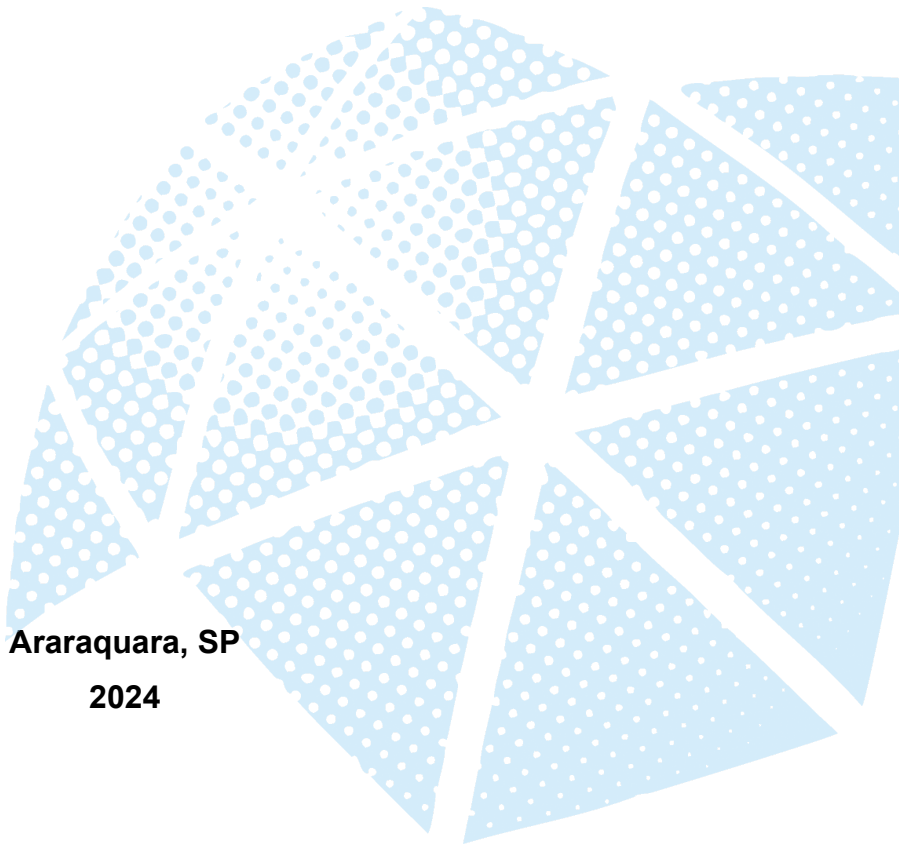


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara
Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica

MARIA CAROLINA DI PALMA

**SOBRECARGA DE SÓDIO PROMOVE ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E NO
EQUILÍBRIO HIDROELETROLÍTICO E INDUZ NEUROINFLAMAÇÃO**

Araraquara, SP
2024



MARIA CAROLINA DI PALMA

**SOBRECARGA DE SÓDIO PROMOVE ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E NO
EQUILÍBRIO HIDROELETROLÍTICO E INDUZ NEUROINFLAMAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau Bacharela em Farmacêutico(a).

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Débora Simões de Almeida Colombari

Coorientador(a): Prof^a. Dr^a. Aline Andrade Mourão

Araraquara, SP

2024

P171s

Palma, Maria Carolina Di.

Sobrecarga de sódio promove alterações cardiovasculares e no equilíbrio hidroeletrolítico e induz neuroinflamação / Maria Carolina Di Palma. – Araraquara, 2024.

30 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Farmácia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Débora Simões de Almeida Colombari.

Coorientadora: Aline Andrade Mourão.

