Cintia Taniguti Lima

Estudo da inflamação e deposição de colágenos associados ao aumento da lesão vascular induzida por cateter perivascular em camundongos submetidos à sobrecarga salina

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

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Silvia Lacchini

**São Paulo
2020**

Cintia Taniguti Lima

Estudo da inflamação e deposição de colágenos associados ao aumento da lesão vascular induzida por cateter perivascular em camundongos submetidos à sobrecarga salina

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

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Silvia Lacchini

**São Paulo
2020**

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

Estudo da inflamação e deposição de colágenos associados ao aumento da lesão vascular induzida por cateter perivascular em camundongos submetidos à sobrecarga salina / Cintia Taniguti Lima. -- São Paulo, 2020.

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

Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Silvia Lacchini.

Descritores: 1.Colágeno 2.Cloreto de sódio
3.Inflamação 4.Imuno-histoquímica 5.Arterias carótidas
6.Arteria femoral

USP/FM/DBD-070/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Agradecimentos:

Gostaria de agradecer a Profa Dra Maria Claudia Irigoyen do Laboratório de Hipertensão Experimental do InCor, pois sem ela muito disso seria possível; pois foi quem me incentivou desde do começo, desde o exame de proeficiência. Nunca poderei retribuir o que fez por mim, um pessoa que depositou tanta confiança, me recebeu de braços abertos e sempre me auxiliou em tudo. Também aos técnicos e alunos de seu laboratório, que sempre me ajudaram, meu muito obrigada.

Agradeço ao Professor José Eduardo Krieger do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCorpelo empréstimo do sistema de pletismografia de cauda para executar este projeto.

À CAPESP por te fornecido auxílio financeiro com a bolsa de Doutorado.

À banca de qualificação, que me auxiliou para o término da tese, sugerindo pontos importantes para essa conclusão.

Aos meus queridos colegas de laboratório, muito obrigada pelo companheirismo, bons momentos e loucuras dos mutirões de laboratório.

A minha orientadora, professora, amiga, para quem não tenho palavras para expressar minha gratidão. Você sempre me acolheu e me orientou no

laboratório e na vida. Tudo que eu sei até hoje devo a você, Sua paciência e inteligência é um exemplo a seguir!

Ao meu esposo que me acompanhou em toda trajetória, sempre me incentivando, me apoiando e enxugando minhas lágrimas, meu porto seguro, sempre com palavras de sabedoria me fazendo enxergar a decisão certa a ser tomada. Olho o caminho percorrido de 22 anos de convivência e vejo o meu companheiro ideal. Obrigada por seguir essa trajetória ao meu lado, sem você seria impossível!

Ao meu filho, peço desculpas por muitos dias em que o deixei para ir trabalhar, o meu mau humor pelo cansaço, e os dias intermináveis que teve que ir trabalhar comigo (sentado imóvel em uma cadeira por horas a fio, chegava até dormir....). Meu amor, espero que um dia você entenda que sou mãe! Mas também tenho muitas responsabilidades do trabalho e nunca te abandonarei. Te amo!

Lista de abreviaturas

°C = Graus Celcius

ABC = Método de imunohistoquímica usando Estreptavidina–Biotina–
Peroxidase

Ac = Anticorpo

Ang I = Angiotensina I

Ang II = Angiotensina II

ANOVA = Análise de Variância

CD = Artéria carótida direita

CD45 – antígeno comum de leucócitos

CE = Artéria carótida esquerda

Col IV – colágeno do tipo IV

Col VII – colágeno do tipo VII

Cont = Grupo Controle

DAB = 3,3 Diaminobenzidina

DPM = Desvio Padrão da Média

ECA = Enzima Conversora de Angiotensina I

FC = Frequência cardíaca

FD = Artéria femoral direita

FE = Artéria femoral esquerda

g = grama

GAG = Glicosaminaglicana

IHQ = Imunohistoquímica

IL-6 – interleucina 6

MEC = Matriz Extracelular

MMP2 – metaloproteinase de matriz 2

Na = Sódio

NaCl = Cloreto de sódio

OMS = Organização Mundial de Saúde

PAS = Pressão arterial sistólica

PG = Proteoglicana

PVAT = Tecido Adiposo Perivascular

Sal-12 = Grupo tratado com Salina 1% por 12 semanas

Sal-2 = Grupo tratado com Salina 1% por 2 semanas

SRA = Sistema renina-angiotensina

TGF- β = Fator de crescimento transformante- β

Lista de Tabelas

		página
TABELA 1	Distribuição dos grupos experimentais, procedimentos executados e tempos de tratamento	33
TABELA 2	Apresentação dos anticorpos primários utilizados, suas diluições, condições de recuperação antigênica e diluições utilizadas para o procedimento de Imunohistoquímica (IHQ).	47
TABELA 3	Apresentação dos anticorpos secundários utilizados para cada anticorpo primário e suas diluições	48
TABELA 4	Escore de intensidade de marcação para a análise semi-quantitativa da IHQ	49

Lista de Figuras

	página
Figura 1	Esquema representativo de como foram realizados os tratamentos, os momentos da indução da lesão vascular e a coleta dos tecidos. 35
Figura 2	Esquema do sistema de medida de pressão caudal utilizado nos experimentos 36
Figura 3	Imagens representando as etapas da implantação do cateter em torno da artéria femoral. 40
Figura 4	Esquema geral de procedimentos histológicos e análises microscópicas 42
Figura 5	Fotomicrografias representativas de um detalhe da parede vascular na fotomicrografia à esquerda: corte de uma artéria femoral controle, na disposição de coleta, com os tecidos adjacentes. 43
Figura 6	Fotomicrografias representativas de detalhes das artérias sem lesão (à esquerda) e com lesão (à direita). 44
Figura 7	Valores medidos de peso corporal, acompanhados semanalmente 51
Figura 8	Balanco hídrico e alimentar (avaliado por gaiola metabólica) em 24 horas 53
Figura 9	A pressão arterial sistólica (PAS) e a frequência cardíaca 54
Figura 10	Proporção íntima/média (%) nas artérias carótida e femoral 55
Figura 11	Porcentagem da deposição total de fibras de colágeno nas artérias carótidas e femorais. 56
Figura 12	Deposição de Col IV na túnica média das artérias carótidas e femorais. 57
Figura 13	Deposição de Col VII nos meios túnicos das artérias carótidas e femorais. 57
Figura 14	Expressão da MMP2 na túnica média das artérias carótida e femoral 58

		Página
Figura 15	Células carotídeas CD45 positivas em adventícia e tecido adiposo perivascular (PVAT).	59
Figura 16	Células femorais CD45 positivas em adventícia e tecido adiposo perivascular (PVAT).	60
Figura 17	Expressão de IL-6 and carotídea e femoral na túnica média	61
Figura 18	Expressão de galectina-3 nas artérias carótida e femoral na túnica média.	62
Figura 19	Expressão carotídea e femoral de TGF- β na túnica média	63

Resumo

Lima CT. *Estudo da inflamação e deposição e colágenos associados ao aumento da lesão vascular induzida por cateter perivascular em camundongos submetidos à sobrecarga salina* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Sabe-se que a ingestão excessiva de sódio na dieta afeta a função cardiovascular, abre-se a necessidade de entender se a sobrecarga salina altera a estrutura arterial, bem como sua resposta a uma lesão induzida. Neste contexto, estudos anteriores demonstraram que ocorre um aumento na magnitude da lesão vascular em camundongos submetidos à sobrecarga salina e que tal resposta parece se relacionar à produção local de angiotensinas II e (1-7). Considerando que a angiotensina II apresenta importante ação pró-inflamatória, desenvolvemos a hipótese de que este aumento na lesão vascular verificado nos camundongos submetidos à sobrecarga salina está relacionado a um aumento na resposta inflamatória, que poderia ser modulada pela produção local de angiotensinas. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi o de caracterizar a resposta inflamatória após indução da lesão por cateter perivascular nas artérias carótida e femoral de camundongos submetidos à sobre carga salina. Para tal, camundongos C57Bl6 machos foram distribuídos em grupos: controle ou recebendo solução de NaCl 1% por 2 ou 12 semanas. Duas semanas antes do final dos experimentos, um cateter de 2mm de comprimento foi implantado em torno das artérias carótida e femoral esquerdas para induzir a lesão vascular. Ao final do estudo, a pressão arterial foi medida por pletismografia de cauda. As artérias foram coletadas e preparadas para análise histológica (Verhoeff-Van Gieson para medida da lesão vascular e picrossirius para medida da deposição e colágeno) e por imunohistoquímica (para colágenos não fibrilares, infiltrado inflamatório e marcadores inflamatórios). A sobrecarga salina não induziu alteração importante na pressão arterial, mas foi capaz de aumentar a lesão arterial induzida pelo cateter perivascular. Embora a lesão vascular aumente a deposição de colágeno em todas as artérias, este foi significativo apenas nas femorais dos grupos salina. Além disso, a lesão vascular associada à sobrecarga salina também aumentou a expressão de colágeno IV e MMP2, sugerindo que o tratamento leve a um remodelamento da matriz extracelular mais pronunciado. Embora a indução a lesão vascular aumente a expressão de IL-6 nas carótidas de forma semelhante em todos os grupos, o infiltrado de células inflamatórias (CD45+) é significativamente maior no tecido adiposo perivascular nas artérias dos grupos salina que sofreram lesão. Este aumento na resposta inflamatória pode estar associado com o aumento de deposição de colágenos, o que pode ser explicado pelo aumento importante da expressão de TGF- β nas duas artérias, mesmo sem lesão induzida. Desta forma, a modulação do TGF- β pode ser o mecanismo que permite explicar a exacerbação nas respostas à lesão vascular observadas nos animais que recebem sobrecarga salina.

Descritores: Colágeno; Cloreto de sódio; Inflamação; Imuno-histoquímica; Artérias carótidas; Artéria femoral.

