrari atualizar](#) levando à determinação mais acurada da distribuição tecidual de todos os componentes. Por isso, diferentemente da visão endócrina clássica do SRA, hoje se fala em sistemas renina-angiotensina teciduais, com funções autócrinas e parácrinas, tendo como seu principal peptídeo efector a Ang II exercendo suas ações

em órgãos-alvo. Foram observados todos ou quase todos os componentes em muitos tecidos, especialmente em coração e tecido vascular, incluindo tecido adiposo perivascular e músculo liso da aorta (Tamura et al., 1995; Kobayashi e Takei, 1996; Irigoyen e cols., 2009).

Além das ações hemodinâmicas, diversos estudos têm atualmente abordado as propriedades pró-inflamatórias da angiotensina II. Considerando os efeitos da angiotensina II, diversos grupos mostraram a importância do balanço entre seus dois tipos de receptores na função vascular, onde o subtipo AT1 estaria relacionado às ações vasoconstritoras e pró-inflamatórias, enquanto o subtipo AT2 estaria relacionado a efeitos opostos (Irigoyen e cols., 2003). Sabe-se que a angiotensina II pode atuar como citocina pró-inflamatória na parede vascular, microambiente normalmente afetado pelo sistema renina-angiotensina (Irigoyen e cols., 2005). Recentemente, foi demonstrado que a sobrecarga salina inibe a expressão de receptores AT2 em artérias de resistência (Gonzalez e cols., 2005). Além disso, a sobrecarga salina influencia o remodelamento vascular, levando à dilatação de artérias de resistência e elásticas (Simon e cols., 2003), podendo, em situações mais crônicas, levar ao prejuízo da sua distensibilidade.

Além disso, não se pode deixar de considerar a importância regulatória que o sódio tem sobre a atividade do sistema renina angiotensina. É bem sabido que a sobrecarga de sódio influencia a secreção de renina para o plasma (Irigoyen e cols., 2005). Esta dependência da secreção de renina com a concentração de sódio foi sugerida pela primeira vez por Vander, em 1967, quando este propôs que o aumento do sódio tubular era detectado pelas células da mácula densa, que então sinalizaria para as células granulares reduzirem a secreção de renina, e vice-versa

(Schnermann, 1998). Tais respostas são bem caracterizadas em estudos agudos (Cholewa e cols., 2005). Contudo, não foram encontradas evidências mostrando que a redução da taxa de secreção de renina, dos estoques de renina e da sua síntese durante a sobrecarga salina crônica sejam mediadas por um mecanismo de ativação contínua da mácula densa (Hackenthal e Nobiling, 1994).

Neste sentido, estudo realizado previamente mostrou que ratos submetidos à sobrecarga salina durante 12 meses apresentavam pressão arterial normal e atividade de renina plasmática reduzida, embora o que chamasse a atenção fosse o fato de que a expressão gênica da renina se encontrava aumentado em relação aos animais não tratados. Tal fato sugere que existam mudanças nos mecanismos de processamento da pró-renina em renina numa situação crônica (existindo outras ações de pró-renina). De fato, recentemente foi demonstrada a existência e a ativa participação do receptor de pró-renina na regulação cardiovascular (Nguyen e cols., 2002). Estes conhecimentos aproximam mais a possibilidade de participação do sistema renina-angiotensina na regulação cardiovascular tanto nos aspectos hemodinâmicos como nos não hemodinâmicos.

Dessa forma, a quantidade de sódio provinda da dieta pode influenciar a capacidade do sistema cardiovascular em responder e adaptar-se a diversas situações. Se considerarmos que a sobrecarga de sódio é reconhecida como um mecanismo de estresse cardiovascular e que esta leva a alterações funcionais e estruturais vasculares, independentemente da pressão arterial, podemos então propor que a sobrecarga salina modifica a capacidade vascular em responder à injúria em camundongos, e que, direta ou indiretamente, o sistema renina-angiotensina modela tal resposta.

1.5 Justificativa

A quantidade de sódio provinda da dieta pode influenciar a capacidade do sistema cardiovascular em responder e adaptar-se a diversas situações. Se considerarmos que a sobrecarga de sódio é reconhecida como um mecanismo de estresse cardiovascular e que esta leva a alterações funcionais e estruturais vasculares, independentemente de pressão arterial, podemos então propor a hipótese de que a sobrecarga salina modifica a capacidade vascular em responder a injúria em camundongos, e que direta ou indiretamente, o sistema renina-angiotensina modela tal resposta.

2. OBJETIVOS

Para testar a hipótese proposta, o objetivo do presente trabalho foi:

- Verificar se a sobrecarga salina leva ao aumento de neoíntima nas artérias carótidas e femorais submetidos à lesão.
- Avaliar a participação do sistema renina-angiotensina na resposta vascular à lesão nos animais submetidos à sobrecarga salina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Para os dois objetivos propostos, foram usados camundongos isogênicos machos C57Bl/6, provenientes do Biotério do Departamento de Anatomia – ICB/USP. Os animais foram mantidos em câmaras com ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura de 22°C a 24 °C e livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos cirúrgicos e os protocolos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo cujo protocolo foi registrado sob nº 044/11 (documento em anexo).

3.2. Tratamentos

Os animais foram aleatoriamente separados em grupos e tratados ou não com solução salina 1% para beber. Assim, foram formados três grupos, sendo: 1) recebendo água filtrada (Controle), 2) recebendo solução de NaCl 1% para beber por duas semanas (sal-2), e 3) recebendo solução de Na Cl 1% para beber por doze semanas (sal-12). Todos os animais entraram no protocolo experimental com 4 semanas de idade, e o tratamento foi executado em tempos de 2 e 12 semanas. É importante ressaltar que todos os animais terminaram o estudo com 16 semanas de idade, tendo então os grupos iniciado e terminado o estudo com as mesmas idades. A figura 2 apresenta um esquema de como foram conduzidos os tratamentos.

Figura 2 – Representação esquemática dos grupos preparados e dos tratamentos procedimentos experimentais realizados em cada grupo.

Ao longo do experimento os animais foram e pesados semanalmente, de forma a adaptarem-se à manipulação e saber-se sobre possíveis alterações de peso durante os tratamentos.