1. Sódio. 2. Neuroinflamação. 3. Sistema nervoso central. I. Colombari, Débora Simões de Almeida, orient. II. Mourão, Aline Andrade, coorient. III. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP Campus de Araraquara

Esta ficha não pode ser modificada

MARIA CAROLINA DI PALMA

**SOBRECARGA DE SÓDIO PROMOVE ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E NO
EQUILÍBRIO HIDROELETROLÍTICO E INDUZ NEUROINFLAMAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Bacharela em Farmácia.

Área de Concentração: Fisiologia

Data da defesa: 29/10/2024

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari
UNESP - Faculdade de Odontologia de Araraquara

Fernanda Campos de Medeiros
UNESP - Faculdade de Odontologia de Araraquara

Gabriela Maria Lucera
UNESP - Faculdade de Odontologia de Araraquara

Milede Hanner Saraiva Paes
UNESP - Faculdade de Odontologia de Araraquara

Profa. Dra. Patrícia Maria de Paula
UNESP - Faculdade de Odontologia de Araraquara

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão pelo apoio e orientação da Prof^a. Dr^a. Débora Simões de Almeida Colombari e da Prof^a. Dr^a. Aline Andrade Mourão durante todo o desenvolvimento do projeto de iniciação científica e de elaboração deste TCC. A dedicação e expertise de ambas as doutoras foram fundamentais para o sucesso deste trabalho.

Além disso, gostaria de agradecer o apoio do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) pelo financiamento deste estudo e pelo seu incentivo à pesquisa nacional, a qual sou muito grata em poder ter colaborado mesmo que com uma pequena parcela quando mensurada toda sua grandiosidade, em sua capacidade de impactar positivamente a saúde e a vida de milhares de pessoas.

RESUMO

Há uma correlação da elevada ingestão de sódio com a incidência de doenças cardiovasculares. A maior ingestão de sódio também promove neuroinflamação, que por sua vez pode causar hipertensão. Dados da literatura mostram que TNF-alfa injetado no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) induz à hipertensão. Desta forma, os objetivos do projeto foram verificar as alterações na expressão de Fos, astrócitos e micróglia no PVN, no órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) e no órgão subfornical (OSF), e analisar variações cardiovasculares e do equilíbrio hidrossalino após 7 dias de sobrecarga de NaCl 2%. Foram utilizados ratos Holtzman (300g-320 g). O grupo controle recebeu água e ração à vontade, e o grupo experimental recebeu apenas solução de NaCl 2% para beber e ração à vontade. A duração do tratamento foi de 7 dias. A ingestão de líquidos e a excreção renal foi medida antes e durante os 7 dias de sobrecarga de sódio. Ao final do último dia os ratos foram perfundidos, o sangue coletado por punção cardíaca e os encéfalos coletados para marcações imuno-histoquímicas de Fos (marcador de ativação neuronal), IBA-1 (marcador de micróglia) e GFAP (marcador de astrócito). Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM. Observamos aumento na ingestão de sódio, no volume urinário e na excreção de sódio, e redução no peso corporal e na ingestão de ração nos ratos que ingeriram somente NaCl 2%. Não houve ativação neuronal do PVN e OSF, mas houve um aumento na ativação neuronal no OVLT. Observamos também um aumento da astrogliose no OVLT, sem alterações significativas no PVN e OSF nos ratos que ingeriram NaCl 2%. Por outro lado, houve uma tendência no OVLT e no OSF a redução do número de micróglia. Os dados demonstram que a sobrecarga de NaCl 2% induziram alterações do equilíbrio hidroeletrolítico. Dados iniciais, apontam para uma neuroinflamação no OVLT. Ainda, a ativação neuronal do OVLT, mostra que esta área parece se manter ativada durante este estímulo osmótico crônico. Mais estudos terão que ser feitos para verificar se a inflamação no OVLT e a ativação neuronal estão envolvidos com a hipertensão observada neste modelo de sobrecarga de sódio.

Palavras-chave: sódio; neuroinflamação; sistema nervoso central.

