

Avaliação da Sobrecarga Salina na Complacência Arterial em Animais Espontaneamente Hipertensos

Thais Luma de Oliveira Roza

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Mestrado em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, dezembro de 2021

Avaliação da Sobrecarga Salina na Complacência Arterial em Animais Espontaneamente Hipertensos

Thais Luma de Oliveira Roza

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Prof. Dra. Carmem Luiza Sartório - Orientadora

Prof. Dr. José Geraldo Mill – Coorientador

Prof. Dra. Nazaré Souza Bissoli – Banca interna

Prof. Dr. Roberto de Sá Cunha – Banca externa

Prof. Dra. Sônia Alves Gouvêa – Coordenadora

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, dezembro de 2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Registro de Julgamento de Dissertação de Mestrado

A Comissão Julgadora que examinou a Dissertação de Mestrado da candidata **THAÍS LUMA DE OLIVEIRA**, intitulada "**AVALIAÇÃO DA SOBRECARGA SALINA NA COMPLACÊNCIA ARTERIAL EM ANIMAIS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**", decidiu, por unanimidade, aprovar a referida Dissertação de Mestrado. Dessa forma, a candidata cumpriu todos os requisitos descritos no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e, portanto, a Comissão Julgadora declara que a aluna faz jus à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Vitória, 7 de dezembro de 2021.

Prof^ª. Dr^ª. Carmem Luiza Sartório
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – Orientadora

Prof^ª. Dr^ª. Nazaré Souza Bissoli
Universidade Federal do Espírito Santo (PPGCF/UFES) – Titular interno

Prof. Dr. Roberto de Sá Cunha
Titular externo

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

D278a de Oliveira Roza, Thais Luma, 1993-
Avaliação da Sobrecarga Salina na Complacência Arterial em
Animais Espontaneamente Hipertensos / Thais Luma de
Oliveira Roza. - 2021.
93 f. : il.

Orientadora: Carmem Luiza Sartório.
Coorientador: José Geraldo Mill.
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Sal. 2. Hipertensão. 3. Complacência arterial. 4.
Velocidade da onda de pulso. I. Sartório, Carmem Luiza. II. Mill,
José Geraldo. III. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 612

Dedicatória

Ao pesquisador brasileiro que com pouco, cria.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”
- Isaac Newton, 1675

Agradecimentos

Este trabalho é fruto do apoio de diversas pessoas que estiveram presentes em minha caminhada. Agradeço primeiramente à Deus, pois sem Sua proteção e cuidado, nada seria possível. Agradeço ao meu marido Cleomar, por em tantos momentos ser quem me motivou e fortificou, por ser refúgio e boa companhia, por sempre acreditar em mim e nos nossos sonhos. Ao meu pai, por cada palavra de incentivo, à minha mãe obrigada por me ensinar com essência, isso fez toda a diferença até aqui. Aos meus irmãos, Bel obrigada por me dar os melhores conselhos, Dudu e Karol obrigada pelos melhores presentes que ganhei durante esse mestrado: Ícaro, Yara e Yuri. Obrigada família por compreenderem as ausências quando foi necessário, vocês são minha base, amo vocês!

Às minhas amigas Patrícia e Gisleine, que no decorrer do mestrado estiveram ao meu lado e me mantiveram confiante da realização deste sonho, amo vocês.

Ao meu tripé, Carmem, Mill e Enildo. Inicialmente, agradeço à minha orientadora Dra. Carmem Sartório, pela dedicação prestada em me orientar e por tudo que me ensinou. Ao meu coorientador e professor Mill, obrigada por todo o suporte, por me ensinar tanto e por ser um exemplo. Foi uma honra professor, e é com muita humildade que digo que o senhor me inspira a ser a minha melhor versão. E ao Enildo, sem você este trabalho não teria a cereja do bolo. Te agradeço por toda ajuda nos experimentos, e principalmente, com o método de VOP, obrigada por me acolher e me fazer sentir em casa nesses últimos 2 anos.

Aos alunos do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular, Divo, Elis, Rafael, Juliana e Ludimila. Por eu chegar em um momento onde vocês já encontravam-se tão avançados, fui carinhosamente nomeada de “caçulinha” por vocês ou “rapa do tacho” pelo Enildo, e por isso em tantos momentos me ensinaram, cada um à sua maneira, agradeço por cada conselho e ajuda. Em especial agradeço ao Divo por me ensinar a plotar gráficos no prisma, e a Ludimila por me ajudar na revisão deste trabalho, te agradeço pela amizade, te levo para a vida Ludi.

A turma PPGCF/19, Jordana, Matheus, Thamirys, Suellen, Karol, Anna Karolina, Jandinay, Cleide e Cristiane, foi muito bom compartilhar muitas das disciplinas e trocar tantos conhecimentos com vocês. Aos queridos do PPGCF, Ana Catarina, Igor, Polly, Silas, Sabrina, Cavatti, Eduardo, Charles, Oscar, Jeanine, Tiago, Flávia, Eduarda, Edgar, Ana Daria, Jocimar, Jessyca, Wender, Letícia, Débora, Tagana, Nathalie e ao Leonardo por suas tentativas falidas em querer me fazer engatar o doutorado. Em especial, agradeço à Evellyn pelo suporte no momento acadêmico que mais precisei, por não só me motivar, mas me fazer lembrar do meu valor. Agradeço também ao Matheus pela sua dedicação em me ajudar com método de TBARS e AOPP e Jordana e Thamirys por sua amizade.

Aos professores do PPGCF-UFES, obrigada por todo o conhecimento disposto, os quais me fizeram me apaixonar ainda mais pela fisiologia e pesquisa científica. Em especial, agradeço ao professor Léo por sua contribuição no protocolo da VOP, sugerindo usar a dP/dt para a exatidão do início da onda.

Aos funcionários da Ufes meu muito obrigada, isto incluem secretários, prestadores de limpeza, de segurança e manutenção/subprefeitura. Agradeço principalmente aos meninos que recolhiam a maravalha.

Aos funcionários do biotério e CEUA-UFES, que prontamente foram tão solícitos e contribuíram tanto para este trabalho, em especial agradeço ao Jailson e Rodolpho por sempre me esclarecerem nos cuidados com meus animais.

Aos meus animais, meu eterno respeito e gratidão.

Ao LHT, agradeço à Viviane por toda a dedicação em me ensinar tudo sobre técnicas histológicas e por todo amparo na confecção das lâminas de histologia e ao Tarcio agradeço por toda disponibilidade e ajuda.

Ao LABERV, agradeço aos alunos e ao professor Roger por me incluírem nas reuniões online de seminário durante a pandemia e partilharem comigo tanto saber, foi um dos momentos mais especiais, obrigada por tudo pessoal.

Ao LUCCAR, agradeço aos alunos sempre tão carinhosos e acolhedores comigo. Destaco, em especial, o Tadeu que me deu importantes dicas na fotomicrografia das imagens de histologia do trabalho. Ao Flávio por toda ajuda, e ao professor Breno por toda a solicitude em me abrir as portas do laboratório.

Ao ELSA-Brasil, agradeço mais uma vez ao Professor Mill por me inserir nesse ambiente, onde pude aprender a fazer VOP em humanos, o que era uma curiosidade, e ao me incluir no projeto Viana Vacinada, o qual tenho muita gratidão e orgulho de dizer que trabalho. Agradeço também à Adriana, Íris, Sara, Hully, Penha, Isac, Thayná, Karen, Beatriz, Gaby, JP e a todos os outros, por partilharem momentos tão incríveis. Em especial, agradeço à Thais Ruchdeschel por tanto me motivar e por ser um exemplo de profissionalismo, bem como todas as caronas e tentativas em querer me fazer engatar na pesquisa clínica.

Aos professores Dra. Nazaré e Dr. Roberto de Sá, agradeço por aceitarem o convite, é uma honra tê-los como avaliadores desta dissertação.

À UFES e CAPES pelo auxílio financeiro concedido, e pela oportunidade de ser bolsista para me dedicar exclusivamente à realização desse sonho.

Por fim, agradeço aos autores/artigos que serviram de embasamento para este estudo, certamente se vi mais longe (como na frase), foi por todo um universo de conhecimento anteriormente gerado e agregado, agradeço a todos eles.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Hipertensão, consumo de sal e rigidez arterial	16
1.2 Considerações teóricas	19
1.3 Fisiopatologia da hipertensão arterial	21
1.4 Fisiopatologia da rigidez arterial	22
1.5 VOP e PP como marcador de rigidez arterial	23
1.6 Consumo de sódio	25
1.7 Alto consumo de sal, hipertensão e rigidez arterial	27
2. OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo Geral.....	32
2.2 Objetivos específicos	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Protocolo Experimental.....	34
3.1.2 Consumo de líquidos em gaiola coletiva e avaliação ponderal	35
3.1.3 Gaiola Metabólica.....	36
3.1.4 Pletismografia de Cauda	37
3.2 Medidas hemodinâmicas	38
3.2.1 Método invasivo para obtenção da VOP	38
3.2.2 Aquisição PAS, PAD, PAM, PP e FC por medida direta	40
3.3 Coleta de órgãos	41
3.4 Técnicas Histológicas	43
3.5 Morfometria.....	46
3.5.1 Avaliação das lâminas elásticas na túnica média	46
3.5.2 Quantificação do colágeno e determinação da AST	46
3.5.3 Medidas de tensão e estresse de parede	47
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
4. RESULTADOS	50
I. EFEITOS DO CONSUMO DE SAL E HIPERTENSÃO EM 60 DIAS	50
4.1.1 Dados ponderais	50
4.1.2 Peso de fezes	51
4.1.3 Consumo de ração	52
4.1.4 Consumo de água ou solução salina	53

4.1.5 Avaliação do volume urinário	55
4.1.6 Excreção urinária de sódio, potássio, creatinina e perda proteica ...	56
4.1.7 Pletismografia basal, 30 e 60 dias.....	59
II. MEDIDA DIRETA DE PRESSÃO ARTERIAL	60
4.2.1 Dados ponderais e relação órgão/tíbia.....	60
4.2.2 Efeitos hemodinâmicos do alto consumo de sal	61
4.2.3 PAS não invasiva vs. PAS invasiva.....	62
4.2.4 Sobrecarga salina aumenta a PP de animais hipertensos	62
4.2.5 Sobrecarga salina eleva a VOP de animais hipertensos.....	63
III. ESTRUTURA E REMODELAMENTO VASCULAR	64
4.3.1 Área luminal da aorta e AST da camada média.....	64
4.3.2 Deposição de colágeno.....	65
4.3.4 Lamelas elásticas.....	66
4.3.5 Fragmentação das lamelas elásticas	67
4.3.6 Tensão de parede	68
4.3.7 Estresse da camada média vascular.....	69
5. DISCUSSÃO	71
6. CONCLUSÃO	81
7. REFERÊNCIAS.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

Δt	Diferença do tempo entre as ondas de pulso
ANG II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
AST	Área de secção transversa da camada média
CEUA	Comissão de ética na utilização de animais
<i>d</i>	Distância entre os pontos de inserção do cateter
DAS	Dieta alto sal
DBS	Dieta baixo sal
DCV	Doenças cardiovasculares
dP/dt	Derivada temporal
DRC	Doença renal crônica
ECA	Enzima conversora de angiotensina
eNOS	Oxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro padrão da média
FC	Frequência cardíaca
GM	Gaiola metabólica
HA	Hipertensão arterial
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HFHS	Dieta rica em gordura e sacarose
IBGE	Instituto brasileiro de geografia e estatística
K⁺	Potássio
LOA	Lesão de órgão-alvo
mmHg	Milímetros de mercúrio
MMPs	Metaloproteinases de matriz
Na⁺	Sódio

NaCl	Cloreto de sódio
NHANES I	Pesquisa nacional para análise de saúde e nutrição
NO	Oxido nítrico
OMS	Organização mundial da saúde
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
PNS	Pesquisa nacional de saúde
PP	Pressão de pulso
RNM	Ressonância nuclear magnética
SHR	Rato espontaneamente hipertenso
SNS	Sistema nacional de saúde
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TGF-β1	Fator de crescimento transformante beta tipo 1
TNM	Tratamento não medicamentoso
VE	Ventrículo esquerdo
VOP	Velocidade da onda de pulso
VOP-cf	Velocidade da onda de pulso – carotídeo femoral

RESUMO

A interação entre PA e ingestão de sódio é amplamente reconhecida e apoiada por numerosos estudos. Mais recentemente, estudos clínicos vem mostrando uma estreita relação entre aumento de rigidez arterial (medida por VOP) e consumo de sal em populações. Nosso estudo teve como objetivo, inferir a rigidez arterial por VOP em ratos SHR após tratamento com sal (1%), teor correspondente ao consumo médio brasileiro (9,34 g sal - PNS). Ratos machos Wistar e SHR foram divididos em: controle (Wistar/C e SHR/C) e sal, recebendo solução de NaCl 1% por 60 dias: (Wistar/S e SHR/S). Durante o tratamento, os ratos foram submetidos (basal, ~30 e ~60 dias) à aferição da pressão arterial sistólica (PAS) por pletismografia de cauda e avaliações em gaiola metabólica. Após 60 dias, os animais foram cateterizados nas áreas carótida e femoral para análises de VOP e medidas hemodinâmicas direta. As aortas foram coletadas e preparadas para análise histológica para determinar espessamento arterial, fragmentação de lâminas elásticas, deposição de colágeno e tensão e estresse de parede. Durante o tratamento, observamos aumento da PAS apenas em animais SHR ~30 dias (SHR/C $200 \pm 5,2$ vs. SHR/S $218 \pm 3,2$, $P < 0,01$) e ~60 dias (SHR/C $206 \pm 5,8$ vs. SHR/S $225 \pm 3,3$, $P < 0,05$). Após 60 dias, o consumo crônico de sal aumentou significativamente a rigidez arterial de ratos SHR, correspondendo à 8% na medida de VOP (SHR/C $6,2 \pm 0,2$ vs. SHR/S $6,7 \pm 0,3$ m/s), e 11% na PP (SHR/C $54 \pm 1,3$ vs. SHR/S $60 \pm 1,7$ mmHg). O aumento de rigidez arterial, foi observado independente do aumento concomitante da PAS, pois observamos queda de PAS no grupo SHR/C (61 mmHg) e SHR/S (72 mmHg) após anestesia no protocolo cirúrgico, redução não detectada em animais Wistar. Avaliações na estrutura aórtica do grupo SHR/S evidenciaram aumento de 9% na deposição de colágeno e 130% na fragmentação de lâmina elástica. Por consequência, observamos aumento de 18,6% na tensão e 6,1% no estresse de parede em relação ao grupo SHR/C. Estes achados sustentam nossa hipótese que a sobrecarga salina à 1% pode causar alterações na dinâmica e estrutura vascular levando ao surgimento de doenças cardiovasculares, o que reforça a necessidade de redução no consumo de sal como uma importante estratégia para a prevenção de eventos cardiovasculares.

ABSTRACT

The interaction between BP and sodium intake is widely recognized and supported by numerous studies. More recently, clinical studies have shown a close relationship between increased arterial stiffness (as measured by the gold standard VOP choice) and salt consumption in populations. Our study aimed to infer arterial stiffness by VOP in SHR rats after treatment with salt (1%), a content corresponding to the average Brazilian consumption (9.34 g salt - PNS). Male Wistar and SHR rats were divided into: control (Wistar/C and SHR/C) and salt, receiving 1% NaCl solution for 60 days: (Wistar/S and SHR/S). During treatment, the rats were submitted (baseline, ~30 and ~60 days) to measurement of systolic blood pressure (SBP) by tail plethysmography and metabolic cage evaluations. After 60 days, the animals were catheterized in the carotid and femoral areas for PWV analysis and direct hemodynamic measurements. The aortas were collected and prepared for histological analysis to determine arterial thickening, elastic lamina fragmentation, collagen deposition and wall tension and stress. During treatment, we observed an increase in SBP only in animals SHR ~30 days (SHR/A 200 ± 5.2 vs. SHR/S 218 ± 3.2 , $P < 0.01$) and ~60 days (SHR/A 206 ± 5.8 vs. SHR/S 225 ± 3.3 , $P < 0.05$). After 60 days, chronic sodium intake significantly increased arterial stiffness in SHR rats, corresponding to 8% in the PWV measurement (SHR/C 6.2 ± 0.2 vs. SHR/S 6.7 ± 0.3 m/s), and 11% in PP (SHR/C 54 ± 1.3 vs. SHR/S 60 ± 1.7 mmHg). The increase in arterial stiffness was observed regardless of the concomitant increase in SBP, as we observed a decrease in SHR in the SHR/C (61 mmHg) and SHR/S (72 mmHg) groups after anesthesia in the surgical protocol, a reduction not detected in Wistar animals. Assessments of the aortic structure of the SHR/S group showed an increase of 9% in collagen deposition and 130% in elastic lamina fragmentation. Consequently, we observed an increase of 18.6% in tension and 6.1% in wall stress compared to the SHR/C group. These findings support our hypothesis that 1% sodium consumption can cause changes in vascular dynamics and structure, leading to the emergence of cardiovascular diseases, which reinforces the need to reduce salt consumption as an important strategy for the prevention of cardiovascular events.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão, consumo de sal e rigidez arterial

Conceito, importância e prevalência

As doenças cardiovasculares (DCV), afecções do coração e circulação, tem sido a principal causa de mortalidade no mundo desde a década de 1960. No Brasil, ocasionam cerca de 46 mortes a cada hora (Ribeiro et al., 2016; SBC, 2021). A hipertensão arterial (HA) é considerada o mais expressivo fator de risco para estas doenças (Brasileira, 2016). O estudo de NHANES I, observou presença de hipertensão em 1.557 de 1.992 mortes por doenças circulatórias (Ford, 2011). Evidências científicas já demonstraram que pequenas reduções na pressão arterial (PA), podem produzir grande impacto na redução da morbimortalidade cardiovascular (Bombig et al., 2014).

A hipertensão arterial é uma condição clínica de origem multifatorial, caracterizada por sustentar elevação dos níveis de pressão arterial sistólica (PAS) igual ou superior a 140 mmHg, e pressão arterial diastólica (PAD) acima de 90 mmHg. Seu diagnóstico é determinado a partir de aferição de pressão arterial em repouso dentro de condição estabilizada (Brasileira, 2016).

A alta prevalência de HA a torna um dos principais problemas de saúde pública no Brasil e no mundo. Um estudo de análise sistemática para o *Global Burden of Disease* comparou os efeitos independentes de 67 fatores de risco e grupos de fatores de risco de 21 regiões entre 1990 e 2010. Este estudo classificou a hipertensão como o principal fator de risco global sendo responsável por 9,4 milhões de mortes/ano, figura 1 (Lim et al., 2012). No Brasil, estima-se que aproximadamente 30% da população adulta possa ter PA elevada, e este índice pode aumentar nas próximas décadas em função do envelhecimento da população (OMS, 2014).

1990		2010		
Classificação média (95% UI)	Fator de risco	Fator de risco	Classificação média (95% UI)	% Mudança (95% UI)
1.1 (1-2)	1 Infância abaixo do peso	1 Pressão alta	1.1 (1-2)	27% (19 to 34)
2.1 (1-4)	2 Poluição do ar doméstico	2 Tabagismo	1.9 (1-2)	3% (-5 to 11)
2.9 (2-4)	3 Tabagismo	3 Poluição do ar doméstico	4.6 (3-7)	-37% (-44 to -29)
4.0 (3-5)	4 Pressão alta	4 Fruta baixa	5.0 (4-8)	29% (25 to 34)
5.5 (3-8)	5 Amamentação irregular	5 Etilismo	5.1 (3-7)	32% (17 to 47)

Figura 1: Hipertensão se torna principal fator de risco global. Modificado de Lim, et. al, 2012.

São fatores de risco para a hipertensão: Genética, idade, sexo, etnia, excesso de peso e obesidade, alta ingestão de sódio, consumo abusivo de álcool, sedentarismo e fatores socioeconômicos. O tratamento da hipertensão pode ser dividido em tratamento medicamentoso, podendo ser realizado com diuréticos, bloqueadores beta adrenérgicos e inibidores da enzima conversora de angiotensina, e tratamento não medicamentoso (TNM) que está relacionado à boas práticas no estilo de vida (Brasileira, 2016).

Na abordagem não farmacológica da hipertensão, a redução do consumo de sal é uma das mais importantes intervenções. Estudos já demonstraram que ao reduzir a ingestão de sódio para quantidades recomendadas (<5 g de sal, equivalente 2 g de sódio/dia, OMS), pode-se obter redução da pressão arterial (Bombig et al., 2014). Em uma metanálise avaliando 3.230 indivíduos, foi estimado que uma redução na excreção de sódio urinário de 6 g sódio/dia estaria associada a uma redução de 10,8 mmHg na PAS de indivíduos hipertensos, e 4,3 mmHg em indivíduos normotensos (Caldeira et al., 2013). Entre os índios Yanomami, que consumiam baixa ingestão de sal, não foram observados casos de hipertensão arterial (Mancilha-Carvalho & Silva, 2003).

No entanto, estes estudos vão na contramão de tendências alimentícias que têm se mostrado cada vez mais longe desta realidade. Na atualidade, exagerar na quantidade de sódio é mais fácil e imperceptível do que se imagina, visto que cada grama de sal de cozinha contém 0,4 g de sódio. Além do mais, o sódio está presente em grande parte dos alimentos industrializados. Estudos mostram que a quantidade de sal consumida pelas famílias brasileiras é em média de 12 g, ou seja, duas vezes superior ao limite recomendado (IBGE, 2011). Uma pesquisa realizada em 23 países estimou que uma ingestão de sal dentro do limite recomendado, poderia em 10 anos, prevenir 8,5 milhões de mortes no mundo (Vanerson et al., 2015).

A exposição da hipertensão à longo prazo, pode levar a ocorrência de lesão de órgãos-alvo (LOA) e alterações estruturais do sistema cardiovascular como: desenvolvimento de hipertrofia ventricular esquerda, disfunção renal e aumento da rigidez aórtica, o que torna a HA ainda mais difícil de controlar (Muiesan et al., 2013). A rigidez arterial é o termo empregado para caracterizar alterações de

propriedades físicas da parede arterial tais como distensibilidade, complacência e elasticidade (Mendes-Pinto & Rodrigues-Machado, 2019). A medida da velocidade da onda de pulso (VOP) é uma forma simples e não invasiva de avaliar a rigidez das artérias. A medida da VOP pode ser verificada na aorta e nos vasos arteriais periféricos. No entanto, atualmente a medida da VOP entre a artéria carótida e femoral (VOP-cf), que define a velocidade de onda de pulso principalmente da aorta, é a mais utilizada (Jannasz et al., 2019).

O enrijecimento das grandes artérias ocorrem por mecanismos que continuam a ser investigados. Dentre eles, a arteriosclerose é um processo natural que acompanha o envelhecimento causando endurecimento, perda de elasticidade e espessamento progressivo das paredes arteriais. Esse mecanismo é derivado de estresse oxidativo que causa efeitos degenerativos na túnica média ao longo do tempo, no entanto foi descrito que a hipertensão potencializa seus efeitos. Um estudo com 1.079 indivíduos mostrou que o aumento da VOP em hipertensos foi significativamente maior (0,93 m/s por década, $P < 0,001$), do que (0,44 m/s por década) em normotensos (Diaz et al., 2018).

Dada a importância da hipertensão como um potencial preditor clínico para o agravamento das DCV, muitos estudos clínicos e pré-clínicos são desenvolvidos para investigação de mecanismos fisiopatológicos. Dentre os modelos utilizados em roedores, tem-se o rato espontaneamente hipertenso (SHR) que foi desenvolvido por Okamoto e Aoki após reprodução genética de 20 gerações entre irmãos (*inbred*). Estes animais nascem normotensos e, ao longo da vida, tornam-se hipertensos, reproduzindo um modelo semelhante à hipertensão essencial humana. Dessa forma, a SHR é uma cepa reconhecida como de excelência para estudos de investigação em hipertensão e doenças cardiovasculares (Fazan et al., 2006; Vanerson et al., 2015).

1.2 Considerações teóricas

A pressão arterial (PA) é definida por PAS e PAD, estas representam os pontos extremos entre o fenômeno pulsátil no ciclo cardíaco. O componente pulsátil é definido pela pressão de pulso (PP= PAS-PAD) que depende de componentes mecânicos e hemodinâmicos em torno do componente fixo pressão arterial média (PAM). O sistema arterial possui duas funções essenciais: a função condutora e a função amortecedora (Nogueira et al., 2003; Safar & Laurent, 2003).

Pela função condutora, as artérias são responsáveis por conduzir adequado volume sanguíneo do ventrículo esquerdo (VE) para os vasos de todos os tecidos de acordo com necessidades metabólicas. A função amortecedora atenua o choque causado pelas pulsações intermitentes da contração ventricular esquerda a partir das propriedades viscoelásticas da parede arterial, de modo que o sangue seja direcionado em um fluxo quase constante. A união destas duas funções forma a propagação (onda ejetora) e reflexão da onda de pulso arterial (onda refletida), exemplo figura 2 (Mendes-Pinto & Rodrigues-Machado, 2019; Michael O'Rourke, 1995; O'Rourke, 2013).

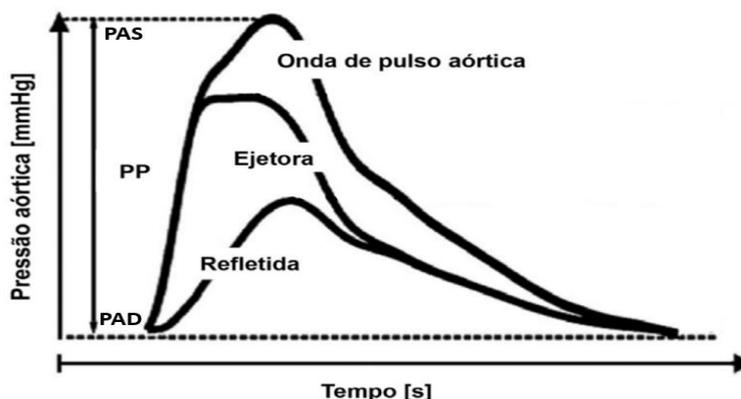


Figura 2: Composição da onda de pulso aórtica pela onda ejetora e onda refletida. PP: pressão de pulso. Modificado de Mendes-Pinto & Rodrigues-Machado, 2013.

A capacidade das artérias de acomodar o volume ejetado pelo VE pode ser descrita como distensibilidade, complacência ou rigidez arterial (Michael O'Rourke, 1995). Isso se deve às propriedades mecânicas passivas das artérias de grande calibre dadas, especificamente, pela elastina e pelo colágeno. A aorta, se distende durante a sístole, acomodando o aumento de volume, reduzindo pressão, e recua durante a diástole para manter a pressão. Como resultado desse mecanismo de tamponamento, a pressão arterial média é mantida dentro

do sistema arterial e o fluxo não pulsátil é obtido no leito capilar (Pickup et al., 2019). A elastina se organiza em fibras elásticas na parede vascular representando 40–50% do peso seco tecidual na aorta torácica, sendo o principal componente da artéria aorta abdominal e carótidas (Rucker, 1976). As fibras elásticas permanecem por toda a vida do organismo, porém estão vulneráveis à degradação e despolimerização, o que altera suas propriedades mecânicas (Mitchell, 2014; Rucker & Tinker, 1985).

O “Windkessel” ou “reservatório elástico” é um conceito que foi criado por Stephen Hales (sec. XVIII) e é utilizado como análogo às propriedades elásticas das grandes artérias, onde a circulação humana é comparada à um sistema hidráulico, (figura 3). O armazenamento de sangue nas artérias elásticas durante a sístole é descarregado durante a diástole, isso amortece as oscilações da pressão arterial durante o ciclo cardíaco e mantém a perfusão dos órgãos na diástole. No entanto, em condições de aumento da rigidez arterial, há uma redução nessa função, levando ao aumento da pulsatilidade com pressões sistólica e de pulso mais altas (O’Rourke, 2013; Pickup et al., 2019).