3.3. Experimentos

Para responder aos objetivos propostos, foram realizados dois experimentos distintos, sendo:

Experimento 1: estudo da formação da neointima em artérias carótida e femorais submetidas à lesão vascular em camundongos tratados ou não com sobrecarga salina. A lesão vascular foi induzida por implante de anel de polietileno

2mm de comprimento em torno das artérias carótidas e femorais, mantido por 2 semanas. Após o período da lesão, as artérias foram coletadas para análise histomorfométrica e imuno-histoquímica.

Experimento 2: Novos grupos foram preparados e, após os períodos já descritos, as artérias foram coletadas e congeladas para a quantificação de angiotensinas I, II e 1-7.

3.4. Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca

Na última semana de tratamento, foi feita medida de pressão arterial sistólica por pletismografia de cauda. É importante ressaltar que durante a semana prévia à medida, os animais foram adaptados ao sistema.

As variáveis hemodinâmicas foram avaliadas para se ter controle de que os tratamentos não modificam a pressão arterial, importante fator que atua na estrutura do sistema cardiovascular e na resposta da lesão, para garantir que os resultados obtidos, fossem independentes de fatores hemodinâmicos. O método de medida usado nos permite obter apenas a pressão arterial pulsátil (PA) e a frequência cardíaca (FC).

Para a medida de pletismografia de cauda, o camundongo foi colocado em caixa restritora aquecida para promover uma vasodilatação na cauda do mesmo. O esfigmomanômetro adaptado para camundongos foi colocado na cauda e insuflado até a obstrução total do fluxo sanguíneo para a artéria caudal. A obstrução do fluxo é diminuída lentamente até a captação dos primeiros picos de pressão arterial sistólica (figura 3).

Figura 3 – Esquema do sistema de medida de pressão caudal utilizado nos experimentos.

Os valores de pressão foram captados por um transdutor eletromagnético conectado a um amplificador, que transmite o sinal para um conversor de sinal analógico- digital que registra em tempo real no microcomputador, os valores de pressão arterial foram analisados pelo programa WINDAQ com uma frequência de amostragem 1000Hz por canal. Para a determinação da pressão arterial caudal e frequência cardíaca de repouso, foram consideradas as médias de dez registros por animal realizados em um mesmo dia. As medidas hemodinâmicas foram realizadas no Laboratório de Hipertensão Experimental da Unidade de Hipertensão do InCor, HC.FMUSP, com supervisão da Profa. Dra. Maria Cláudia Irigoyen.

3.5. *Indução da lesão vascular por implante do cateter perivascular*

A indução da lesão vascular foi feita usando um método que leva à inflamação perivascular e consequente formação de neoíntima, fase inicial da formação da lesão vascular. Os procedimentos para a indução da lesão foram feitos conforme

descrito anteriormente pelo grupo (Lacchini et al., 2009). Cabe ressaltar que, como estratégia de estudo, os animais foram controles de si mesmos, onde foram induzida a lesão vascular nas artérias carótida e femoral esquerdas, mantendo-se as artérias direitas como controle. O cateter utilizado para os experimentos é um cateter de polietileno PE 90 (DI 0.86mm - DE 1.27mm, polyethylene tubing, Clay Adams) de 2mm de comprimento com abertura em um dos lados para que possa “abraçar” a artéria. É importante salientar que o cateter apenas fica em torno da artéria, nunca devendo obstruir o fluxo de sangue. O cateter, após inserido em torno do vaso, é mantido fechado por um fio de algodão 4.0.

Para a implantação do cateter em torno da artéria carótida comum, é feita uma incisão ventral na região cervical. A carótida é isolada e é feita a implantação do cateter, próximo à bifurcação (figura 4). A pele é suturada com fio de polipropileno 6.0 vascular (Prolene - Ethicon).

Figura 4 – Artéria carótida esquerda isolada (notar região da bifurcação). Aumento de 10 x 1.

Para a implantação do cateter na artéria femoral, ficou estabelecido que o segmento da artéria femoral onde o cateter é implantado é a região mais proximal,

com maior calibre (figura5A), O cateter implantado na femoral é o mesmo utilizado na carótida. Após a implantação do cateter (Figuras 5B e 5C), a pele era suturada com fio de polipropileno 6.0 vascular.

A

B

C

Figura 5 – Implantação do cateter na artéria femoral. A – visualização e isolamento da artéria femoral (aumento: 10 x 1,0); B – inserção do cateter em torno da artéria (aumento: 10 x 1,5); C – fixação do cateter em torno da artéria por meio do fio de algodão (aumento: 10 x 1,5).

3.6. Coleta dos tecidos

Como mencionado anteriormente, os tecidos foram coletados para avaliação histológica ou quantificação de proteínas. Para a avaliação morfométrica, os animais (n=10) foram eutanasiados por overdose de anestésico, com injeção intraperitoneal de ketamina (180 mg/kg), xylazina (20mg/kg) e aplicação também de dose de heparina sódica (50U por animal). A lavagem do sistema vascular foi feita com solução fisiológica, sob pressão constante de 80 a 90 mmHg, através do ventrículo esquerdo, sendo que .posteriormente o animal foi perfundido com formol a 4% tamponado (tampão fosfato de sódio). Foram coletados fragmentos das artérias carótidas e femorais.

3.7. *Processamento histológico e morfometria*

Para realização da análise histológica, os tecidos foram perfundidos com salina e fixados com formol, sendo depois mantidos de 24 a 48 horas em formol tamponado 4%. Após este período, os tecidos foram dispostos em cassete plástico processador/incluser; e processados em aparelho auto-técnico com ciclo total de 10 horas (realizando a desidratação, diafanização e parafinização do material). Os tecidos processados foram incluídos em parafina usando uma central de inclusão, levados a micrótomo e cortados em 5µm de espessura. Os cortes foram colocados em lâminas silanizadas e então se seguiu o seguinte procedimento para a desparafinização dos tecidos: Três banhos de xilol, sendo cada um com 20 minutos de duração; em seguida, dois banhos de álcool 100%, um banho de álcool 95%, um banho de álcool 70% e um banho de álcool 50%, sendo cada um com duração de 5 minutos.

Os cortes foram analisados em microscópio acoplado a sistema de digitalização de imagem, sendo as imagens dos vasos analisadas com uso de um software específico. Para análise morfológica dos tecidos, as lâminas foram analisadas em microscópio Zeiss Axioscope II, acoplado a câmera fotográfica (AxioCam MR3), para captura de imagens. O programa utilizado foi AxioVision Release. 4.8.1 (11-2009).