Abstract

Lima CT. *Study of inflammation and deposition and collagen associated with increased vascular injury induced by perivascular catheter in mice subjected to saline overload* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

It is known whether an excessive intake of sodium in the diet affects cardiovascular function, opening up a need to understand whether overloading saline alters the arterial structure, as well as its response to an induced injury. In this context, previous studies have shown that there is an increase in the magnitude of vascular lesions in mice, which are caused by excess saline and that this response seems to be related to the local production of angiotensin II and (1-7). Angiotensin II has an important pro-inflammatory action, developing a hypothesis of increased vascular damage caused by mice that affects the saline overload is related to an increase in the inflammatory response, which could be modulated by the local production of angiotensin. Thus, the aim of the present study was to characterize an inflammatory response after inducing injury by a perivascular catheter in the carotid and femoral arteries of mice applied to overload saline. For this, the male C57Bl6 were distributed in groups: control or 1% NaCl solution for 2 or 12 weeks. Two weeks before the end of the experiments, a 2 mm long catheter was implanted around the left femoral and carotid arteries to induce vascular injury. At the end of the study, blood pressure was measured by tail plethysmography. As arteries were collected and prepared for histological analysis (Verhoeff-Van Gieson to measure vascular injury and picrosirius to measure deposition and staining) and by immunohistochemistry (for non-fibrillar collagens, inflammatory infiltrates and chemical markers). An overload of saline did not induce significant changes in blood pressure, but was able to increase the arterial injury induced by the perivascular catheter. Although vascular injury increases the deposition of all arteries, it was significant only in the celebrations of saline groups. In addition, a vascular lesion associated with saliva overload also increased the expression of IV and MMP2, suggesting that the treatment leads to a more pronounced extracellular matrix remodeling. Although inducing vascular injury increases the expression of IL-6 in the carotids in a similar way in all groups, the infiltration of inflammatory cells (CD45 +) is significantly greater in the perivascular adipose tissue in the arteries of the injured saline groups. This increase in the inflammatory response may be associated with increased collagen deposition, which can be explained by the significant increase in the expression of TGF- β in both arteries, even without induced injury. Thus, modulation of TGF- β may be the mechanism that explains the exacerbation in the responses to vascular injury observed in animals that receive saline overload.

Descriptors: Collagen; Sodium chloride; Inflammation; Immunohistochemistry; Carotid arteries; Femoral artery

Sumário

	Página
Lista de abreviaturas	i
Lista de Tabelas	iii
Lista de Figuras	iv
Resumo	vi
Abstract	vii
1. Introdução	1
1.1. Relação da sobrecarga salina com a regulação cardiovascular	1
1.2. Adaptações da parede vascular mediadas pela sobrecarga salina	5
1.3. Alterações na parede vascular após lesão: influência da sobrecarga salina	7
1.4. Justificativa	10
2. Objetivos	11
3. Materiais e Métodos	12
3.1. Animais	12
3.2. Grupos experimentais	13
3.3. Protocolo experimental	14
3.4. Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca por pletismografia de cauda	16
3.5. Avaliação em gaiola metabólica por 24 horas	18
3.6. Indução da lesão vascular/ cateter perivascular	20
3.7. Eutanásia e coleta de tecidos	21
3.8. Processamento histológico e morfometria	22
3.9. Avaliação da lesão vascular	23

		Página
3.10	Avaliação da rede colágena vascular pela coloração de Picrosírius	26
3.11	Avaliação dos marcadores inflamatórios e de componentes da MEC por imunohistoquímica	26
3.12	Análise Estatística	31
4	RESULTADOS	32
4.1	Avaliação lesão vascular determinada pela razão íntima/média	35
4.2	Avaliação da deposição de fibras de colágeno	36
4.3	Estudo do infiltrado celular e marcadores inflamatórios	40
5	Discussão	45
5.1	Estudo da relação entre a sobrecarga salina com alterações de pressão arterial e frequência cardíaca	45
5.2	Avaliação das modificações da matriz extracelular envolvidas na rigidez arterial e no desenvolvimento da lesão vascular	46
5.3	Verificação se a sobrecarga salina leva a uma alteração no infiltrado inflamatório e em marcadores inflamatórios locais que podem ser associados com a lesão vascular	47
6	Conclusões	49
7	Referências Bibliográficas	50
8	Anexo	56

1. Introdução

1.1 Relação da sobrecarga salina com a regulação cardiovascular

A evolução de humanos e demais primatas aconteceu inicialmente em condições de acesso reduzido ao sal. Naquelas condições, o aporte de sal na dieta provinha de alimentos naturais, sendo inferior a 0,5 g de sal (0,2 g de sódio) por dia (MACGREGOR, 1998). Contudo, a ingestão de sal aumentou ao longo da história humana, especialmente pela descoberta de seu uso para a preservação de alimentos.

No Brasil, assim como nos demais países industrializados, a ingestão de cloreto de sódio e alimentos processados se encontra muito acima do limite aceitável. Segundo Organização Mundial de Saúde, ingere-se no Brasil cerca de 11g/dia de NaCl por dia, Organização Mundial da Saúde (OMS 2019) sendo que para diminuição de risco de doenças cardíacas e derrames cerebrais o recomendado é de 5g de NaCl ou 2g de sódio e pelo menos 3,51g de potássio por dia. Atualmente, o consumo de alimentos processados com grande quantidade de sal constitui um problema de saúde pública importante (LIMA et al, 2017).

Este aumento do consumo de sal, representa um grande desafio para os sistemas fisiológicos para excretar essas grandes quantidades de sal, e uma consequência é um aumento gradual da pressão arterial (PA), (HE et al 2010; INTERSALT, 1998) aumentando assim o risco de complicações cardiovasculares associadas à hipertensão (MENTE et al., 2014). Entre estas

complicações, estão o acidente vascular cerebral, ataque cardíaco, insuficiência cardíaca e doença renal. Além disso, uma alta ingestão de sal pode ter efeitos diretos no acidente vascular cerebral (PERRY et al 1992; TOBIAN et al 2010) infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, hipertrofia ventricular esquerda (HVE) (MERSSELLI et al 1997) doença renal (CIANCIARUSO et al 1998). A relação entre o sal e os mecanismos de controle vascular tem sido melhor compreendida, e hoje a sua ingestão é considerada como um dos principais mecanismos de estresse e risco cardiovascular.

Desta forma, evidenciou-se a necessidade de estudar o impacto que a dieta rica em sal causa sobre o sistema cardiovascular, abrindo um campo rico de estudos experimentais. Entre as décadas de 1960 e 1970, começaram a ser realizados estudos utilizando como modelo de dieta rica em sódio a sobrecarga vinda pela água de beber contendo NaCl 1%. Este modelo, associado à redução da massa renal ou ao tratamento com substâncias como a angiotensina II (Ang II), permitiram entender como os rins processam o conteúdo de sódio e eliminam seu excesso, mantendo os níveis de pressão arterial estável (IMAI et al, 2010). Num período subsequente, passou a ser largamente empregada a sobrecarga de 4% a 8% de NaCl na ração, visto ser capaz de induzir o desenvolvimento de hipertensão arterial em tempos relativamente curtos e não necessitava de ações concomitantes que reduzissem a capacidade renal de excretar sódio. Contudo, estes modelos de sobrecarga salina envolvendo altos valores de NaCl ultrapassam em muito a palatabilidade da ração e também a proporção da carga de sódio ingerida em estudos com humanos.

Assim, torna-se importante pensar num modelo de alta ingestão de sal que se aproxime das observações feitas na população humana. Isso significa que, considerando a realidade brasileira, o modelo melhor seria aquele que corresponda à ingestão entre 10 de sal por dia. Levando em conta peso corporal e taxa metabólica, estima-se que a sobrecarga de 1% de NaCl em ratos e camundongos corresponde a uma dose diária de 5 a 10 g de sal em humanos (FOLKOW, 1992). Desta forma, pode-se trabalhar com um modelo experimental que recebe uma carga de sódio aproximadamente duas vezes maior que o máximo recomendado pela OMS.

Estudos em ratos e humanos, mostraram que o aumento da concentração de sal na dieta se relaciona com o aumento de pressão arterial, possivelmente por alteração de peptídios vasoativos, mecanismos vasodilatadores ou aumento de estresse oxidativo, entre outros (BAYORH et al., 2004). Desta forma, a sobrecarga de sal elevaria a pressão arterial, levando a alterações estruturais e funcionais em órgãos-alvo, como coração e rins (FROLICH et al, 2005), ou mesmo em artérias (SAFAR et al., 2000). Neste momento, surge o desafio de interpretar os efeitos cardiovasculares que a sobrecarga salina desencadeia e entender o que ocorre independente da hipertensão. Este desafio é importante, visto que está bem estabelecido o um pacto que a pressão arterial exerce sobre o sistema cardiovascular, levando ao aumento da massa ventricular esquerda, remodelamento do ventrículo esquerdo, bem como fibrose vascular, cardíaca e renal (SUSIC e FROHICH, 2012). Estes efeitos em humanos levaram ao conceito de que a sobrecarga salina na dieta seja considerada um fator de risco cardiovascular independente (DUCAILAR et al.,2002).

A partir destes conceitos, torna-se importante entender que um modelo de sobrecarga salina que não induz hipertensão arterial se aproxima muito mais do dia-a-dia da população humana, visto que a maioria ingere carga elevada de sal (a população brasileira ingere mais de duas vezes o recomendado pela OMS) e não apresenta hipertensão.

Considerando que a ingestão de solução salina 1% se aproxima com a carga diária de 10g em humanos e, sem outros tratamentos concomitantes não induz alteração de pressão arterial, tem-se que o modelo de sobrecarga salina 1% na água é um excelente modelo para testar as ações que o excesso de sal induz antes do indivíduo se tornar hipertenso. Existem diversos estudos na literatura mostrando não ocorrer alteração importante da pressão arterial nem em curtos períodos de tratamento (WASHINO et al, 2018) e nem em períodos mais crônicos, como 6 semanas (LACCHINI et al, 2001) ou 12 semanas (LIMA et al., 2015; SILVA et al, 2013). O fato deste modelo não induzir aumento importante da pressão arterial permite compreender que as adaptações cardiovasculares que ocorrem se dão de forma independente da PA. Como grande parte destes estudos foi desenhada para explicar os processos envolvidos com a manutenção da hipertensão, os mecanismos relacionados ao controle de pressão arterial em indivíduos normotensos com sobrecarga salina ainda não estão totalmente esclarecidos. Também não está claro até que ponto os sistemas de regulação de pressão estão adaptados à sobrecarga salina (YANG et al 2017).