ABSTRACT

There is a correlation between high sodium intake and the incidence of cardiovascular disease. Higher sodium intake also promotes neuroinflammation, which in turn can cause hypertension. Literature data show that TNF- α injected into the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) induces hypertension. In this way, the objectives of the project were to verify the changes in the expression of Fos, astrocytes and microglia in the PVN, in the vascular organ of the lamina terminalis (OVLT) and in the subfornical organ (SFO), and to analyze cardiovascular and water-saline balance variations after seven days of 2% NaCl overload. Holtzman rats (300g-320g) were used. The control group received water and food *ad libitum*, and the salt-loading group received only 2% NaCl solution for drinking and food *ad libitum*. The duration of treatment was seven days. Fluid intake and renal excretion were measured before and during the seven days of sodium overload. At the end of the last day, the rats were perfused, blood was collected by cardiac puncture, and the brains were collected for immunohistochemical staining of Fos (neuronal activation marker), IBA (microglia marker) and GFAP (astrocyte marker). Data were expressed as mean $\pm$ SEM. We observed increased sodium intake, urinary volume and sodium excretion and a reduction in body weight and feed intake in rats that ingested only 2% NaCl. There was no neuronal activation in the PVN and OSF, but an increase in neuronal activation in the OVLT. We also observed increased astrogliosis in the OVLT, with no significant changes in PVN and OSF in the rats that ingested 2% NaCl. On the other hand, there was a trend in the OVLT and OSF to reduce the number of microglia. The data demonstrate that 2% NaCl overload induced changes in the hydroelectrolytic balance. Initial data point to a neuroinflammation in the OVLT. Furthermore, the neuronal activation of OVLT shows that this area remains activated during this chronic osmotic stimulus. More studies must verify whether OVLT inflammation and neuronal activation are involved with hypertension observed in this sodium overload model.

Keywords: sodium; neuroinflammation; central nervous system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Linha do tempo referente ao protocolo experimental utilizado	16
Figura 2 – Alterações de (A) peso corporal, (B) ingestão de ração em ratos que ingeriram água ou NaCl 2% por 7 dias	17
Figura 3 – Alterações de (A) volume urinário, (B) excreção de sódio e (C) ingestão de líquidos em ratos que ingeriram água ou NaCl 2% por 7 dias	18
Figura 4 – Alterações na osmolaridade plasmática em ratos que ingeriram água ou NaCl 2% por 7 dias	19
Figura 5 – Corte coronal do prosencéfalo mostrando a marcação imunohistoquímica da proteína Fos que ingeriram água ou NaCl 2% por 7 dias	20
Figura 6 – Corte coronal do prosencéfalo mostrando a marcação imunohistoquímica dos astrócitos com GFAP (vermelho) ou de micróglica com IBA-1 (verde) em ratos que ingeriram água ou NaCl 2% por 7 dias	21
Figura 7 – Quantificação da astrogliose (GFAP) e do número de micróglias (IBA-1) no PVN, núcleo paraventricular do hipotálamo; OVLT, órgão vascular da lâmina terminal; OSF, órgão subfornical de ratos que ingeriram água ou NaCl 2% por 7 dias	22
Figura 8 – Pressão arterial média (MAP) e de frequência cardíaca (HR) durante o ciclo claro-escuro de ratos que ingeriram água ou NaCl 2% por 7 dias	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HR	Frequência cardíaca
MAP	Pressão arterial média
NaCl	Cloreto de sódio
NTS	Núcleo do trato solitário
OVL	Órgão vascular da lâmina terminal
PVN	Núcleo paraventricular
RVL	Região rostroventrolateral do bulbo
OSF	Órgão subfornical
SNC	Sistema nervoso central