Figura 6 – Esquema de procedimentos histológicos e análises microscópicas: A) colocação do tecido em cassete após processo de processamento; B) inclusão em bloco de parafina; C) corte de blocos realizados em micrótomo e colocados em lâminas histológicas; D) análise microscópica e fotografia das lâminas; e E) Análise das imagens fotografadas.

3.8. Avaliação da lesão vascular

A quantificação da neointima foi feita em lâminas coradas para Verhoeff-van Gieson. Foram avaliados 6 cortes por vaso, fazendo-se uma média para cada animal. A coloração de Verhoeff permite a coloração das lâminas elástica interna e externa, possibilitando definir claramente os limites de íntima e média.

Coloração de Verhoeff – Van Gieson [referencia](#)

Para a coloração de Verhoeff – Van Gieson os tecidos foram mantidos em estufa à 37°C por 5 minutos em seguida mantidos em xilol 5 minutos. Esta etapa foi realizada 3 vezes consecutivas. Os cortes foram desparafinizados, hidratados (álcool a 100, 95, 80 e 70%), chegando em água destilada. Após, a sequência de coloração deu-se da seguinte forma:

- 1) Coloração pela hematoxilina de Verhoeff por 20 minutos
- 2) Lavagem em água corrente
- 3) Diferenciação em cloreto férrico 2 %
- 4) Lavagem novamente em água corrente
- 5) Tratamento com solução de hipossulfito por 5 minutos
- 6) Lavagem em água corrente por 5 minutos
- 7) Coloração com solução de Van Gieson por 5 minutos
- 8) Desidratação e montagem.

As fibras elásticas são coradas em preto, os núcleos em azul escuro, colágeno e citoplasma em vermelho.

Quantificação da lesão

Usando os cortes corados para Verhoeff e Van Gieson (Figura 7), foram feitas medidas da área da luz do vaso, da lamina elástica interna e lamina elástica externa (para obtenção das áreas das túnicas íntima e média). O índice de espessura de parede foi determinado traçando os limites da luz do vaso na espessura do menor eixo vascular a média da espessura da parede muscular nos quatro quadrantes. A Figura 8 apresenta fotomicrografias representativas de um detalhe da parede vascular, onde se pode visualizar as lâminas elásticas interna e externa.

Figura 7 – Na fotomicrografia à esquerda: corte de uma artéria femoral controle, na disposição de coleta, com os tecidos adjacentes. À direita: artéria femoral com o cateter de polietileno em volta e os tecidos adjacentes. Pode-se observar que não há interferência hemodinâmica aparente do diâmetro da luz do vaso induzida pelo cateter em torno da artéria.

Figura 8 – Fotomicrografias representativas de detalhes das artérias sem lesão (à esquerda) e com lesão (à direita). A: túnica íntima; B: lâmina elástica interna e C: lâmina elástica externa.

Para cada vaso, foram feitos 6 cortes em série de forma a avaliar uma parte considerável da região de interesse. A região de interesse foi cortada (5 μ m) de modo a dispor-se do corte para cada tecido.

A relação percentual íntima/média que varia em torno de 4% a 6% em camundongos normais nos permite avaliar o grau de hipertrofia da íntima. A maior formação de neoíntima está associada a uma chance maior de oclusão do vaso. A

análise da formação de neoíntima é representada percentualmente, como referido na literatura (Fujita et ali; 1999; Shibata et; 2001).

3.9. *Avaliação da rede colágena vascular pela coloração de Picrossírius*

Para esta análise, foi usada a coloração de Picrossírius, que ressalta a presença e disposição de fibras colágenas. A coloração Picrossírius é um método muito eficiente e simples para localizar e caracterizar o colágeno presente em diferentes tecidos, permitindo observar as relações existentes entre morfologia e histoquímica (Junqueira et ali; 1991). Este método foi utilizado para avaliar deposição perivascular de fibras colágenas dos vasos estudados.

Esta coloração permite o estudo das fibras colágenas sob dois pontos de vista: a disposição e presença de fibras colágenas em torno do vaso pela visualização em campo claro e a diferenciação tecidual dos tipos de fibras, através da birrefringência do colágeno, capaz de desviar o feixe de luz polarizada. Assim, a luz, emitida pelo microscópio em uma única direção (e não observada pelo olho humano) é desviada de forma diferente, conforme o calibre da fibra colágena, sendo visualizada em cores diferentes. Assim, a fibra fina (composta por colágenos de fibras mais finas como o colágenos do tipo III ou a fibra imatura) é vista em tons verdes, a fibra mais espessa (de colágenos mais espessos como o colágeno do tipo I ou fibras mais maduras) é vista em tons vermelhos, enquanto as fibras de espessura intermediária são vistas em tons amarelos e laranja.

Neste estudo, foram corados 5 cortes de cada vaso,, sendo avaliados ao menos 3 cortes em boas condições e feita a média por vaso e por animal. A Figura 9 apresenta um esquema de como são visualizadas as fibras colágenas nos vasos.

A avaliação em campo claro consiste na medida da área em torno da adventícia, menos a área da lâmina elástica externa; assim, define-se especificamente a área da túnica adventícia. Tomamos o cuidado de medir o diâmetro do vaso (maior medida) no menor eixo (reduz o erro de medida, caso a artéria não seja fixada totalmente aberta e fique achatada). Essa medida foi usada para dividir o valor obtido da área da adventícia, de forma a ter-se uma medida de área da túnica proporcional ao diâmetro do vaso. Esta avaliação é mais importante para artérias que podem se apresentar com diferentes calibres e, proporcionalmente, mudam o tamanho de adventícia.

Figura 9: Esquema de corte e avaliação da artéria para fibras colágenas.
A = Adventícia; B = Lâmina Elástica Externa; C = Lâmina Elástica

Interna; D = Maior medida do menor eixo. Figura de Nara B Rabechi, 2010

Já a avaliação sob luz polarizada consistiu em quantificar separadamente as fibras colágenas mais espessas (amarelas e vermelhas) e as mais finas (verdes, menos maduras). Até o presente momento, não temos concluídas todas as análises sob luz polarizada para aorta, e serão apresentados os resultados parciais obtidos para as artérias cardíacas.