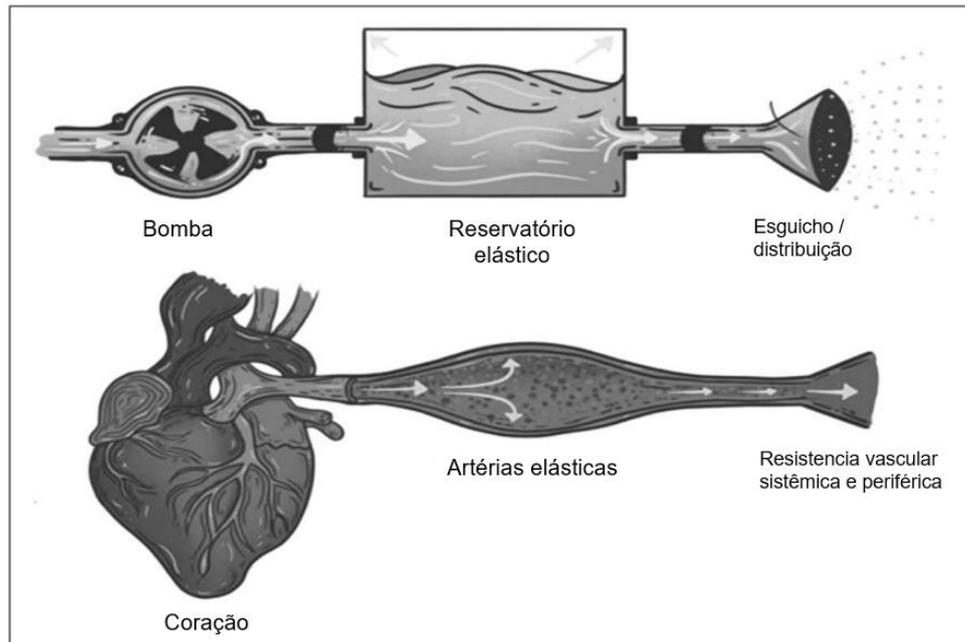


Figura 3: Representação do efeito Windkessel, onde as propriedades elásticas das grandes artérias e a circulação humana é comparada à um sistema hidráulico. Modificado de Pickup et al., 2019.

1.3 Fisiopatologia da hipertensão arterial

Teoria do mosaico de Page

A hipertensão pode ser classificada como primária (ou essencial), representando entre 85 e 95% dos casos e sem causa atribuível, ou secundária, normalmente resultante de uma doença pré-estabelecida (Bakris, 2018). Dentre nomes pioneiros na pesquisa de hipertensão, Dr. Irvine Page descreveu a natureza complexa e presumivelmente multifatorial da hipertensão pelo termo “mosaico”, criando a teoria do mosaico no final da década de 1940 (Harrison et. al., 2021).

A teoria do mosaico é representada por um diagrama que é utilizado para ilustrar os múltiplos fatores responsáveis pela gênese da hipertensão. Primeiramente foram incluídas diversas alterações vasculares em cada alça do diagrama (figura 4-a). Conforme a pesquisa evoluiu, um novo diagrama pôde ser construído (figura 4-b). As linhas tracejadas destacam a interação entre disfunções vasculares, consumo de sódio e mecanismos renais as quais serão melhor descritas mais à frente.

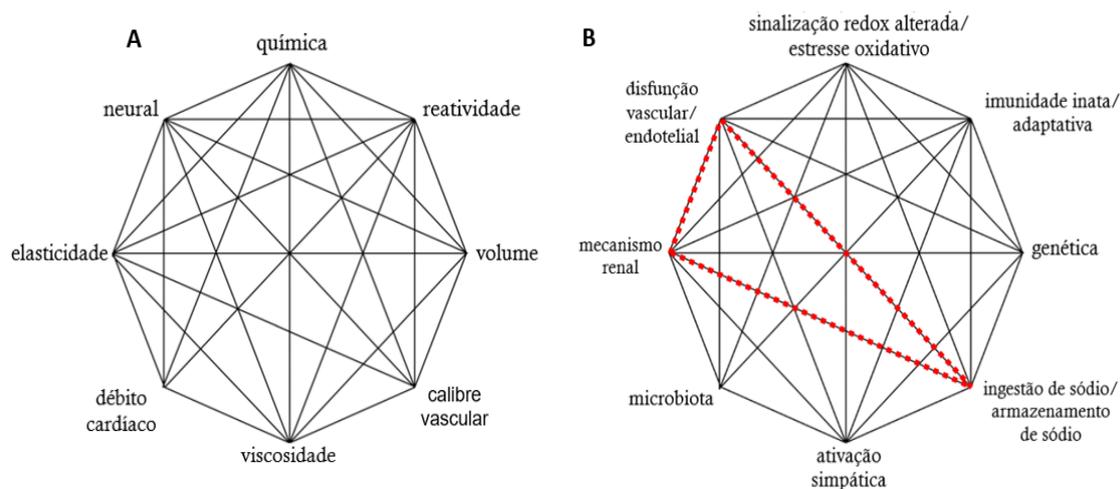


Figura 4: Diagrama da teoria do mosaico de Page, original de 1949 (a) e atualizada em 2021 (b). Adaptado de Harrison e cols. 2021.

Na alça vascular, uma alteração que provavelmente contribui para a hipertensão é o enrijecimento das grandes artérias de condução, em particular, o endurecimento da aorta proximal (Harrison et. al., 2021). As alterações promovidas pelo aumento da rigidez aórtica afetam o aspecto de adaptação que a aorta possui sobre a pressão e fluxo sanguíneo em cada ciclo cardíaco (O'Rourke, 2013). As alterações pela fragmentação da elastina na parede aórtica estariam associadas com subsequente desenvolvimento de hipertensão.

1.4 Fisiopatologia da rigidez arterial

Alça vascular do diagrama do mosaico de Page

A pressão sistólica e rigidez arterial estão intimamente relacionadas e interagem em um ciclo vicioso. De uma forma geral, a interpretação mais comum neste mecanismo, é onde a pressão arterial elevada aumenta o estresse de parede aórtico, o que acelera a degradação da elastina (Mitchell, 2014).

As alterações fisiopatológicas que contribuem para o aumento da rigidez arterial são divididas entre o componente passivo e ativo do sistema arterial. O componente ativo é composto por alterações na função endotelial e tônus do músculo liso vascular, fatores como envelhecimento e hipertensão promovem alterações na expressão fenotípica das células lisas, causando remodelamento que leva à perda da contratilidade. (Mendes-Pinto & Rodrigues-Machado, 2019).

E o componente passivo, consiste nas alterações mecânicas da parede vascular. Em baixos níveis de pressão sanguínea, a elastina controla o comportamento da parede do vaso, ficando relativamente extensível. Com a elevação da PA, o estresse de parede aumenta, o que acelera a degradação da elastina levando ao aumento da rigidez arterial e aumento adicional da PA. Com a pressão arterial elevada e sustentada, o colágeno torna-se cada vez mais rígido e a parede do vaso fica menos extensível (Pickup et al., 2019). Ações como a degeneração de fibras elásticas e deposição de colágeno (mediadas pelo envelhecimento) e deposição de lipídios com formação de mediadores inflamatórios (aterosclerose) contribuem neste mecanismo.

Como resultado, as alterações que o aumento da rigidez promove na distensibilidade, complacência e elasticidade das grandes artérias afetam a forma como a pressão e fluxo se adaptam em cada ciclo cardíaco. Assim, a hipertensão é vista como uma forma acelerada de envelhecimento vascular que leva ao enrijecimento da aorta, sendo o enrijecimento arterial tanto causa como consequência da hipertensão (Harrison, et. al., 2021; Pickup et al., 2019).

1.5 VOP e PP como marcador de rigidez arterial

Pela íntima ligação ao grau de elasticidade intrínseca da parede arterial e método prático, a medida da VOP é considerada padrão ouro para avaliar a rigidez das grandes artérias (Et-Taouil et al., 2001; Van Bortel et al., 2012). Esta medida foi derivada de um modelo de elasticidade vascular onde o volume ejetado forma o “reservatório elástico” denominado *Windkessel* (O’Rourke, 2013). A VOP é determinada pelo cálculo do tempo de trânsito entre dois locais de gravação na linha de propagação das ondas de pulso (Bortolotto & Safar, 2006), figura 5.

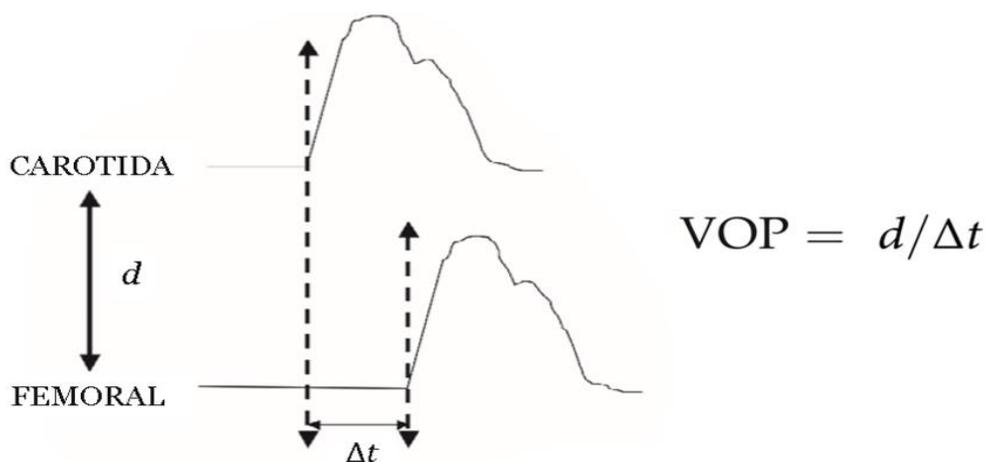


Figura 5: Cálculo de Bramwell e Hill para aquisição da VOP. d = distância entre os pontos (carótida-femoral) e Δt = tempo de trânsito entre as ondas de pulso. Modificado de Bortolotto & Safar, 2006.

Dessa forma, a VOP é baixa em artérias com paredes flexíveis e mais alta em vasos com paredes mais rígidas (Mendes-Pinto & Rodrigues-Machado, 2019). Em humanos, valores de VOP acima de 12 m/s são considerados anormais e segundo classificação de estratificação de risco cardiovascular, um valor >10 m/s pode sugerir presença de LOA (Brasileira, 2016; Han et al., 2017; Kaess & Rong, 2012). A VOP pode ser determinada por equipamentos como tonometria arterial, manguitos que captam a onda de pulso por oscilometria, doppler ou ressonância nuclear magnética (RNM) (Mendes-Pinto & Rodrigues-Machado, 2019).

A PP é determinada pela subtração dos valores entre PAS e PAD, sua interação está relacionada ao aumento da amplitude de reflexão da onda, sendo assim considerada um fator preditivo de rigidez arterial definido pelo componente pulsátil. Safar & Laurent (2003) demonstraram como a dinâmica de amplificação da PP é alterada a partir da rigidez provocada pela idade (figura 6). Aos 24 anos, a taxa de propagação é relativamente baixa nos vasos centrais e aumenta

progressivamente à medida que se tornam mais estreitos e menos distensíveis. Aos 68 anos, com os efeitos da rigidez arterial instalada, à amplificação da PP desaparece, fazendo com que a PA central e periférica se tornem idênticas, e aos 54 anos a situação é intermediária (Safar & Laurent, 2003).

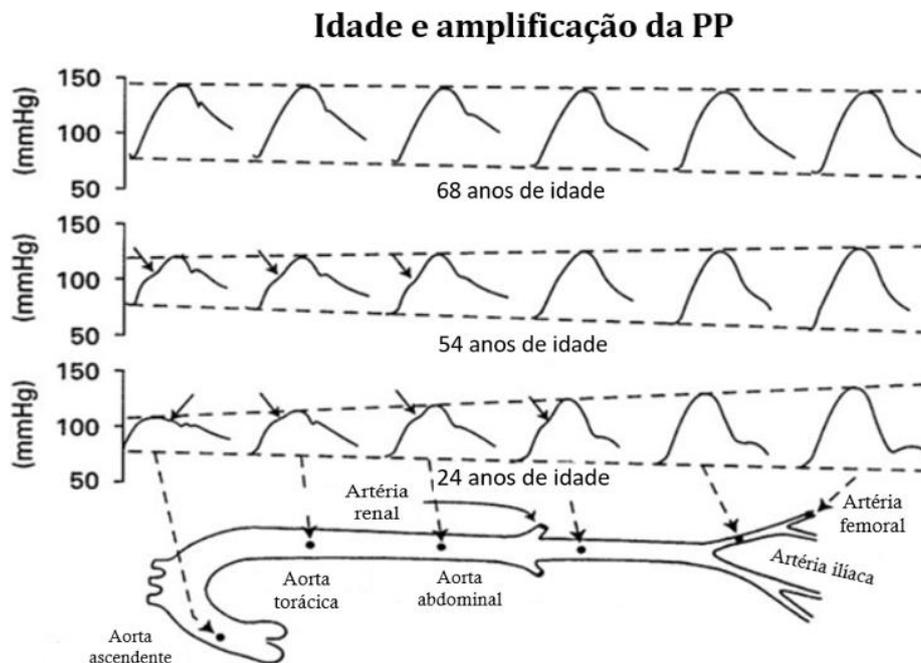


Figura 6: Propagação da onda PP das artérias centrais para as periféricas em indivíduos com 24, 54 e 68 anos de idade. (Modificado de Safar & Laurent, 2003)

Múltiplas abordagens terapêuticas potenciais foram propostas e testadas para reduzir a rigidez arterial. No entanto, a rigidez e pressão arterial possui uma relação bidirecional muito próxima. Qualquer mudança na PA ocasionaria um efeito na rigidez arterial e vice-versa. No momento, não há evidências robustas para apoiar a noção de que a rigidez arterial pode ser considerada reversível, exceto como uma consequência direta da redução da PA (Pickup et al., 2019).

1.6 Consumo de sódio

História e sua regulação no organismo

A prática de acrescentar sal nos alimentos ocorreu com a introdução da agricultura, cerca de 10.000 anos atrás. Antes disso, nossos ancestrais viviam com base em uma alimentação com cerca de 0,8 g sódio/dia. O consumo de sal era tão desconhecido que em idiomas mais antigos não existe uma palavra para sal. Cerca de 5.000 anos atrás, os Chineses descobriram função de conservação de alimentos a partir do sal, isso possibilitou o estoque de alimentos, reduzindo a necessidade de migração, o que promoveu o desenvolvimento de comunidades. Em um dado momento, o sal já foi chamado de “ouro branco”, sendo trocado por ouro na proporção de um para um (Ritz, 1996).

A palavra “sal” foi originada do latim “*salarium*”, uma vez que parte do salário dos soldados romanos era em sal. Até o século XIX, o sal ainda era a única fonte utilizada na conservação dos alimentos, fato que mudou com o surgimento da refrigeração por volta do ano de 1860, assim a utilização e consequente ingestão começou a diminuir. No entanto, com os ensejos da vida moderna a produção de alimentos industrializados como processados, embutidos e enlatados promoveu retorno do aumento do consumo de sal estando atualmente entre 9 e 12 g por dia na maioria dos países (Forechi et al., 2015; Ritz, 1996).

O sódio é o principal cátion do fluido extracelular, seus níveis plasmáticos situam-se entre 135 e 145 mEq/litro, a diminuição deste íon impossibilitaria mecanismos fisiológicos essenciais à manutenção da vida (Évora et al., 1999; Sarno et al., 2009). A fonte de sódio no organismo é exclusivamente feita pela alimentação. O sódio adentra no organismo pelo sistema gastrointestinal, sendo completamente absorvido. Após a absorção, o sódio da circulação é filtrado nos rins e reabsorvido para a corrente sanguínea para manter níveis apropriados. O remanescente é excretado pela urina, a qual comporta 90 a 95% da perda de sódio sendo o restante perdido pelo suor e fezes. Um desbalanço dessas funções pode culminar em distúrbios como o excesso de sódio plasmático (hipernatremia) ou valores plasmáticos de sódio inferiores ao normal (hiponatremia) (Paula & Costa, 2010; P. N. Rocha, 2011).

Os rins possuem mecanismos eficientes de controle de reabsorção e excreção de sódio em uma complexa dinâmica renal relacionado à natriurese pressórica. Dois mecanismos renais são considerados principais nesse controle: (1) mecanismo físico, o qual o aumento da filtração glomerular gerado pela pressão hidrostática intersticial renal ocasiona reabsorção de sódio tubular, e (2) mecanismo bioquímico, o qual a regulação dos transportadores de sódio é feita pela pressão de perfusão renal. Estes mecanismos são gerenciados sob influência primordial do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), o qual é secretado por variações de volemia e concentrações de sódio e potássio (Amaral & Sposito, 2006; Kurtz et al., 2016; Paula & Costa, 2010).

Em condições de hipovolemia, uma cascata de mecanismos para diminuir a excreção de sódio pela urina é desencadeada. A diminuição de sódio no túbulo distal, é detectada pela macula densa, o que estimula a secreção de renina no aparelho justaglomerular dos rins. A renina cliva o angiotensinogênio, gerando angiotensina I, a qual produz a enzima conversora de angiotensina (ECA) e esta converte Ang I em angiotensina II (Ang II). Após formada, a Ang II atua por dois principais receptores, o receptor de angiotensina tipo 1, que promove efeitos como vasoconstrição, anti-natriurese, liberação de aldosterona, fibrose e proliferação celular, enquanto o receptor de angiotensina tipo 2 contrabalança esses efeitos. Em resposta a Ang II, a aldosterona é então secretada. (Gonzalez et al., 2018; Mizuno et al., 1981).

Resultante da ação excessiva da aldosterona pode ocorrer hipernatremia, o que leva os osmorreceptores do núcleo supra-óptico a liberar o hormônio antidiurético para contrabalancear estes efeitos. A regulação do sódio é também influenciada pelo hormônio natriurético atrial, o qual estimula a excreção de água e sódio. O aumento da volemia também suprime as ações da aldosterona e hormônio antidiurético, o que ocasiona grande perda de sódio e água pela urina (McCann et al., 1994; Paula & Costa, 2010).

1.7 Alto consumo de sal, hipertensão e rigidez arterial

Alça ingestão de sódio e mecanismos renais do diagrama do mosaico de Page

Devido à influência do sódio sobre a regulação da PA, o alto consumo de sódio pode promover modulação da PA a partir de alterações de mecanismos reguladores renais. O SRAA é profundamente influenciado pela ingestão de sódio, em condições normotensas, a dieta alto sal (DAS) inibe o SRAA sistêmico, enquanto a dieta baixo sal (DBS) ativa esse sistema.

No entanto, há evidências crescentes de que o SRAA tecidual se comporta de forma contrária aos níveis plasmáticos de renina durante uma DAS. O mecanismo fisiopatológico se desencadearia por uma ativação inadequada do SRAA causando hipertensão por diversas vias. A alta concentração de sódio levaria a ativação da via ECA/Ang II/AT₁R promovendo aumento de PA e hipertensão. E a ativação do receptor de aldosterona pela Ang II levaria à retenção de sódio, resposta inflamatória e estresse oxidativo. Além do mais, em contraposição a via ECA2/Ang-(1-7)/MAS, relacionada a proteção do órgão a qual contrabalança os efeitos vasoconstritores da via ECA/Ang II/AT₁R, estaria atenuada pela dieta alto sal. Desenvolvendo um cenário que favorece a hipertensão por várias vias, figura 7, (Gonzalez et al., 2018).

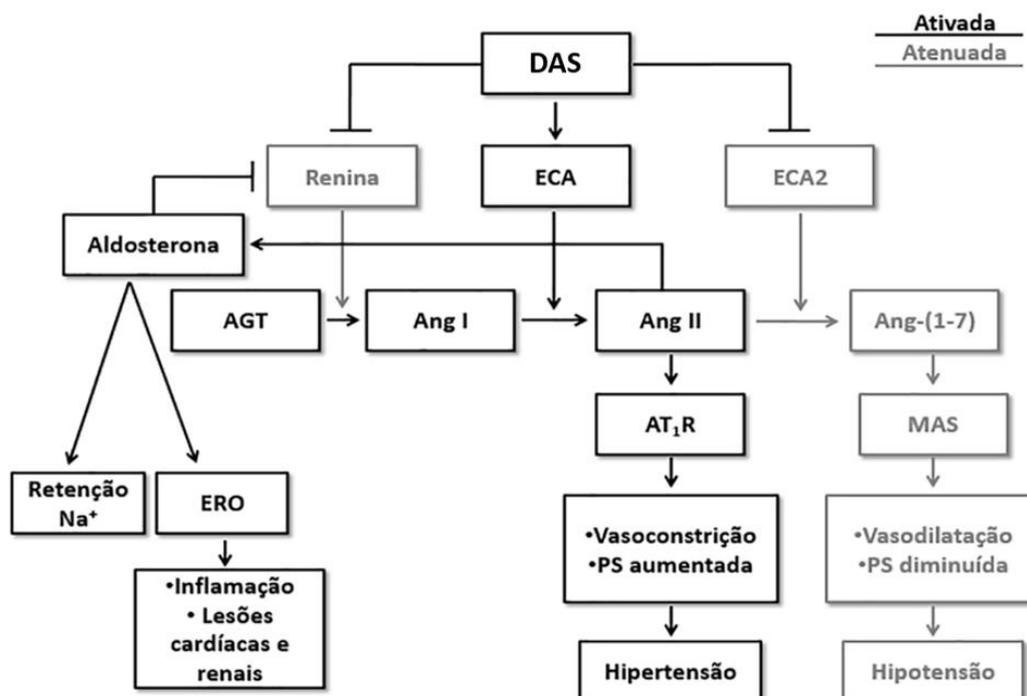


Figura 7: Ativação inadequada do SRAA promovida pelo alto consumo de sal, levando a hipertensão, retenção de sódio e stress oxidativo. (Modificado de Gonzalez et. al, 2018).

Outra forma de influência do sal na pressão arterial pelo sistema renal, é pelos mecanismos de osmorregulação e natriurese pressórica. O aumento da volemia em função da retenção de água decorrente do consumo de sódio eleva o débito cardíaco e gradualmente a resistência periférica. A retenção de 9 gramas de sal, faz com que o organismo retenha cerca de 1 litro de água. Esse aumento ocasiona uma sobrecarga no sistema cardiovascular. O depósito de sódio leva à vasoconstrição gerada pela tentativa do organismo de manter homeostasia, o que desencadeia a elevação da PA (Peixoto, 1999).

Inicialmente, cogitava-se que o aumento da volemia, induzida pela retenção de sódio, seria o principal mecanismo no desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda. Entretanto, evidências clínicas e experimentais indicam que o consumo de sal pode levar ao desenvolvimento de hipertrofia arterial, especialmente relacionada ao desenvolvimento de fibrose tecidual, mesmo na ausência de alterações pressóricas ou volêmicas (Grigороva et al., 2016; Tobian & Hanlon, 1990).

Outro mecanismo onde o alto consumo de sal leva ao aumento de PA, agora no sistema arterial, está relacionado à modulação da função da célula endotelial e estresse oxidativo (Salvi et al., 2018). Nesse mecanismo, o alto consumo de sódio induz um prejuízo na produção de NO, causando um efeito vasodilatador ineficiente, levando ao aumento de tensão que eleva PA (figura 8).

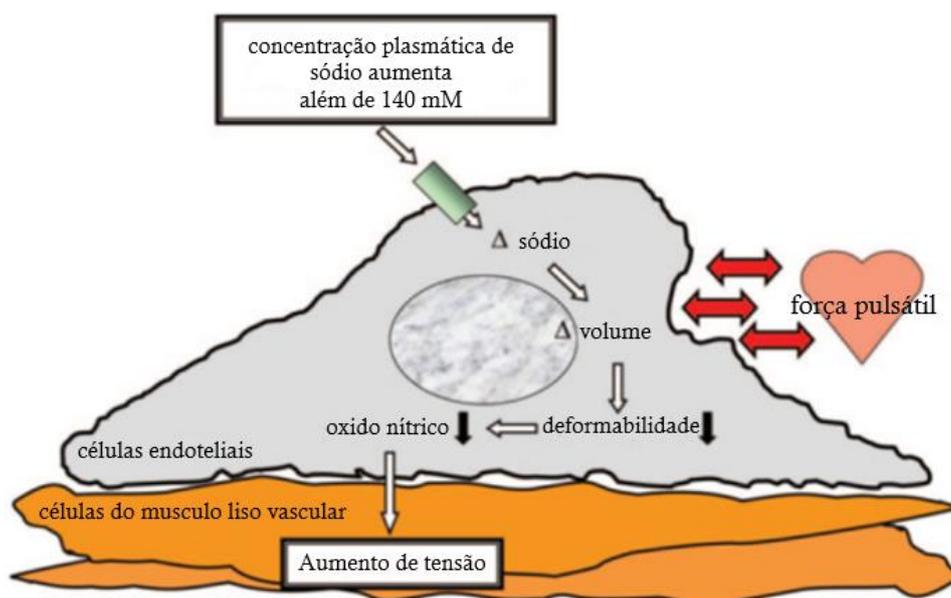


Figura 8: Aumento da concentração de sódio intracelular desencadeando prejuízos na produção de NO (Modificado de Oberleithner et. al, 2007).

Mais especificamente, este mecanismo ocorre por modificações na matriz extracelular, a qual inclui múltiplas proteínas estruturais, compreendendo colágeno e elastina, e é regulada por metaloproteinases de matriz (MMPs). A MMP2 e a MMP9 são ativadas pela dieta rica em sódio, levando ao aumento do fator transformador de crescimento beta1 (TGF- β 1), assim como prejuízo na inibição da produção endotelial de TGF- β 1 (Salvi et al., 2018) figura 9.