1.2 Adaptações da parede vascular mediadas pela sobrecarga salina

As doenças vasculares acometem tanto artérias elásticas como de resistência e são a principal causa de morbidade e mortalidade na sociedade ocidental (BAUER et al, 2014). 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 (SEBASTIAN et al 2018).

O desenvolvimento de hipertensão sistólica com consumo elevado de sódio pode ser o resultado da rigidez arterial que por sua vez, pode resultar em dilatação arterial induzida pelo aumento do fluxo sanguíneo e tensão de cisalhamento (SIMON, 2003). Embora o Tratado de Medicina Interna do Imperador Amarelo citasse há 5000 anos atrás que a alta ingestão de sal se relaciona com o aumento na força do pulso arterial, a medicina ocidental fez esta associação apenas há poucas décadas. Em 1960, Dahl publicou, pela primeira vez, revisão apontando a associação entre o consumo de NaCl e o desenvolvimento de hipertensão arterial (DAHL, 1960). Além disso, hoje se sabe que a dieta baixa em sódio (44 mmol / dia, durante 25 meses) em indivíduos normotensos reduz a rigidez arterial, indicando que o sódio na dieta pode ter um efeito arterial independente da pressão, sobre as propriedades viscoelásticas das artérias. (AVOLIO, et al). Desta forma, pode-se considerar

que a rigidez arterial sofre efeito da ingestão de sal tanto em condições de normalidade de pressão arterial como na hipertensão.

Estudos realizados em nosso laboratório indicaram que a sobrecarga salina em camundongos pelos tempos de 2 e 12 semanas leva a alterações diferentes em artérias de resistência e artérias de condução (elásticas). Artérias elásticas como aorta tendem a aumentar a deposição de fibras colágenas, especialmente de fibras espessas de colágeno, na túnica adventícia, sugerindo um aumento de rigidez (SILVA et al., submetido). Por outro lado, em vasos de resistência como artérias cardíacas, a deposição de fibras de colágeno é diminuída nos animais recebendo sobrecarga salina.

Além de colágeno, a matriz extracelular (MEC) vascular é uma rede dinâmica composta por proteínas estruturais, proteoglicanos, fatores de crescimento, citocinas e enzimas que fornecem um arcabouço essencial para organização estrutural de artérias e veias. Alterações na deposição, composição e organização da MEC podem afetar negativamente a função da estrutura estudada. A regulação da homeostase da MEC depende de um equilíbrio complexo entre fatores bioquímicos, forças mecânicas percebidas através de interações célula-MEC e célula-célula. Os diferentes grupos de proteínas da matriz extracelular (como colágenos tipo I e III ou fibronectina) podem ser acumulados em excesso e desenvolver fibrose vascular (PESSANHA et al., 1999).

Outro elemento importante são as glicosaminoglicanas (GAGs), que, embora sejam menos estudados, estão entre os principais componentes da MEC de vários tecidos, inclusive as artérias. AS GAGs podem formar longos blocos de

polissacarídeos, podem se ligar covalentemente a proteínas e formar proteoglicanas (PGs) ou podem permanecer como polissacarídeos livres (FRANCYNE et al., 2017; KISELOVA et al 2014; COUCHMAN et al, 2012). As PGs estão associadas a várias funções fisiológicas, tais como estado de hidratação tecidual. Especificamente, as cargas negativas destas moléculas permitem a atração por íons carregados positivamente, como sódio e, por seu efeito higroscópico, a adsorção de moléculas de água. Assim, o tecido torna-se apto a suportar forças de compressão ou mesmo a realizar seleção por carga, no caso da filtração glomerular. Além disso, alguns estudos associam a presença de PGs com a formação de fibrilas de colágeno, modificação da atividade do TGF- β , interação com receptores de superfície celular, angiogênese e outros processos relacionados ao remodelamento vascular (IOZZO, 1998).

1.3 Alterações na parede vascular após lesão: influência da sobrecarga salina

A composição vascular e seu estado fisiológico são fundamentais para determinar como este vaso responderá a alterações fisiológicas ou patológicas. Neste sentido, um modelo interessante para induzir um estado vascular alterado é a indução de lesão arterial pela colocação de um cateter perivascular. Este modelo está bem estabelecido em camundongos e permite simular etapas precoces do processo de lesão arterial, como a aterosclerose. Embora este modelo não desenvolva lesões complexas como as observadas em humanos ou em coelhos, permite estudar as etapas iniciais que envolvem

um processo inflamatório, a proliferação de células musculares lisas da túnica média para a túnica íntima e a formação de uma chamada neoíntima, caracterizada pelo aumento da espessura desta camada normalmente muito fina para dentro da luz vascular (SCHAAN et al, 2004). Em estudo realizado em nosso laboratório (LIMA et al, 2015), verificamos que a sobrecarga salina interfere na magnitude da lesão vascular induzida em artérias femorais e carótidas de camundongos. Tais achados mostraram que tempos maiores de sobrecarga salina se relacionam com um aumento na magnitude da lesão vascular induzida. Como este modelo de lesão vascular envolve um processo inflamatório, é de se pensar que possa haver uma alteração na resposta inflamatória nestes animais. Neste modelo de lesão, também é sabido que componentes do sistema renina-angiotensina, como a enzima conversora de angiotensina I (ECA) ou a própria angiotensina II ou seu receptor AT1 atuam de forma importante no desenvolvimento desta lesão induzida (AKISHITA et al., 2001; LACCHINI et al., 2009; INABA et al., 2011; LACCHINI et al., 2009; INABA et al, 2011). Por outro lado, em nosso estudo anterior, verificamos que a sobrecarga salina é capaz de modular a produção local de angiotensina II (Ang II) e de angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)), que apresenta efeitos antagônicos à Ang II (LIMA et al, 2015).

Complementarmente, a associação entre a ingestão de cloreto de sódio e um aumento de atividade ou de resposta inflamatória em humanos tem acontecido recentemente (HU et al, 2018; WENSTEDT et al, 2019). Portanto, é de se pensar que um processo semelhante pode ocorrer em outros animais, como ratos e camundongos. Desta forma, mesmo em ausência de hipertensão (fator reconhecido como desencadeante de uma resposta inflamatória), é possível

que a sobrecarga salina represente um fator de risco associado aos processos de lesão vascular. Neste caso, a associação com a maior lesão observada em estudo anterior pode se dar por interferência com o sistema renina-angiotensina ou outro mecanismo que mude o perfil inflamatório e o remodelamento da matriz extracelular vascular. Cabe então entender que modificações no remodelamento da matriz extracelular ocorrem e se alterações inflamatórias são induzidas pelo tratamento NaCl 1% em tempos mais curtos (concomitantes com a indução da lesão vascular) ou mais crônicos (anteriores e concomitantes à lesão vascular).

1.4 Justificativa

Considerando que a sobrecarga salina induz adaptações vasculares alterando sua estrutura, mesmo na ausência de hipertensão e que estas também são envolvidas com uma maior magnitude da lesão vascular, faz-se necessário entender, nesse contexto, qual modificação ocorre na matriz extracelular (especialmente a matriz colágena), bem como qual a participação de mediadores inflamatórios neste modelo de lesão. Este questionamento é de grande relevância, visto que a população ingere quantidades diárias excessivas de sódio (e o modelo proposto se aproxima da dose ingerida pela população brasileira), mas, na sua maioria, não apresenta hipertensão (em torno de 35% da população é hipertensa) (Ministério da Saúde 2019). Desta forma, podemos nos questionar o que ocorre com a estrutura arterial durante o processo de adaptação a uma alta ingestão de sódio (quando o indivíduo ainda não é hipertenso), bem como se esta condição aumenta a susceptibilidade ao desenvolvimento de lesão vascular. Face ao exposto, a hipótese do presente estudo é a de que a sobrecarga salina induz adaptações vasculares que modificam a matriz extracelular vascular, bem como o estado inflamatório, aumentando a susceptibilidade à formação de lesões vasculares.

2.Objetivos

O objetivo do presente estudo foi o de avaliar o estado inflamatório e o remodelamento da matriz extracelular de artérias carótidas e femorais de camundongos submetidos à sobrecarga salina frente a um estímulo lesivo induzido por cateter perivascular. Para alcançar este objetivo, os objetivos secundários são:

- 2** Avaliar se os tempos de sobrecarga salina se relacionam com alterações de pressão arterial e frequência cardíaca
- 3** Identificar se os tempos de sobrecarga salina levam a modificações de elementos da matriz extracelular especialmente envolvidos na rigidez arterial e no desenvolvimento da lesão vascular
- 4** Verificar se a sobrecarga salina leva a uma alteração no infiltrado inflamatório e em marcadores inflamatórios locais que podem ser associados com a lesão vascular

3. Materiais e métodos

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57Bl/6 machos, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP). Estes animais foram distribuídos em grupos como segue: grupo recebendo água potável por todo o estudo (Controle - Cont); e grupos que receberam água potável acrescida de 1% de NaCl, tratados por 2 semanas (Sal-2) ou 12 semanas (Sal-12). Todos os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia, em condições experimentais padrão, distribuídos de forma a ficar 5 animais por gaiola, com acesso livre a água e ração, e em regime de ciclo claro-escuro de 12hs.

Durante todo o protocolo experimental, os animais eram pesados e tinham o consumo de água estimado por gaiola semanalmente. Ao final do estudo foram submetidos a avaliação em gaiola metabólica, medidas de pressão arterial por pletismografia de cauda e à indução da lesão vascular (por implante de cateter perivascular). Após, os animais foram eutanasiados e seus tecidos coletados para avaliação.