A análise foi feita em utilizando aumento de 100X, sendo a artéria dividida em quadrantes. Para cada quadrante foi feita a análise de pixel de cada uma das partes desta artéria, obteve-se uma média para cada artéria. A figura 10A exemplifica o que se observa em um corte de artéria carótida sem lesão, corado para picrossirius e visto em campo claro; esta coloração permite a visualização da região onde as fibras colágenas estão presentes. Contudo, não se tem ideia mais precisa da disposição molecular das fibras colágenas ou se estas se encontram mais íntegras ou degradadas. Já na figura 10B, pode-se observar a mesma artéria corada para Picrossirius visualizada sob luz polarizada; neste caso, pode-se distinguir as fibras colágenas de diversas espessuras e avaliar a deposição de fibras finas (coradas em verde), espessas (coradas em vermelho) e intermediária (coradas em amarelo) de colágeno perivascular.

Figura 10 – Fotomicrografia representativa de artéria carótida corada com picrossirius. A artéria visualizada em campo claro (A) mostra a fibrose perivascular em vermelho; quando a mesma artéria é visualizada em luz polarizada (B) pode-se observar a apresentação das diversas fibras colágenas. Aumento 400X.

3.10. *Análise das lamelas elásticas*

Para esta análise foi usada a coloração de Weigert, [referencia](#) que resalta a presença das lamelas elásticas. Desta forma, foi possível estabelecer se os tratamentos levam a uma alteração da quantidade de lamelas elásticas e consequentemente da disposição e número de células musculares lisas. Assim, podemos avaliar um possível remodelamento vascular foi acompanhado por uma adaptação correspondente do sistema colágeno e elástico. A Figura 11 mostra como são visualizadas as lamelas elásticas nesta coloração.

Figura 11 – Fotomicrografia representativa de artéria carótida corada para Weigert, onde ressaltam-se as lamelas elásticas (setas). Aumento: 200x.

3.11. Avaliação do sistema Renina- Angiotensina por imunohistoquímica

Foi usado o método de imunohistoquímica para a detecção da presença de componentes importantes do sistema renina-angiotensina e sua avaliação de forma semi-quantitativa. Para tal, os cortes foram submetidos à imunohistoquímica (IHQ) para enzima conversora de angiotensina I (ECA) e angiotensina II (ang II).

Reação de imunohistoquímica

O método de IHQ utilizado foi o tipo A-B-C (Estreptoavidina – Biotina – Peroxidase). A seguir, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ a 3% por 15 minutos. Os tecidos foram incubados em câmara úmida, de um dia para outro, a 4°C com anticorpos primários (Ac 1º), diluídos em Albumina de Soro Bovino (BSA, Bovine Sorum Albumin, Sigma®) a 2%.

Para a marcação da Enzima Conversora de Angiotensina I (ACE goat polyclonal C-20; Santa Cruz Biotechnology, Inc.®) foi usado anticorpo policlonal produzido em cabra na diluição de 1:400. O controle negativo foi realizado omitindo-se o anticorpo primário e colocando-se somente o substrato (BSA), no primeiro corte de cada lâmina histológica.

A seguir, foram incubados com imunoglobulina biotinilada anti-cabra (Vector®, Burlingame, EUA) na diluição de 1:1000, durante 30 minutos. Em seguida, foi acrescentada a Estreptavidina usando-se o kit ABC Vecstain Elite (Vector®, Burlingame, EUA) durante 30 minutos.

A revelação da reação IHQ foi feita usando-se diaminobenzidina (DAB) como cromógeno (Kit DAB Vector®). A contra-coloração foi feita com hematoxilina, seguida pela montagem das lâminas com Clearmount™ (Zymed® Laboratories).

Recuperação Antigênica

Recuperação antigênica é uma técnica usada para desmascarar os antígenos que foram cobertos ou alterados pela fixação, antes do início do procedimento,

A imunomarcação para Ang II já foi padronizada de acordo com o protocolo utilizado para ECA, porém, antes dos procedimentos padrão foi feita a recuperação antigênica na qual foi utilizado tampão citrato com pH = 6,0. As lâminas foram colocadas em banho-maria a 97°C. Após a recuperação antigênica ser realizada e sua temperatura normalizada (temperatura ambiente), deu-se início a técnica de IHQ propriamente dita. Foi usado o anticorpo primário Angiotensin II (Antipeptide H-8160, Bachem®) na concentração de 1:200 diluído em BSA e as lâminas incubadas overnight a temperatura de 4°C.

As lâminas passaram pelo mesmo processo padronizado de IHQ para ECA exceto pelo anticorpo secundário que no caso foi usado anti-coelho (goat anti-rabbit - Vector Laboratories®) na concentração 1:1000 diluído em PBS 1X durante 45 minutos a temp./ambiente, além disso para o uso da Streptoavidina, foi utilizado Elite ABC kit (Vectastain®), feita a revelação da imunomarcação com DAB e contracoloração com hematoxilina.

Avaliação semi-quantitativa da ECA por imunohistoquímica

A avaliação da ECA por Imunohistoquímica, foi feita de forma semi-quantitativa, usando um escore de marcação de 0 a 4 , como mostrado na tabela abaixo.

Tabela 1 - Escore de intensidade de marcação para a análise semi-quantitativa da IHQ

Escore	Marcação
0	Sem marcação
1	Pouca marcação
2	Marcação leve
3	Marcação intensa
4	Marcação muito intensa

Para a análise, os vasos foram observados em microscópio e, através do padrão de marcação anteriormente definido, foi possível classificar o escore de cada vaso. Feito isso, foi encontrada uma média de escore para cada vaso e o seu respectivo desvio padrão. Os dados encontrados foram expostos em gráficos comparando os vasos e seus diferentes tratamentos.

3.12. Quantificação dos níveis de Angiotensinas

Para a avaliação da expressão protéica, os grupos foram preparados e seus tecidos foram coletados. Os animais foram anestesiados (ketamina 90mg/kg e xylazina 10mg/kg, IP), para a coleta dos fragmentos de artérias femorais e posteriormente mortos por overdose de anestésico sendo retiradas as artérias carótidas. Para os vasos controle, foram coletados segmentos de aproximadamente 2mm na região correspondente àquela onde foi feita a lesão vascular (no vaso contralateral); já para as artérias com lesão, foi coletado o fragmento de 2mm envolto pelo cateter. Os tecidos retirados foram imediatamente congelados e mantidos em freezer -80oc até o momento das quantificações. Estes vasos coletados foram usados para a quantificação de angiotensinas I, II e 1-7, de forma a permitir uma compreensão melhor da regulação do sistema renina-angiotensina.