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	DESENVOLVIMENTO	12
2.1	MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1.1	Animais	12
2.1.2.	Sobrecarga de sódio	12
2.1.3.	Excreção de sódio	12
2.1.4.	Imunohistoquímica	13
2.1.5.	Osmolaridade plasmática	14
2.1.6.	Análise estatística	15
2.1.7.	Protocolos experimentais	15
2.2.	RESULTADOS	16
2.2.1.	Efeito da sobrecarga de NaCl 2% por 7 dias sobre o peso corporal e ingestão de ração	16
2.2.2.	Efeito da sobrecarga de NaCl 2% por 7 dias sobre o volume urinário, excreção de sódio e ingestão de líquido	17
2.2.3.	Efeito do tratamento de 7 dias com sobrecarga de NaCl 2% sobre a osmolaridade plasmática	18
2.2.4.	Imunohistoquímica para análise qualitativa da ativação neuronal (marcado com Fos) no PVN, OVLT e OSF de ratos tratados com sobrecarga de sódio por 7 dias	19
2.2.5.	Ativação de astrócitos (marcado com GFAP) ou de micróglia (marcação com IBA-1) no PVN, OVLT e OSF de ratos tratados com sobrecarga de sódio por 7 dias	20
2.3.	DISCUSSÃO	23
3.	CONCLUSÃO	25
	REFERÊNCIAS	26

1. INTRODUÇÃO

O aumento exagerado do consumo de cloreto de sódio na dieta é um dos principais fatores que contribuem para a alta incidência de fisiopatologias relacionadas ao sistema cardiovascular como a hipertensão arterial (HA). De fato, a incidência de HA no Brasil acomete 20% da população adulta ¹. Devido a essas taxas significativas, muitos pesquisadores têm direcionado seus estudos à HA associada a elevada ingestão de sódio, cátion (conjuntamente com seus íons associados) responsável por 90% da atividade osmótica plasmática e essencial à manutenção dos processos fisiológicos do organismo ^{2,3}.

Nesse sentido, o sistema nervoso central (SNC) possui importante papel na organização de respostas frente a perturbações osmóticas através dos osmorreceptores, neurônios especializados situados no prosencéfalo em área desprovidas de barreira hematoencefálica, que são sensíveis às alterações de sódio e/ou osmolaridade plasmática⁴. As regiões prosencefálicas que contém os osmorreceptores, enviam projeções excitatórias diretas ou indiretas para áreas do SNC importantes para o controle autonômico e cardiovascular como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), o núcleo do trato solitário (NTS) e a região rostroventrolateral do bulbo (RVL) ⁵⁻⁹. Ademais, o PVN também se projeta para o NTS e o RVL ^{10,11}, e de fato, estudos têm mostrado que alterações na osmolaridade plasmática desencadeadas por sobrecarga de sódio promovem o aumento da pressão arterial, da atividade nervosa simpática ^{12,13} e aumento da secreção de vasopressina ¹⁴.

Outras regiões do SNC que são muito importantes para o controle da osmolaridade plasmática e que tem osmorreceptores estão situados na lâmina terminal no prosencéfalo, tais como o órgão vasculoso da lâmina (OVLT) terminal e o órgão subfornical (OSF) ¹⁵. Essas duas áreas, uma vez ativadas por aumentos da osmolaridade plasmática, como a que acontece durante a sobrecarga de sódio, ativam outras áreas do SNC, tais como o PVN ¹⁵⁻¹⁷.

A neuroinflamação tem sido implicada na HA ^{18,19}. De fato, níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), Interleucina-6 (IL-6) e Interleucina-1 beta (IL-1 β) foram observados em modelos

experimentais de HA ¹⁸⁻²⁰. Já é sabido que as células do sistema imune inato como os macrófagos, possuem diversos papéis na fisiologia da HA dependente de sódio, podendo, mediante a geração de citocinas pró-inflamatórias, modular as regiões de controle cardiovascular para induzir a hipertensão [revisão em ²¹].