O protocolo experimental foi executado de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (CEUA-ICB/USP, número de protocolo CEUA nº 1024240918) e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da USP (CEUA-FMUSP, protocolo de pesquisa nº 185/14).

3.2 Grupos experimentais

Os grupos experimentais preparados para a execução do estudo foram:

1. Grupo controle, recebendo água filtrada durante todo o protocolo (Cont, n=20)
2. Grupo salina recebendo solução de NaCl 1% para beber nas 2 semanas finais de protocolo (Sal-2, n=20)
3. Grupo salina recebendo solução de NaCl 1% para beber durante as 12 de protocolo (Sal-12, n=20)

Cabe ressaltar que, para evitar interferência da idade ao final do estudo, todos os animais iniciaram o protocolo experimental com 4 semanas de vida (logo após o desmame), terminando o protocolo de estudo após 12 semanas (completando 16 semanas de vida). O número de 20 animais por grupo de tratamento deve à execução de dois experimentos, um envolvendo a avaliação em gaiola metabólica e hemodinâmica (n=10 em cada grupo) e outro envolvendo a indução da lesão vascular e análise tecidual das artérias (n=10 em cada grupo). A **Tabela 1** apresenta como os animais foram distribuídos em cada grupo.

TABELA 1 – Distribuição dos grupos experimentais, procedimentos executados e tempos de tratamento

Grupos	Avaliação histológica	Avaliação hemodinâmica	Tempo de tratamento	Tratamento
Cont	n=10	n=10	12 semanas	água
Sal-2	n=10	n=10	10+2 semanas	água+ salina 1%
Sal-12	n=10	n=10	12 semanas	salina 1%

3.3 Protocolo experimental

Os animais foram separados aleatoriamente nos grupos experimentais e tratados com livre acesso à água e/ou solução salina 1% e ração durante todo o protocolo experimental. Os três grupos já descritos (Cont, Sal-2 e Sal-12) foram submetidos aos tratamentos e utilizados ou para o Experimento 1 (avaliação hemodinâmica e em gaiola metabólica) ou para o Experimento 2 (avaliação da lesão vascular, remodelamento da matriz extracelular e do estado inflamatório). Todos os animais foram acompanhados semanalmente, com a medida do peso corporal e acompanhamento do crescimento, bem como a estimativa da ingestão de água semanal por caixa (com 5 animais). Este acompanhamento serviu para confirmar o crescimento correto dos animais e se o tratamento estava ocorrendo como esperado.

Experimento 1: avaliação hemodinâmica e em gaiola metabólica

Os grupos experimentais foram tratados como descrito e, na última semana de protocolo, foram submetidos à avaliação hemodinâmica e à avaliação em gaiola metabólica, como será detalhado a seguir. A preparação destes grupos se deveu especialmente pelo fato de que o processo cirúrgico e a lesão vascular envolvem processos inflamatórios que podem interferir na detecção de valores de pressão arterial e frequência cardíaca, bem como no bem-estar durante a permanência do animal dentro da gaiola metabólica.

Experimento 2: avaliação da lesão vascular, remodelamento da matriz extracelular e do estado inflamatório

A preparação dos grupos experimentais para a avaliação da lesão vascular, bem como do processo inflamatório e do remodelamento da matriz extracelular vascular envolveu a indução da lesão vascular. Como será descrito a seguir, este procedimento foi realizado através de uma cirurgia para implante de cateter perivascular 2 semanas antes do final dos tempos experimentais. A Figura 1 representa de forma esquemática como o experimento foi executado. Fica evidente que, nos dois grupos salina estudados, o grupo Sal-2 envolveu a sobrecarga salina de forma concomitante com a indução da lesão vascular, enquanto o grupo Sal-12 foi submetido à sobrecarga salina crônica, anterior e concomitante com a indução da lesão vascular.

Figura 1 – Esquema representativo de como foram realizados os tratamentos, os momentos da indução da lesão vascular e a coleta dos tecidos.

Ao final da 12ª semana de protocolo, os animais foram eutanasiados com sobrecarga de anestésico, seguida de exsanguinação. Na sequência, foram coletados blocos de tecido contendo segmentos das artérias carótidas e femorais. Os procedimentos serão detalhados a seguir.

3.4 Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca por pletismografia de cauda

Na última semana de tratamento, foi feita medida de pressão arterial sistólica e frequência cardíaca por pletismografia de cauda. Na semana anterior

às medidas, os animais foram adaptados ao sistema, sendo as medidas realizadas em 2 dias seguidos.

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 no desenvolvimento da lesão e remodelamento vascular. Esta análise é importante para garantir que os resultados obtidos sejam independentes de alterações da pressão arterial. O método de medida usado nos permite obter apenas a pressão arterial sistólica (PAS) e a frequência cardíaca (FC).

Para a medida de pletismografia de cauda, o camundongo foi colocado em caixa restritora, com aquecimento, para promover uma vasodilatação na artéria caudal do mesmo. O esfignomanômetro adaptado para camundongos foi colocado em torno da 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 2).

Figura 2 – Esquema do sistema de medida de pressão caudal utilizado nos experimentos.

Os valores de PAS foram captados utilizando um sistema CODA 8 (Kent Scientific Corporation), que permite adquirir os valores sequencialmente, selecionando medidas válidas por avaliação (20 medidas válidas). Estas medidas de PAS foram realizadas em 2 dias seguidos, calculando a média por animal. A FC foi calculada pelo sistema a partir dos picos de PAS detectados.

As medidas hemodinâmicas foram realizadas na Unidade de Experimentação Animal do InCor (HC.FMUSP), sob supervisão do Prof. Dr. José Eduardo Krieger.

3.5 Avaliação em gaiola metabólica por 24 horas

Quarenta e oito horas antes do final do protocolo, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas (Tecniplast), que permitem mensurar o peso de ração e volume de água ingeridos, além do peso de fezes e volume de urina excretados. Estas medidas foram realizadas após o animal permanecer na gaiola por 24 horas. No dia anterior cada animal foi adaptado ao novo ambiente, iniciando, no dia seguinte, o tempo de permanência de 24 horas. O peso inicial da ração era conhecido, bem como o volume da água. 24 horas após, era calculada a diferença da ração e água restantes, para calcular o consumo. Além disso, a gaiola possui recipientes especiais para a separação e coleta de urina e fezes, que foram medidas. As gaiolas metabólicas permaneceram em condições controladas dentro do Biotério do Departamento de Anatomia do ICB/USP.

Para se obter o volume exato de líquido ingerido, o animal recebeu um bebedouro com um volume conhecido e após 24 horas, o volume remanescente foi medido. Foi considerado também o volume de líquido desprezado encontrado em um coletor específico. Assim, calculou-se o valor preciso que foi ingerido, subtraindo-se o valor inicial da soma do volume remanescente e do volume desprezado. O resultado é referente ao consumo hídrico (água ou solução salina 1%) no tempo de 24 horas.

Para obtenção de valores precisos na urina produzida, foi colocado nos coletores de urina das gaiolas metabólicas óleo mineral, em uma quantidade suficiente para que a superfície da urina excretada fosse coberta e evitar a evaporação (uma vez que a urina por ser mais densa, tende a se depositar no fundo do recipiente). Ao término das 24 horas, a urina foi coletada e centrifugada para que o óleo mineral e/ou qualquer outro material biológico fosse separado da urina. A retirada da urina foi realizada com auxílio de uma pipeta e esta mesma urina foi centrifugada novamente para que se tivesse a certeza de que não houve contaminação. Os tubos de urina foram armazenados em freezer -80 para análises posteriores.

Para quantificar a ingesta de ração, esta foi inicialmente pesada e oferecida no período de 24 horas. Ao término do tempo, a ração foi pesada novamente para calcular quantos grama o animal ingeriu. Pesamos também a quantidade de fezes no mesmo período de 24 horas.

3.6 Indução da lesão vascular/ cateter perivascular.

A indução de lesão vascular nas artérias carótidas e femorais (esquerdas) em todos os grupos foi realizada por um método que leva à inflamação perivascular e consequente formação de neointima, fase inicial da formação da lesão vascular.

Os procedimentos para a indução da lesão foram executados como descrito anteriormente pelo nosso grupo (LACCHINI et al, 2009; LIMA CT, et al, 2015). Cabe ressaltar que, como estratégia de estudo, os animais foram controles de si mesmos, sendo induzida a lesão vascular nas artérias carótida e femoral esquerdas e mantendo-se as respectivas artérias direitas como controle. Para tal, o cateter utilizado para os experimentos foi um cateter de polietileno PE 90 (DI 0.86mm - DE 1.27mm, polyethylenetubing, Clay Adams) de 2mm de comprimento com abertura em um dos lados para que pudesse “abraçar” a artéria. É importante salientar que o cateter apenas fica em torno da artéria, nunca obstruindo o fluxo de sangue (Figura 3). O cateter, após inserido em torno do vaso, foi mantido fechado por um fio de algodão 4.0. Para a implantação do cateter em torno da artéria carótida comum, foi feita uma incisão ventral na região cervical. A carótida foi isolada e foi feita a implantação do cateter, próximo à bifurcação. A pele foi suturada com fio de polipropileno 6.0 vascular (Prolene - Ethicon). Para a implantação do cateter na artéria femoral, ficou estabelecido que o segmento da artéria femoral onde o cateter é implantado seria a região mais proximal, com maior calibre. O cateter implantado na femoral foi o mesmo utilizado na carótida. Após a implantação do cateter a pele foi suturada com fio de polipropileno 6.0 vascular.

A

B

C

Figura 3 – Imagens representando as etapas da implantação do cateter em torno da artéria femoral. A: pode-se ver a pele seccionada, a gordura próxima à região inguinal aberta e o fio de algodão passando sob a artéria femoral, já isolada; B: o catéter perivascular é implantado em torno da artéria utilizando-se um corte longitudinal em sua parede; C: o catéter é fechado utilizando-se o fio de algodão. Note-se que o catéter, em qualquer momento, obstrui o fluxo de sangue pela artéria.