Protocolo de Extração de Angiotensinas

A extração das angiotensinas foi realizada em colunas Oasis C₁₈ previamente ativadas com metanol (5 mL), tetrahydrofurano (5 mL), hexano (5 mL), metanol (5 mL) e água (10 mL). Após a ativação, as amostras foram aplicadas nas colunas, lavadas com água e eluídas na mistura etanol/ácido acético/água na proporção 90%/4%/6%. Os eluatos são então liofilizados, redissolvidos em 500mL de fase móvel A (5% de acetonitrila em 0,1% de ácido ortofosfórico) e filtrados com membrana 0,22µm para serem analisados por HPLC.

Os peptídeos foram separados em uma coluna de fase reversa Aquapore ODS 300 (250 x 4,6 mm), 7 μ , utilizando 5 min de gradiente isocrático seguido por 20 minutos de gradiente linear de 5% a 35% de fase móvel B (95% Acetonitrila em ácido trifluoroacético 0,1%), sob um fluxo de 1,5 mL/min por 40 minutos por HPLC.

As angiotensinas de cada amostra foram identificadas, comparando-as com o tempo de retenção das angiotensinas padrão no HPLC.

3.13. *Análise Estatística*

Os valores expressos como média $\pm$ desvio padrão da média (DPM). Foram avaliados estatisticamente comparando-se os grupos por análise de variância (ANOVA) de dois caminhos, complementada por teste *post hoc* de Bonferroni. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de $p \leq 0,05$. [Referencia](#)

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos considerando os experimentos realizados, são apresentados na mesma ordem da metodologia. Assim, foram realizados todos os estudos experimentais, tendo-se para os três grupos investigados, peso corporal, pressão arterial e frequência cardíaca aferidos. Foram coletados os tecidos realizados as análises histológicas, bem como a quantificação das angiotensinas vasculares.

4.1 Avaliação de peso corporal e medidas hemodinâmicas

A seguir, são apresentados três momentos da avaliação de peso corporal (figura 12), onde se pode verificar que, houve ganho de peso ao longo do estudo em todos os grupos de animais, não havendo diferença significativa entre os grupos.

Figura 12: Valores dos pesos corporais medidos durante os tratamentos

Os valores obtidos para o peso corporal se relacionam de forma interessante com as variáveis hemodinâmicas, visto que também não se alteraram em função dos tratamentos. Como mostrado nas figuras 13 e 14, não verificamos diferença entre os valores de PA (figura 13) e de frequência cardíaca (figura 14) em função da sobrecarga salina em 2 ou 12 semanas.

Figura 13: medida indireta de pressão arterial sistólica por pletismografia de cauda

Figura 14: medida de frequência cardíaca por pletismografia de cauda

4.2 Análise da lesão vascular

A relação percentual entre área da túnica íntima e área da túnica média (I/M) tem sido amplamente usada para quantificar a magnitude da lesão vascular. A avaliação da relação I/M mostrou ocorrer aumento nos vasos submetidos à lesão pelo cateter perivascular em todos os grupos (Figura 15). A figura 15 apresenta os valores obtidos de lesão vascular nas artérias carótidas (figura 15A) e artérias femorais (figura 15B). Verificamos que, tanto para artérias carótidas como femorais, a sobrecarga salina por 2 semanas não alterou a magnitude da lesão vascular, comparada aos respectivos controles. Contudo, o grupo que recebeu sobrecarga salina por 12 semanas mostrou aumento na magnitude da lesão tanto nas artérias carótidas como femorais.

Figura 15 – Relação percentual entre íntima e média nas artérias carótidas sem lesão (A) e com lesão (B). * $p \leq 0,05$, comparado com grupo controle; # $p \leq 0,05$, comparado com os demais grupos. CD Carótida Direita, CE Carótida Esquerda, FD Femoral Direita, FE Femoral Esquerda, Cont controle, sal2 tratamento salina 2 semanas, sal12 tratamento salina 12 semanas.

4.3 Análise das lamelas elásticas

A quantificação das lamelas elásticas pela coloração de Weigert não mostrou modificação nos grupos tratados em relação ao controle, tanto nas artérias carótidas (figura 16A) como nas artérias femorais (figura 16B). Além disso, não verificamos alteração no número de lamelas elásticas nos vasos submetidos à lesão.

Figura 16 – Contagem média das lamelas elásticas nas artérias carótidas (A) e femorais (B).

4.4 Análise de Fibras Colágenas

A análise das fibras colágenas foi feita considerando, em luz polarizada, as fibras espessas (apresentadas em vermelho), as fibras finas (apresentadas em verde) e as intermediárias (apresentadas em amarelo). Os três tipos de fibras foram verificados em todos os vasos estudados, tanto artérias carótidas como femorais.

A análise das fibras colágenas na artéria carótida está apresentada na figura 17, onde verificamos a distribuição percentual de tipos de fibras nos vasos sem lesão (A) em comparação com os submetidos à lesão (B). É interessante verificar que o padrão de frequência das fibras colágenas tem como predominância das fibras finas (verdes), menos maduras, e que tal padrão se mantém após a lesão vascular. Contudo, a sobrecarga salina por 2 semanas apresenta uma redução importante na presença de fibras finas e um concomitante aumento na presença de fibras intermediárias (mais maduras). Outro ponto que chama a atenção é o fato de que, nos grupos tratados com salina mais cronicamente, o padrão de distribuição das fibras colágenas volta a se assemelhar ao grupo controle; contudo, uma perturbação como a lesão vascular, mostra que existe uma exacerbação nesta resposta, levando à intensa deposição dos tipos de fibras colágenas. A figura 18 apresenta fotomicrografias representativas de carótidas submetidas à lesão vascular controle (figura 18A), após 2 semanas (figura 18B) e após 12 semanas (figura 18C).

Figura 17 – Porcentagem de fibras colágenas espessas (vermelhas), finas (verdes) e intermediárias (amarelas) observadas nas artérias carótidas sem lesão (A) e com lesão (B) Cve (controle fibras vermelhas) Cvd (controle fibras verdes) Cam (controle fibras amarelas) S2 (grupo salina 2 semanas, S12 (grupo salina 12 semanas) ve(vermelho) vd(verde) am (amarela). * $p \leq 0,05$, comparado com grupo controle; # $p \leq 0,05$, comparado com os demais grupos.