Dessa forma, não sabemos até o momento se essa sobrecarga de sódio aumenta a atividade neuronal e produz neuroinflamação em regiões que, diretamente ou indiretamente, se relacionam com o controle neuro-humoral da pressão arterial, tais como o PVN, o OVLT e o OSF. Sendo assim, o estudo da atividade neuronal e da neuroinflamação nestas áreas durante protocolo de sobrecarga de sódio, poderia elucidar os mecanismos envolvidos na HA dependente de sódio. Neste estudo o protocolo de sobrecarga de sódio será feito pelo oferecimento de solução de NaCl 2% como único líquido a ser ingerido pelos ratos durante o período de 7 dias, conforme já descrito na literatura ^{22,23}.

Com isso, a principal hipótese do projeto foi avaliar se a sobrecarga de sódio poderia estar provocando uma neuroinflamação em regiões prosencefálicas como PVN, OVLT e OSF, o que consequentemente contribuiria com a elevação da atividade nervosa simpática e então, com a elevação da pressão arterial média. Para avaliar a neuroinflamação foram analisadas alterações na expressão de astrócitos e microglias (células imuno residentes), e alterações na expressão da proteína Fos (um marcador de ativação neuronal) em neurônios do PVN, OVLT e OSF de ratos tratados com sobrecarga de NaCl 2%. Além disso, outro objetivo do projeto em questão foi avaliar se essa sobrecarga de sódio poderia provocar alterações significativas no sistema cardiovascular, em parâmetros físicos e até no equilíbrio hidrossalino dos animais estudados, então a partir disso, foi realizado o acompanhamento da pressão arterial média, frequência cardíaca, osmolaridade plasmática, ingestão de fluidos, excreção de urina e de sódio, variações no peso corporal e também variações quanto a ingestão de ração ^{22,23}.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1. Animais

Foram utilizados ratos Holtzman adultos (300 a 320 g), mantidos em gaiolas individuais com livre acesso a ração e água em salas climatizadas (temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade de $50\% \pm 10\%$), com ciclo claro-escuro de doze horas (luzes acesas das 07:00 h às 19:00 h). Os protocolos propostos estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA – 07/2021).

2.1.2. Sobrecarga de sódio

A sobrecarga de sódio foi feita pela substituição da bureta de água da gaiola por uma bureta de solução de NaCl 2% conforme descrito na literatura (Choe *et al.*, 2015; Mitchell *et al.*, 2018) e a solução de NaCl 2% será o único líquido para os animais beberem por 7 dias.

2.1.3. Excreção de sódio

Inicialmente os animais passaram por um período de 3 dias de aclimação nas gaiolas suspensas, dessa forma, ao final do último dia de aclimação (resultado referente ao dia 0) foi coletada uma pequena amostra de urina em um eppendorf de 2 mL de cada um dos animais, com objetivo de mensurar a excreção de sódio urinária basal. A partir disso, a excreção de sódio foi mensurada durante todo o protocolo experimental e amostras foram coletadas diariamente até o final do 7º dia de sobrecarga de sódio, quando os animais passaram pelo processo de perfusão sanguínea. Até o dia em que foram realizadas as análises das amostras, essas foram

mantidas congeladas e então no dia da análise, completamente descongeladas, levemente homogeneizadas e por fim, avaliadas no Analisador de Eletrólitos (íon seletivo) semi automático (INBRAS). Inicialmente foi realizada a calibração inicial do equipamento com as soluções padrão A e B provenientes do kit de calibração e, caso fosse necessária, nessa etapa poderia ser utilizada também a solução condicionadora de elétrons. Finalizada essa etapa, as amostras de urina foram diluídas seguindo uma proporção de 1 parte de urina para 4 partes de água deionizada, a amostra foi aspirada pelo aparelho e o resultado gerado demonstrando a quantificação de íons sódio em mol. A excreção urinária foi calculada pela multiplicação do volume urinário com a concentração de sódio em 1 ml de urina.