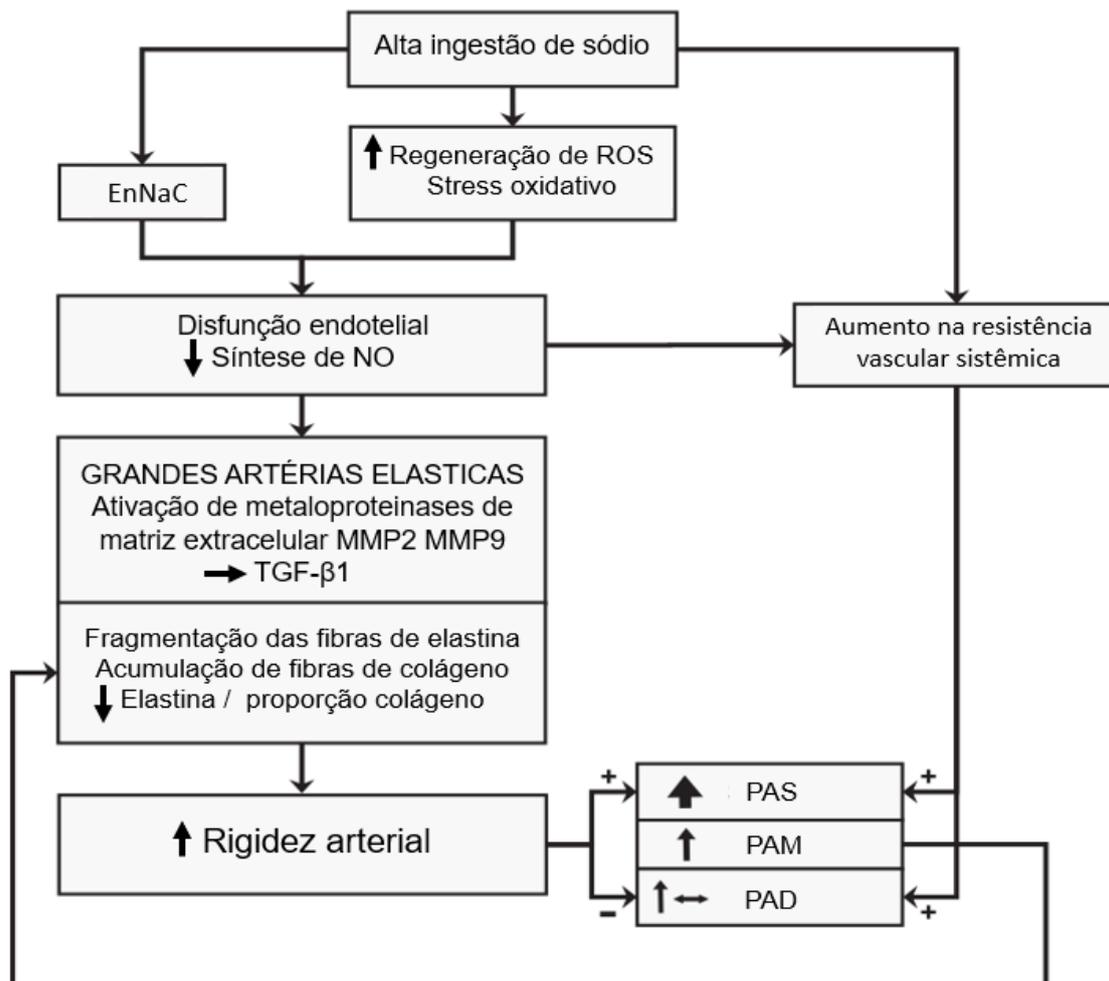


Figura 9: Mecanismos complexos subjacentes à relação entre a ingestão elevada de sal, pressão arterial e rigidez arterial. EnNaC, canal de endotélio de sódio; MMP, metaloproteinases de matriz; TGF, fator transformador de crescimento. Modificado de Salvi et al., 2018.

Dessa forma, a fibrogênese mediada por TGF- β 1 contribui para um aumento da rigidez arterial, e o efeito vasoconstritivo do TGF- β 1 promove o desenvolvimento de hipertensão, o que leva ao aumento de rigidez da parede arterial (Kusche-Vihrog et al., 2015; Oberleithner et al., 2007; Rodriguez-Iturbe, 2010; Sindler et al., 2011).

Muitos estudos básicos e clínicos mostram que alterações da rigidez arterial pela fragmentação da elastina na parede aórtica, são associadas com subsequente desenvolvimento da hipertensão. Experimentos com camundongos mostraram uma relação inversa entre a quantidade de elastina na aorta e a pressão sistólica, sendo que a redução da expressão da elastina precede o início da hipertensão (Le et al., 2011; Wagenseil & Mecham, 2012), tabela 1.

Genótipo	% Elastina	PAS (mmHg)
Bac+Eln+/+	120	105 ± 10
Eln+/+	100	122 ± 28
Bac+Eln+/-	80	125 ± 17
Eln+/-	60	175 ± 19
Bac+Eln-/-	30	183 ± 14

Tabela 1: Relação entre porcentagem aproximada de elastina e efeitos na pressão sistólica (Modificado de Wagenseil & Mecham, 2012).

A estreita interdependência entre PA e VOP é um fenômeno bem conhecido na fisiologia cardiovascular e foi repetidamente demonstrada em estudos sobre hemodinâmica vascular (Salvi et al., 2018). Muitos estudos ainda tentam entender a gênese da hipertensão, um estudo interessante “*Arterial stiffness and hypertension: chicken or egg?*” reunindo comparações de rigidez arterial vista por PP e VOP ao longo do tempo mostra que este mecanismo funciona a partir de muitas variáveis que ainda precisam ser investigadas, no entanto, a rigidez arterial precederia a hipertensão, sendo um potencial determinante em um mecanismo de *feedback* (Mitchell, 2014).

Embora o papel do sódio na hipertensão tenha sido amplamente documentado, seu efeito nas grandes artérias não está totalmente elucidado (Et-Taouil et al., 2001). Além do mais, os resultados apresentados na maioria dos trabalhos experimentais normalmente utilizam-se de doses muito elevadas de sal (7-8% na dieta), e isso limita uma interpretação translacional. Especialmente, não foi demonstrado se a elevação moderada do consumo de sal com 1% de NaCl na água de beber exerce efeito na rigidez arterial (medida por VOP), seja alterando ou potencializando os efeitos da hipertensão arterial.

Objetivo

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar efeitos do tratamento com sobrecarga salina na rigidez arterial e parâmetros cardiovasculares em ratos com hipertensão arterial espontânea (SHR).

2.2 Objetivos específicos

Avaliar efeitos da sobrecarga de sal (1% NaCl na água de beber por 60 dias) na:

- ✓ Na função renal em gaiola metabólica;
- ✓ Pressão arterial sistólica (pletismografia de cauda);
- ✓ Efeitos hemodinâmicos por medida direta (intrarterial);
- ✓ Velocidade de onda de pulso (VOP) carotídeo-femoral;

Realizar análise morfofuncional das artérias aorta de animais SHR submetidos ou não à sobrecarga de sal por meio de:

- ✓ Análise histológica do conteúdo de colágeno e elastina;
- ✓ Morfometria da parede arterial.
- ✓ Cálculo de tensão e estresse de parede.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Protocolo Experimental

Foram utilizados 32 ratos machos, Wistar e SHR de 12 semanas de idade fornecidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo. Os ratos foram distribuídos em 4 grupos (n=8), sendo dois deles submetidos à sobrecarga de sal (NaCl 1% na água de beber) e os demais de cada cepa sendo seus respectivos controles, ou seja:

- Wistar água (Wistar/C)
- Wistar sal (Wistar/S)
- SHR água (SHR/C)
- SHR sal (SHR/S)

Os animais foram separados aleatoriamente e mantidos em gaiolas coletivas contendo dois animais. Os grupos foram mantidos com livre acesso a água e ração, sendo que os animais do grupo Wistar/S e SHR/S receberam, ao invés de água, a solução salina. Todos os animais foram mantidos em temperatura ambiente de 23 a 25 °C e ciclo claro-escuro de 12h, respeitando as normas de biotério de pesquisa recomendada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-UFES, n.39/2019). A sequência experimental é esquematizada na figura 10.

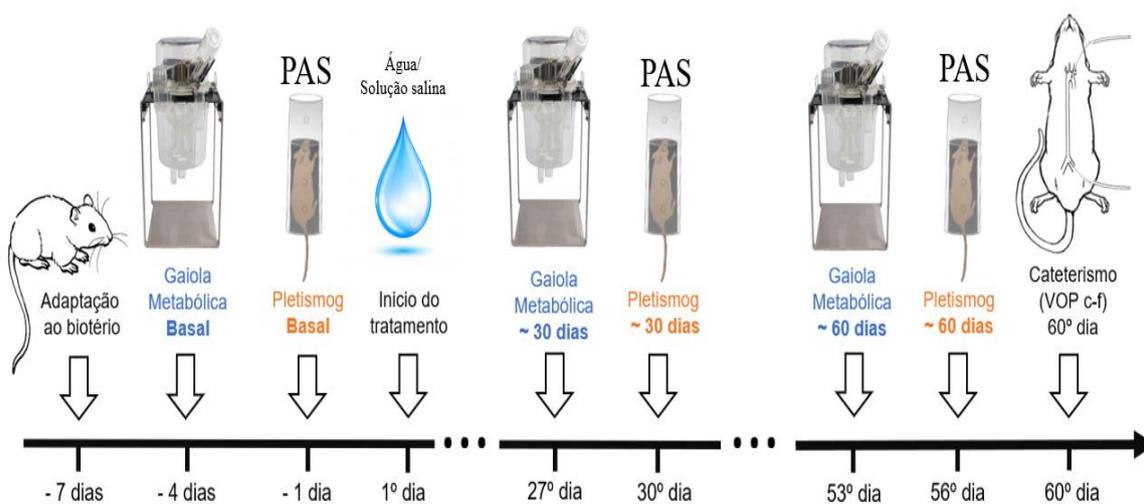


Figura 10: Fluxograma do tratamento e protocolos experimentais, n=4-8.

3.1.2 Consumo de líquidos em gaiola coletiva e avaliação ponderal

O tratamento teve duração de 60 dias e desde o primeiro, em todos os grupos foram realizadas medidas da ingestão de água ou solução salina e pesagem semanal ainda em gaiola coletiva, (figura 11).

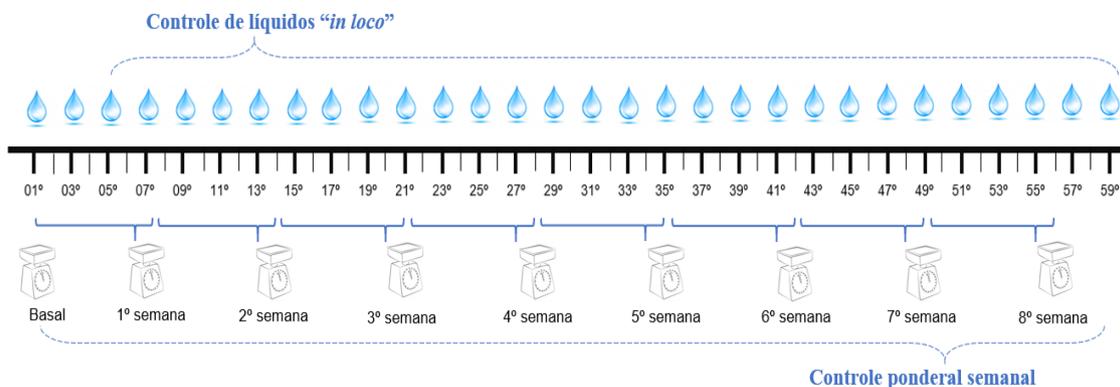


Figura 11: Fluxograma do controle de líquidos e peso ao longo do tratamento, $n=8$.

O início do tratamento de cada gaiola com 2 animais, foi marcado pelo início da oferta de 500 ml de 1% de NaCl na água de beber para animais sal e 500 ml de água para os animais controle. Os valores foram anotados com duplo controle - em planilha com calendário, bem como marcados em etiquetas com calendário na própria gaiola coletiva (figura 12). Dois dias depois o valor residual era mensurado e mais 500 ml de água ou solução salina ofertadas até que todas as gaiolas completassem 60 dias. Ao final do tratamento, o valor ofertado foi subtraído do valor residual e dividido por quatro (2 dias/2 animais), dessa forma foi possível acompanhar a média da ingestão diária de líquidos que os animais consumiram em 60 dias e obter o perfil de cada grupo em relação ao consumo de sal ao longo do tempo.

Foram adotadas medidas para diminuir a porcentagem de variação, como manipulação das gaiolas por apenas uma pessoa e aviso para não mover as gaiolas (figura 12-b). Porém a porcentagem de variação não dependeu somente do observador, mas também do observado. Desta forma, foi feito um cálculo de correção de variação pelo valor da ingestão de líquidos ingerida em gaiola metabólica (GM) pelo próprio animal correspondente. Ou seja, o valor médio do consumo de água em gaiola coletiva do primeiro mês foi corrigido pelo valor médio obtido na GM de 30 dias e o valor médio de ingestão do segundo mês, corrigido pelo consumo médio da GM aos 60 dias.

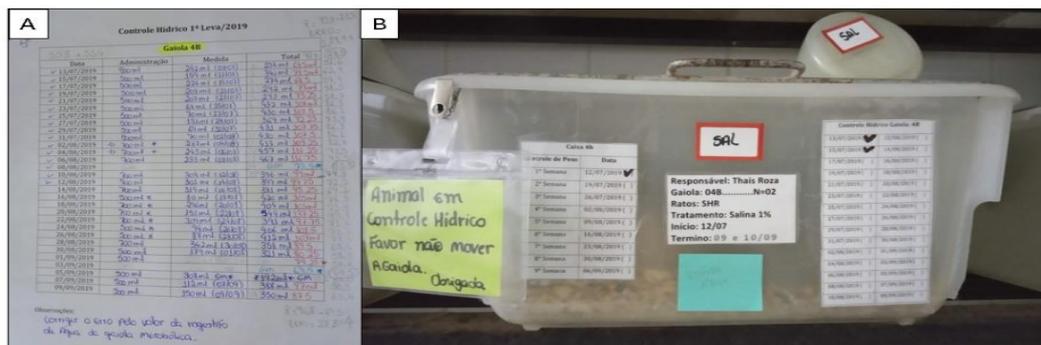


Figura 12: **a.** Planilha calendário de controle de líquidos. A variação dos valores diários foram corrigidos pela média de consumo de líquidos nas gaiolas metabólicas de 30 e 60 dias. **b.** Modelo de etiquetas usado em todas as gaiolas, para controle de líquidos e de peso semanal.

3.1.3 Gaiola Metabólica

Além do acompanhamento gradual de ingestão de água, uma amostra de 6 ratos por grupo foi individualmente mantida em gaiolas metabólicas (TECNIPLAST, ITALIA), durante 3 momentos: basal (antes do início do tratamento), 30 e 60 dias após início do tratamento (solução de NaCl 1%) ou inclusão no grupo controle (água) figura 13. A ração foi pesada e a água foi medida antes do início do protocolo, e assim foi realizada a avaliação do consumo de água e ração, assim como volume urinário e pesagem das fezes. As primeiras 24h foram destinadas à ambientação do animal à gaiola metabólica, e as seguintes 24h foram destinadas à avaliação dos parâmetros mencionados. Após a ambientação e realização dos referidos protocolos, o volume urinário foi medido, sendo a urina coletada e encaminhada para análise laboratorial de Na^+ , K^+ , creatinina e proteínas totais (Laboratório Tommasi de análises clínicas).

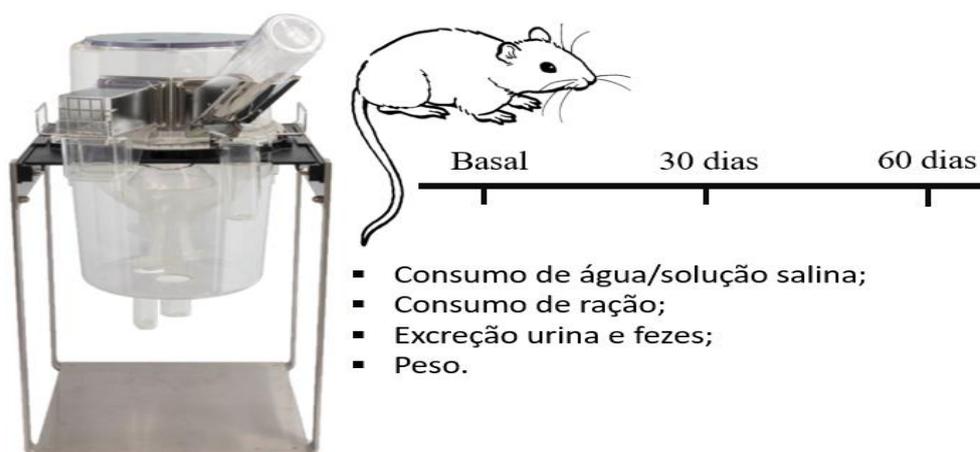


Figura 13: Fluxograma da avaliação da sobrecarga salina em gaiola metabólica, $n=6$.

3.1.4 Pletismografia de Cauda

Antes e durante o tratamento, aferiu-se de modo não invasivo a PAS por pletismografia de cauda. Este procedimento foi realizado no dia que antecedeu o início do tratamento (basal), sendo repetido após 30 e 60 dias, figura 14. No dia anterior à realização dos registros os animais foram ambientados ao equipamento, ao manguito na cauda e ao tubo de contenção (IITC INC/Life Science, 23924 Victory Blvd, Woodland Hills, Ca 91367-1253 USA). Os animais também foram ambientados antes de cada registro por 10 minutos, a fim de evitar a influência de estresse sobre a pressão arterial sistólica. No dia do registro os animais foram acomodados em câmara aquecida, com um manguito de pulso pneumático acoplado na região proximal da cauda. Um esfigmomanômetro foi insuflado e desinflado automaticamente e o valor de pelo menos 5 medidas de PAS para cada animal foi obtido através dos sinais do transdutor acoplado a um computador, como descrito em trabalhos anteriores, (M. P. Baldo et al., 2011; N. K. C. Lima et al., 2006). A temperatura foi mantida controlada entre 29 e 32°C e todo procedimento foi realizado durante um período máximo de 40 minutos. Os valores foram anotados para análise posterior, onde foi descartado o primeiro e último registro, e feito a média dos três valores centrais para cada animal.

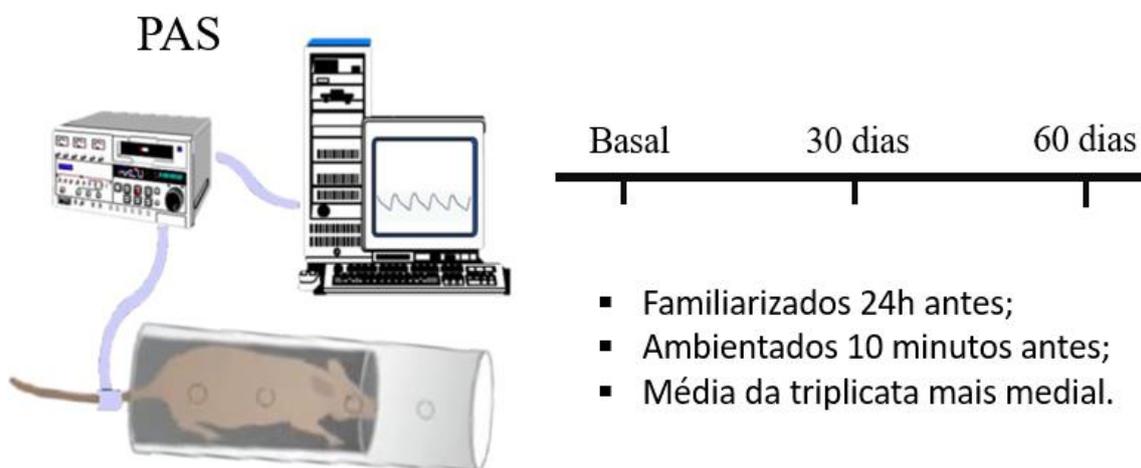


Figura 14: Fluxograma da avaliação da PAS por pletismografia de cauda, n=8.

3.2 Medidas hemodinâmicas

3.2.1 Método invasivo para obtenção da VOP

Para obter a VOP foi realizada uma medida simultânea das ondas de pulso pressórica em dois pontos da artéria aorta. Para isso, foram utilizadas duas cânulas de polietileno (PE): Uma introduzida através da artéria carótida (até alcançar a aorta torácica) e outra pela artéria femoral (até a aorta abdominal). Cada uma dessas cânulas consiste na fusão de dois cateteres com comprimento fixo – um PE50 (60 mm) acoplado a um PE10 (25 mm) com uma medida fixa. Esses cateteres foram devidamente preenchidos com salina heparinizada (50UI/ml) em temperatura ambiente previamente à sua inserção.

A extremidade distal de ambas as cânulas (PE50) foi conectada a um sistema de transdução de pressão (MLT0699, ADINSTRUMENTS) por meio de um conector exatamente igual no tipo e no comprimento (figura 15).

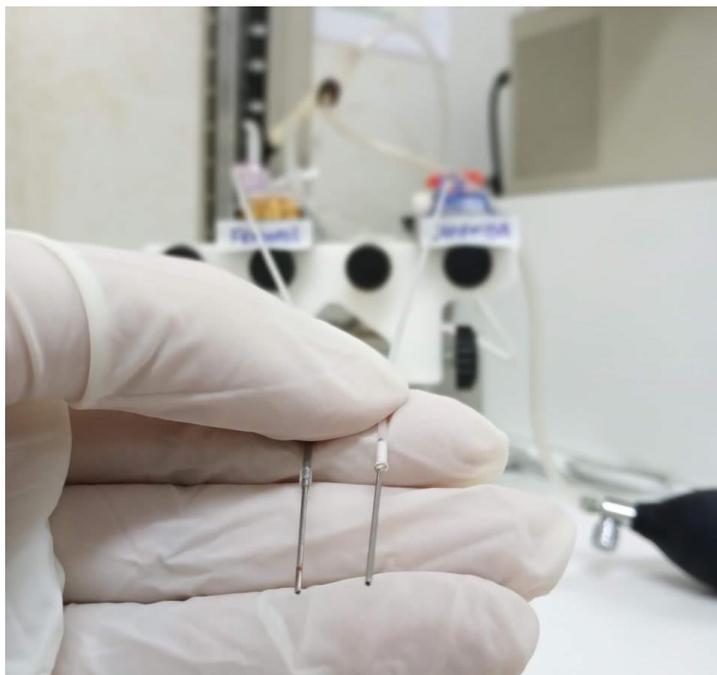


Figura 15: Cânulas do sistema de velocidade da onda de pulso.

Calibração do sistema VOP

Para a calibração simultânea do sistema, os dois transdutores foram conectados à coluna de mercúrio concomitantemente. Após teste de sincronia de leitura da pressão entre os transdutores, foi feito o cateterismo dos animais.

Cateterismo dos animais

Os ratos foram anestesiados com Ketamina (90mg/kg) e Xilazina (10mg/kg). Em seguida, as cânulas foram inseridas na artéria carótida e na artéria femoral esquerda, até o ponto de fusão entre PE10 e PE50 e fixadas com fio cirúrgico para evitar deslocamento durante o procedimento. A extremidade da cânula foi inserida até que atingisse a artéria aorta, seguindo uma medida fixa pré-estabelecida, e a outra extremidade foi inserida ao sistema VOP, figura 16.

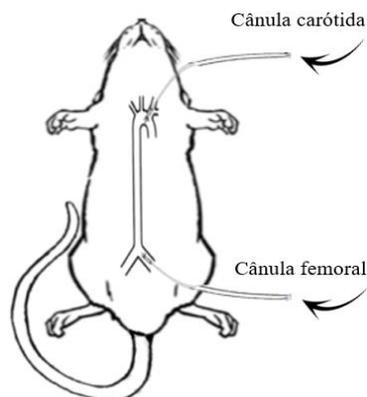


Figura 16: Ilustração de cateterismo carotídeo-femoral para aquisição de VOP.

Registro das ondas de pulso - VOP

Após 20 minutos de estabilização da PA, foram obtidos registros simultâneos de pressão durante no mínimo 15 minutos. O registro foi acompanhado em tempo real para monitoramento dos parâmetros hemodinâmicos do animal. Para registro e análise foi utilizado o software LabChart v. 7.0 (ADINSTRUMENTS).

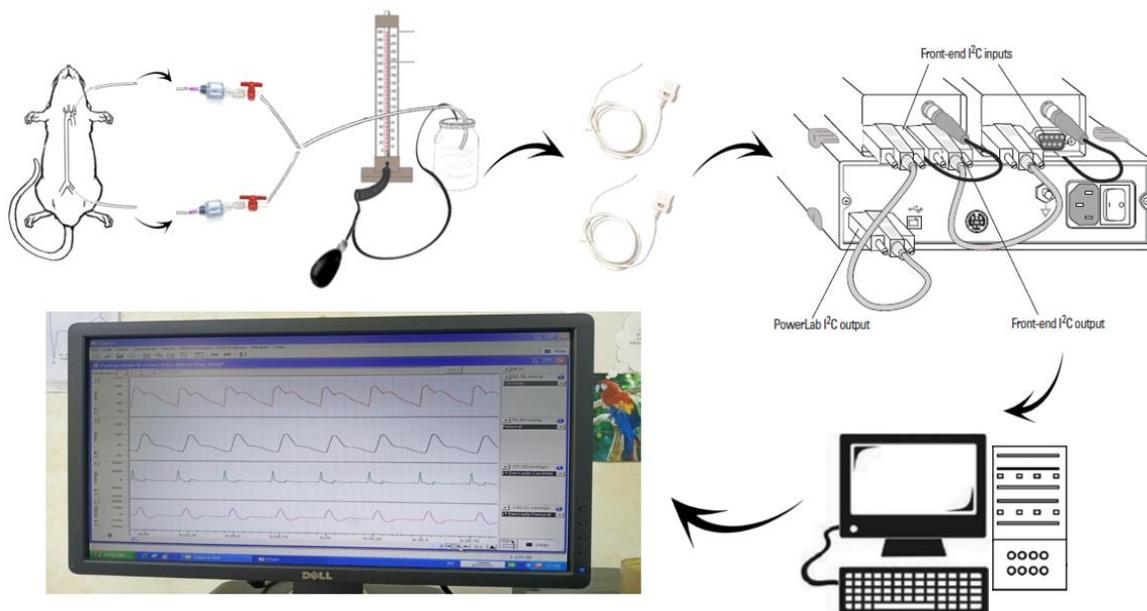


Figura 17: Sistema montado para aquisição das ondas de pulso carotídeo-femoral para o cálculo de velocidade da onda de pulso.

Aquisição da distância entre os pontos - VOP

Após o término do registro, os animais foram eutanasiados por exsanguinação, os órgãos da cavidade torácica foram removidos e a aorta foi exposta em sua totalidade para realizar a medida entre as extremidades das cânulas ali inseridas. Esta medida foi realizada com a superposição de um fio de algodão, entre a distância das extremidades das duas cânulas, e este seguimento recebeu o nome de “distância entre os pontos” (*foot to foot*). Em seguida o valor foi medido com auxílio de um paquímetro e anotado para posterior análise.

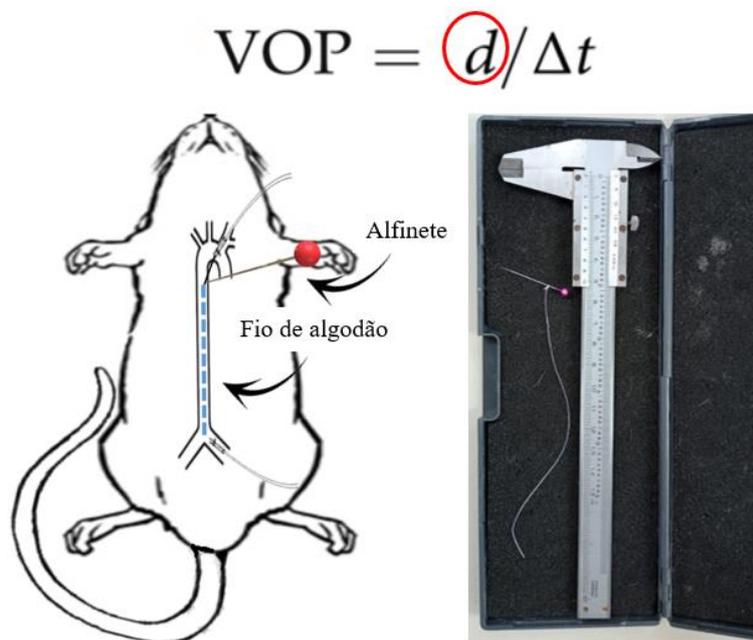


Figura 18: Método utilizado para aquisição da distância entre os pontos, “foot-to-foot”.

3.2.2 Aquisição PAS, PAD, PAM, PP e FC por medida direta

Além dos valores da VOP, utilizando cálculos de médias dos valores pressóricos registrados, esse sistema possibilitou acesso à dados hemodinâmicos invasivos como pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e a pressão de pulso (PP) foi determinada pelo cálculo de subtração dos valores entre PAS e PAD.