3.7 Eutanásia e coleta de tecidos

Ao final das 12 semanas do protocolo experimental, os animais foram submetidos a eutanásia e coleta dos tecidos para estudo. A eutanásia foi realizada pela injeção intraperitoneal de quetamina (180mg/Kg) e xylazina (20mg/Kg), seguida de exsanguinação. A perfusão do sistema vascular foi feita sob pressão constante de 80 a 90 mmHg, através do ventrículo esquerdo no ápice do coração com um corte pequeno no átrio direito, para extravasamento de sangue e a solução salina 0,9% da perfusão. Posteriormente, o animal foi perfundido com formol a 4% tamponado (tampão fosfato de sódio). Foram coletados fragmentos de tecidos envolvendo as artérias carótidas e femorais. Estes fragmentos permaneceram

em formol 4% tamponado por mais 24 horas, sendo depois armazenados em álcool etílico 70% para posterior processamento histológico.

Ao término da eutanásia e coleta dos tecidos, os animais dispostos em sacos plásticos apropriados e identificados para descarte de material biológico e congelados em freezer apropriado para descarte de animais, localizado no biotério do InCor FMUSP.

3.8 Processamento histológico e morfometria

Após o procedimento de fixação, os tecidos foram dispostos em cassete plástico e processados em aparelho auto-técnico com ciclo total de 10 horas (realizando a desidratação, diafanização e parafinização do material), como resumido na Figura 4. Os tecidos processados foram incluídos em paraplast usando uma central de inclusão. Os cortes foram feitos em micrótomo a 5µm de espessura e colocados em lâminas silanizadas para imunohistoquímica e não silanizadas para outras colorações (Picrossírius, Verhoeff-Van Gieson). Posteriormente, foram realizados os procedimentos histoquímicos e de imunohistoquímica relacionados à avaliação da lesão vascular, da matriz extracelular e ao processo inflamatório.

Os cortes foram analisados em microscópio acoplado à um 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 AxioVison Release. 4.8.1 (11-2009), sendo as imagens salvas em formato TIF e analisadas em software ImageJ.

Figura 4 – Esquema geral de procedimentos histológicos e análises microscópicas, iniciando pelo processamento dos tecidos (A), inclusão em paraplast (B), corte e disposição em lâminas (C) e obtenção das imagens em microscópio (D) e análise utilizando software apropriado (E).

3.9. Avaliação da lesão vascular

A quantificação da neoíntima foi feita em lâminas coradas para Verhoeff-van Gieson permitindo a coloração das lâminas elástica interna e externa,

possibilitando definir claramente os limites de íntima e média. As fibras elásticas são coradas em preto, os núcleos em azul escuro, colágeno e citoplasma em vermelho. Usando os cortes corados para Verhoeff-Van Gieson, foram feitas medidas da área da luz do vaso, da lâmina elástica interna e lâmina elástica externa traçando-se com o mouse os limites do lúmen, sobre a imagem na tela do computador (para obtenção das áreas das túnica 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 5 apresenta fotomicrografias representativas de um detalhe da parede vascular, onde se pode visualizar as lâminas elásticas interna e externa.

Figura 5 – Fotomicrografias representativas de um detalhe da parede vascular 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.

Os cortes analisados foram em um microscópio ligado a um sistema de digitalização de imagem, sendo as imagens digitalizadas dos vasos analisados com uso de um software ImageJ. Para análise de tecido de sua morfologia, as lâminas foram analisadas em microscópio da Zeiss com câmera acoplada, da marca AxioCan MR3, para captura de imagens. Com o programa da AxioVision Release 4.8.1 (11-2009).

A avaliação da lesão consiste na medida da área em torno da lâmina elástica externa (LEE), da lâmina elástica interna (LEI) e a luz do vaso (Figura 5). Assim, a área da túnica média é definida pela área da LEE subtraída da área da LEI (LEE-LEI). Já a área da túnica íntima é definida pela área da LEI subtraída da área da luz (LEI-luz). A lesão vascular é definida pela razão íntima/média multiplicada por 100 (razão percentual I/M).

Figura 6 – 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.

3.10. Avaliação da rede colágena vascular pela coloração de Picrosírius

Para esta análise, foi usada a coloração de Picrosírius (MONTES E JUNQUEIRA, 1988), que ressalta a presença e disposição de fibras de colágeno. A coloração de Picrosírius é um método muito eficiente para localizar e caracterizar o colágeno presente em diferentes tecidos, permitindo observar as relações existentes entre morfologia e histoquímica. Este método foi utilizado para avaliar deposição de fibras de colágeno na túnica média dos vasos estudados. As análises envolveram imagens obtidas em campo claro. 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.

As imagens foram processadas utilizando Software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) onde foi calculada a área da túnica média analisada e marcados os pontos de coloração vermelha correspondentes às fibras de colágenos. A partir disso, foi calculada a porcentagem de área marcada.

3.11 Avaliação dos marcadores inflamatórios e de componentes da MEC por imunohistoquímica

Foi usado o método de imunohistoquímica para a detecção da presença de marcadores inflamatórios (TGF- β , IL-6 e galectina-3), bem como marcador comum de leucócitos (CD45), colágenos dos tipos IV e VII (colágenos não fibrilares) e metaloproteinase de matriz 2 (MMP2, uma collagenase). Para os

testes, foram utilizadas lâminas com 3 cortes com 5 µm de espessura cortados em micrótomo (1 controle negativo + 2 testes). Como controle negativo, foi omitido o anticorpo primário, usando apenas TBS-TC (usado para diluir anticorpo primário).

A seguir, é apresentado o protocolo utilizado na imunohistoquímica. As Tabelas 2 e 3 mostram as condições padronizadas para a imunohistoquímica e seguidas no estudo. Brevemente, os cortes foram desparafinizados e hidratados até H₂O, sendo depois mantidos em tampão fosfato (PBS). Neste momento, procedeu-se a recuperação antigênica (em banho-maria a 98°C), testando condições com tampão citrato em pH 6,0 e 7,2 ou EDTA pH 8,0. Na sequência, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena, incubando-se os cortes em H₂O₂ 3%, e, a seguir, foi feita a incubação com os anticorpos primários (4°C por aproximadamente 16 horas, Tabela 2). Foi usado o método ABC para a detecção dos anticorpos primários, sendo a diluição específica para cada anticorpo secundário é apresentada na Tabela 3. A contra-coloração foi realizada usando-se hematoxilina em tempo suficientemente curto para que os núcleos ficassem levemente corados. No final, os cortes foram desidratados e as lâminas montadas com lamínula.

TABELA 2 – Apresentação dos anticorpos primários utilizados, suas diluições, condições de recuperação antigênica e diluições utilizadas para o procedimento de Imunohistoquímica (IHQ).

Anticorpo primário	Espécie	Recuperação Antigênica	Diluição para IHQ	Fabricante
CD 45	Mouse	Tampão tris citrato pH 7,0	1:100	Vector ®
TGF β	Rabbit	Tampão tris citrato pH 6,0	1:100	Chemicon Internacional®
IL 1 – β	Rabbit	Tampão tris citrato pH 8,0	1:100	Abcan®
Colágeno IV	Rabbit	Tampão tris citrato pH 7,0	1:200	Chemicon Internacional®
Colágeno VII	Mouse	Tampão tris citrato pH 6,0	1:200	Chemicon Internacional®
MMP-2	Rabbit	Tampão tris citrato pH 8,0	1:50	Chemicon Internacional®
Galectina	Rabbit	Tampão tris citrato pH 6,0	1:100	Gentilmente doado pelo Prof Dr. Roger Chammas

Para cada IHQ, foram avaliados 10 animais de cada grupo experimental. Para cada grupo, foram avaliadas:

- a. carótida direita (controle, CD)
- b. carótida esquerda (lesão, CE)
- c. femoral direita (controle, FD)
- d. femoral esquerda (lesão, FE)

Desta forma, de cada animal experimental, foram avaliadas as duas artérias carótidas e as duas artérias femorais.

TABELA 3 – Apresentação dos anticorpos secundários utilizados para cada anticorpo primário e suas diluições

Anticorpo primário	Anticorpo secundário	Diluição do AC secundário	Fabricante
CD 45	Anti - Mouse	1:1000	Vector ®
TGF β	Anti-Rabbit	1:1000	Vector ®
IL 1 – β	Anti-Rabbit	1:500	Vector ®
Colágeno IV	Anti-Rabbit	1:1000	Vector ®
Colágeno VII	Anti - Mouse	1:1000	Vector ®
MMP-2	Anti-Rabbit	1:1000	Vector ®
Galectina	Anti-Rabbit	1:1000	Vector ®

A padronização dos protocolos de IHQ, determinou-se o pH com melhor resultado para cada anticorpo primário. Com exceção da IHQ para CD45, todas as outras IHQ foram avaliadas estabelecendo um escore de intensidade de marcação, atribuindo numeração de 0 (sem marcação) a 4 (marcação muito intensa). A Tabela 4 apresenta como foi estabelecido o escore de marcação.

TABELA 4 – Escore de intensidade de marcação para a análise semi-quantitativa da IHQ

ESCORE	SIGNIFICADO
0	Nenhuma Marcação
1	Marcação leve
2	Marcação entre leve e moderada
3	Marcação Moderada
4	Marcação Intensa

Para a análise da IHQ para CD45, foram medidos segmentos de área da túnica adventícia e do tecido adiposo perivascular (PVAT), realizando-se a contagem, nestas áreas, das células marcadas positivamente (marrons) e a mensuração de suas áreas (em μm^2). Após, foi calculado o número correspondente de células por milímetro quadrado (células/ mm^2).

3.12 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente comparando-se os grupos por análise de variância (ANOVA) de um ou dois caminhos, complementados por teste *post hoc* de Bonferroni. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de $p \leq 0,05$. Os valores foram expressos como média +/- desvio padrão da média (DPM).

4. RESULTADOS

Aspecto geral dos animais durante e ao final do tratamento

Os grupos iniciaram o protocolo experimental com condição física semelhante, mesma idade e peso. Ao longo das 12 semanas de tratamento, não ocorreram intercorrências e nem perda de algum dos animais. O ganho semanal de peso foi semelhante entre os grupos, atingindo peso corporal semelhante no final do estudo, como pode ser observado na Figura 7. As aparentes diferenças de peso na semana final são muito pequenas e não significantes.