Figura 18 – Fotomicrografias representativas da porcentagem de fibras colágenas observadas nas artérias carótidas com lesão observadas sem luz polarizada. A: grupo controle; B: grupo salina 2 semanas; e C: grupo salina 12 semanas. Aumento: 200x.

A avaliação da distribuição percentual das fibras colágenas nas artérias femorais apresentou resultado semelhante ao observado nas artérias carótidas, onde se verifica uma diferente distribuição das fibras colágenas no grupo que recebeu sobrecarga salina por 2 semanas (Figura 19). Contudo, no caso das artérias femorais, não verificamos alteração na quantidade de fibras depositadas se compararmos os vasos sem lesão (figura 19A) em relação aos com lesão (figura 19B).

Figura 19 – Porcentagem de fibras colágenas espessas vermelhas (ve), finas verdes (vd) e intermediárias amarelas (am) observadas nas artérias femorais sem lesão (A) e com lesão (B). * $p \leq 0,05$, comparado com grupo controle.

4.5 Estudo dos componentes do Sistema Renina-Angiotensina

Para avaliarmos a participação do sistema renina-angiotensina neste processo de resposta à lesão vascular induzida em animais submetidos à sobrecarga salina, optamos por uma análise quantitativa muito bem padronizada e aceita, que é a quantificação dos peptídios que compõem o sistema por HPLC. Por outro lado, consideramos importante associar esta quantificação à observação diretamente no vaso, sendo que para isso a IHQ se apresenta como método de escolha.

Avaliação semiquantitativa de ECA nos vasos por imunohistoquímica

A figura 19 apresenta os resultados de escore obtidos na avaliação da IHQ para ECA. Uma observação interessante a ser feita está no fato de que a intensidade das marcações para ECA correspondem à intensidade da lesão vascular observada tanto em artérias carótidas como femorais (figura 15A e 15B). Desta forma, verificamos que a lesão vascular se relaciona a um aumento na marcação para ECA em todos os grupos; contudo, os animais que receberam sobrecarga salina por 12 semanas apresentaram uma marcação mais intensa que os demais grupos (figuras 20A e 20B).

Figura 20 – Escore de marcação para ECA nas artérias carótidas (A) e femorais (B).

* $p \leq 0,05$, comparado com grupo controle; # $p \leq 0,05$, comparado com os demais grupos.

Quantificação das angiotensinas I, II e 1-7 por HPLC

A quantificação das angiotensinas vasculares por HPLC reforça os resultados obtidos no estudo com anticorpos, pela imunohistoquímica. Como pode ser observado na Figura 21 (gráficos à esquerda, A e B), existe uma alteração da relação entre Ang II e Ang (1-7) nas carótidas (sem lesão) dos animais que

receberam sobrecarga salina. Por outro lado, quando avaliamos as carótidas submetidas à lesão vascular (Figura 21, gráficos à direita, C e D), verificamos que o aumento na Ang (1-7) observado nos animais que receberam sobrecarga salina por 12 semanas persiste. Porém, chama a atenção para o fato de não termos mais redução da Ang II nos vasos com lesão dos animais com sobrecarga salina.

Figura 21: Quantificação da angiotensina I (A), e angiotensinas II e (1-7) (B) nas artérias carótidas sem lesão (gráficos à esquerda) e da angiotensina I (C), e angiotensinas II e 1-7 (D) nas artérias com lesão (gráficos à direita), conforme os grupos estudados. * $p \leq 0,05$ quando comparado aos demais grupos.

Quando avaliamos as angiotensinas na artéria femoral sem lesão (Figura 22, gráficos à esquerda, A e B), verificamos que a relação entre Ang II e Ang (1-7) é semelhante àquela observada na carótida dos animais que receberam sobrecarga

salina. Por outro lado, verificamos que estes mesmos vasos apresentaram aumento de Ang I, diferente do que foi observado para as carótidas. Ainda, no que diz respeito às femorais com lesão (Figura 22, gráficos à direita, C e D), verificamos um padrão de resposta também muito semelhante ao observado nas carótidas, tanto no que diz respeito ao aumento de Ang (1-7), à não redução de Ang II e à redução de Ang I.

Figura 22: Quantificação da angiotensina I (A), e angiotensinas II e (1-7) (B) nas artérias femorais sem lesão (gráficos à esquerda) e da angiotensina I (C), e angiotensinas II e 1-7 (D) nas artérias com lesão (gráficos à direita), conforme os grupos estudados. * $p \leq 0,05$ quando comparado aos demais grupos.

5. DISCUSSÃO

As conclusões do estudo foram que a ingestão elevada de sal aumenta a magnitude da lesão vascular, sem incrementos de pressão arterial. Além disso, interfere na deposição de colagénio vascular e na síntese de ang II e ang (1-7), possivelmente relacionadas com este aumento da lesão.

Observou-se que o tratamento elevado de sal não alterou os parâmetros hemodinâmicos, como pressão arterial e frequência cardíaca. Estes achados são consistentes com estudo anterior em ratos (Lacchini et. Al., 2001), onde não se esperava observar um aumento da pressão arterial em animais normotensos que receberam solução salina 1% para beber. Muitos estudos clínicos e experimentais associaram o consumo elevado de sal e o aumento da pressão arterial (Frisoli et al., 2012). No entanto, existem outros estudos que sugerem que uma elevada ingestão de sal pode ser diretamente associada com o risco de acidente vascular cerebral, hipertrofia ventricular esquerda, e outros.

A razão entre a área da túnica íntima e túnica média (razão I/M) tem sido amplamente utilizada para quantificar a magnitude da lesão vascular em artérias femorais e carótidas. Esta morfometria informa claramente a resposta neointimal após a lesão. Além disso, está bem estabelecido que o implante de um cateter perivascular é capaz de induzir uma reação inflamatória local, o qual é responsável pela formação de neointima. Embora não se tenha observado alterações na pressão arterial, pode-se considerar que a sobrecarga salina determina um ajustate que deve

influenciar a magnitude da lesão. A diferença de magnitude lesão medida no grupo submetido a 12 semanas de sobrecarga salina sugere que existe um desequilíbrio de fatores reguladores. Estudos clínicos têm demonstrado que pacientes sensíveis ao sal aumentam marcadores inflamatórios, em comparação com sal-resistentes (Larrousse et al., 2006). Além disso, as observações experimentais em ratos normotensos mostram que a sobrecarga salina pode promover a formação da neoíntima, mesmo em ratos normotensos, e que hipertensão pode exacerbar esta formação neointimal (Takeda et al., 2008).