3.3 Coleta de órgãos

Coração

Após a eutanásia, o tórax do animal foi rapidamente aberto, o coração retirado e lavado em solução salina. Foram removidos os grandes vasos, e o excesso de umidade removido com papel de filtro e pesado em balança de precisão (Marte, mod. AL500).

Aorta

Após obter a medida da distância entre os pontos, a aorta foi inteiramente removida e limpa de resíduos de sangue em uma placa de petri com solução salina fisiológica (0,9%) fria. Seguidamente, um fragmento da aorta torácica foi limpo de seu tecido conectivo e adaptado a um sistema de fixação (figura 19-b), onde teve uma de suas extremidades conectadas à uma cânula e a outra completamente ocluída (figura 19-c). A aorta manteve-se insuflada com solução aquosa de formol tamponado a 10% em uma pressão equivalente à da pressão arterial média do animal analisado por 15 minutos. Esse procedimento teve como finalidade preservar as dimensões internas da aorta conservando sua estrutura o mais próximo do fisiológico. Em seguida a aorta fixada foi armazenada em cassetes histológicos, seguindo protocolo de inclusão em parafina e colorações.

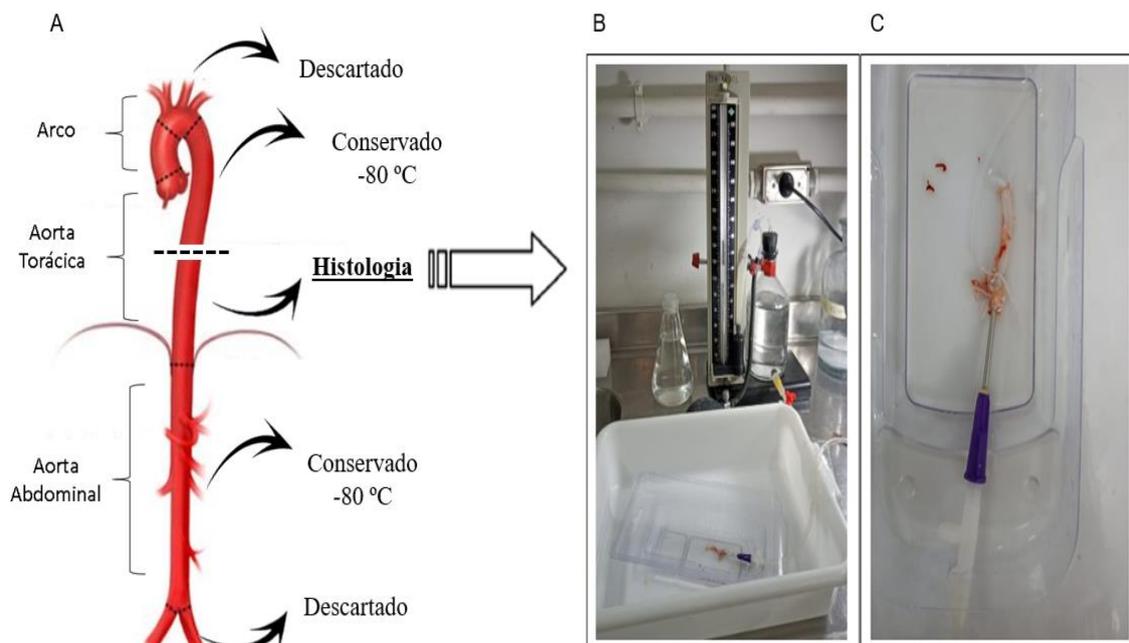


Figura 19-a,b,c: **a.** Esquema de como a aorta foi dividida. **b.** Sistema de fixação por pressão, utilizado para conservar diâmetro da luz vascular nos cortes histológicos. **c.** Aorta torácica inferior sendo perfundida com solução aquosa de formol tamponado (10%).

Rim, pulmão, tibia

Os rins foram removidos e lavados em solução salina fria, o excesso de umidade foi removido com papel de filtro, sendo então pesados em balança de precisão (Marte, mod. AL500). Foi realizada a pesagem dos pulmões (peso úmido), e para obter o percentual de água, os órgãos foram colocados em estufa a 65 °C por 24 horas e posteriormente pesados para o cálculo da relação úmido/seco, (M. P. Baldo et al., 2011; Mill et al., 2003). Por fim, a tibia foi removida, separada dos tecidos anexos e seu comprimento determinado com paquímetro, para posterior normalização dos pesos dos órgãos pelo tamanho do animal.

Análise off-line das ondas de pulso

Para o cálculo da VOP foi feita obtenção do “tempo entre os pulsos” (Δt - *foot-to-foot time*), realizada pela análise off-line dos registros de pulso pressórico na aorta torácica e abdominal. O Δt entre os dois pulsos, foi determinado em cada registro, por amostragem de 10 pares de pulsos escolhidos aleatoriamente. Para aumentar a exatidão do ponto de início do pulso de pressão (*foot*), as curvas de pressão arterial foram transformadas em sua primeira derivada temporal (dP/dt) e em seguida o “t” foi medido como a diferença em milissegundos entre o cruzamento da dP/dt da aorta torácica com o valor zero no sentido de valores positivos (saída de pressão estacionária para a subida da pressão), até o cruzamento do mesmo ponto no registro da dP/dt da aorta abdominal (figura 20).

$$VOP = d/\Delta t$$

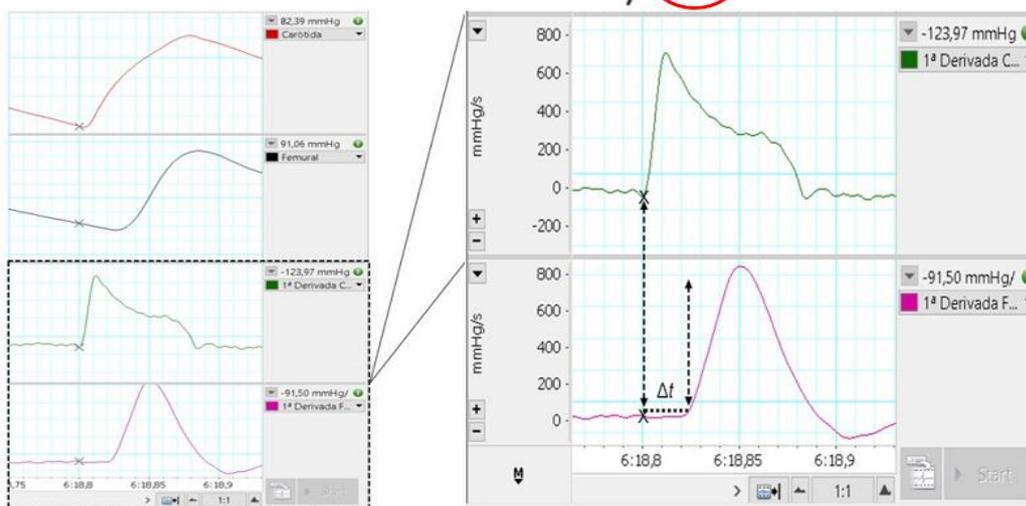


Figura 20: Esquema utilizado para encontrar o tempo entre os pulsos (Δt), para o registro e análise, as curvas de pressão arterial foram transformadas em sua primeira derivada temporal (dP/dt), usando o sistema software LabChart v. 7.0 (ADINSTRUMENTS).

Conhecidos os valores, o t médio foi calculado para cada animal, e junto com a D, a VOP foi determinada pela simples razão que estabelece a função de velocidade: $V = D/t$, sendo D em metros, t em segundos e VOP em m/s.

$$VOP = d/\Delta t$$

Figura 21: Fórmula utilizada para calcular velocidade da onda de pulso.

3.4 Técnicas Histológicas

Preparação do material

A aorta torácica foi identificada e disposta em cassetes histológicos (Easy Path), sendo fixada e conservada em formalina tamponada a 10% por 48 horas, desidratada 24 horas no álcool à 70%, depois encaminhada para o Laboratório Multiusuário de Histotécnicas da UFES, onde seguiu o protocolo de processamento das amostras, o qual inclui a (desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Para tanto, utilizou-se processador automático de tecidos (Lupetec Modelo PT 05), e os banhos foram feitos automaticamente seguido pelas seguintes etapas:

- a) Etanol 80% por 60 minutos;
- b) Etanol 90% por 60 minutos;
- c) Etanol 100% por 60 minutos;
- d) Etanol 100% por 60 minutos;
- e) Etanol 100% por 60 minutos;
- f) Etanol 100%:Xilol 100% (1:1) por 30 minutos;
- g) Xilol 100% por 30 minutos;
- h) Xilol 100% por 30 minutos;
- i) Xilol 100% por 30 minutos;
- j) Parafina histológica a 60°C por 30 minutos;
- k) Parafina histológica a 60°C por 30 minutos;
- l) Parafina histológica a 60°C por 30 minutos;
- m) Inclusão em parafina a 60°C em formas especiais e secagem.

Cortes e coloração

As aortas incluídas em parafina foram submetidas à microtomia com secção seriada com espessura de 5 µm. Foram produzidas duas lâminas para cada coloração específica do animal a ser avaliado a) Picrossirius red e b) Verhoeff.

A) O corante Picrosirius red, proporciona uma coloração avermelhada ao colágeno e amarelada ao tecido remanescente, estabelecendo um método histoquímico específico para identificação e quantificação do colágeno. O protocolo de coloração incluiu os seguintes passos:

- a) Xilol I: 3 minutos;
- b) Xilol II: 3 minutos;
- c) Xilol III: 3 minutos;
- d) Álcool Etílico – Xilol P.A (1:1): 3 minutos;
- e) Álcool Etílico (100%) I: 3 minutos;
- f) Álcool Etílico (100%) II: 3 minutos;
- g) Álcool Etílico (96%) III: 3 minutos;
- h) Água corrente: 3 minutos;
- i) Corante Picrossirius red: 30 minutos;
- j) Água corrente: banho rápido
- k) Álcool Etílico (96%) I: 1 minuto;
- l) Álcool Etílico (100%) II: 1 minutos;
- m) Álcool Etílico (100%) III: 1 minutos;
- n) Álcool Etílico – Xilol (1:1): 3 minutos;
- o) Xilol III: 3 minutos;
- p) Xilol II: 3 minutos;
- q) Xilol I: 3 minutos.

C) O corante Verhoeff em aorta, promove uma coloração marrom escura a negra na área das fibras elásticas é um método histoquímico específico para avaliação das lâminas elásticas. O protocolo de coloração utilizado foi o seguinte:

- a) Xilol I: 3 minutos;
- b) Xilol II: 3 minutos;
- c) Xilol III: 3 minutos;
- d) Álcool Etílico – Xilol P.A (1:1): 3 minutos;
- e) Álcool Etílico (100%) I: 3 minutos;
- f) Álcool Etílico (100%) II: 3 minutos;
- g) Álcool Etílico (96%) III: 3 minutos;
- h) Água corrente: 5 minutos;
- i) Iodo (Lugol): 3 minutos;
- j) Hipossulfito de sódio: 30 segundos;
- k) Água corrente: 10 minutos;
- l) Corante Verhoeff: 1 minuto e 20 segundos;
- m) Cloreto férrico a 2%: banho rápido;
- n) Água corrente: 15 minutos;
- o) Álcool à 95%: banho rápido;
- p) Água corrente: 10 minutos;
- q) Álcool Etílico (96%) I: 1 minuto;
- r) Álcool Etílico (100%) II: 1 minutos;
- s) Álcool Etílico (100%) III: 1 minutos;
- t) Álcool Etílico – Xilol (1:1): 3 minutos;
- u) Xilol III: 3 minutos;
- v) Xilol II: 3 minutos e
- x) Xilol I: 3 minutos.

Determinação das fibras elásticas e do colágeno da aorta

A análise dos cortes foi realizada no Laboratório Multiusuário de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR) no microscópio (AX70, Olympus Corporation, Japão) acoplado com uma câmera de vídeo (AxioCam ERc5s, Carl Zeiss, Alemanha). A avaliação e leitura das lâminas histológicas foi realizada por um só examinador treinado. As lâminas foram codificadas previamente por um observador externo ao estudo de modo que o observador interno pudesse realizar as análises de modo imparcial. As análises foram utilizadas com o software livre ImageJ. Todos os dados coletados foram descritos em planilha Excel para posterior análise estatística.

3.5 Morfometria

3.5.1 Avaliação das lâminas elásticas na túnica média

As lâminas elásticas, evidenciadas pela coloração de Verhoeff, foram avaliadas de forma quantitativa, contando-se o número de lâminas elásticas em cada segmento arterial. A contagem das lâminas elásticas foi realizada com o número de lâminas elásticas presentes no segmento da aorta; sendo a aorta dividida em 6 a 8 segmentos, calculada a média por animal ao final. A análise qualitativa foi usada para avaliar a possível descontinuidade das lâminas elásticas onde foi aplicado um escore de 0 (sem alteração) até 4 (grande alteração). O escore de avaliação seguiu os critérios seguintes: 0 nenhuma alteração; 1 descontinuidade em 0% a 25% das lâminas; 2 descontinuidade em 26% a 50% das lâminas; 3 descontinuidade em 51% a 75% das lâminas; 4 descontinuidade em mais de 75% das lâminas (Barão et al., 2019).

3.5.2 Quantificação do colágeno e determinação da AST

A quantificação do colágeno, evidenciada pela coloração picosirius red foi avaliada percentualmente de forma quantitativa. Quatro fotos aleatórias (40X) de cada secção da aorta foram obtidas e a fração de colágeno da túnica média foi avaliada com um método de detecção de limiar de cor semiautomático. O conteúdo de colágeno foi calculado como uma porcentagem da área total. A fibrose adventicial foi excluída da análise (Rubies et al., 2019).

As mesmas lâminas coradas com picrosirius, foram utilizadas para determinar a área de secção transversa (AST). As avaliações foram feitas pela média entre a subtração dos valores da adventícia e a intima medidas automaticamente e medida de forma manual. Após a determinação da AST, o valor foi corrigido pela dimensão da tibia.

3.5.3 Medidas de tensão e estresse de parede

A tensão de parede é determinada pela lei de Laplace como: $T_{(\text{dinas/cm}^2)} = P \times R$, onde T é a tensão, P é a PAM na qual o vaso foi fixado e R é o raio do vaso. Essa equação possibilita um raciocínio de equilíbrio entre pressão sanguínea, distensão de vaso e raio. Desta forma a pressão necessária para distender um vaso é inversamente proporcional à luz arterial, isto é, quanto maior a luz, menor a pressão necessária para promover sua distensão (Brekke et al., 2002).

O estresse de parede é a força exercida sobre a área a qual esta força é exercida. Usando essa definição na fisiologia cardiovascular, esse estresse é a força que é exercida sobre a estrutura das artérias, como exemplo nas ASTs onde as células do musculo liso vascular exercem uma força sobre a parede do vaso em resposta a tensão correspondente. Assim sendo, para chegar ao valor do estresse de parede será necessária a medida da espessura da parede e da seguinte fórmula: $E_{(\text{dinas/cm}^2)} = (PAM \times A) / M$, onde P é a pressão arterial média (mmHg), A é a área luminal (μm^2) e M a área de secção transversa da camada média (μm^2) (Brekke et al., 2002; W. A. Rocha et al., 2010).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm EPM. A normalidade da distribuição dos dados foram testadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As médias dos valores entre os grupos foram estatisticamente avaliadas através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, completamente randomizadas, seguida do teste de Tukey, utilizando-se o software Prism 5.0® (GraphPad, San Diego, CA, USA). O teste *t* de Student bicaudal foi utilizado para comparação entre duas amostras independentes. As diferenças entre os grupos foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

Resultados

4. RESULTADOS

Os resultados são apresentados por avaliação estatística intracepas e intercepas no decorrer de três segmentos:

- I. Efeitos do consumo de sal e hipertensão em 60 dias;
- II. Medida direta da pressão arterial;
- III. Estrutura e remodelamento vascular

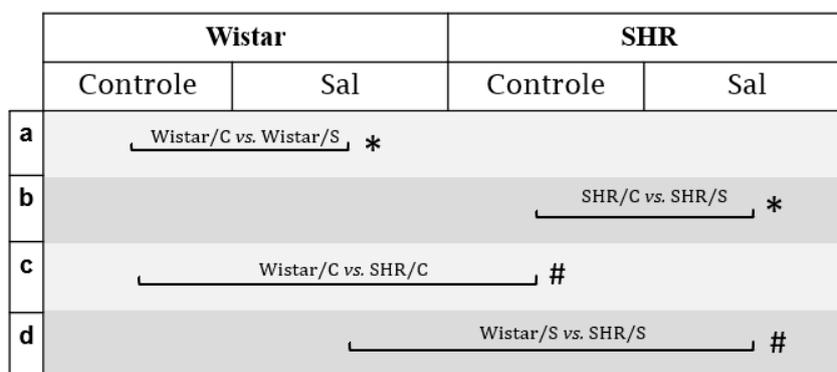


Figura 22: Esquema de comparações entre os grupos. Grupo Wistar/S e SHR/S (em consumo de solução salina 1% NaCl) e Wistar/C e SHR/C (controle, em consumo de água). Comparações referente ao tratamento (expressos por *) = (a). Wistar/C vs. Wistar/S; (b). SHR/C vs. SHR/S. E referente à hipertensão (expressos por #) = (c). Wistar/C vs. SHR/C; (d). Wistar/S vs. SHR/S.

I. EFEITOS DO CONSUMO DE SAL E HIPERTENSÃO EM 60 DIAS

4.1.1 Dados ponderais

Peso corporal em gaiola coletiva

O peso corporal foi acompanhado semanalmente durante 60 dias de tratamento (figura 23), e seu ganho percentual avaliado ao final do tratamento (figura 24). Os grupos não revelaram diferenças significativas considerando o tratamento, ou seja, sal vs. controle.

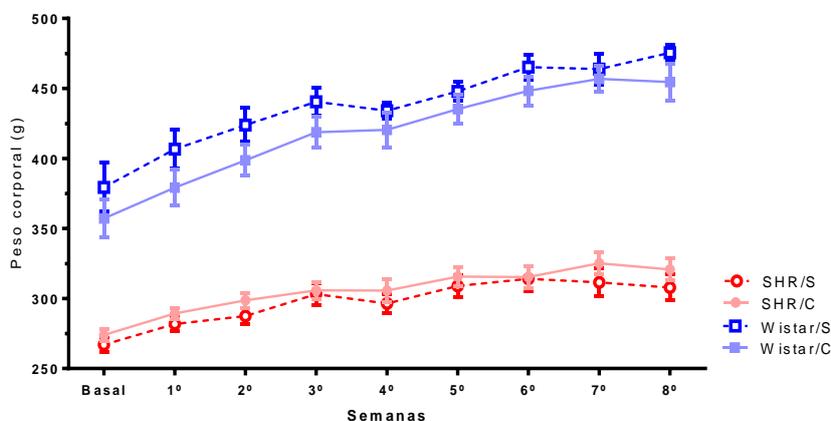


Figura 23: Peso corporal de animais hipertensos e normotensos com e sem sobrecarga salina ao longo de 8 semanas em gaiola coletiva, dados representam a média \pm EPM, $n=8$.

Entretanto, os animais SHR apresentaram menor ganho de peso quando comparados aos animais Wistar, mesmo independente do tratamento, (Wistar/C 102 ± 8 vs. SHR/C 42 ± 8 g, $P < 0,001$ e Wistar/S 97 ± 15 vs. SHR/S 46 ± 6 g, $P < 0,01$ – figura 24).

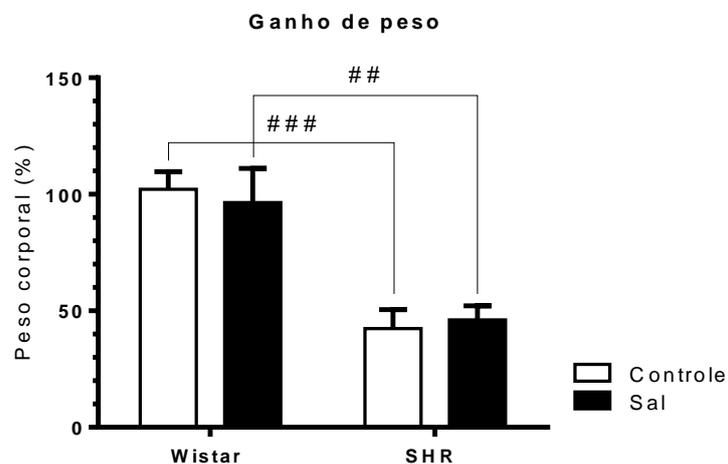


Figura 24: Efeitos da sobrecarga salina no ganho percentual de peso corporal, dados são expressos como média \pm EPM, ANOVA de 2 vias. ## $P < 0,01$ vs. SHR/C e ### $P < 0,001$ vs. SHR/S, $n = 8$.

4.1.2 Peso de fezes

Em gaiola metabólica

O peso das fezes dos animais foi avaliado em gaiola metabólica nos períodos basal, 30 e 60 dias. O alto consumo de sal resultou no aumento do peso de fezes em animais hipertensos aos 30 dias em relação ao valor basal ($30,3 \pm 1,5$ vs. $16,3 \pm 2,5$ g, $P < 0,05$ – figura 25).

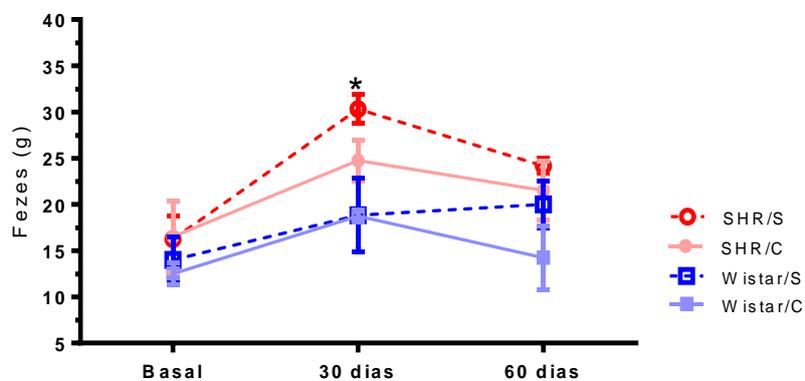


Figura 25: Peso de fezes em GM nos períodos 30 e 60 dias de tratamento comparados ao basal, dados são expressos por média, ANOVA de 2 vias. * $P < 0,05$ vs. SHR/S basal, $n = 4-6$.

4.1.3 Consumo de ração

Em gaiola metabólica

As análises de comparação sal vs. controle não revelaram diferença significativa entre os grupos, mesmo quando avaliando valores de 30 e 60 dias em relação ao valor basal (figura 26).

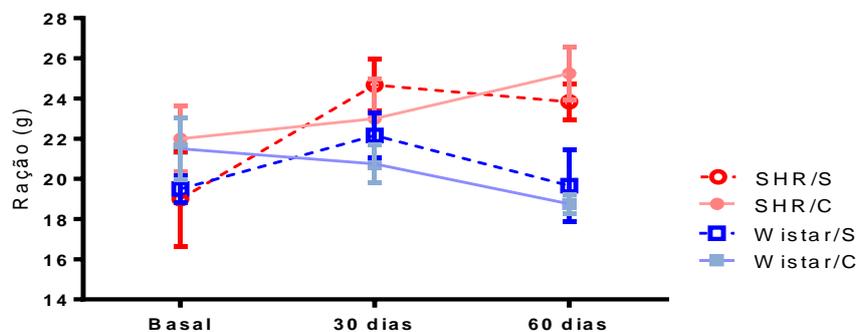


Figura 26: Consumo de ração em GM nos períodos 30 e 60 dias de tratamento comparados ao basal, dados são expressos por média, ANOVA de 2 vias, $n=4-6$.

No entanto, o consumo de ração foi maior no grupo hipertenso aos 60 dias em comparação com o grupo normotenso sem o tratamento com sal (SHR/C $25,3 \pm 1,3$ vs. Wistar/C $18,8 \pm 0,5$ g, $P<0,05$ – figura 27-c).

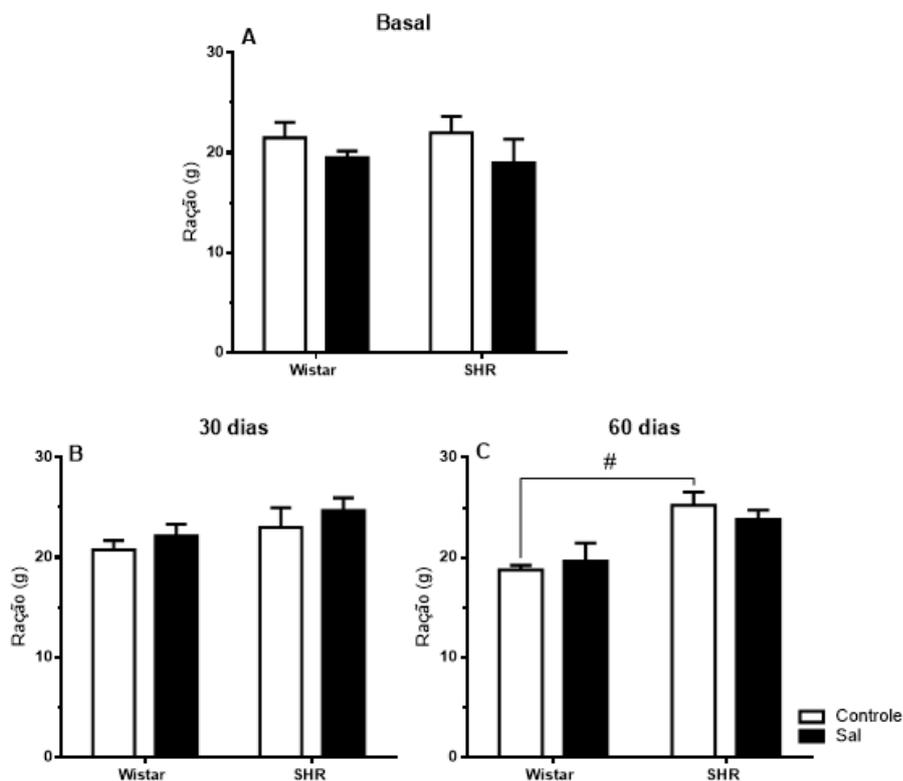


Figura 27: Efeitos da sobrecarga salina no consumo de ração avaliados em GM nos períodos basal, 30 e 60 dias de tratamento, os dados são expressos com média \pm EPM, ANOVA de 2 vias. c. $\#P<0,05$ vs. Wistar/C, $n=4-6$.

4.1.4 Consumo de água ou solução salina

Avaliação em gaiola coletiva e em gaiola metabólica

O consumo de líquido (água ou solução salina) foi avaliado durante 60 dias em gaiola coletiva seguindo as técnicas mencionadas no item. 3.1.2 dos métodos. No entanto, houve um aumento da ingestão de solução salina pelos animais SHR/S a partir do 11º dia de tratamento (SHR/C $44,4 \pm 2,7$ vs. SHR/S $88,8 \pm 6,9$ ml, $P < 0,0001$), sendo necessário aumentar o fornecimento de 500 para 700ml.