2.1.4. Imunohistoquímica

Os animais foram anestesiados profundamente (tiopental sódico 80 mg/kg de pc, intraperitoneal, Cristália Produtos Químicos farmacêuticos Ltda, Campinas, SP, Brasil). A seguir, foi feita a perfusão com salina tamponada (PBS 0,1 M; pH = 7.4) seguido de uma solução de paraformaldeído (Sigma, St. Louis, MO, USA) a 4% (PFA 4%) em PBS 0,1 M e pós-fixados em sacarose 30% em PBS 0,1 M (pH = 7,4) por 24 h. A seguir os encéfalos foram congelados em micrótomo de congelamento (Leica, CM1800, Bannockburn, IL, USA) e cortes coronais de 30 µm do prosencéfalo e do bulbo foram coletados para serem submetidos ao procedimento de imunohistoquímica conforme descrito a seguir.

Um em quatro cortes foram incubados por 15 minutos em uma solução de bloqueio contendo 10% de soro normal de cabra (NGS, Sigma, St.Louis, MO, USA) e Triton-X 0,3% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em PBS 0,1 M. Para a imuno-histoquímica de micróglia e astrócitos, após o bloqueio inicial, os cortes foram lavados (3x10 min) em PBS 0,1 M. A seguir, o cortes foram incubados em anticorpo primário anti-GFAP feito em camundongo (1:400, Chemicon International, Temecula, CA, USA) um marcador específico para astrócitos e incubados simultaneamente com anticorpo primário anti-IBA feito em coelho (1: 4000, Santa Cruz Biotechnology, CA, usa), marcador de micróglia, em PBS 0,1 M contendo 1% de NGS e Triton-X 0,3% por

48 horas à 4°C. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS (3 x 10 min) e então submetidos a 1 hr de incubação em IgG anti-camundongo biotinilado feito em cabra (1: 500, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). Os cortes foram lavados em PBS (3 x 10 min) antes de serem incubados com Streptavidina Alexa Fluor 594 conjugado (1:500; Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) e Alexa Fluor 488 anti-coelho feito em cabra (1:500, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) contendo 1% de NGS e Triton-X 0,3% em PBS 0,1 M. Depois de novas lavagens em PBS (3 x 5 min), os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, secos em ar ambiente e protegidos da luz durante 2 horas antes de serem colocadas lamínulas usando uma solução de montagem que protege a redução da fluorescência (Fluoromount Aqueous Mounting Medium, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Para a imunohistoquímica de c-Fos, marcador de ativação neuronal, 1 em 4 cortes foram incubados por 15 minutos em uma solução de bloqueio contendo 10% de soro normal de cabra (NGS, Sigma, St.Louis, MO, USA) e Triton-X 0,3% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em PBS 0,1 M. Após o bloqueio inicial, os cortes foram lavados (3x10 min) em PBS 0,1 M. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-FOS feito em coelho (1: 4000, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) em PBS 0,1 M contendo 1% de NGS e Triton-X 0,3% por 48 horas à 4°C e foi feita a reação de imuno-histoquímica por reação com diaminobenzidina (DAB), conforme descrito na literatura (Ji LL et al., 2007). As seções foram examinadas em um microscópio de fluorescência/campo claro, dependendo da marcação (Leica DM5500 B, Wetzlar, Hessen, Alemanha).

A contagem de células imunopositivas para FOS e células microgliais foi feita de forma manual utilizando o software Image J. Para a contagem de astrócitos, utilizamos a metodologia descrita na literatura (Speretta GF et al., 2019).

2.1.5. Osmolaridade plasmática

Após a completa anestesia dos animais para o processo de perfusão sanguínea, já mencionado anteriormente, foram coletadas amostras de sangue ventriculares para dosagem de osmolaridade plasmática. Com auxílio de uma seringa de 1mL foi

realizada a punção cardíaca e logo em seguida iniciada a perfusão sanguínea. Vale destacar que o número de amostras sanguíneas coletadas efetivamente pela técnica de punção cardíaca foi baixo, dessa forma, a fim de elevar o número amostral para análise estatística um grupo adicional de animais foi submetido ao mesmo protocolo experimental pelo período de sete dias e então amostras sanguíneas foram coletadas a partir da técnica de decapitação sob anestesia.