Figura 7: Valores medidos de peso corporal, acompanhados semanalmente em todos os grupos estudados, mostrando que a sobrecarga salina não interfere no ganho de peso corporal, os grupos tratados acompanham o crescimento do grupo controle durante as 12 semanas de tratamento.

Avaliação do balanço alimentar e hídrico em gaiola metabólica

A avaliação dos valores obtidos da gaiola metabólica dos animais dos grupos tratados com sobrecarga salina 2 ou 12 semanas e do grupo controle foi realizada na última semana de tratamento. A Figura 8 apresenta os valores médios obtidos para consumo de ração e de água e excreção de fezes e urina. Foi possível identificar que não houve diferença no consumo de ração entre os Cont e Sal-12. No entanto, o grupo Sal-2 apresentou uma diminuição no consumo de alimentos e um aumento na excreção de fezes em comparação com outros dois grupos (Figura 8). Isso poderia parecer contraditório, mas possivelmente se deve a maior presença de água nas fezes (não verificamos se estas estariam mais volumosas ou pastosas) quando o animal é recebe sobrecarga salina por um curto período de tempo (Sal-2).

A Figura 8 também mostra a ingestão de água e excreção de urina. A ingestão mais aguda de sal estimula a sede e o aumento de sal nas fezes, como sugerido anteriormente, pode levar ao acúmulo de água e aumento do peso fecal. Por outro lado, o grupo Salt-12 está adaptado à ingestão crônica de sódio, apresentando aumento da ingestão de água e excreção de urina, conforme já descrito na literatura.

Figura 8: Balanço hídrico e alimentar (avaliado por gaiola metabólica) em 24 horas. O balanço alimentar foi significativamente diferente apenas no Salt-2. A ingestão de água e a excreção de urina aumentaram nos grupos Sal-2 e Sal-12. * $p \leq 0,05$ em comparação com a cont.

4.1 Avaliação de pressão arterial e frequência cardíaca

De forma geral, a pressão arterial e a frequência cardíaca não foram afetadas pela ingestão crônica de sódio, quando comparadas ao grupo Cont. No entanto, o Salt-2 apresentou um leve aumento da pressão arterial (Figura 9), possivelmente relacionado à adaptação ao aumento da ingestão de sal. Esses achados estão de acordo com estudos anteriores em ratos e camundongos,

reforçando que animais normotensos recebendo NaCl 1% na água potável não desenvolvem espontaneamente hipertensão arterial, pelo menos em 12 semanas. Além disso, conforme esperado, também não ocorre alteração da frequência cardíaca nos grupos recebendo sobrecarga salina.

Figura 9: A pressão arterial sistólica (PAS) e a frequência cardíaca foram obtidos por pletismografia da cauda, mostrando um pequeno aumento na PAS dos animais Salt-2. * $p \leq 0,05$ em comparação com cont.

4.2. Avaliação lesão vascular determinada pela razão íntima/média

A avaliação da lesão vascular é fundamental para o presente estudo, pois entendemos que pode haver uma importante relação entre os componentes da matriz extracelular, o infiltrado inflamatório e a magnitude da lesão vascular. A razão íntima/média tem sido amplamente utilizada para quantificar a magnitude da lesão vascular, pois informa claramente a resposta neointimal após estímulo lesivo, caracterizando o processo de lesão vascular. Os valores médios obtidos nos vasos com lesões variam de 15 a 40%, dependendo do tratamento. A Figura 10 apresenta nossos achados, confirmando que o implante do cateter

perivascular leva à migração celular para a túnica íntima, induzindo a formação de neointima.

Esse processo acontece em todos os grupos. No entanto, a ingestão crônica de sódio leva a uma maior formação de neointima, se comparada ao grupo Cont e ao Sal-2, tanto nas artérias carótidas e femorais.

Figura 10: Proporção íntima/média (%) nas artérias carótida e femoral. Observe o aumento da razão I/M após lesão vascular em todos os tratamentos. Barra branca: direita, artéria sem lesão; barra preta: artéria com lesão esquerda. * $p \leq 0,05$ comparado à artéria sem lesão; # $p \leq 0,05$ comparado às artérias com lesão dos grupos Cont e Sal-2.

4.3. Avaliação da deposição de fibras de colágeno

A matriz extracelular é composta por colágenos fibrilares, como Col I e III, que podem ser estudados como deposição total de colágeno nas artérias coradas pela técnica de Picrosirius. As seções coradas por Picrosirius e avaliadas por campo claro permitem a visualização as fibras de colágeno coradas em vermelho na túnica média. Os valores médios da porcentagem de coloração

vermelha são mostrados na Figura 11 e representam a deposição total de fibras de colágeno na túnica média. Curiosamente, a artéria carótida parece não responder à lesão, apresentando um aumento muito baixo do conteúdo de colágeno na túnica média. Por outro lado, a artéria femoral apresenta um aumento importante da deposição de colágeno na túnica média, possivelmente como parte do processo de remodelamento. Este aumento é significativo nos grupos que receberam sobrecarga salina.

Deposição de colágeno total na carótida

Deposição de colágeno total na femoral

Figura 11 – Porcentagem da deposição total de fibras de colágeno nas artérias carótidas e femorais. Barra branca: direita, artéria sem lesão; barra preta: artéria com lesão esquerda. * $p \leq 0,05$ comparado à artéria sem lesão

Para verificar se a ingestão de sódio pode interferir nos pequenos colágenos de ancoragem, foram analisados os colágenos tipo IV e VII. Curiosamente, o Col IV aumentou nas artérias carótidas após a lesão (Figura 12), enquanto as artérias femorais não apresentaram aumento significativo. A Figura 13 mostra que o Col VII não mudou após lesão vascular e a ingestão de sódio não afeta essa deposição.

Figura 12: Deposição de Col IV na túnica média das artérias carótidas e femorais. As artérias carótidas apresentaram expressão aumentada após lesão, principalmente sal-12; por outro lado, as artérias femorais não alteraram significativamente a deposição de Col IV após a lesão. Barra branca: direita, artéria sem lesão; barra preta: artéria com lesão esquerda. * $p \leq 0,05$ comparado à artéria sem lesão.

Figura 13: Deposição de Col VII nos meios túnicos das artérias carótidas e femorais. As artérias carótida e femoral não alteraram significativamente a deposição de Col IV após a lesão. A alta ingestão de sódio não pode alterar a deposição de Col VII nessas artérias. Barra branca: direita, artéria sem lesão; barra preta: artéria com lesão esquerda.

Para verificar uma possível atividade de remodelamento vascular, a metaloproteinase de matriz 2 (MMP2) foi estudada em todos os grupos e artérias. A análise nas artérias carótida e femoral mostrou um aumento importante da MMP2 na túnica média de todos os tratamentos após a lesão. Este aumento está de acordo com uma condição inflamatória e remodelamento ativo. Curiosamente, o grupo Sal-12 apresentou maior expressão de MMP2 em artérias carótidas também em condição basal, sem lesão (Figura 14). Essa observação pode sugerir um processo de remodelamento em andamento após 12 semanas de alta ingestão de sal, independentemente da lesão vascular.

Figura 14: Expressão da MMP2 na túnica média das artérias carótida e femoral. As artérias carótida e femoral apresentam aumento da expressão de MMP2 após a lesão, principalmente o Sal-2 e o Sal-12. É importante notar que a carótida do sal-12 mostra alta expressão nas artérias sem lesão. Barra branca: direita, artéria sem lesão; barra preta: artéria com lesão esquerda. * $p \leq 0,05$ comparado à artéria sem lesão.

4.4. Estudo do infiltrado celular e marcadores inflamatórios

O infiltrado de células inflamatórias foi estudado medindo-se a densidade de células CD45 positivas (CD45+) na túnica adventícia e no tecido adiposo perivascular (PVAT). As artérias carótidas aumentaram o número de células CD45+ no PVAT após a lesão, mostrando uma maior migração apenas nos animais Sal-12. Curiosamente, a adventícia parece não estar participando desse processo, como mostra a Figura 15. A importante redução nas células CD45+ na adventícia do grupo Cont após a lesão pode estar possivelmente relacionada a um deslocamento de células inflamatórias na artéria.

Figura 15: Células carotídeas CD45 positivas em adventícia e tecido adiposo perivascular (PVAT). O PVAT parece estar mais envolvido na resposta à lesão arterial, apresentando um aumento da densidade celular CD45 +, principalmente no Sal-12. Barra branca: direita, artéria sem lesão; barra preta: artéria com lesão esquerda. * $p \leq 0,05$ comparado à artéria sem lesão.

Por outro lado, as artérias femorais apresentaram aumento da migração de células inflamatórias na túnica adventícia e no PVAT. Embora as duas regiões vasculares apresentem aumento na densidade celular inflamatória após a lesão, esse aumento foi significativo no PVAT de camundongos Sal-12 (Figura 16).

Figura 16: Células femorais CD45 positivas em adventícia e tecido adiposo perivascular (PVAT). Embora a adventícia e o PVAT aumentem a densidade celular inflamatória após a lesão, o PVAT parece estar mais envolvido na resposta à lesão arterial, apresentando um aumento da densidade celular CD45 +, principalmente no Sal-12. Barra branca: direita, artéria sem lesão; barra preta: artéria com lesão esquerda. * $p \leq 0,05$ comparado à artéria sem lesão.

Além do aumento de células inflamatórias, o processo de lesão envolveu a expressão de IL-6 na túnica média. Este marcador inflamatório aumentou após lesão em todos os tratamentos nas artérias carótidas. No entanto, esse aumento foi significativo apenas em camundongos Sal-12. Além disso, as artérias femorais aumentaram a IL-6 após lesão apenas no grupo Sal-12 também (Figura 17), indicando que a sobrecarga crônica de sal pode induzir uma predisposição à inflamação no leito vascular.