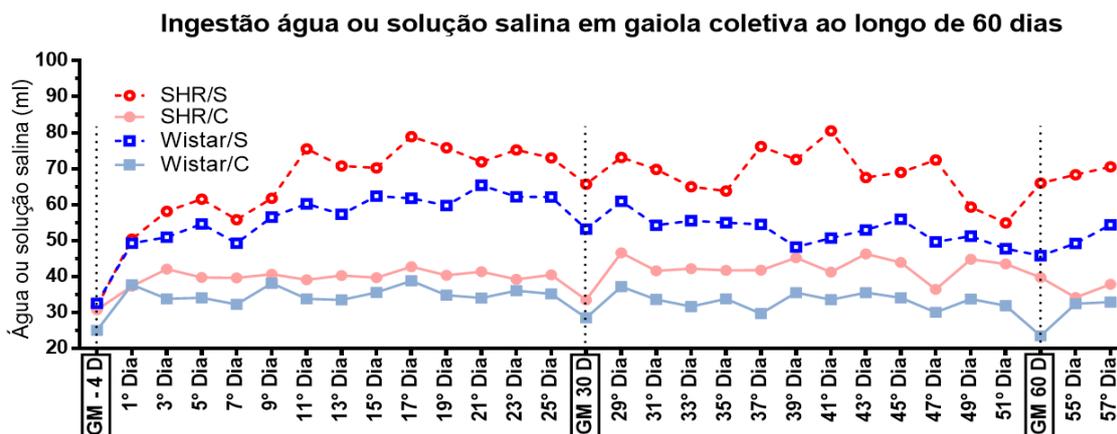


Figura 28: Consumo de água ou solução salina em animais normotenso e hipertensos ao longo de 60 dias de observação. Linhas verticais indicam valores de consumo em gaiola metabólica (GM basal, 30 e 60 dias), médias da GM foram correspondentemente utilizadas para corrigir percentual de erro.

Foi observado aumento significativo do consumo de solução salina em ambos os grupos, normotenso (Wistar/S $51 \pm 2,4$, vs. Wistar/C $33 \pm 0,5$ ml, $P < 0,0001$) e hipertenso, (SHR/S $78 \pm 7,1$ vs. SHR/C $41 \pm 0,7$ ml, $P < 0,0001$). Curiosamente, também observamos aumento significativo da ingestão líquida quando comparando animais hipertensos, de normotensos até mesmo independente do tratamento com sal. (SHR/C $41 \pm 0,7$ vs. Wistar/C $33 \pm 0,5$ ml, $P < 0,05$; SHR/S $78 \pm 7,1$ vs. Wistar/S $51 \pm 2,4$ ml, $P < 0,0001$), figura 29.

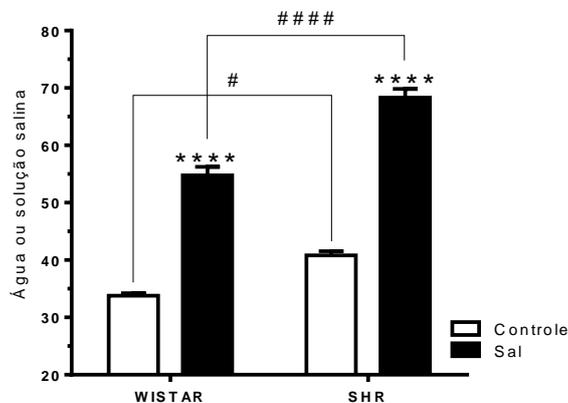


Figura 29: Média diária de consumo de água ou solução salina em gaiolas coletivas. Dados são expressos como média \pm EPM. Sal vs. controle **** $P < 0,0001$; Hipertensão vs. normotenso # $P < 0,05$; ##### $P < 0,0001$, $n=8$.

Da mesma forma, no entanto em gaiola metabólica, observamos o mesmo resultado nos períodos de 30 e 60 dias comparado ao próprio valor basal (figura 30) e de maneira individual aos 30 e 60 dias de tratamento (figura 31).

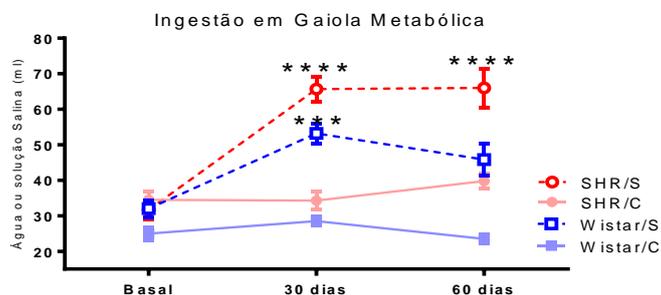


Figura 30: Consumo de água e solução salina em gaiola metabólica valores de 30 e 60 dias comparados valor basal, dados expressos como média \pm EPM, ANOVA de 2 vias.) (**** $P < 0,0001$; *** $P < 0,001$), $n = 4-6$.

Nas avaliações individuais, houve aumento significativo nas análises sal vs. controle aos 30 dias (Wistar/C $28,5 \pm 1,3$ vs. Wistar/S $53,2 \pm 2,8$ ml, $P < 0,001$; SHR/C $34,3 \pm 2,6$ vs. SHR/S $65,7 \pm 3,5$ ml, $P < 0,0001$ – figura 31-b) e aos 60 dias (Wistar/C $23,5 \pm 1,3$ vs. Wistar/S $45,8 \pm 4,6$ ml, $P < 0,05$; SHR/C $39,8 \pm 2,1$ vs. SHR/S $66 \pm 5,5$ ml, $P < 0,01$ – figura 31-c). Este aumento também foi encontrado em avaliações hipertenso vs. normotenso submetidos ao mesmo tratamento aos 30 dias (Wistar/S $53,2 \pm 2,8$ vs. SHR/S $65,7 \pm 3,5$ ml, $P < 0,05$ – figura 31-b) e aos 60 dias (Wistar/S $45,8 \pm 4,6$ vs. SHR/S $66 \pm 5,5$ ml, $P < 0,05$ – figura 31-c).

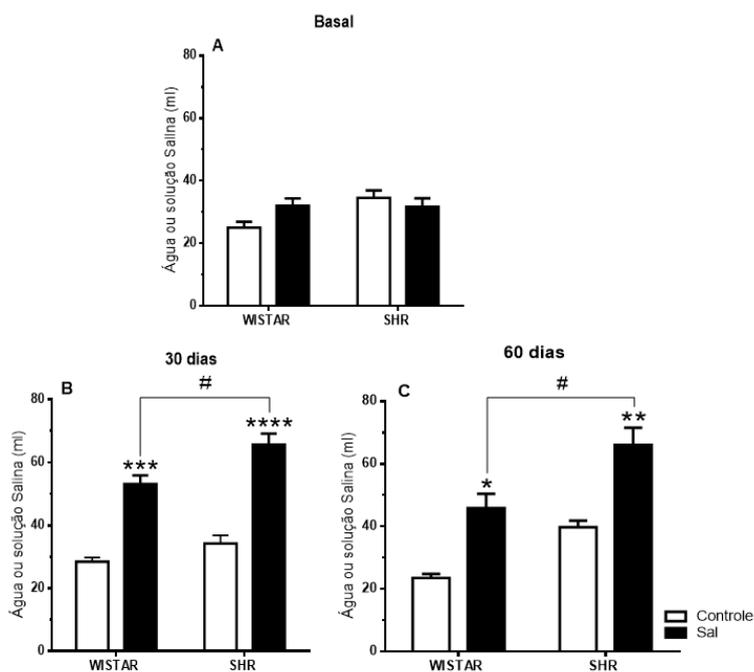


Figura 31: Efeitos da sobrecarga salina no aumento da ingestão de água ou solução salina. Avaliação em gaiola metabólica nos períodos basal, 30 e 60 dias, dados são expressos com média \pm EPM, ANOVA de 2 vias. **b.** *** $P < 0,001$ vs. Wistar/C; **** $P < 0,0001$ vs. SHR/C e # $P < 0,05$ vs. Wistar/S. **c.** * $P < 0,05$ vs. Wistar/C; ** $P < 0,01$ vs. SHR/C e # $P < 0,05$ vs. Wistar/S, $n = 4-6$.

4.1.5 Avaliação do volume urinário

Em gaiola metabólica

A diurese foi maior em animais hipertensos e normotensos em tratamento com sal em comparação ao controle, como pode-se observar na avaliação de 30 e 60 dias em relação ao basal (figura 32) e de maneira individual (figura 33).

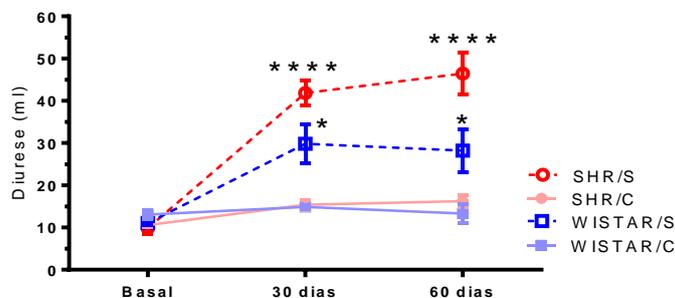


Figura 32: Diurese em gaiola metabólica nos períodos 30 e 60 dias comparados ao valor basal, dados são expressos por média \pm EPM, ANOVA de 2 vias. SHR/S 30 dias e SHR/S 60 dias vs. SHR/S basal (**** $P < 0,0001$) e Wistar/S 30 dias e Wistar/S 60 dias vs. Wistar/S basal ($*P < 0,05$), $n = 4-6$.

Individualmente comparando sal vs. controle, foi observado aumento significativo aos 30 dias (Wistar/C $14,9 \pm 0,5$ vs. Wistar/S $30,4 \pm 3,7$ ml, $P < 0,05$; SHR/C $15,4 \pm 1,2$ vs. SHR/S $41,8 \pm 3,0$ ml, $P < 0,0001$ figura 33-b) e aos 60 dias, esta diferença apresentou-se apenas em animais hipertensos (SHR/C $16,3 \pm 1,5$ vs. SHR/S $46,5 \pm 4,9$ ml, $P < 0,001$ figura 33-c). Independente do tempo de tratamento a diurese foi maior no grupo SHR quando comparado ao grupo Wistar ($P < 0,05$).

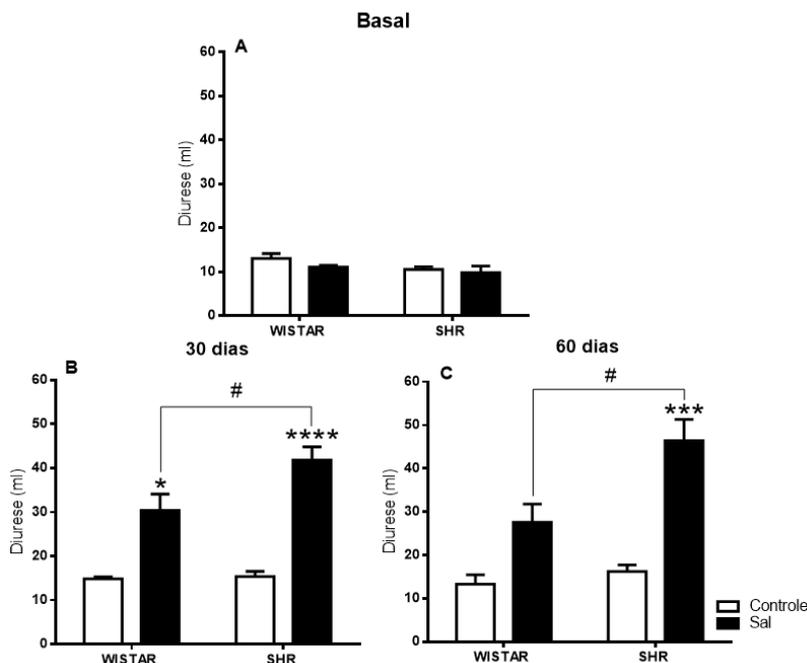


Figura 33: Efeitos da sobrecarga salina no volume urinário. Avaliação em gaiola metabólica nos períodos basal, 30 e 60 dias, dados são expressos com média \pm EPM, ANOVA de 2 vias. **b.** $*P < 0,05$ vs. Wistar/C; **** $P < 0,0001$ vs. SHR/C; # $P < 0,05$ vs. Wistar/S. **c.** *** $P < 0,001$ vs. SHR/C; # $P < 0,05$ vs. Wistar/S, $n = 4-6$.

4.1.6 Excreção urinária de sódio, potássio, creatinina e perda proteica

- Excreção de sódio urinário

A natriurese foi maior em animais hipertensos e normotensos em tratamento com sal avaliando o tempo de 30 e 60 dias pelo próprio valor basal (figura 34).

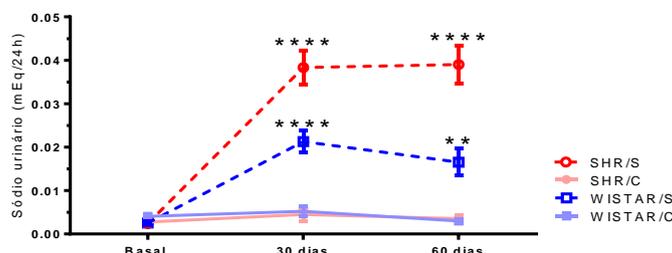


Figura 34: Natriurese de animais hipertensos e normotensos com e sem sobrecarga salina comparado ao valor basal, dados são expressos por média, ANOVA de 2 vias. (**** $P < 0,0001$; ** $P < 0,01$), $n = 4-6$.

E avaliando os grupos individualmente: Aos 30 dias (Wistar/C $0,005 \pm 0,001$ vs. Wistar/S $0,021 \pm 0,003$ $P < 0,001$; SHR/C $0,004 \pm 0,001$ vs. SHR/S $0,038 \pm 0,004$ mEq/24h, $P < 0,0001$ – figura 35-b) e aos 60 dias (Wistar/C $0,003 \pm 0,001$ vs. Wistar/S $0,017 \pm 0,003$ $P < 0,05$; SHR/C $0,004 \pm 0,001$ vs. SHR/S $0,039 \pm 0,04$ mEq/24h, $P < 0,0001$ – figura 35-c). Sendo que aos 60 dias, esta excreção foi maior no grupo hipertenso quando comparado ao grupo normotenso (Wistar/S $0,017 \pm 0,003$ vs. SHR/S $0,039 \pm 0,04$ mEq/24h, $P < 0,0001$ – figura 35-c).

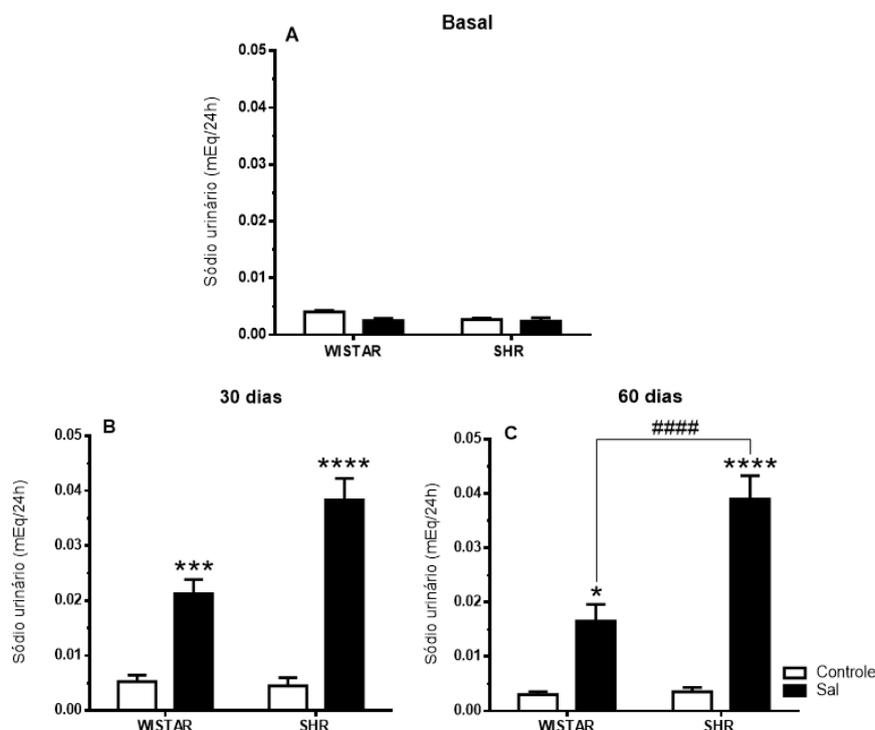


Figura 35: Avaliação da excreção de sódio urinário corrigida pelo volume urinário em gaiola metabólica e peso dos animais aos períodos basal, 30 e 60 dias (A,B,C respectivamente). Os dados são expressos com média \pm EPM, ANOVA de 2 vias. **b.** *** $P < 0,001$ vs. Wistar/C; **** $P < 0,0001$ vs. SHR/C e #### $P < 0,001$ vs. Wistar/S. **c.** * $P < 0,05$ vs. Wistar/C; **** $P < 0,0001$ vs. SHR/C e # $P < 0,05$ vs. Wistar/S, $n = 4-6$.

- Excreção urinária de potássio

As análises de excreção de potássio comparando grupos sal vs. controle não revelaram diferenças significativas, no entanto, a excreção de potássio foi maior no grupo hipertenso aos 60 dias em comparação com o grupo normotenso (Wistar/S $0,013 \pm 0,002$ vs. SHR/S $0,022 \pm 0,002$ g, $P < 0,01$ – figura 36-c).

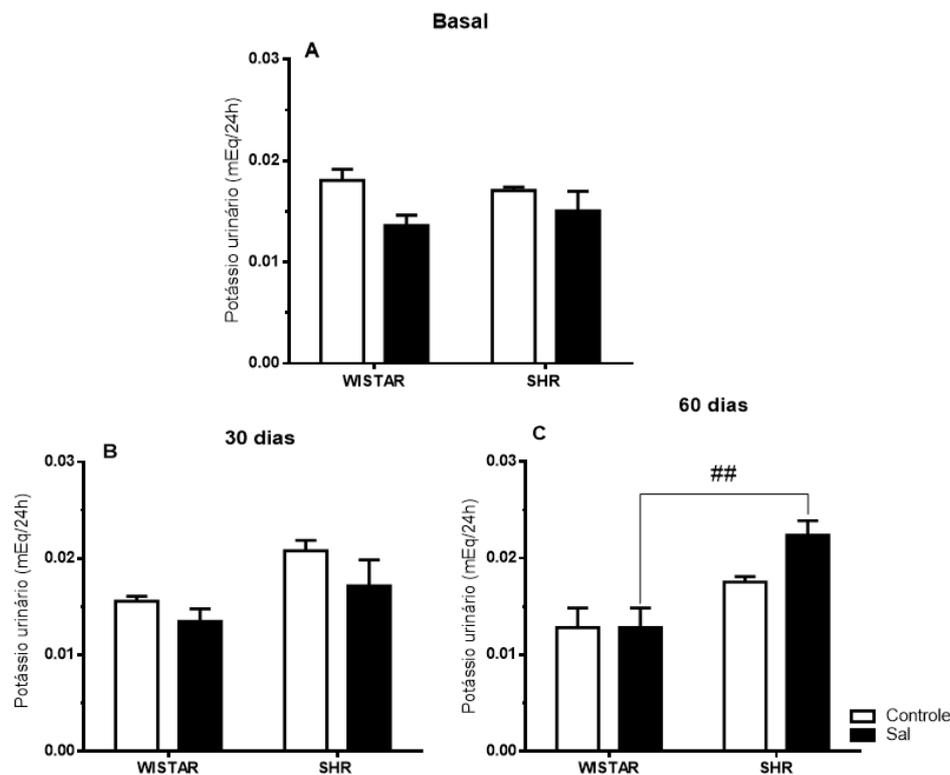


Figura 36: Avaliação da excreção de potássio urinário corrigido pelo volume urinário da gaiola metabólica correspondente aos períodos basal, 30 e 60 dias. Os dados são expressos com média \pm EPM, ANOVA de 2 vias, $n = 4-6$.

- Excreção urinária de creatinina

Independente do tempo de tratamento, as análises não mostraram alterações na excreção de creatinina (figura 37-c).

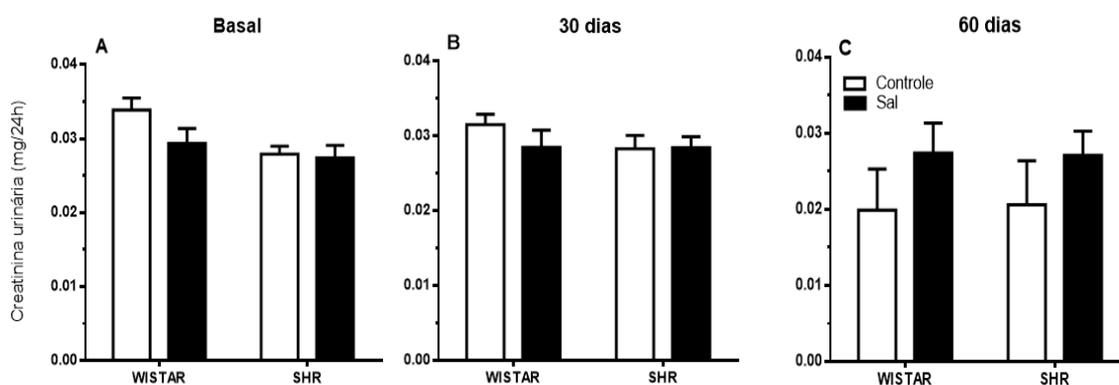


Figura 37: Efeitos da sobrecarga salina na excreção de creatinina urinária corrigida pela urina de 24h da gaiola metabólica correspondente aos períodos basal, 30 e 60 dias (A,B,C respectivamente). Dados são expressos com média \pm EPM, ANOVA de 2 vias. $\#P < 0,05$, $n = 4-6$.

- Perda urinária de proteína

Houve aumento de perda urinária de proteína em animais hipertensos tratados com sal aos 60 dias de tratamento em comparação ao seu valor basal.

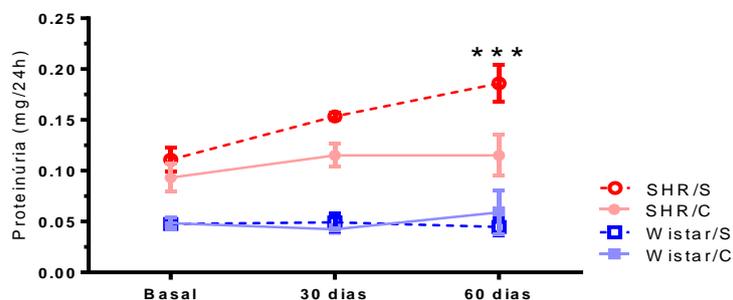


Figura 38: Proteinúria nos períodos de 30 e 60 dias vs. basal. Dados são expressos por média, ANOVA de 2 vias. SHR/S 60 dias vs. SHR/S basal (***) $P < 0,001$, $n = 4-6$.

As análises comparando sal vs. controle mostraram aumento de proteinúria aos 30 dias no grupo hipertenso (SHR/C $0,12 \pm 0,01$ vs. SHR/S $0,15 \pm 0,01$ mg/24h, $P < 0,05$ - figura 39-b), e aos 60 dias (SHR/C $0,12 \pm 0,02$ vs. SHR/S $0,19 \pm 0,02$ mg/24h, $P < 0,05$ - figura 39-c). E considerando hipertensos vs. normotensos houve aumento de proteinúria nos grupos tratados com sal em todos os tempos (Basal: SHR/S $0,11 \pm 0,01$ vs. Wistar/S $0,05 \pm 0,01$ $P < 0,001$ - figura 39-a; aos 30 dias: SHR/S $0,15 \pm 0,01$ vs. Wistar/S $0,05 \pm 0,01$ $P < 0,0001$ - figura 39-b; e aos 60 dias: SHR/S $0,19 \pm 0,02$ vs. Wistar/S $0,04 \pm 0,01$ mg/24h, $P < 0,0001$ - figura 39-c). Havendo também ao tempo basal aumento de proteinúria nos animais tratados com água (SHR/C: $0,09 \pm 0,01$ vs. Wistar/C: $0,05 \pm 0,01$, $P < 0,05$ - figura 39-a) e aos 30 dias (SHR/C: $0,12 \pm 0,01$ vs. Wistar/C: $0,04 \pm 0,01$, $P < 0,01$ - figura 39-b).

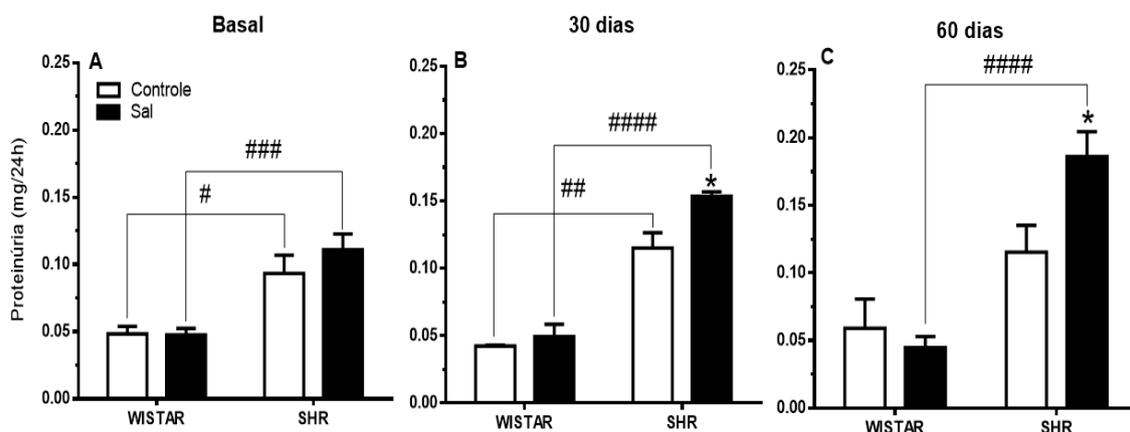


Figura 39: Proteinúria em gaiola metabólica nos períodos basal, 30 e 60 dias. Dados são expressos com média \pm EPM, ANOVA de 2 vias. A. ### $P < 0,01$ vs. Wistar/S. B. * $P < 0,05$ vs. SHR/C, ### $P < 0,01$ vs. Wistar/C; #### $P < 0,0001$ vs. Wistar/S. C. #### $P < 0,001$ vs. Wistar/S, $n = 4-6$.

4.1.7 Pletismografia basal, 30 e 60 dias

Comparados ao valor basal, a PAS do grupo SHR/S aumentou significativamente aos 30 e 60 dias. O aumento também pode ser visto em SHR/C - 60 dias, o que pode ser caracterizado como efeito do tempo, figura 40.

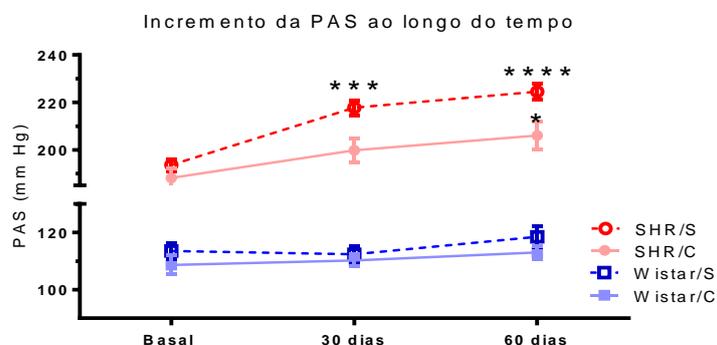


Figura 40: PAS por pletismografia de cauda ao longo de 60 dias, dados são expressos com média, ANOVA de 2 vias. *** $P < 0,001$ vs. SHR/S basal, **** $P < 0,0001$ vs. SHR/S basal e * $P < 0,05$ vs. SHR/C basal, $n = 8$.