A quantificação das lamelas elásticas por Weigert não mostrou nenhuma mudança nos grupos tratados em comparação com o controle, tanto nas artérias carótidas e das artérias femurais. O fato de não termos verificado diferenças entre os tratamentos sugere que o estímulo oferecido pela sobrecarga salina não foi suficiente para determinar uma mudança ou adaptação significativa no sistema elástico. No entanto, uma avaliação mais detalhada pode mostrar se a sobrecarga de sal efetivamente altera o sistema elástico. Por outro, a análise das fibras de colágeno nas artérias carótidas mostra uma distribuição percentual com predominância de fibras finas (verde), menos maduras, sugerindo uma possível renovação constante do sistema de colágeno, e que esse padrão se mantém após a lesão vascular. Contudo, a sobrecarga salina parece alterar a deposição e a degradação das fibras de colagénio, uma vez que, após 2 semanas de sobrecarga, existe uma redução substancial da presença das fibras finas (possivelmente por redução de sua síntese), mas também existe um aumento na presença de fibras de intermediárias (mais maduras), provavelmente devido a uma redução na degradação

das fibras existentes. Outro ponto que se destaca é o fato de que, nos camundongos tratados mais cronicamente com solução salina, o padrão de distribuição das fibras colágenas volta a se assemelhar com o grupo controle. No entanto, uma perturbação tecidual, como uma lesão vascular, mostra uma exacerbação neste sistema e leva a uma intensa deposição dos três tipos de fibras de colagénio. A avaliação da distribuição percentual das fibras de colágeno nas artérias femorais mostrou resultados semelhantes aos observados nas artérias carótidas, onde há uma distribuição diferente das fibras de colágeno no grupo que recebeu sobrecarga salina por 2 semanas. O aumento da deposição de colágeno foi descrito anteriormente, em ratos. Foi demonstrado que a sobrecarga salina (1%) induz a deposição de colagénio na carótida de ratos espontaneamente hipertensos stroke-prone (Levy et al., 1997), e se associa com a fibrose cardíaca em ratos espontaneamente hipertensos (Varagic et al., 2008). Além disso, a sobrecarga salina leva à proliferação da neoíntima e a lesões necróticas nas artérias intrarrenais de SHR (Limas et al., 1980). Estas observações trazem uma perspectiva muito interessante, o que sugere que o sistema de colagénio é sensível à quantidade de sal consumido e que, participa do processo de indução da rigidez arterial. Considerando os estudos com sobrecarga salina, um ponto importante a destacar é a presença de hipertensão nestes estudos. Considerando que a hipertensão aumenta marcadores inflamatórios que podem contribuir com a hipertensão "per se", a deposição de colágeno e a lesão vascular, o presente estudo traz a ideia de que alguns processos na parede vascular podem ocorrer independentemente de aumento da pressão arterial.

Uma observação interessante a ser feita é o fato de que a intensidade da marcação positiva para a ECA por imunohistoquímica corresponde à intensidade da lesão vascular observada em ambas as artérias carótida e femoral. Num estudo anterior, foi descrita a relação entre o aumento das cópias do gene da ECA, a atividade da ECA vascular e a lesão vascular em camundongos geneticamente modificados (Lacchini et al., 2009). Além disso, verificou-se no presente estudo que a lesão vascular está relacionada com um aumento da marcação de ECA em todos os grupos. Contudo, os animais que receberam sobrecarga salina durante 12 semanas mostraram uma marcação mais intensa do que os demais. Por outro, a quantificação da angiotensina vascular por HPLC reforça os resultados obtidos no estudo de imunohistoquímica.

Neste sentido, verificamos que tanto as artérias femorais e como carótidas mostraram uma alteração da relação de Ang II e Ang (1-7) em animais que receberam sobrecarga salina. Neste grupo, ocorreu uma redução significativa de Ang II e aumento progressivo de Ang (1-7), o que pode representar um mecanismo de proteção, em condições fisiológicas vasculares, possivelmente pela alteração da actividade de enzimas formadoras de Ang II (ECA reduziria) e ang (1-7) (ECA2 aumentaria). Embora não tenhamos avaliado a atividades destas enzimas, temos dois indícios que corroboram esta ideia: 1) nestes mesmos vasos não verificamos alteração de Ang I, sugerindo que a ECA2 está eventualmente clivando Ang II em Ang (1-7); e 2) a marcação positiva para ECA na imunohistoquímica das carótidas sem lesão, embora não nos demonstre a atividade propriamente desta enzima, pode se relacionar a uma não alteração na sua regulação neste caso.

Além disso, a avaliação das artérias carótidas e femoral submetidas à lesão vascular, demonstram que o aumento da Ang (1-7) observado nos animais que receberam a sobrecarga salina persiste durante 12 semanas. Recentemente, o receptor Mas de Ang (1-7) (Varagic et al., 2008), e a atividade de renina plasmática (Chandramohan et al., 2008) foram associados à hipertensão sal-sensível.

Neste sentido, podemos considerar que a produção ang (1-7) e também a síntese do receptor Mas estão relacionadas com a adaptação vascular à elevada ingestão de sal. No entanto, é importante atentar para o fato de não verificarmos redução de Ang II nas artérias com lesão dos animais com sobrecarga salina. Possivelmente existe, nestes vasos, um aumento da atividade da ECA, o que pode ser sugerido tanto pela redução de Ang I (significativa no grupo tratado por 12 semanas), como pela marcação positiva aumentada para ECA na imunohistoquímica.