Figura 17: Expressão de IL-6 and carótídea e femoral na túnica média. É possível observar um aumento da expressão de IL-6 após lesão mais pronunciada nas carótidas. No entanto, apenas o Salt-12 aumentou significativamente a IL-6. Barra branca: direita, artéria sem lesão; barra preta: artéria com lesão esquerda. * $p \leq 0,05$ comparado à artéria sem lesão.

Existem alguns fatores envolvidos na regulação da resposta inflamatória e no remodelamento da matriz extracelular, como o TGF- β . Além disso, a Galectina-3 tem sido adotada como biomarcador para doenças inflamatórias cardiovasculares e fibrose (Fulton et al, 2019; Hara et al, 2020). Barman e colaboradores (2019) demonstraram que a galectina-3 participa da migração e apoptose das células musculares lisas pulmonares durante a hipertensão pulmonar. Neste estudo, a Galectina-3 não aumentou na túnica média vascular (Figura 18), provavelmente devido à ausência de hipertensão arterial ou a diferentes mecanismos envolvendo migração e fibrose em leito vascular diferente do pulmonar.

Figura 18: Expressão de galectina-3 nas artérias carótida e femoral na túnica média. A análise não demonstrou qualquer alteração na expressão da galectina-3 induzida por lesão vascular ou alta ingestão de sódio. Barra branca: direita, artéria sem lesão; barra preta: artéria com lesão esquerda.

Diferentemente dos resultados da galectina-3, a análise de TGF- β mostra claramente um aumento importante da expressão de TGF- β na túnica média das artérias carótida e femoral de camundongos Sal-12, independentemente da lesão induzida pelo cateter perivascular (Figura 19). Esta observação é muito importante, no momento em que muitas das respostas inflamatórias e modulação do colágeno estão ocorrendo nos camundongos com sobrecarga crônica de sal.

Figura 19: Expressão carotídea e femoral de TGF-β na túnica média. É possível observar um aumento da expressão de TGF-β em ambas as artérias no grupo Sal-12. Nesse caso, a lesão induzida pelo cateter não altera a expressão basal de TGF-β. Barra branca: direita, artéria sem lesão; barra preta: artéria com lesão esquerda. * $p \leq 0,05$ comparado à artéria Cont.

5. Discussão

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que, num modelo de sobrecarga crônica de sal, não ocorre desenvolvimento de hipertensão arterial, sugerindo que diversos fatores envolvidos com a hipertensão não estão influenciando o processo avaliado. Nesta condição, a indução de lesão vascular leva a um dano maior nos animais que receberam a sobrecarga salina crônica (Sal-12), processo este que cursa com um aumento na deposição de fibras de colágeno e de colágeno IV (não fibrilar) na túnica média. Este processo possivelmente se deve ao aumento de atividade inflamatória basal, com elevação dos níveis teciduais de TGF- β , elevando a IL-6 e aumentando o infiltrado de células inflamatórias no local da lesão (CD45+).

5.1 Estudo da relação entre a sobrecarga salina com alterações de pressão arterial e frequência cardíaca

Os resultados obtidos mostram não haver alteração importante na pressão arterial e na frequência cardíaca dos animais tratados com sobrecarga salina 1% em tempos mais curtos (Sal-2) e crônicos (Sal-12). Estes achados são corroborados por estudos anteriores realizados em nosso laboratório, mostrando que camundongos não desenvolvem hipertensão arterial quando submetidos à sobrecarga de NaCl por 2 ou 12 semanas (LIMA et al., 2015; SILVA et al., submetido). Desta forma, podemos considerar que as alterações na lesão vascular observadas, bem como na matriz extracelular e em

marcadores inflamatórios se devem a efeitos diretos do tratamento e não secundário, decorrente de hipertensão.

5.2 Avaliação das modificações da matriz extracelular envolvidas na rigidez arterial e no desenvolvimento da lesão vascular

Este estudo confirmou que a indução da lesão vascular por implante de cateter perivascular é capaz de produzir aumento da razão íntima/média, caracterizando a formação de neoíntima e, em última análise, de lesão vascular (LACCHINI et al., 2009). Em estudo anterior (LIMA et al., 2015), já havíamos demonstrado que a sobrecarga salina aumenta a magnitude desta lesão, possivelmente alterando a relação da produção local de Ang II e Ang-(1-7). Contudo, não estava claro se havia modificação de outros componentes vasculares, especialmente os que compõem a MEC. Por isso, no presente trabalho, avaliamos alguns componentes da matriz colágena, importante em processos de lesão e de rigidez arterial.

Considerando que a matriz extracelular constitui grande parte da parede arterial, é de se esperar que a lesão vascular afete seus componentes. Um processo complexo e dinâmico de produção e degradação de substâncias durante o remodelamento pode ser desencadeado (STAMENKOVIC, 2003). A quantidade, qualidade e organização das fibras de colágeno diferem significativamente, dependendo da interação da produção e degradação do colágeno, afetando a estrutura da parede arterial (BORGES et al., 2008). Por outro lado, as MMPs (como a MMP2) atuam digerindo colágeno e elastina (SEGURA et al., 1998). Como a lesão vascular associada à sobrecarga salina

aumentou a expressão de colágeno IV e MMP2, podemos considerar que a ingestão maior de sódio leva a um remodelamento da matriz extracelular mais pronunciado. Este pode se relacionar a uma maior intensidade de lesão, como verificado.

5.3 Verificação se a sobrecarga salina leva a uma alteração no infiltrado inflamatório e em marcadores inflamatórios locais que podem ser associados com a lesão vascular

Também é importante destacar a relação positiva entre inflamação e lesão. Embora a indução de lesão vascular aumente a expressão de IL-6 nas carótidas de maneira semelhante em todos os grupos, o infiltrado inflamatório (CD45 +) é significativamente maior no tecido adiposo perivascular nas artérias das artérias com lesão dos grupos que receberam sobrecarga salina. Esse aumento na resposta inflamatória pode estar associado a um aumento na deposição de colágeno, o que pode ser explicado pelo aumento significativo da expressão de TGF- β nas duas artérias, mesmo sem lesão induzida. A associação entre a atividade inflamatória e a deposição de matriz colágena em tecidos do sistema cardiovascular está bem definida na literatura e deve ser levada em consideração (RIOS et al., 2019). Um estudo demonstrou que a alta ingestão de sal estava associada à ativação da via pró-fibrótica mediada por TGF β na vasculatura, resultando em um aumento da rigidez aórtica sem elevação da pressão arterial (GRIGOROVA et al., 2018). Um mecanismo

semelhante pode estar ocorrendo em artérias menores, como as artérias carótida e femoral.

Considerando a relação entre alta ingestão de sódio e doenças cardiovasculares (DCV), reforçada pelo fato de as DCV serem um problema relevante de saúde pública, estudos sobre a adaptação à alta ingestão de sódio como fator estressor são fundamentais para descobrir mecanismos e, finalmente, subconjuntos de políticas públicas na redução da ingestão de sódio.

6. Conclusões

Este estudo avaliou a inflamação e o remodelamento da matriz extracelular devido à sobrecarga de sal após lesão nas artérias carótida e femoral em camundongos. O principal achado foi o de que a alta ingestão de sal aumenta a magnitude da lesão vascular, interferindo na deposição de colágeno vascular. O aumento da expressão de TGF- β em animais com alta ingestão de sal pode ser o mecanismo responsável pela exacerbação da resposta inflamatória à lesão vascular. É importante destacar que esses efeitos foram verificados na ausência de hipertensão, sugerindo que as alterações estruturais observadas podem ser devidas a mecanismos não hemodinâmicos.

7. Referências Bibliográficas

- AKISHITA M, SHIRAKAMI G, IWAI M, WU L, AOKI M, ZHANG L, TOBA K, HORIUCHI M. Angiotensin converting enzyme inhibitor restrains inflammation-induced vascular injury in mice. *J Hypertens.* Jun;19(6):1083-8. 2001.
- AVOLIO AP, CLYDE KM, BEARD TC, COOKE HM, HO KK, O'ROURKE MF. Improved Arterial Distensibility in Normotensive Subjects on a Low Salt Diet. PMID: 3954670 DOI: 10.1161/01.atv.6.2.166.1986.
- BAILEY, M. W. MCBRIDE, J. D. MCCLURE, W. BEATTIE, D. GRAHAM, A. F. DOMINICZAK, ET AL. Effects of dietary salt on gene and protein expression in brain tissue of a model of sporadic small vessel disease. *Clinical Science*, v. 132, p. 1315-1328, 2018.
- BAYORH MA, GANAFA AA, SOCCI RR, SILVESTROV N, ABUKHALAF IK. The role of oxidative stress in salt-induced hypertension. *Am J Hypertens.* Jan;17(1):31-6. 2004.
- BORGES LF, R. G. JALDIN, R. R. DIAS, N. A. STOLF, J. B. MICHEL, P. S. GUTIERREZ. Collagen is reduced and disrupted in human aneurysms and dissections of ascending aorta. *Hum Pathol.*, v. 39, n. 3, p. 437-443, 2008.
- BRISS PA, GOODMAN RA, BOWMAN BA. Prevention of Chronic Disease in the 21st Century: Elimination of the Leading Preventable Causes of Premature Death and Disability in the USA. *Lancet*, 384 (9937), 45-52, Jul 5, 2014.
- CAO G, DELLA PENNA SL, KOUYOUMDZIAN NM, CHOI MR, GORZALCZANY S, FERNÁNDEZ BE, TOBLLI JE, ROSÓN MI. Immunohistochemical expression of intrarenal renin angiotensin system components in response to tempol in rats fed a high salt diet. *World J Nephrol.* Jan 6;6(1):29-40. doi: 10.5527/wjn.v6.i1.29. 2017.