Nas avaliações individuais (figura 41-a,b,c), observamos aumento significativo nas análises comparando sal vs. controle em animais SHR nos períodos 30 dias (SHR/C $200 \pm 5,2$ vs. SHR/S $218 \pm 3,2$ mmHg, $P < 0,01$ - figura 41-b) e 60 dias (SHR/C $206 \pm 5,8$ vs. SHR/S $225 \pm 3,3$ mmHg, $P < 0,05$ - figura 41-c). E aumento significativo de ($P < 0,0001$) em todos os grupos avaliando animais hipertensos vs. normotensos com mesmo tratamento, Basal: (Wistar/C $109 \pm 3,3$ vs. SHR/C $188 \pm 4,2$; Wistar/S $114 \pm 2,9$ vs. SHR/S $194 \pm 2,5$ mmHg - figura 41-a); 30 dias: (Wistar/C $110 \pm 2,1$ vs. SHR/C $200 \pm 5,2$; Wistar/S $112 \pm 2,7$ vs. SHR/S $218 \pm 3,2$ mmHg - figura 41-b), e aos 60 dias: (Wistar/C $113 \pm 2,2$ vs. SHR/C $206 \pm 5,8$; Wistar/S $119 \pm 3,8$ vs. SHR/S $225 \pm 3,3$ mmHg - figura. 41-c).

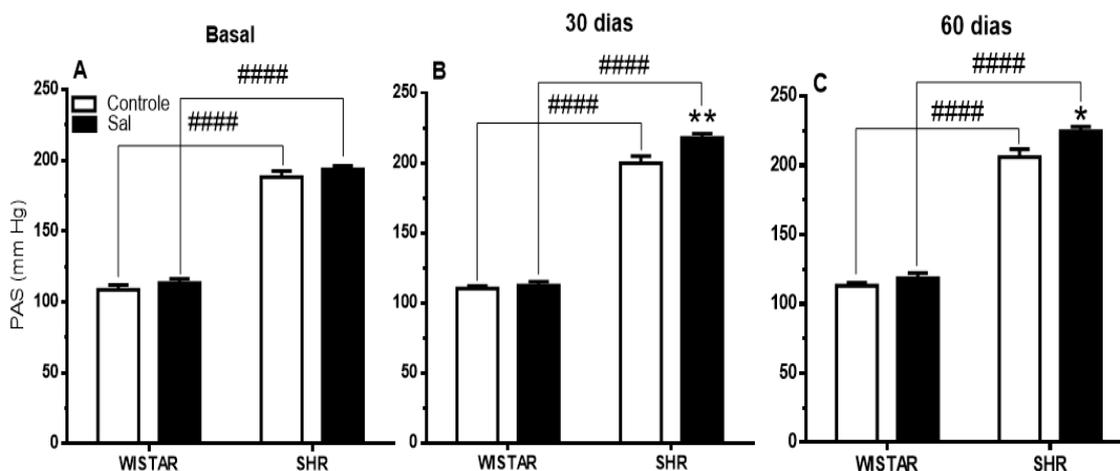


Figura 41: Efeitos da sobrecarga salina na PAS por pletismografia em animais hipertensos e normotensos, nos períodos basal, 30 e 60 dias (A,B,C respectivamente), dados são expressos com média \pm EPM. ANOVA de 2 vias. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, #### $P < 0,0001$, $n = 8$.

II. MEDIDA DIRETA DE PRESSÃO ARTERIAL

Avaliação hemodinâmica

Ao completar 60 dias de tratamento, os animais foram submetidos à medida direta da PA e medida da VOP. Após essas análises foi realizada eutanásia e remoção dos órgãos para avaliação ponderal e histológica.

Mortalidade

Devido as dificuldades técnicas da cirurgia de cateterismo carotídeo-femoral, no decorrer do experimento houve uma perda de 2 animais (1 Wistar/C e 1 SHR/C).

4.2.1 Dados ponderais e relação órgão/tíbia

O tratamento com sal aumentou significativamente o peso dos rins de animais Wistar (Wistar/C 1.320 ± 33 vs. Wistar/S 1.497 ± 29 , $P < 0,01$) e rim/tíbia (Wistar/C 300 ± 7 vs. Wistar/S 344 ± 8 , $P < 0,01$), o que não ocorreu no grupo SHR. Considerando hipertensão (mesmo quando corrigindo o peso absoluto pela dimensão da tíbia), houve aumento significativo do coração (Wistar/C 1.067 ± 38 vs. SHR/C 1.237 ± 44 , $P < 0,05$) e coração corrigido pela tíbia (Wistar/C 242 ± 6 vs. SHR/C 312 ± 9 , $P < 0,0001$; Wistar/S 254 ± 11 vs. SHR/S 310 ± 4 , $P < 0,001$); pulmão corrigido pela tíbia (Wistar/C 384 ± 22 vs. SHR/C 476 ± 13 , $P < 0,05$) e rim peso absoluto (Wistar/C 1.320 ± 33 vs. SHR/C 1.148 ± 39 , $P < 0,01$; Wistar/S 1.497 ± 29 vs. SHR/S 1.114 ± 29 , $P < 0,0001$) e rim corrigido pela tíbia (Wistar/S 344 ± 8 vs. SHR/S 286 ± 6 , $P < 0,0001$) – tabela 2.

	WISTAR		SHR	
	Controle (n=8)	Sal (n=8)	Controle (n=8)	Sal (n=7-8)
Tíbia (cm)	$4,4 \pm 0,04$	$4,4 \pm 0,06$	$3,9 \pm 0,02$ # (a)	$4,0 \pm 0,03$ # (b)
Coração (mg)	$1.104 \pm 0,05$	$1.067 \pm 0,04$	$1.208 \pm 0,02$ # (c)	$1.237 \pm 0,04$
Coração/tíbia (mg/cm)	$254 \pm 0,01$	$242 \pm 0,01$	$310 \pm 0,004$ # (d)	$312 \pm 0,01$ # (e)
Pulmão úmido. (mg)	$1.958 \pm 0,07$	$1.697 \pm 0,1$	$2.087 \pm 0,1$	$1.892 \pm 0,05$
Pulmão /tíbia (mg/cm)	$449 \pm 0,02$	$384 \pm 0,02$	$535 \pm 0,04$ # (f)	$476 \pm 0,01$
Pulmão seco. (mg)	$410 \pm 0,01$	$399 \pm 0,04$	$432 \pm 0,02$	$378 \pm 0,01$
Água pulmão (%)	$79 \pm 0,5$	$76 \pm 2,1$	$79 \pm 0,8$	$80 \pm 0,3$
Rim (mg)	$1.497 \pm 0,03$	$1.320 \pm 0,03$ * (g)	$1.114 \pm 0,03$ # (h)	$1.148 \pm 0,04$ # (i)
Rim/tíbia (mg/cm)	$344 \pm 0,01$	$300 \pm 0,01$ * (j)	$286 \pm 0,01$	$290 \pm 0,01$ # (k)

Tabela 2: Parâmetros ponderais de órgãos e relação órgão/tíbia por análise sal vs. controle (*) e hipertenso vs. normotenso (#). **a.** ##### $P < 0,0001$ vs. Wistar/C; **b.** ##### $P < 0,0001$ vs. Wistar/S; **c.** # $P < 0,05$ vs. Wistar/C; **d.** ##### $P < 0,0001$ vs. Wistar/C; **e.** #### $P < 0,001$ vs. Wistar/S; **f.** # $P < 0,05$ vs. Wistar/C; **g.** ** $P < 0,01$ vs. Wistar/C; **h.** ## $P < 0,01$ vs. Wistar/C; **i.** ##### $P < 0,0001$ vs. Wistar/S; **j.** ** $P < 0,01$ vs. Wistar/C e **k.** ##### $P < 0,0001$ vs. Wistar/S. Dados são expressos como média \pm EP, ANOVA de 2 vias. ** $P < 0,01$, $n = 7-8$.

4.2.2 Efeitos hemodinâmicos do alto consumo de sal

Pressão arterial sistólica, diastólica, média e frequência cardíaca

Nas análises realizadas por método invasivo, observamos que não houve diferença significativa nas análises sal vs. controle na PAS, PAD, PAM e FC. Entretanto nas análises considerando hipertenso vs. normotenso observamos aumento significativo nos parâmetros de PAS nos animais SHR quando comparados a seus respectivos Wistar com o mesmo tratamento (Wistar/C $116 \pm 3,8$ vs. SHR/C $146 \pm 4,4$, $P < 0,0001$; Wistar/S $119 \pm 3,3$ vs. SHR/S $153 \pm 3,0$ mmHg, $P < 0,0001$ – figura 42-a). Este aumento também foi observado na PAD entre animais tratados com água (Wistar/C $78 \pm 3,8$ vs. SHR/C $92 \pm 3,5$ mmHg, $P < 0,05$ – figura 42-b). Na PAM houve aumento nos SHR quando comparados a Wistar, independente do tratamento (Wistar/C $93 \pm 3,9$ vs. SHR/C $114 \pm 4,1$ $P < 0,01$; Wistar/S $98 \pm 2,1$ vs. SHR/S $118 \pm 3,2$ mmHg, $P < 0,01$ – figura 42-c). E na avaliação da frequência cardíaca não foi observada diferença significativa entre os grupos (figura 42-d).

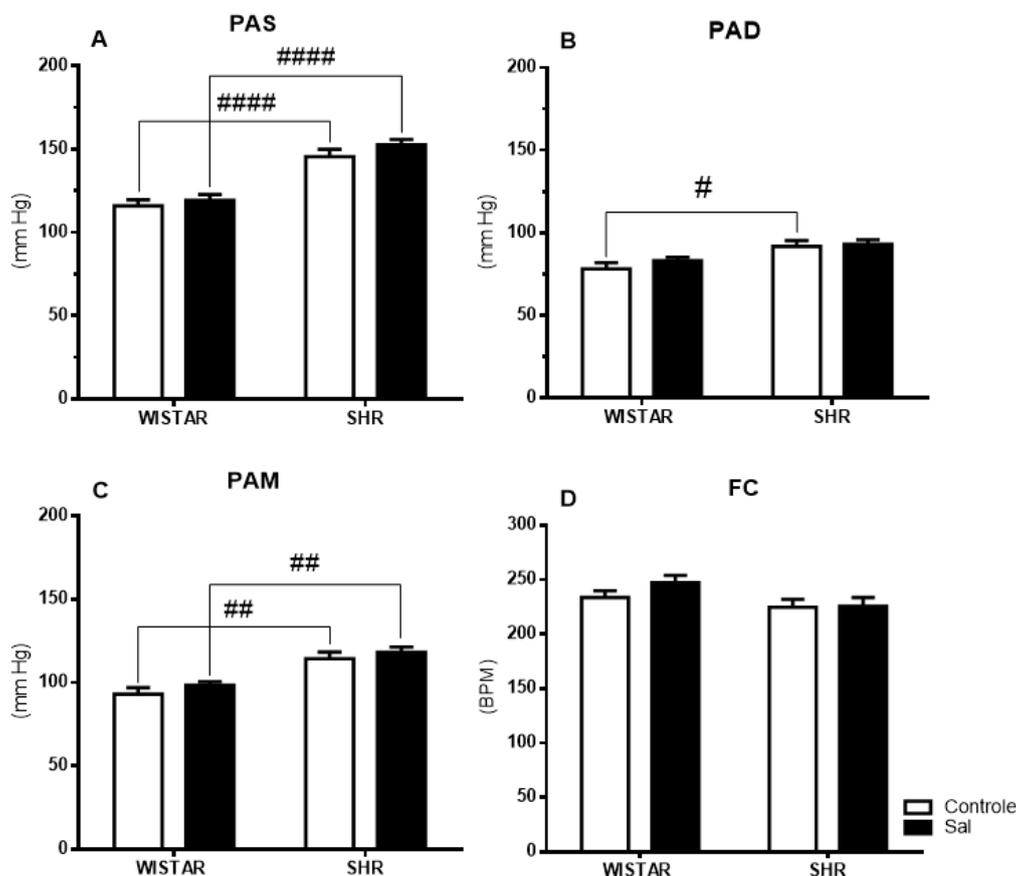


Figura 42: Função hemodinâmica por cateterismo arterial após 60 dias de sobrecarga salina em animais hipertensos e normotensos. a. Pressão Arterial Sistólica – PAS; b. Pressão Arterial Diastólica – PAD; c. Pressão Arterial Média – PAM e d. Frequência Cardíaca – FC, dados são expressos como média ± EPM, ANOVA de 2 vias. ##### $P < 0,0001$, ## $P < 0,01$, # $P < 0,05$, $n = 7-8$.

4.2.3 PAS não invasiva vs. PAS invasiva

Redução da PAS após efeitos da anestesia

Comparando a PAS direta vs. não invasiva (pletismografia), houve uma significativa redução apenas na PAS de animais hipertensos, sendo 61 mmHg em SHR/C: (SHR/C 206 ± 5,8 vs. SHR/C 146 ± 4,4 mmHg, $P < 0,0001$) e 72 mmHg em SHR/S: (SHR/S 225 ± 3,3 vs. SHR/S 153 ± 3,0 mmHg, $P < 0,0001$), figura 43.

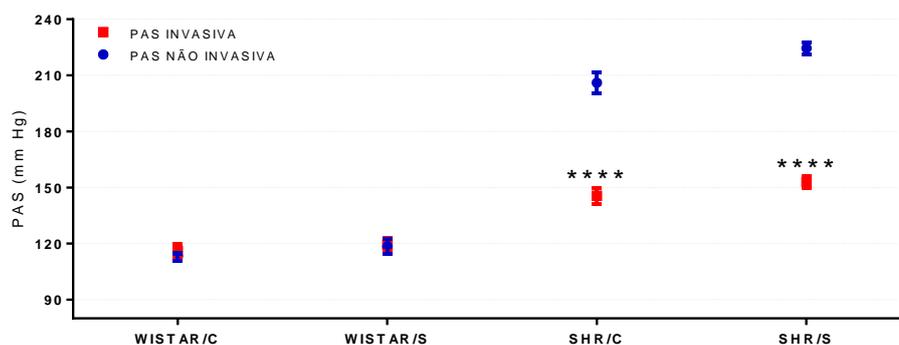


Figura 43: Pressão Arterial Sistólica (PAS) não invasiva (pletismografia de cauda) vs. invasiva (cateterismo carotídeo-femoral). Dados são expressos com média ± EPM, ANOVA de 2 vias. **** $P < 0,0001$ vs. SHR/C PAS não invasiva e **** $P < 0,0001$ vs. SHR/S PAS não invasiva e **** $P < 0,0001$ vs. SHR/S PAS não invasiva, $n = 7-8$.

4.2.4 Sobrecarga salina aumenta a PP de animais hipertensos

Independente da redução da PAS após o anestésico, a PP foi maior em animais hipertensos quando comparados aos animais normotenso (Wistar/C 38 ± 1,2 vs. SHR/C 54 ± 1,3 $P < 0,0001$; Wistar/S 36 ± 1,8 vs. SHR/S 60 ± 1,7 mmHg, $P < 0,0001$ – figura 44). E adicionalmente, animais hipertensos tratados com sal mostraram PP elevada quando comparado ao grupo controle (SHR/C 54 ± 1,3 vs. SHR/S 60 ± 1,7 mmHg, $P < 0,05$ – figura 44). Este achado sugere possíveis efeitos da sobrecarga de sódio nos mecanismos de complacência arterial.

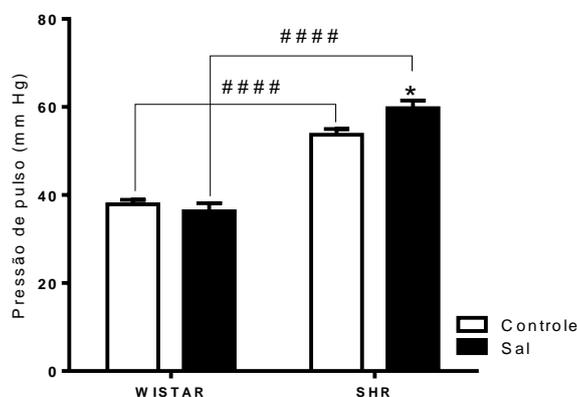


Figura 44: Pressão de pulso por cateterismo carotídeo-femoral após 60 dias de sobrecarga salina, dados são expressos por média ± EPM, ANOVA de 2 vias. * $P < 0,05$ vs. SHR/C; ##### $P < 0,0001$ vs. Wistar/C e ##### $P < 0,0001$ vs. Wistar/S, $n = 7$ e 8.

4.2.5 Sobrecarga salina eleva a VOP de animais hipertensos

Avaliamos a rigidez arterial de animais hipertensos e normotensos tratados com solução salina pela medida de VOP seguindo as técnicas mencionadas no item 3.2.1 dos métodos. Corroborando os achados da PP (figura 44), a hipertensão se mostrou um importante fator, elevando a VOP em 43% em relação ao grupo normotenso sem influência de sal (Wistar/C $4,3 \pm 0,3$ vs. SHR/C $6,2 \pm 0,2$ m/s, $P < 0,05$). No entanto, avaliando a soma dos fatores hipertensão e alto consumo de sal houve um incremento de 49% (Wistar/S $4,5 \pm 0,3$ vs. SHR/S $6,7 \pm 0,3$ m/s, $P < 0,001$ – figura 45-a).

Mais além, as análises comparando sal vs. controle mostraram que a sobrecarga salina aumentou significativamente a VOP de animais hipertensos tratados com sal quando comparado aos animais hipertensos em consumo de água (SHR/C $6,2 \pm 0,2$ vs. SHR/S $6,7 \pm 0,3$ m/s, $P < 0,05$ – figura 45-b), sendo o incremento de VOP após a sobrecarga salina correspondente à 8%. Esses achados fortificam um possível efeito provocado na rigidez arterial induzida pelo alto consumo de sal.

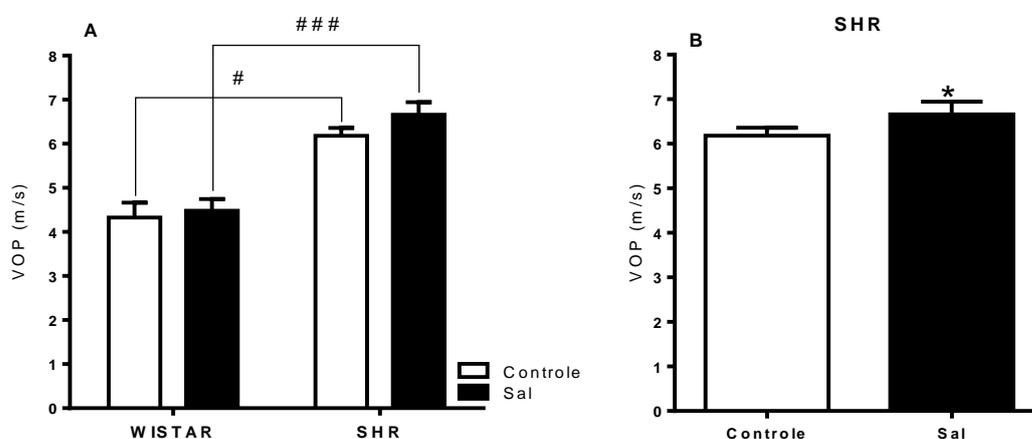


Figura 45: Velocidade da Onda de Pulso (VOP) em animais hipertensos e normotensos por cateterismo carotídeo-femoral ao 60º dia de sobrecarga salina, dados são expressos por média \pm EPM, test t, * $P < 0,05$, $n = 7-8$.

III. ESTRUTURA E REMODELAMENTO VASCULAR

Para avaliar os possíveis efeitos do alto consumo de sódio que levaram ao aumento da PP e VOP, avaliamos o componente passivo e ativo da fisiopatologia da rigidez arterial, o qual o componente passivo consiste de alterações mecânicas da parede vascular e o componente ativo de alterações na função endotelial e tônus do musculo liso vascular. Investigamos se 60 dias com tratamento com 1% de NaCl na água de beber promoveu remodelamento nas artérias aortas de ratos com e sem hipertensão. Para isso, inicialmente determinamos o valor absoluto da área luminal e da área de secção transversa da camada média vascular (AST) e avaliamos o colágeno, quantidade de lâminas elásticas e se houve fragmentação. Posteriormente foi determinado parâmetros funcionais, como medida de tensão de parede e estresse da camada média vascular – tabela 3.

	WISTAR		SHR	
	Controle (n=7)	Sal (n=7)	Controle (n=8)	Sal (n=8)
Área luminal (μm^2)	47000 \pm 2012	49857 \pm 3446	44750 \pm 1698	47250 \pm 3239
Área externa média (μm^2)	253849 \pm 10880	270332 \pm 19029	241292 \pm 16927	255340 \pm 15171
AST da camada média (μm^2)	11000 \pm 926	12143 \pm 738	17000 \pm 2155 #	18375 \pm 1475 #

Tabela 3: Valor absoluto da área luminal, área externa da camada média e área da secção transversa (AST) da camada média após 60 dias com sobrecarga salina. # $P < 0,005$ vs. Wistar/C e # $P < 0,005$ vs. Wistar/S. Dados são expressos por média \pm EPM, ANOVA de 2 vias, $n=7-8$.

4.3.1 Área luminal da aorta e AST da camada média

As análises não mostraram alterações na área luminal de animais tratados com ou sem hipertensão, (figura 46).

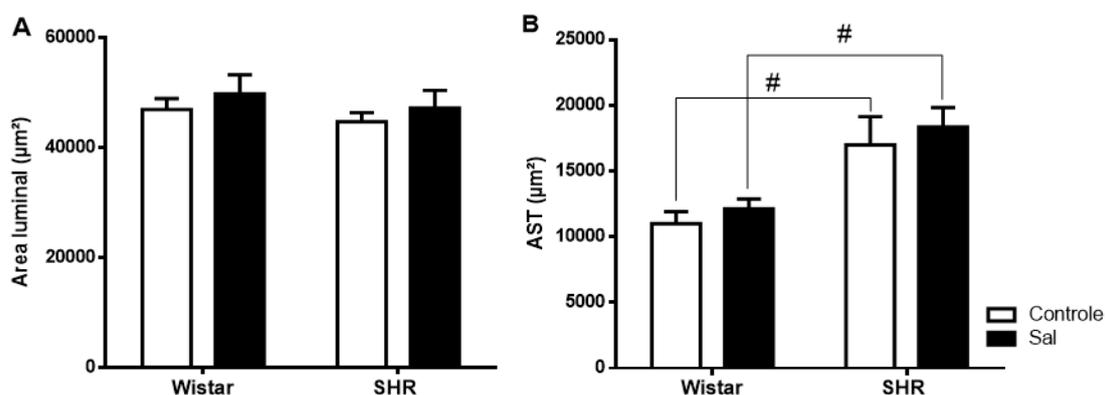


Figura 46: Área luminal (A) e AST da camada média (B). Dados são expressos por média \pm EPM, ANOVA de 2 vias, $n=7-8$.

4.3.2 Deposição de colágeno

Sendo uma possível resposta para justificar o aumento da VOP e PP causada pela sobrecarga salina em animais hipertensos, as análises morfológicas mostraram maior deposição de colágeno na camada média da aorta de animais hipertensos em tratamento com sal em relação ao grupo controle (SHR/C $7 \pm 0,7$ vs. SHR/S $16 \pm 2,3$ %, $P < 0,01$). Curiosamente a deposição de colágeno foi maior no grupo Wistar em relação aos SHR independente do tratamento com sódio, (SHR/C $7 \pm 0,7$ vs. Wistar/C $17 \pm 1,8$ %, $P < 0,001$), figura 47.

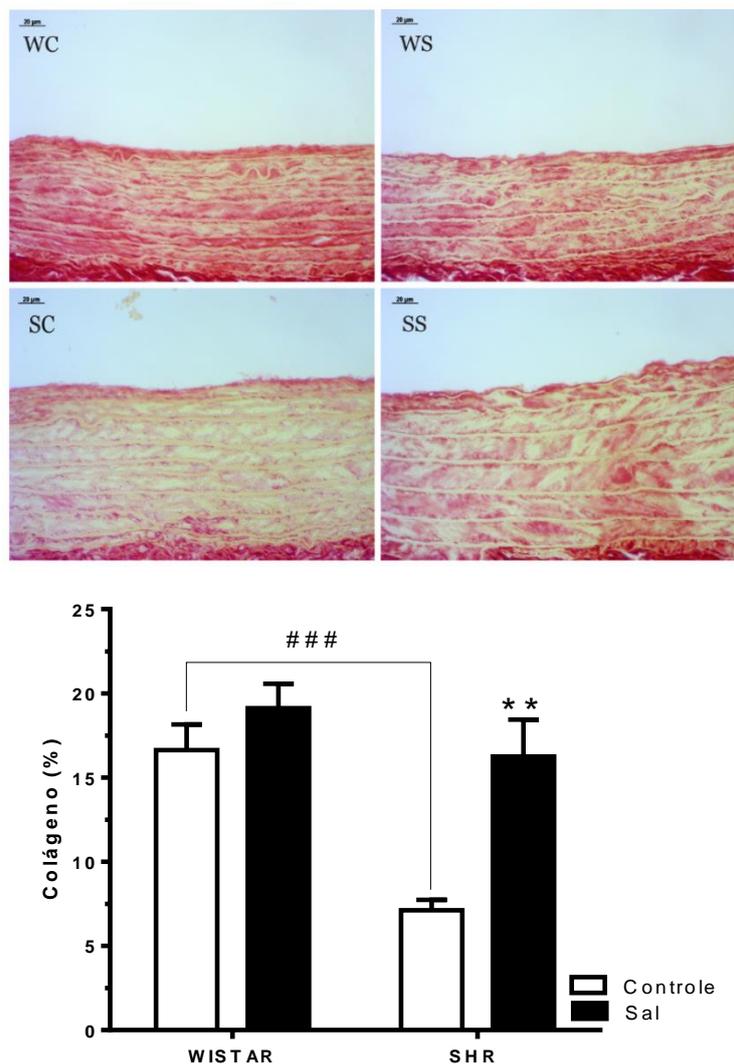


Figura 47: Percentual de deposição de colágeno aórtico. Dados expressos por média \pm EPM, ANOVA de 2 vias. * $P < 0,05$ vs. SHR/C; # $P < 0,05$ vs. Wistar/S; ### $P < 0,001$ vs. Wistar/C, $n = 7-8$.

4.3.4 Lamelas elásticas

As análises da contagem de lamelas elásticas na artéria aorta, não mostraram alterações neste componente elástico associado ao consumo de sal e nem mesmo entre as cepas.

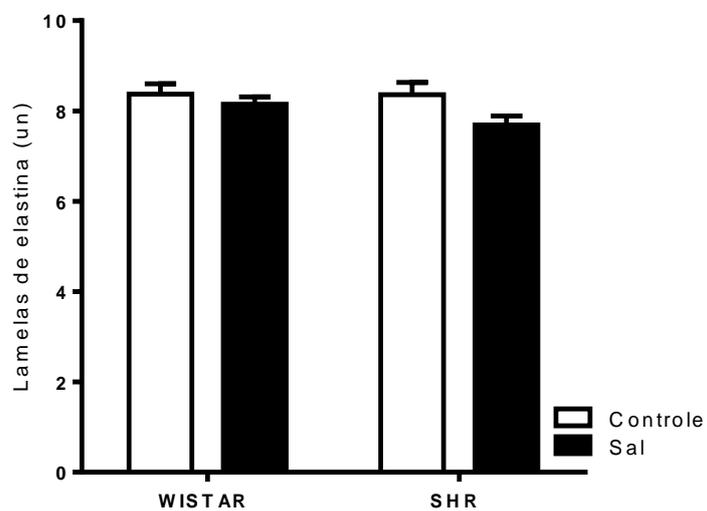


Figura 48: Quantificação das lamelas elásticas da aorta. Dados são expressos por média \pm EPM, ANOVA de 2 vias, $n=7-8$.