6. **Conclusões**

Considerando os objetivos propostos, os resultados obtidos permitem concluir que a sobrecarga salina leva a adaptações vasculares que:

- leva ao aumento de neoíntima nas artérias carótidas e femorais submetidas à lesão, com alteração concomitante da rede colágena;
- altera a relação entre angiotensinas II e (1-7) tanto em vasos sem lesão como nos com lesão, de forma possivelmente propiciar o aumento de relação íntima/média observado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chandramohan G, Bai Y, K. Norris, Rodriguez-Iturbe B., Vaziri ND. Effects of Dietary Salt on Intrarenal Angiotensin System, NAD(P)H Oxidase, COX-2, MCP-1 and PAI-1 Expressions and NF- κ B Activity in Salt-Sensitive and -Resistant Rat Kidneys. *Am J Nephrol* 2008;28:158–167
- Dzau VJ, Krieger JE, Hutchinson HG. Molecular mechanisms of hypertension. In: *molecular Cardiovascular Medicine*. New York, Chap. 15, E Haber Ed. Scientific American Inc., 1995; pp 225-242.
- Frisoli TM, Schmieder RE, Grodzicki T, Messerli FH. Salt and Hypertension: Is Salt Dietary Reduction Worth the Effort? *The American Journal of Medicine* (2012) 125, 433-439.
- Gibbons GH, Dzau VJ. Mechanisms of disease: the emerging concept of vascular remodeling. *New Engl. J. Med.*, 1994; 330: 1431-1438.
- Gimbrone Jr. MA, Nagel T, Topper JN. Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *J. Clin. Invest.*, 1997; 99:1809-1813.
- Gonzalez M, Lobos L, Castillo F, Galleguillos L, Lopez NC, Michea L. High-salt diet inhibits expression of angiotensin type-2 receptor in resistance arteries. *Hipertensión*, 2005. 45:853-859.

- Hackenthal E, Nobiling R., Renin-angiotensin system. B: Renin secretion and its regulation. In: Swales JD (ED) Textbook of Hypertension, Oxford Chap. 11, Blackwell Sci. Public, 1994. Pp 232-234.
- Harrison-Bernard, L. M. The renal Renin-Angiotensin System. *Adv Physiol Educ* 33, p.: 270–74; 2009.
- Imai, Y.; Kuba, K.; Ohto-Nakanishi, T.; Penninger, J. M. Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) in Disease Pathogenesis. *Circulation Journal Official Journal of the Japanese Circulation Society. Vol.74, p.405-10*: 2010.
- Irigoyen MC, Lacchini S, DeAngelis K, Michelini L. Fisiopatologia da hipertensão: o que avançamos? *Revista da Sociedade de cardiologia do estado de São Paulo*, 1:20-45, 2003;
- Irigoyen MC, Lacchini S, DeAngelis K, Pereira AC, Krieger JE, Krieger ME. Fisiopatologia da hipertensão arterial. In: Tratado de cardiologia SOCESP. Cap 3, Nobre F e Serrano Jr CV, 2ª Ed, Ed. Manole , pp. 413-435, 2009;
- Kobayashi H, Takei Y. The Renin-Angiotensin System – comparative aspects. Berlin: Spring-Verlag, 1996.
- Lacchini S, Heimann AS, Evangelista FS, Cardoso L, Silva GJ, Krieger JE. *Physiol Genomics*. Cuff-induced vascular intima thickening is influenced by titration of the Ace gene in mice. 2009 May 13;37(3):225-30.
- Lacchini S, Heimann AS, Evangelista FS, Cardoso L, Silva GJ, Krieger JE. *Physiol Genomics*. Cuff-induced vascular intima thickening is influenced by titration of the Ace gene in mice. *Physiol Genomics*, 37 (3) :225-30, 2009.

- Larrousse M, Bragulat E, Segarra M, Sierra C, Coca A, de La Sierra A. Increased Levels of Atherosclerosis Markers in Salt-Sensitive Hypertension. *Am J Hypertens* 2006;19:87–93
- Levy BI, Poitevin P, Duriez M, Guez DC, Schiavi PD, Safar ME. Sodium, survival, and the mechanical properties of the carotid artery in stroke-prone hypertensive rats. *J Hypertens*. 1997 Mar;15(3):251-8.
- Limas C, Westrum B, Limas CJ, Cohn JN. Effect of salt on the vascular lesions of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1980 Jul-Aug;2(4):477-89.
- Nguyen G, Delarue F, Burcklé C *et al*. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 2002; 109: 1417–1427.
- Oigman, W.; Neves, M. F. T. Sistema renina-angiotensina e hipertrofia ventricular esquerda. *Rev Bras Hipertens vol 7(3), p. 261-7: julho/setembro de 2000.*
- Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *New. Engl. J. Med.*, 340:115-126, 1999;
- Shnermann J, 1998 Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *Am J Physiol*. 274:R263-R279.
- Schnermann J, Briggs JP. The macula densa is worth its salt. *J Clin Invest*. 1999 Oct;104(8):1007-9.
- Simon G, Jaeckel M, Illtes G. Altered structure and distensibility of arteries en salt-fed rats. *J Hypertens*, 2003, 21:137-43.

- Stamenkovic I. Extracellular matrix remodeling: the role of matrix metalloproteinases. J Pathol 2003; 200:448-464;
- Takeda R, Suzuki E, Takahashi M, Oba S, Nishimatsu H, Kimura K, Nagano T, Nagai R, Hirata Y. Calcineurin is critical for sodium-induced neointimal formation in normotensive and hypertensive rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol 294: H2871–H2878, 2008.
- Tamura K. et al. Recent advances in the study of renin and angiotensinogen genes: from molecules to the whole body. Hypertens. Res. v.18, p.7-18, 1995.
- Tulis DA, Unthank JL, Prewit RL. Flow-induced arterial remodeling in rat mesenteric vasculature. Am. J. Physiol., 274:H874-H882, 1998.
- Varagic J, Frohlich ED, Susic D, Ahn J, Matavelli L, Lopez B, Diez J. AT1 receptor antagonism attenuates target organ effects of salt excess in SHR without affecting pressure. Am J Physiol Heart Circ Physiol 294: H853–H858, 2008.

8. ANEXOS

APROVAÇÃO

O Coordenador da CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 09.11.11, após atendimento a diligência encaminhada **APROVOU *ad-referendum*** o Protocolo de Pesquisa nº 044/11 intitulado: "Efeito da sobrecarga salina sobre a resposta à injúria vascular em camundongos: possível participação do sistema renina-angiotensina", apresentado pelo Programa de Fisiopatologia Experimental.

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

Pesquisador (a) Responsável: Silvia Lacchini

Pesquisador (a) Executante: Cintia Taniguti Lima

CEP-FMUSP, 09 de novembro de 2011.

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

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador interino
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire 1º andar CEP 01248-903 – Fone : 3061-8004
mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br