- CIANCIARUSO B, BELLIZZI V, MINUTOLO R, TAVERA A, CAPUANO A, CONTE G, DE NICOLA L. Salt intake and renal outcome in patients with progressive renal disease. *Miner Electrolyte Metab.* 24:296-301. 1998.
- COUCHMAN JR, PATAKI CA, An introduction to proteoglycans and their localization. *J. Histochem. Cytochem.* 60:885–97. 2012.
- DAHL LK. Salt, fat and hypertension: the Japanese experience. *Nutr Rev.* PMID 13813705.1960.
- DU CAILAR G1, RIBSTEIN J, MIMRAN A. Dietary sodium and target organ damage in essential hypertension. *Am J Hypertens.* Mar;15(3):222-9.2002.
- Folha informativa – Alimentação saudável; disponível em https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_joomlabook&view=topic&id=227. 06-11 14:12:17. 2019.
- FOLKOW B: Critical review of studies on salt and hypertension. *ClinExpHypertens A*14:1–14. 1992.
- FRANCYNE K, OSAGO H, MASON RW, YAMAGUCHI S, KOBAYASHI H, TSUCHIYA M, ORII T, TOMATSU S. Glycosaminoglycans detection methods: Applications of mass spectrometry. *Molecular Genetics and Metabolism.*120(1-2):67-77.2017.
- FROHLICH ED, VARAGIC J. Sodium directly impairs target organ function in hypertension. *Curr Opin Cardiol.* Sep;20(5):424-9. 2005.
- GIRÃO-SILVA T, MIYAKAWA AA, LACCHINI S. Experimental models for identifying target events in vascular injury. In: *Endothelial Signaling in Vascular Dysfunction and Disease: From Bench to Bedside* (Editor: S Chatterjee). Elsevier, 2020.
- GRIGOROVA NY, W WEI, N. PETRASHEVSKAYA, V. ZERNETKINA, O. JUHASZ, R. FENNER ET AL. Dietary sodium restriction reduces arterial stiffness, vascular TGF- β -dependent fibrosis and marinobufagenin in young normotensive rats. *International Journal of Molecular Science*, v. 18, p. 1-14, 2018.

- HE FJ, MACGREGOR GA. Reducing population salt intake worldwide: from evidence to implementation. *Prog Cardiovasc Dis*.52:363-82.2010.
- HU JW, WANG Y, CHU C, WANG K, YAN Y, ZHENG W, MA Q, MU JJ. The responses of the inflammatory marker, pentraxin 3, to dietary sodium and potassium interventions. *J Clin Hypertens (Greenwich)*.May;20(5):925-931. doi: 10.1111/jch.13273. Epub 2018 Apr 27.2018.
- IMAI Y, KUBA K, NAKANISHI TO, PENNINGER JM. Angiotensin-converting Enzyme 2 (ACE2) in Disease Pathogenesis. *Circ J*, 74 (3), 405-10 Mar 2010.
- INABA S, IWAI M, FURUNO M, KANNO H, SENBA I, OKAYAMA H, MOGI M, HIGAKI J, HORIUCHI M. Temporary treatment with AT1 receptor blocker, valsartan, from early stage of hypertension prevented vascular remodeling. *Am J Hypertens*. May;24(5):550-6. doi: 10.1038/ajh.2011.6. Epub 2011 Feb 3. 2011.
- INABA S, IWAI M, FURUNO M, KANNO H, SENBA I, OKAYAMA H, MOGI M, HIGAKI J, HORIUCHI M. Temporary treatment with AT1 receptor blocker, valsartan, from early stage of hypertension prevented vascular remodeling. *Am J Hypertens*. May;24(5):550-6. doi: 10.1038/ajh.2011.6. Epub 2011 Feb 3. 2011.
- Intersalt Cooperative Research Group Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. *BMJ*.297:319-28. 1988
- IOZZO RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* 67:609–65.1998.
- JIANG HE, PAUL K WHELTON. Commentary: Salt intake, hypertension and risk of cardiovascular disease: an important public health challenge. *International Journal of Epidemiology*, Volume 31, Issue 2, April, Pages 327–331, <https://doi.org/10.1093/ije/31.2.327>.2002.
- KISELOVA N, DIEKER T, SPILLMANN D, RAMSTROM M. An automated mass spectrometry-based screening method for analysis of sulfated glycosaminoglycans,*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450:598–603. 2014.

- LACCHINI S, FERLIN EL, MORAES RS, RIBEIRO JP, IRIGOYEN MC. Contribution of nitric oxide to arterial pressure and heart rate variability in rats submitted to high-sodium intake. *Hypertension*. PMID 11566899.2001.
- LACCHINI S, HEIMANN AS, EVANGELISTA FS, CARDOSO L, SILVA GJ, KRIEGER JE. Cuff-induced vascular intima thickening is influenced by titration of the Ace gene in mice. *Physiol Genomics*. 2009 May 13;37(3):225-30. doi: 10.1152/physiolgenomics.90288. Epub 2009 Mar 3. 2008.
- LIMA CT, SILVA JCS, VIEGAS KAS, OLIVEIRA TCS, LIMA RS, SOUZA LE, ARAGÃO D, CASARINI DEC, IRIGOYEN MCI, LACCHINI S. Increase in Vascular Injury of Sodium Overloaded Mice May Be Related to Vascular Angiotensin Modulation. *PLoS One*, 10 (6), e0128141 2015 Jun 1 eCollection 2015.
- MACGREGOR GA, DE WARDENER ELE, Salt, Diet and Health. Cambridge: Cambridge University Press.2019-06-11 14:12:17. 1998.
- MAGALHAES JC, DA SILVEIRA AB, MOTA DL, PAIXÃO AD. Renal function in juvenile rats subjected to prenatal malnutrition and chronic salt overload. *Experimental physiology*, v. 91, p. 611-619, 2006.
- MESSERLI FH, SCHMIEDER RE, WEIR MR, Salt. A perpetrator of hypertensive target organ disease? *Arch Intern Med*. 157:2449-52. 1997.
- MONTES GS, JUNQUEIRA LCU, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 21: 55-58, Abr-Jun, 1998.
- O'DONNELL M, MENTE A, YUSUF S. Sodium and Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*, 371 (22), 2137-8 Nov 27, 2014.
- PERRY IJ, BEEVERS DG. Salt intake and stroke: a possible direct effect. *J Hum Hypertens*. 6:23-25. 1992.
- PESSANHA MG, HAHN MD, LACERDA CAM. Myocardial Repair With Long-Term and Low-Dose Administration of a Nitric Oxide Synthesis Inhibitor. Myofibroblasts, Type III Collagen and Fibronectin. *Arq Bras Cardiol*, 73 (1), 87-96 Jul 1999.

- RIOS FJ, ZOU ZG, HARVEY AP, HARVEY KY, NOSALSKI R, ANYFANTI P, CAMARGO LL, LACCHINI S, RYAZANOV AG, RYAZANOVA L, MCGRATH S, GUZIK TJ, GOODYEAR CS, MONTEZANO AC, TOUYZ RM. Chanzyme TRPM7 protects against cardiovascular inflammation and fibrosis. *Cardiovasc Res*. 2020 Mar 1;116(3):721-735.
- SAFAR M. Pulse pressure and cardiovascular risk. *J Med Liban*. Nov-Dec;48(6):354-5. 2000.
- SCHAAN BD, LACCHINI S, MOREIRA E D, MACHADO U, SCHMIDT H, IRIGOYEN MC. Sympathetic Modulation of the Renal Glucose Transporter GLUT2 in Diabetic Rats. *Autonomic Neuroscience*. (2004).
- SEBASTIAN A, CORDAIN L, FRASSETTO L, BANERJEE T, MORRIS RC. Postulating the Major Environmental Condition Resulting in the Expression of Essential Hypertension and Its Associated Cardiovascular Diseases: Dietary Imprudence in Daily Selection of Foods in Respect of Their Potassium and Sodium Content Resulting in Oxidative Stress-Induced Dysfunction of the Vascular Endothelium, Vascular Smooth Muscle, and Perivascular Tissues. *Med Hypotheses*, 119, 110-119 Oct 2018
- SEGURA AM, R.E. LUNA, K. HORIBA, ET AL. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases and their inhibitors in thoracic aortic aneurysms and aortic valves of patients with Marfan's syndrome. *Circulation*, v. 98, p. II331-II33, 1998.
- SILVA JCS. Efeito da sobrecarga salina no remodelamento vascular. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2013.
- SIMON G. Experimental evidence for blood pressure-independent vascular effects of high sodium diet. *Am J Hypertens - Review*. PMID 14643585.2003.
- STAMENKOVIC I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *The Journal of pathology*, v. 200, p. 448-464, 2003.

- SUSIC D, FROHLICH ED. Salt consumption and cardiovascular, renal, and hypertensive diseases: clinical and mechanistic aspects. *Curr Opin Lipidol.* Feb;23(1):11-6. doi: 10.1097/MOL.0b013e32834d9c52.2012.
- TOBIAN L, HANLON S. High sodium chloride diets injure arteries and raise mortality without changing blood pressure. *Hypertension.* 15:900-903.1990.
- WENSTEDT EF, VERBERK SG, KROON J, NEELE AE, BAARDMAN J, CLAESSEN N, PASAOGLU ÖT, RADEMAKER E, SCHROOTEN EM, WOUDA RD, DE WINTHER MP, ATEN J, VOGT L, VAN DEN BOSSCHE J. Salt increases monocyte CCR2 expression and inflammatory responses in humans. *JCI Insight.* Nov 1;4(21). pii: 130508. doi: 10.1172/jci.insight.130508.2019.
- YANG J, WU S, ZHU L, CAI J, FU L. Hydrogen-containing Saline Alleviates Pressure Overload-Induced Interstitial Fibrosis and Cardiac Dysfunction in Rats. *Mol Med Rep,* 16 (2), 1771-1778 Aug 2017.

8. Anexo

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 27/11/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **185/14** intitulado: **“PARTICIPAÇÃO DA INFLAMAÇÃO E DO REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR NO DESENVOLVIMENTO DA LESÃO VASCULAR E NA RESPOSTA À SOBRECARGA SALINA”** que utilizará **120** animais da espécie **camundongo** apresentado pela Comissão Científica do INCOR.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-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: Maria Cláudia Irigoyen

Pesquisador (a) Executante: Cintia Taniguti Lima

CEUA-FMUSP, 27 de Novembro de 2014

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