4.3.5 Fragmentação das lamelas elásticas

A avaliação morfológica mostrou um significativo aumento de fragmentação das lamelas elásticas causados pelo tratamento de 60 dias com alto consumo salino no grupo normotenso (Wistar/C $1,2 \pm 0,3$ vs. Wistar/S $2,7 \pm 0,6$ un, $P < 0,05$) e hipertenso (SHR/C $1,3 \pm 0,2$ vs. SHR/S $3,0 \pm 0,3$ un, $P < 0,01$ – figura 49). Este achado pode ser uma possível evento fisiopatológico que levou o aumento da pressão de pulso e VOP.

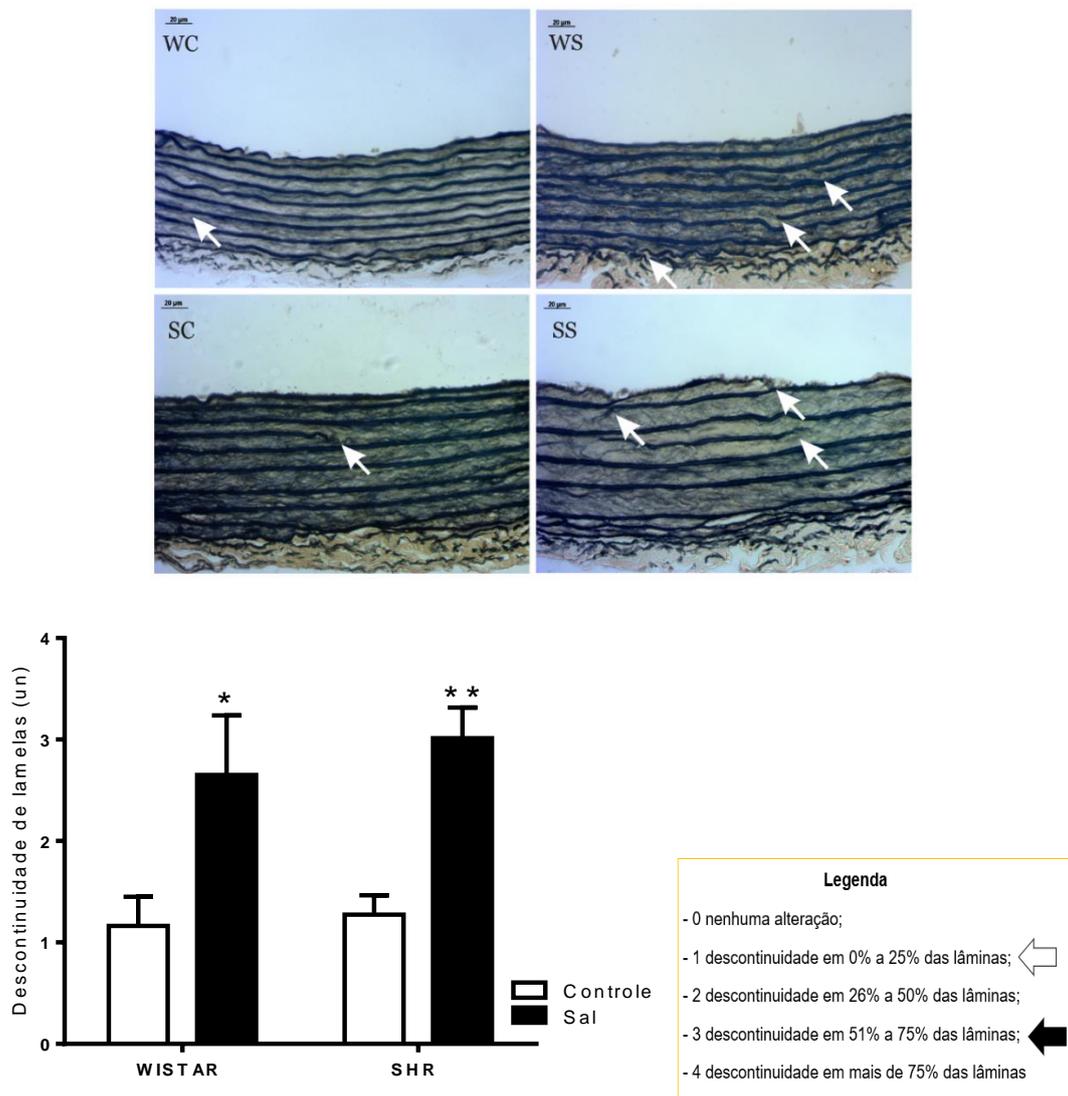


Figura 49: Avaliação de fragmentação das lamelas elásticas da aorta. Dados são expressos por média \pm EPM, ANOVA de 2 vias. * $P < 0,05$ vs. Wistar/C e ** $P < 0,01$ vs. SHR/C, $n=7-8$.

4.3.6 Tensão de parede

A tensão é a resistência da parede vascular à deformação em resposta a uma determinada pressão, é influenciada pelo grau de estresse ao nível dos microfilamentos na camada média vascular, sendo dada em unidade de força por área de parede. Os cálculos de tensão da parede arterial se basearam na lei de Laplace, onde a tensão, dada em dinas/cm², é igual a pressão interna da artéria multiplicada pelo raio do vaso ($T = P \times R$). Nestes cálculos usamos a PAM registrada *in vivo* e na qual os vasos foram fixados como pressão interna. Os cálculos, portanto, não refletem as flutuações da tensão e estresse de parede durante o ciclo cardíaco, mas apenas o valor estático (W. A. Rocha et al., 2010).

Seguindo a tendência dos dados anteriores, a tensão foi maior no grupo hipertenso quando comparado aos normotensos (Wistar/C 71 ± 2 vs. SHR/C 129 ± 4 $P < 0,0001$; Wistar/S 71 ± 3 vs. SHR/S 153 ± 3 dinas/cm², $P < 0,0001$ – figura 50). E adicionalmente, a sobrecarga salina elevou a tensão de parede de animais hipertensos quando comparado ao grupo controle (SHR/C 129 ± 4 vs. SHR/S 153 ± 3 dinas/cm², $P < 0,0001$ – figura 50). Estes resultados fortificam a hipótese que o alto consumo de sódio pode possuir uma interação nos mecanismos de remodelamento vascular que levam a eventos cardiovasculares.

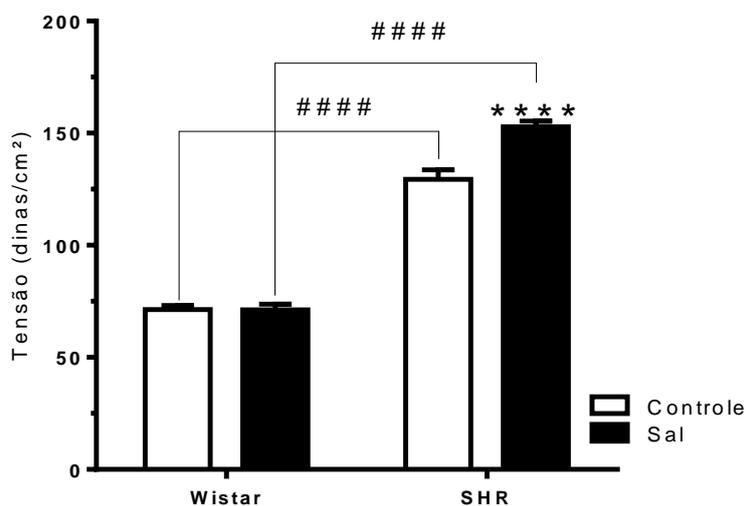


Figura 50: Avaliação de tensão de parede arterial após 60 dias de sobrecarga salina. Dados são expressos por média \pm EPM, ANOVA de 2 vias. **** $P < 0,0001$ vs. SHR/C; ##### $P < 0,0001$ vs. Wistar/C e ##### $P < 0,0001$ vs. Wistar/S, $n=8$.

4.3.7 Estresse da camada média vascular

Estresse é a força exercida pela parede vascular por unidade de área que tem o objetivo de manter o grau de tensão ao nível da camada média vascular em resposta as alterações de pressão arterial. O estresse neste nível normaliza a tensão de parede. Pela Lei de Laplace haveria um gradiente de aumento (ou redução) da luz para a adventícia com espessamento (ou estreitamento) da camada média vascular. No presente trabalho, o estresse da camada média, em dinas/cm² foi definido como a quantidade de pressão na área luminal total distribuída por área de secção transversa da camada média.

Como objetivo de verificar se o aumento de tensão, promovida pela sobrecarga salina, manteve relação direta com as avaliações anteriores, o estresse foi determinado ao nível da camada média, utilizando a formula $E = (P \times A) / M$, onde P é a pressão arterial média (mmHg), A é a área luminal (μm^2) e M é a área de secção transversa da camada média (μm^2) (W. A. Rocha et al., 2010).

As avaliações mostraram que o estresse da camada média vascular foi maior no grupo hipertenso tratado com sal, seja quando comparado ao grupo controle referente a hipertensão (Wistar/S 388 ± 20 vs. SHR/S 524 ± 41 dinas/cm², $P < 0,01$ – figura 51) e grupo controle referente ao tratamento (SHR/C 494 ± 116 vs. SHR/S 524 ± 41 dinas/cm², $P < 0,05$ – figura 51).

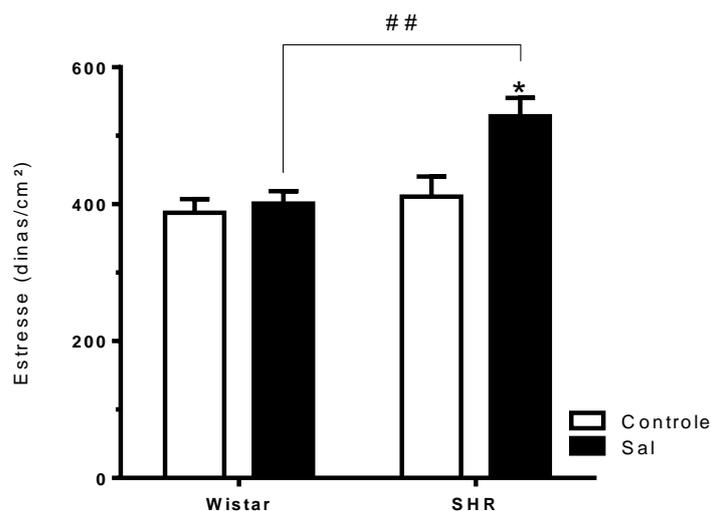


Figura 51: Estresse da camada média da aorta após 60 dias de sobrecarga salina. Dados são expressos por média \pm EPM, ANOVA de 2 vias. * $P < 0,05$ vs. SHR/C e ## $P < 0,01$ vs. Wistar/C, $n=8$.

Discussão

5. DISCUSSÃO

O principal achado deste estudo foi que, a sobrecarga de sal aumentou a rigidez arterial em ratos espontaneamente hipertensos (medida por VOP) independente do aumento concomitante da pressão arterial, indicando que o sal desempenha um papel na rigidez arterial. Este aumento na rigidez também foi observado ao comparar animais normotensos de hipertensos, entretanto, adicionalmente, a rigidez foi maior em animais SHR tratados com sal. O aumento da rigidez aórtica provavelmente se deve, pelo menos em parte, a alterações como degradação de elastina e deposição de colágeno na parede aórtica (visto em histologia).

A interação entre pressão arterial e ingestão de sódio é amplamente reconhecida e apoiada por numerosos estudos. O estudo Intersalt mostrou que a alta ingestão de sódio (acima de 7g/dia) somente foi associada a um aumento do risco cardiovascular e morte em pessoas com hipertensão (Kjeldsen et al., 2017; Rose et al., 1988). Mais recentemente, estudos clínicos vem mostrando uma estreita relação entre o aumento de rigidez arterial, medida por VOP, e consumo de sal em populações (M. Baldo et al., 2019; Siriopol et al., 2018; Y. Wang et al., 2015).

Estudos experimentais mostraram essa dinâmica em animais SHR, onde a ingestão de sal (8%) foi associada com reduzida complacência arterial, independente da PA (Et-Taouil et al., 2001). Em aortas e carótidas de animais alimentados com altas doses de sal (7%), foi observado aumento da espessura da parede e área de secção transversa media-lúmen (Partovian et al., 1998). No entanto, estes estudos possuem uma ingestão muito elevada de sal ao que se consome, o que limita uma interpretação translacional.

O presente estudo avaliou a rigidez arterial por medida de VOP em uma perspectiva experimental utilizando ratos SHR tratados com uma quantidade de sal ajustada ao consumo de indivíduos brasileiros. Para isso, foi usada solução de 1% de NaCl, média que se aproxima ao consumo brasileiro de 9,34 g de sal – PNS (Mill et al., 2021). Entretanto, no decorrer do tratamento, observamos que animais SHR tratados com sal dobraram seu consumo de líquidos ainda no 11º/60º dia, representando um aumento de 35% em relação ao grupo Wistar/S. Diante do aumento da ingestão líquida entre os grupos tratados, um novo cálculo para apurar esta diferença (soma da ingestão líquida e ração mensurada em

gaiola metabólica), revelou um consumo médio diário de 0,054 g no grupo Wistar/C; 0,110 g no grupo Wistar/S; 0,063 g no grupo SHR/C e 0,127 g no grupo SHR/S. Realizando um cálculo do que de fato os grupos estariam ingerindo se tivessem uma proporção humana de 67,5 kg (peso médio – PNS), estes valores corresponderiam à 8,7 (Wistar/C), 16,9 (Wistar/S), 13,8 (SHR/C) e 28,7 (SHR/S).

A avidez por sal (após sobrecarga salina) observada no presente estudo, já foi mostrada anteriormente em animais Wistar (Forechi et al., 2015; Rosa et al., 2020) e um consumo semelhante em animais SHR (Chryasant, 1979). No entanto, até o presente momento não foi demonstrada essa diferença de consumo específica entre as cepas, se não apenas o teor administrado. Já foi demonstrado que o apetite por sal em animais SHR é aumentado em comparação aos ratos Wistar (Ledingham et al., 1990). Esta discrepância no consumo diário de sal, poderia ter afetado os resultados entre grupos Wistar e SHR, no entanto, a variabilidade entre os grupos foi a mesma, correspondendo à 6,7 g/dia. Estudos clínicos mostram grande variabilidade interindividual, com estimativas que variam de 1 até cerca de 25 g/dia (Mill et al., 2021).

Além da correção do teor de sal para 1%, a utilização da cepa SHR, modelo que mais se assemelha com a hipertensão essencial humana, reforça a tentativa de perspectiva translacional, já que o risco cardiovascular aumenta com a hipertensão (Kjeldsen et al., 2017; Rose et al., 1988). No presente estudo, foi observada maiores alterações provocadas pelo sal no grupo SHR. A avaliação do efeito da hipertensão na rigidez arterial mostrou aumento de 43% na VOP de ratos SHR em relação aos normotensos, independente do consumo de sal. Adicionalmente, o efeito do sal em hipertensos (SHR tratados vs. não tratados) elevou a rigidez arterial em 8%. A mesma avaliação entre animais Wistar não revelou alteração.

Cordailat e colaboradores (2011) avaliaram a rigidez arterial com metodologia semelhante à utilizada no presente estudo, no entanto, utilizando animais normotensos e com altas doses de sal (8%). Este estudo mostrou que a sobrecarga salina causou hipertrofia cardíaca, não sendo observado aumento na rigidez arterial vista por VOP. Outro estudo, avaliando rigidez arterial entretanto com ratos SHR, tratados com sal (7% na dieta) mostrou aumento de

rigidez de parede, utilizando o método de medida por módulo de elasticidade incremental (Labat et al., 2001). Já o tratamento mais prolongado (12 semanas) com dose ajustada (1% de sal na dieta) não mostrou alterações na rigidez e estrutura aórtica medida por técnicas de rastreamento de ECO de alta resolução (Levy et al., 1997). Um estudo com ratos sensíveis ao sal e com tendência à hipersensibilidade espontânea (SHRSP), mostrou que um consumo com teor de 5% de sal causou diminuição da distensibilidade e aumento da rigidez, desarranjo específico de elastina na aorta abdominal e diminuição de conteúdo de elastina na aorta torácica (Lindesay et al., 2018).

Os conhecimentos a partir do estudo de Weisbrod et al., (2013) reforçam a ideia de que a rigidez arterial precede a hipertensão, sendo um potencial fator que potencializa seu surgimento, e atua na manutenção de um mecanismo fisiopatológico de retroalimentação (Harrison et. al., 2021). O presente trabalho poderia aceitar a hipótese de Weisbrod (2013), sustentada por Mitchell (2014), pois foi demonstrado um aumento de rigidez e da PA provocado por dieta, associado à alteração da estrutura aórtica. No entanto, não foi avaliado qual alteração ocorreu primeiro.

Além do aumento de rigidez arterial, o presente estudo também mostrou um aumento da PAS (avaliada por pletismografia de cauda) a partir do 28º dia de tratamento com dieta salina. Esses achados são consistentes com outros estudos em ratos hipertensos tratados com sal à 4% (Panth et al., 2016), à 8% (Hayakawa et al., 2020), e em camundongos à 4% (Singh et al., 2021). Este aumento, no entanto, não estava presente quando os animais foram submetidos à anestesia para o protocolo de cateterismo para obtenção de parâmetros hemodinâmicos e VOP.

A redução da PAS pelo protocolo cirúrgico, foi de 72 mmHg no grupo SHR/S e 61 mmHg no grupo SHR/C, enquanto nos animais Wistar não foi observada nenhuma redução. Este efeito foi documentado anteriormente como uma possível inibição que ocorre no sistema nervoso simpático (SNS) após efeitos anestésicos que prejudicam a manutenção da PA na mediação neural central do débito simpático excitatório, que é aumentada na cepa SHR (Bencze et al., 2013). Os achados hemodinâmicos são consistentes com estudos em ratos

Wistar (Lacchini et al., 2009), SHR (C. T. Lima et al., 2015) e em camundongos (Johansson et al., 2009) submetidos à 1% de NaCl na água de beber.

Em concordância com o aumento de rigidez arterial em animais SHR demonstrado pela VOP, o presente estudo também evidenciou um aumento de 11% na PP de animais hipertensos tratados com sal quando comparados ao grupo SHR controle. A medida da PP como método que avalia rigidez arterial na clínica não é tida como primeira escolha, pois a facilidade de oscilação da PAS (seja por causa externa como efeitos do jaleco branco) pode indicar um falso aumento de PP no momento da aferição (Nogueira et al., 2003). No entanto, a utilização deste método nas atribuições de um estudo experimental, poderia ser considerado de grande valia.

A PP sofre influência de acordo com o tipo de anestésico utilizado. Albrecht et al (2014) comparou esses efeitos entre anestésicos e observou que a combinação de Ketamina e Xilazina (25 mmHg) foi ligeiramente inferior ao observado com isoflurano e medetomidina-midazolam-fentanil (31 mmHg). A resposta hemodinâmica ao tratamento com sal (independente da redução da PAS e consequente redução da PP) sustentou a hipótese aqui apresentada, sugerindo possíveis efeitos da sobrecarga de sal nos mecanismos de aumento de rigidez e redução de complacência arterial.

Consistente às alterações na rigidez arterial vista na avaliação de VOP e PP após a sobrecarga de salina em animais SHR, foi observada alterações na parede arterial nas avaliações morfométricas. O sal aumentou 9% a deposição de colágeno em ratos SHR, sendo curiosamente maior (10%) em animais Wistar quando comparados à SHR sem tratamento. Na avaliação da elastina, foi observado que a sobrecarga salina causou a fragmentação de 50-75% das lâminas elásticas na parede aórtica de animais Wistar e SHR. Outros estudos mostraram aumento de conteúdo de colágeno e elastina em SHR à 7% (Partovian et al., 1998), 5% (Lindesay et al., 2018), em Wistar à 1% (Levy et al., 1997), à 2% (Grigorova et al., 2016), e em camundongos à 1% (C. T. Lima et al., 2015).

Além disso, foi identificado um aumento dos índices calculados da tensão e estresse de parede, o que corrobora a modulação vascular em decorrência de

prejuízos de NO, descrita em outros estudos (Li et al., 2009; Singh et al., 2021; Weisbrod et al., 2013; Yu et al., 2015). No grupo SHR/S observamos aumento de 18,6% na tensão, e 6,1% no estresse de parede em relação ao grupo SHR/C. Em animais Wistar a mesma comparação não evidenciou essas alterações. Na avaliação da AST (área de secção transversa) e área luminal, não foi observado alterações provocadas pelo sal entre os grupos, no entanto a AST de animais SHR aumentou em 54,5% quando comparada as de animais Wistar. Corroborando o achado, um estudo utilizando a mesma dose (1%) não observou alteração na AST (C. T. Lima et al., 2015).

Os possíveis mecanismos fisiopatológicos envolvendo rigidez arterial e sobrecarga de sal ainda não foram totalmente elucidados. Entre eles, uma alteração na matriz extracelular da parede arterial levando à alterações da biodisponibilidade de NO, pode ser considerada um dos fatores mais importantes (Herrera et al., 2014). Um experimento *in vitro* utilizando artéria de cordão umbilical humano mostrou que a sobrecarga de sódio diminuiu a barreira do glicocálice endotelial de sódio em cerca de 50%, aumentando a rigidez endotelial em 130% (Oberleithner et al., 2011). Outros estudos mostraram que o sódio desregula a expressão de óxido nítrico sintase endotelial – eNOS (Li et al., 2009) e aumenta a produção intracelular do inibidor competitivo de eNOS, dimetil-L-arginina (Fujiwara et al., 2000). Dessa forma, o aumento do sódio no interstício poderia contribuir para a rigidez arterial (Büssemaker et al., 2010). Esse aumento da concentração plasmática de sódio intracelular estaria envolvido com diferenças no volume e redução da deformabilidade, causado pelas forças de *shear stress*, levando à prejuízos na biodisponibilidade do NO, o que aumentaria a tensão (Edwards & Farquhar, 2015; Oberleithner et al., 2007).

Outro mecanismo fisiopatológico encontrado foi um possível efeito que o sódio exerce sobre o canal de sódio no endotélio. De fato, a dieta rica em sal, mesmo sem alterar a PA, afeta a função das células endoteliais arteriais e pode estimular a produção da forma ativa de TGF β -1 pelas células endoteliais da aorta (Ying & Sanders, 1999). Além disso, foi demonstrado que a dieta rica em sal está associada à estimulação do receptor AT1 aórtico (D. H. Wang & Du, 1998). Com base nesse contexto, é importante reconhecer que o dano vascular induzido pela alta ingestão de sal pode ser modulado por fatores genéticos, em particular pelo

polimorfismo dos genes do receptor AT1 (Benetos et al., 1996) e genes da aldosterona sintase (Pojoga et al., 1998).

Múltiplas abordagens terapêuticas potenciais para reduzir a rigidez arterial foram propostas e testadas, entretanto, a rigidez e PA têm uma relação bidirecional muito próxima, qualquer mudança na rigidez arterial ocasionaria um efeito na PA e vice-versa (Pickup et al., 2019). Estudos observaram esta interação com o objetivo de encontrar a gênese por onde estes mecanismos fisiopatológicos se iniciam. Weisbrod e colaboradores (2013) visualizaram alteração de rigidez arterial utilizando uma dieta rica em gordura e sacarose (HFHS) e a partir de uma avaliação temporal, o estudo mostrou que o aumento de rigidez arterial vista por VOP precedeu (1^o mês) o surgimento do aumento da PA (6^o mês). Corroborando estudos com sal e rigidez arterial, o surgimento de rigidez visto pela dieta HFHS foi associada à ativação de vias inflamatórias e estresse oxidativo na parede aórtica, resultando de uma redução da biodisponibilidade de NO.

Além dos efeitos hemodinâmicos apresentados, o presente estudo também observou alterações metabólicas. Como já falado, o consumo de líquidos foi maior nos grupos que consumiram sal, correspondendo a um aumento de 55% em animais Wistar, chegando a 90% no grupo SHR. Em decorrência ao aumento da ingestão líquida, os animais também mostraram maior diurese mensurada em gaiola metabólica, onde em animais Wistar houve aumento de 87%, chegando a 190% em animais SHR. A análise de consumo de ração e excreção de fezes foi importante para observar alguma possível taxa de retenção de líquidos que poderia influenciar no peso dos animais, o qual não foi observado. Além disso, o peso do consumo de ração, foi um importante fator para determinar o consumo médio de sal em cada grupo ao final do tratamento.

Utilizando a urina de 24h, coletada aproximadamente ao 60^o dia de tratamento, a excreção do sódio urinário (corrigida pela diurese e peso corporal) aumentou em 750% em animais Wistar e 870% em animais SHR. Nas análises de perda de proteína urinária, não observamos alteração da proteinúria em animais Wistar/S comparados à Wistar/C. Entretanto, a mesma avaliação na cepa SHR mostrou aumento de 25% na análise da urina de 24h coletada aos 30 dias, e

59% na análise de 60 dias. Não foram detectadas alterações nas análises de potássio e creatinina urinária.

O aumento de proteinúria foi visto em muitos estudos após sobrecarga salina. Sabe-se que a expressão e o funcionamento dos componentes da SRA estão intimamente relacionados à ingestão de sal. Em ratos SHR a dieta com 8% produziu uma redução da expressão da ECA2, o que desencadeou hipertrofia glomerular, perda da integridade morfológica do podócito, levando à proteinúria (Varagic et al., 2010). Outro estudo em SHR com mesmo tratamento, observou resposta de aumento da concentração de renina plasmática e diminuição da expressão do receptor MAS, desencadeando estresse oxidativo renal, aumento da pressão arterial, diminuição do fluxo sanguíneo renal e proteinúria (Lara et al., 2012). Em ratos Sprague-Dawley a dieta à 8% causou proteinúria, PAS exacerbada, deposição de colágeno, proliferação de células intersticiais e infiltração de macrófagos pela excreção urinária exacerbada de angiotensinogênio (Kawarazaki et al., 2011). Ainda em Sprague-Dawley, foi observado níveis plasmáticos de aldosterona diminuídos desencadeando aumento da PAS, lesão glomerular, intersticial, infiltração de macrófagos no rim e proteinúria (Shefer et al., 2016).

Em animais Wistar a sobrecarga de sal (3%) causou glomeruloesclerose, hipertrofia e estresse oxidativo renal visto por modulações no equilíbrio da enzima conversora de angiotensina (ECA) e enzimas ECA2 renais. O estudo ainda mostrou que uma redução da dieta de sódio evita a proteinúria e está associada a uma modulação do SRA local do rim em direção à proteção renal (Berger et al., 2015).

A visualização de proteinúria no grupo SHR/S do presente estudo, evidenciou dano renal em potencial. Apesar da preservação dos rins em parafina para avaliações morfométricas, devido à pandemia de COVID-19, não foi possível analisar estes tecidos e as possíveis lesões renais que provavelmente seriam encontradas. Um estudo que avaliou a estrutura do rim por histologia após sobrecarga salina (8,9%) em animais Wistar e SHR observou aumento de fibrose tubulointersticial e esclerose glomerular presentes nas duas cepas tratadas com sal (Hayakawa et al., 2020). Além disso, o presente estudo observou aumento

do peso do rim corrigido pela dimensão da tíbia em animais Wistar, o aumento correspondeu à 14,7% em relação ao peso de rins de animais Wistar/C. Apesar de dados da literatura demonstrarem aumento do peso de órgãos após uma dieta com alto consumo de sal em SHR (1% e 8%) (M. P. Baldo et al., 2011; Cordaillat et al., 2011), o presente estudo não evidenciou aumento no peso do coração, pulmão e rins.

Parte da motivação para a realização deste trabalho veio da curiosidade de observar os efeitos do tratamento com sal na rigidez aórtica, a artéria com maior potencial biomecânico de influência na pressão arterial. Apesar de muitos estudos clínicos mostrarem os efeitos do alto consumo de sal na rigidez arterial, poucos são os estudos que avaliaram este parâmetro por VOP em uma perspectiva experimental. A observação realizada no presente estudo, viabilizou novos conhecimentos sobre a medida de VOP e rigidez arterial que ainda é um conhecimento relativamente recente dentro da ampla literatura cardiovascular.

Ademais, a observação deste parâmetro com todo o controle de um estudo experimental, seja pela fiel determinação da distância entre os pontos (*foot-to-foot*) para o cálculo da velocidade entre as ondas de pulso, ou na correlação de alterações físicas do vaso visto por morfometria e avaliações hemodinâmicas. Até então, era desconhecido o efeito de uma quantidade de sal (dentro do que se consome) na rigidez arterial medida por VOP em ratos SHR. Certamente avançamos no conhecimento dos efeitos e possíveis mecanismos pelos quais o sal desempenha rigidez arterial sobre a aorta de ratos. Os achados contribuem e reforçam a necessidade de mais estudos nesta área de tamanha importância para prevenção e redução de eventos cardiovasculares, que interferem na saúde pública mundial.

Limitações

A utilização de cateteres preenchidos com fluido em vez de dispositivos que medem a pressão na ponta dos cateteres, pode ter limitado a precisão de nossa avaliação do tempo de trânsito das ondas de pulso na medida de VOP.

Animais SHR tiveram maior consumo de sal do que animais Wistar, isso pode ter limitado o poder de comparação do efeito do sal entre organismo hipertenso e normotenso, no entanto as avaliações provocadas dentro de cada cepa puderam ser avaliadas.

A pandemia de COVID-2019 inviabilizou avaliações secundárias a qual tivemos curiosidade como a histologia dos rins e coração e avaliações bioquímicas com método de TBARS e AOPP da aorta e rins.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

O tratamento com 1% de NaCl por 60 dias causou aumento da velocidade de onda de pulso e pressão de pulso em animais SHR, não sendo detectado tais alterações em animais Wistar. A dieta com sal promoveu alterações estruturais na aorta como fragmentação de elastina e fibrose vista pela deposição de colágeno em ambas as cepas. Além disso, foi observado aumento na tensão e estresse de parede em ratos SHR. Estes achados sustentam nossa hipótese que o consumo salino à 1% pode causar alterações na dinâmica e estrutura vascular levando ao surgimento de doenças cardiovasculares, o que reforça a necessidade de redução no consumo de sal como uma importante estratégia para a prevenção de eventos cardiovasculares principalmente em indivíduos hipertensos.

Referências

7. REFERÊNCIAS

1. Albrecht, M., Henke, J., Tacke, S., Markert, M., Guth, B., 2014. Effects of isoflurane, ketamine-xylazine and a combination of medetomidine, midazolam and fentanyl on physiological variables continuously measured by telemetry in Wistar rats. ***BMC Veterinary Research***, 10(1), 1 – 14.
2. Amaral & Sposito, 2006. Lipid Modulation of Intravascular and Cellular Sodium Handling: Mechanistic Insights and Potential Clinical Implications. ***Current Vascular Pharmacology***, 4(4), 409 – 416.
3. Bakris, G.L. 2018. Manual MSD
4. Baldo, M. P., Zaniqueli, D., Forechi, L., Machado, R. C., Rodrigues, S. L., & Mill, J. G., 2011. Effects of spironolactone in spontaneously hypertensive adult rats subjected to high salt intake. ***Clinics***, 66(3), 477 – 482.
5. Baldo, M., Brant, L. C. C., Cunha, R. S., Molina, M. del C. B., Griep, R. H., Barreto, S. M., Lotufo, P. A., Bensenor, I. M., & Mill, J. G., 2019. The association between salt intake and arterial stiffness is influenced by a sex-specific mediating effect through blood pressure in normotensive adults: The ELSA-Brasil study. ***Journal of Clinical Hypertension***, 21(12), 1771 – 1779.
6. Barão, F. T. D. F., Barão, V. H. P., Gornati, V. C., Silvestre, G. C. R., Silva, A. Q., Lacchini, S., De Castro, M. M., De Luccia, N., & Da Silva, E. S., 2019. Study of the Biomechanical and Histological Properties of the Abdominal Aorta of Diabetic Rats Exposed to Cigarette Smoke. ***Journal of Vascular Research***, 56(5), 255 –266.
7. Bencze, M., Behuliak, M., & Zicha, J., 2013. The impact of four different classes of anesthetics on the mechanisms of blood pressure regulation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. ***Physiological Research***, 62(5), 471–478.
8. Benetos, A., Larosa, E., Cambien, F., Soubrier, F., Topouchian, J., Guize, L., Safar, M., Poirier, O., Asmar, R., Gautier, S., & Ricard, S., 1996. Influence of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms on aortic stiffness in normotensive and hypertensive patients. ***Circulation***, 94(4) 698 – 703).

9. Berger, R. C. M., Vassallo, P. F., De Oliveira Crajoinas, R., Oliveira, M. L., Martins, F. L., Nogueira, B. V., Motta-Santos, D., Araújo, I. B., Forechi, L., Girardi, A. C. C., Santos, R. A. S., & Mill, J. G., 2015. Renal effects and underlying molecular mechanisms of long-term salt content diets in spontaneously hypertensive rats. ***PLoS ONE***, 10(10), 1 – 17.
10. Bombig, M. T. N., Francisco, Y. A., & Machado, C. A., 2014. The role of salt on the origin of hypertension. ***Revista Brasileira de Hipertensão***, 21(2), 63 – 67.
11. Bortolotto, L. A., & Safar, M. E., 2006. Blood pressure profile along the arterial tree and genetics of hypertension. ***Arquivos Brasileiros de Cardiologia***, 86(3), 166 – 169.
12. Brasileira, S., 2016. *7ª diretriz brasileira de hipertensão arterial*. 107.
13. Brekke, J. F., Gokina, N. I., & Osol, G., 2002. Vascular smooth muscle cell stress as a determinant of cerebral artery myogenic tone. ***American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology***, 283(6 52-6), 2210–2216.
14. Büssemaker, E., Hillebrand, U., Hausberg, M., Pavenstädt, H., & Oberleithner, H., 2010. Pathogenesis of Hypertension: Interactions Among Sodium, Potassium, and Aldosterone. ***American Journal of Kidney Diseases***, 55(6), 1111–1120.
15. Caldeira, D., Vaz-Carneiro, A., & Costa, J., 2013. Qual é o impacto da redução da ingestão de sal na pressão arterial? Análise da revisão sistemática cochrane "effect of longer-term modest salt reduction on blood pressure. ***Acta Medica Portuguesa***, 55(6), 26(5), 490–492.
16. Chrysant, S. G., 1979. Effects of high salt intake and meclofenamate on arterial pressure and renal function in the spontaneously hypertensive rat. ***Clinical Science***, 57(5), 251–253
17. Cordaillat, M., Reboul, C., Gaillard, V., Lartaud, I., Jover, B., & Rugale, C., 2011. Plasma volume and arterial stiffness in the cardiac alterations associated with long-term high sodium feeding in rats. ***American Journal of Hypertension***, 24(4), 451–457.
18. Diaz, A., Tringler, M., Wray, S., Ramirez, A. J., & Cabrera Fischer, E. I., 2018. The effects of age on pulse wave velocity in untreated hypertension. ***Journal of Clinical Hypertension***, 20(2), 258–265.

19. Edwards, D. G., & Farquhar, W. B., 2015. Vascular effects of dietary salt. ***Current Opinion in Nephrology and Hypertension***, 24(1), 8–13.
20. Et-Taouil, K., Schiavi, P., Lévy, B. I., & Plante, G. E., 2001. Sodium intake, large artery stiffness, and proteoglycans in the spontaneously hypertensive rat. ***Hypertension***, 38(5), 1172–1176.
21. Évora, P. R. B., Reis, C. L. dos, Ferez, M. A., Conte, D. A., & Garcia, L. V., 1999. Distúrbios do equilíbrio hidroeletrólítico e do equilíbrio acidobásico - Uma revisão prática. ***Medicina***, 32(4), 451.
22. Fazan, V. P. S., De Kalil, A. L. R., De Alcântara, A. C. L., Genari, A. B., Tavares, M. R., Rodrigues, A. R., & Salgado, H. C., 2006. Ratos espontaneamente hipertensos e neuropatias periféricas. ***Medicina***, 39(1), 39–50.
23. Ford, E. S., 2011. Trends in mortality from all causes and cardiovascular disease among hypertensive and nonhypertensive adults in the united states. ***Circulation***, 123(16), 1737–1744.
24. Forechi, L., Baldo, M. P., De Araujo, I. B., Nogueira, B. V., & Mill, J. G., 2015. Effects of high and low salt intake on left ventricular remodeling after myocardial infarction in normotensive rats. ***Journal of the American Society of Hypertension***, 9(2), 77–85.
25. Fujiwara, N., Osanai, T., Kamada, T., Katoh, T., Takahashi, K., & Okumura, K., 2000. Study on the relationship between plasma nitrite and nitrate level and salt sensitivity in human hypertension: Modulation of nitric oxide synthesis by salt intake. ***Circulation***, 101(8), 856–861.
26. Gonsalez, S. R., Ferrão, F. M., Souza, A. M. de, Lowe, J., & Morcillo, L. da S. L., 2018. Inappropriate activity of local renin-angiotensin-aldosterone system during high salt intake: impact on the cardio-renal axis. ***Jornal Brasileiro de Nefrologia***, 40(2), 170–178.
27. Grigorova, Y. N., Juhasz, O., Zernetkina, V., Fishbein, K. W., Lakatta, E. G., Fedorova, O. V., & Bagrov, A. Y., 2016. Aortic Fibrosis, Induced by High Salt Intake in the Absence of Hypertensive Response, Is Reduced by a Monoclonal Antibody to Marinobufagenin. ***American Journal of Hypertension***, 29(5), 641–646.
28. Han, W., Han, X., Sun, N., Chen, Y., Jiang, S., & Li, M., 2017. Relationships between urinary electrolytes excretion and central

- hemodynamics, and arterial stiffness in hypertensive patients. *Hypertension Research*, 40(8), 746–751.
29. Harrison, 2021. Pathophysiology of Hypertension: The Mosaic Theory and beyond. *Circulation Research*, 847–863.
 30. Hayakawa, Y., Komaki, H., Minatoguchi, S., Yamada, Y., Kanamori, H., Nishigaki, K., & Minatoguchi, S., 2020. High-salt intake accelerates functional and histological renal damage associated with renal tissue overexpression of (pro)renin receptors and AT1 receptors in spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Nephrology*, 24(7), 582–589.
 31. Herrera, V. L., Decano, J. L., Giordano, N., Moran, A. M., & Ruiz-Opazo, N., 2014. Aortic and carotid arterial stiffness and epigenetic regulator gene expression changes precede blood pressure rise in stroke-prone dahl salt-sensitive hypertensive rats. *PLoS ONE*, 9(9).
 32. IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, & Coordenação de Trabalho e Rendimento, 2011. Pesquisa de Orçamentos Familiares: 2008-2009. Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil. *Biblioteca do Ministerio do Planejamento, Orçamento e Gestão*.
 33. Jannasz, I., Sondej, T., Targowski, T., & Dobrowolski, A., 2019. Pulse wave velocity - a useful tool in assessing the stiffness of the arteries. *Polski Merkuriusz Lekarski Polish Medical Journal*, 51–56.
 34. Johansson, M. E., Bernberg, E., Andersson, I. J., Bie, P., Skøtt, O., Gan, L. M., & Bergström, G., 2009. High-salt diet combined with elevated angiotensin II accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of Hypertension*, 27(1), 41–47.
 35. Kaess, B., & Rong, J., 2012. Aortic Stiffness, Blood Pressure Progression, and Incident Hypertension. *The Journal of jama*, 308(9), 875–881.
 36. Kawarazaki, H., Ando, K., Fujita, M., Matsui, H., Nagae, A., Muraoka, K., Kawarasaki, C., & Fujita, T., 2011. Mineralocorticoid receptor activation: A major contributor to salt-induced renal injury and hypertension in young rats. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 300(6).
 37. Kjeldsen, S. E., Narkiewicz, K., Burnier, M., & Oparil, S., 2017. The INTERSALT Study and the complex relationship between salt intake and blood pressure. *Blood Pressure*, 26(2), 65–66.

38. Kurtz, T. W., DiCarlo, S. E., & Morris, R. C., 2016. Logical issues with the pressure natriuresis theory of chronic hypertension. ***American Journal of Hypertension***, 29(12), 1325–1331.
39. Kusche-Vihrog, K., Schmitz, B., & Brand, E., 2015. Salt controls endothelial and vascular phenotype. ***Pflugers Archiv European Journal of Physiology***, 467(3), 499–512.
40. Labat, C., Lacolley, P., Lajemi, M., De Gasparo, M., Safar, M. E., & Benetos, A., 2001. Effects of valsartan on mechanical properties of the carotid artery in spontaneously hypertensive rats under high-salt diet. ***Hypertension***, 38(3), 439–443.
41. Lacchini, S., Heimann, A. S., Evangelista, F. S., Cardoso, L., Silva, G. J. J., & Krieger, J. E., 2009. Cuff-induced vascular intima thickening is influenced by titration of the Ace gene in mice. ***Physiological Genomics***, 37(3), 225–230.
42. Lara, L. S., McCormack, M., Semprum-Prieto, L. C., Shenouda, S., Majid, D. S. A., Kobori, H., Navar, L. G., & Prieto, M. C., 2012. AT 1 receptor-mediated augmentation of angiotensinogen, oxidative stress, and inflammation in ANG II-salt hypertension. ***American Journal of Physiology - Renal Physiology***, 302(1), 85–94.
43. Le, V. P., Knutsen, R. H., Mecham, R. P., & Wagenseil, J. E., 2011. Decreased aortic diameter and compliance precedes blood pressure increases in postnatal development of elastin-insufficient mice. ***American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology***, 301(1), 221–229.
44. Ledingham, J. M., Simpson, F. O., & Hamada, M., 1990. Salt appetite, body sodium, handling of a NaCl load, renin, and aldosterone in genetically and spontaneously hypertensive rats. ***Journal of Cardiovascular Pharmacology***, 16, 6–8.
45. Levy, B. I., Poitevin, P., Duriez, M., Guez, D. C., Schiavi, P. D., & Safar, M. E., 1997. Sodium, survival, and the mechanical properties of the carotid artery in stroke-prone hypertensive rats. ***Journal of Hypertension***, 15(3), 251–258.
46. Li, J., White, J., Guo, L., Zhao, X., Wang, J., Smart, E. J., & Li, X. A., 2009. Salt inactivates endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells.

- Journal of Nutrition*, 139(3), 447–451.
47. Lim, S. S., Vos, T., Flaxman, A. D., Danaei, G., Shibuya, K., Adair-Rohani, H., Amann, M., Anderson, H. R., Andrews, K. G., Aryee, M., Atkinson, C., Bacchus, L. J., Bahalim, A. N., Balakrishnan, K., Balmes, J., Barker-Collo, S., Baxter, A., Bell, M. L., Blore, J. D., Ezzati, M. 2012. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 380(9859), 2224–2260.
 48. Lima, C. T., De Souza Silva, J. C., Da Silva Viegas, K. A., De Souza Oliveira, T. C., De Lima, R. S., De Souza, L. E., Aragão, D., Casarini, D. E., Irigoyen, M. C., & Lacchini, S., 2015. Increase in vascular injury of sodium overloaded mice may be related to vascular angiotensin modulation. *PLoS ONE*, 10(6), 1–16.
 49. Lima, N. K. C., Lima, F. B., Dos Santos, E. A., Okamoto, M. M., Sumida, D. H., Hell, N. S., Furukawa, L. N. S., & Heimann, J. C., 2006. Effect of lifelong high- or low-salt intake on blood pressure, left ventricular mass and plasma insulin in Wistar rats. *American Journal of the Medical Sciences*, 331(6), 309–314.
 50. Lindsay, G., Bézie, Y., Ragonnet, C., Duchatelle, V., Dharmasena, C., Villeneuve, N., & Vayssettes-Courchay, C., 2018. Differential Stiffening between the Abdominal and Thoracic Aorta: Effect of Salt Loading in Stroke-Prone Hypertensive Rats. *Journal of Vascular Research*, 55(3), 144–158.
 51. Mancilha-Carvalho, & Silva, N. A. de S. e., 2003. The Yanomami indians in the INTERSALT study. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 80(3), 295–300.
 52. McCann, S. M., Gutkowska, J., Franci, C. R., Favaretto, A. L., & Antunes-Rodrigues, J., 1994. Hypothalamic control of water and salt intake and excretion. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27(4), 865–884.
 53. Mendes-Pinto, D., & Rodrigues-Machado, M. da G., 2019. Applications of arterial stiffness markers in peripheral arterial disease. *Jornal Vascular Brasileiro*, 18, 1–9.

54. Michael O'Rourke, 1995. Mechanical Principles in Arterial Disease. *Hypertension*, 26. 2–9.
55. Mill, J. G., Malta, D. C., Nilson, E. A. F., Machado, Í. E., Jaime, P. C., Bernal, R. T. I., De Magalhães Cardoso, L. S., & Szwarcwald, C. L., 2021. Factors associated with salt intake in the Brazilian adult population: National health survey. *Ciencia e Saude Coletiva*, 26(2), 555–567.
56. Mill, J. G., Milanez, M. D. C., De Resende, M. M., Gomes, M. D. G. S., & Leite, C. M., 2003. Spironolactone prevents cardiac collagen proliferation after myocardial infarction in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 30(10), 739–744.
57. Mitchell, G. F., 2014. Arterial Stiffness and Hypertension: Chicken or Egg?. *Hypertension*, 64(2), 210–214.
58. Mizuno, K., Hata, S., & Fukuchi, S., 1981. Effect of sodium intake on angiotension-converting enzyme activity of aorta in rats. *Clinical Science*, 61(2), 249–251.
59. Muiesan, M. L., Salvetti, M., Rizzoni, D., Paini, A., Agabiti-Rosei, C., Aggiusti, C., & Agabiti Rosei, E., 2013. Resistant hypertension and target organ damage. *Nature, Hypertension Research*, 36(6), 485–491.
60. Nogueira, R., Muxfeldt, E., Salles, G. F., & Bloch, K. V., 2003. A importância clínica da pressão de pulso. *Revista Brasileira Hipertensão*, 10(2), 140–141.
61. O'Rourke, et. al., 2013. McDonald's Blood Flow in Arteries Theoretical, Experimental and Clinical Principles. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 6(9), 1689–1699.
62. Oberleithner, H., Peters, W., Kusche-Vihrog, K., Korte, S., Schillers, H., Kliche, K., & Oberleithner, K., 2011. Salt overload damages the glycocalyx sodium barrier of vascular endothelium. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 462(4), 519–528.
63. Oberleithner, H., Riethmüller, C., Schillers, H., MacGregor, G. A., De Wardener, H. E., & Hausberg, M., 2007. Plasma sodium stiffens vascular endothelium and reduces nitric oxide release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(41), 16281–16286.
64. OMS, 2014. *Www.Paho.Org.com* acesso em 08/04/2021 disponível em:

- https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5420:2018-cervical-cancer&Itemid=3637&lang=es
65. Panth, N., Park, S. H., Kim, H. J., Kim, D. H., & Oak, M. H., 2016. Protective effect of salicornia europaea extracts on high salt intake-induced vascular dysfunction and hypertension. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7).
 66. Partovian, C., Benetos, A., Pommiès, J. P., Mischler, W., & Safar, M. E., 1998. Effects of a chronic high-salt diet on large artery structure: Role of endogenous bradykinin. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 274(5 43-5), 1423–1428.
 67. Paula, A. N. A., & Costa, R., 2010. Effects of a chronic high-salt diet on large artery structure: Role of endogenous bradykinin. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 274(5 43-5), 1423–1428.
 68. Peixoto, E. M. A., 1999. Sódio. *Química nova na escola*.
 69. Pickup, L., Radhakrishnan, A., Townend, J. N., & Ferro, C. J., 2019. Arterial stiffness in chronic kidney disease: A modifiable cardiovascular risk factor? *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 28(6), 527–536.
 70. Pojoga, L., Gautier, S., Blanc, H., Guyene, T. T., Poirier, O., Combien, F., & Benetos, A., 1998. Genetic determination of plasma aldosterone levels in essential hypertension. *American Journal of Hypertension*, 11(7), 856–860.
 71. Ribeiro, A. L. P., Duncan, B. B., Brant, L. C. C., Lotufo, P. A., Mill, J. G., & Barreto, S. M., 2016. Cardiovascular Health in Brazil Trends and Perspectives. *Circulation*, 133(4), 422–433.
 72. Ritz, E., 1996. Nephrology Dialysis Transplantation The history of salt-aspects of interest to the nephrologist. *Nephrol Dial Transplant*, 11, 969–975.
 73. Rocha, P. N., 2011. Hiponatremia: conceitos básicos e abordagem prática. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 33(2), 248–260.
 74. Rocha, W. A., Lunz, W., Baldo, M. P., Pimentel, E. B., Dantas, E. M., Rodrigues, S. L., & Mill, J. G., 2010. Kinetics of cardiac and vascular remodeling by spontaneously hypertensive rats after discontinuation of

- long-term captopril treatment. ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research***, 43(4), 390–396.
75. Rodriguez-Iturbe, B., 2010. Renal infiltration of immunocompetent cells: Cause and effect of sodium-sensitive hypertension. ***Clinical and Experimental Nephrology***, 14(2), 105–111.
76. Rosa, G. B., Cavalet, L. C., De Melo, A. B. S., Junior, M. D. F., Lopes, P. R., Cardoso, R. A., Ferreira, L. A., Tomé, F. D., Nagib, P. R. A., Celes, M. R. N., Pedrino, G. R., Castro, C. H., Mathias, P. C. F., & Gomes, R. M., 2020. High salt intake during puberty leads to cardiac remodelling and baroreflex impairment in lean and obese male Wistar rats. ***British Journal of Nutrition***, 123(6), 642–651.
77. Rose, G., Stamler, J., Stamler, R., Elliott, P., Marmot, M., Pyorala, K., Kesteloot, H., Joossens, J., Hansson, L., Mancia, G., Dyer, A., Kromhout, D., Laaser, U., & Sans, S., 1988. Intersalt: An international study of electrolyte excretion and blood pressure. ***British Medical Journal***, 297(6644), 319–328.
78. Rubies, C., Dantas, A. P., Batlle, M., Torres, M., Farre, R., Sangüesa, G., Montserrat, J. M., Mont, L., Almendros, I., & Guasch, E., 2019. Aortic remodelling induced by obstructive apneas is normalized with mesenchymal stem cells infusion. ***Scientific Reports***, 9(1), 1–12.
79. Rucker & Tinker., 1985. Role of selected nutrients in synthesis, accumulation, and chemical modification of connective tissue proteins. ***Physiological Reviews***, 65(3), 607–657.
80. Rucker, B., 1976. *comments in biochemistry Arterial*. ***September***, 1021–1034.
81. Safar, M. E., & Laurent, P., 2003. Pulse pressure and arterial stiffness in rats: Comparison with humans. ***American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology***, 285(4 54-4), 1363–1369.
82. Salvi, P., Giannattasio, C., & Parati, G., 2018. High sodium intake and arterial stiffness. ***Journal of Hypertension***, 36(4), 754–758.
83. Sarno, F., Jaime, P. C., Ferreira, S. R. G., & Monteiro, C. A., 2009. Sodium intake and metabolic syndrome: a systematic review. ***Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia***, 53(5), 608–616.
84. SBC., 2021. www.cardiometro.com.br. Acesso em: 05 de março de

2021. <http://www.cardiometro.com.br/>.
85. Shefer, G., Marcus, Y., Knoll, E., Dolkart, O., Foichtwanger, S., Nevo, N., Limor, R., & Stern, N., 2016. Angiotensin 1-7 Is a Negative Modulator of Aldosterone Secretion in Vitro and in Vivo. *Hypertension*, 68(2), 378–384.
 86. Sindler, A. L., Fleenor, B. S., Calvert, J. W., Marshall, K. D., Zigler, M. L., Lefer, D. J., & Seals, D. R., 2011. Nitrite supplementation reverses vascular endothelial dysfunction and large elastic artery stiffness with aging. *Aging Cell*, 10(3), 429–437.
 87. Singh, P., Stephenson, R., Castillo, A., & Majid, D. S. A., 2021. High-salt intake reduces renal tissue levels of inflammatory cytokines in mice. *Physiological Reports*, 8(24), 1–11.
 88. Siriopol, D., Covic, A., Iliescu, R., Kanbay, M., Tautu, O., Radulescu, L., Mitu, O., Salaru, D., & Dorobantu, M., 2018. Arterial stiffness mediates the effect of salt intake on systolic blood pressure. *Journal of Clinical Hypertension*, 20(11), 1587–1594.
 89. Tobian, L., & Hanlon, S., 1990. High sodium chloride diets injure arteries and raise mortality without changing blood pressure. *Hypertension*, 15(6), 900–903.
 90. Van Bortel, L. M., Laurent, S., Boutouyrie, P., Chowienczyk, P., Cruickshank, J. K., De Backer, T., Filipovsky, J., Huybrechts, S., Mattace-Raso, F. U. S., Protogerou, A. D., Schillaci, G., Segers, P., Vermeersch, S., & Weber, T., 2012. Expert consensus document on the measurement of aortic stiffness in daily practice using carotid-femoral pulse wave velocity. *Journal of Hypertension*, 30(3), 445–448.
 91. Vanerson, R., Neves, P., Souza, M. K., Passos, C. S., Frank, R., Bacurau, P., Simoes, H. G., Prestes, J., Boim, M. A., Olsen, N., Câmara, S., Carmo, M., Franco, P., & Moraes, M. R., 2015. Resistance Training in Spontaneously Hypertensive Rats with Severe Hypertension. *Sociedade Brasileira de Cardiologia*, 201–209.
 92. Varagic, J., Ahmad, S., Brosnihan, K. B., Habibi, J., Tilmon, R. D., Sowers, J. R., & Ferrario, C. M., 2010. Salt-induced renal injury in spontaneously hypertensive rats: Effects of nebivolol. *American Journal of Nephrology*, 32(6), 557–566.
 93. Wagenseil, J. E., & Mecham, R. P., 2012. Elastin in large artery stiffness

- and hypertension. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 5(3), 264–273.
94. Wang, D. H., & Du, Y., 1998. Regulation of vascular type 1 angiotensin II receptor in hypertension and sodium loading: Role of angiotensin II. *Journal of Hypertension*, 16(4), 467–475.
95. Wang, Y., Mu, J. J., Geng, L. K., Wang, D., Ren, K. Y., Guo, T. S., Chu, C., Xie, B. Q., Liu, F. Q., & Yuan, Z. Y., 2015. Effect of salt intake and potassium supplementation on brachial-ankle pulse wave velocity in chinese subjects: An interventional study. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48(1), 83–90.
96. Weisbrod, R. M., Shiang, T., Sayah, L. Al, Fry, J. L., Bajpai, S., Reinhart-King, C. A., Lob, H. E., Santhanam, L., Mitchell, G., Cohen, R. A., & Seta, F., 2013. Arterial stiffening precedes systolic hypertension in diet-induced obesity. *Hypertension*, 62(6), 1105–1110.
97. Ying, W. Z., & Sanders, P. W., 1999. Dietary salt increases endothelial nitric oxide synthase and TGF- β 1 in rat aortic endothelium. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 277(4 46-4), 1293–1298.
98. Yu, B., Xu, D. J., Sun, H., Yang, K., & Luo, M., 2015. Comparative analysis of mechanical properties of PWV, NO and ascending aorta between WHY rats and SHR rats. *Acta Cardiologica Sinica*, 31(5), 429–435.