Com isso, independente da técnica utilizada, o sangue coletado foi armazenado em tubos EDTA contendo anticoagulantes, em seguida foram centrifugados pelo período de 10 minutos a 3000 rpm e então o sobrenadante caracterizado pela formação do plasma sanguíneo foi coletado e armazenado em eppendorfs de 0.5 mL e então devidamente refrigerado para posterior análise em osmômetro. Para a dosagem foi utilizado osmômetro de (Advanced Instruments Inc., Norwood, USA), então em um primeiro momento foram mensurados alguns padrões com osmolaridade conhecida a fim de confirmar a calibração do aparelho e em seguida, as amostras, já descongeladas, foram analisadas e os resultados avaliados estatisticamente.

2.1.6. Análises Estatísticas

Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguido teste de Student-Newman-Keuls ou teste *t* de Student foram utilizados para as comparações, conforme o indicado. Diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

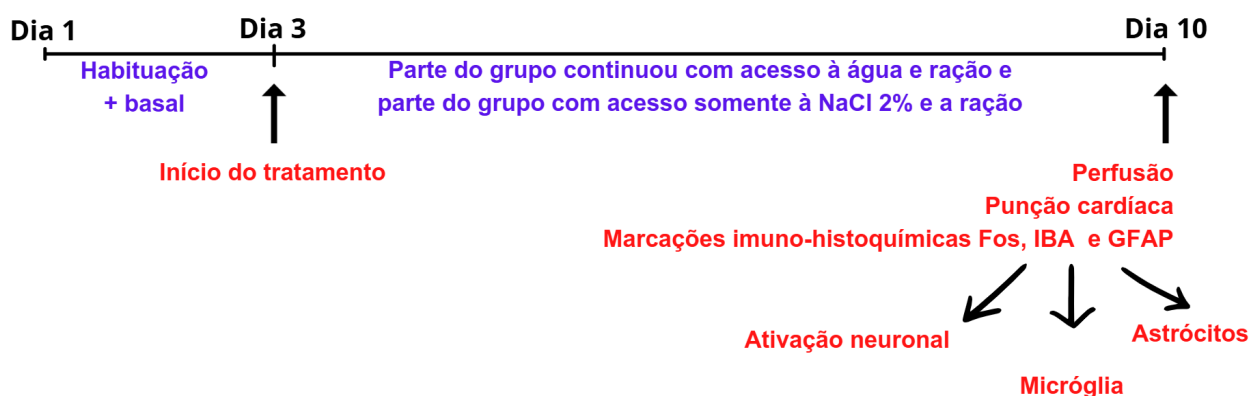
2.1.7. Protocolos Experimentais

Os animais foram colocados em gaiolas suspensas e o peso corporal inicial medido. Após 3 dias de aclimação, os animais foram aleatoriamente separados em ratos controle, que receberam ração e água *ad libitum* e ratos com sobrecarga de NaCl 2%, os quais receberam ração e a substituição da bureta de água pela de NaCl 2% por 7 dias. Neste dia, os animais foram novamente pesados para termos um valor basal do peso no início da sobrecarga de sódio. Durante os 7 dias de sobrecarga de sódio,

amostras de urina foram coletadas e a ingestão diária líquidos foi monitorada, assim no final do 8º dia, ou seja, após 7 dias completos de sobrecarga de sódio (ou água no grupo controle), todos os animais foram novamente pesados e foi feita perfusão com paraformaldeído 4% sob anestesia profunda conforme descrito acima. Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca e os encéfalos foram removidos e cortados conforme descrito acima. Os cortes foram coletados em placas de 24 poços e a partir deste momento fizemos o protocolo abaixo de imuno-histoquímica:

Em cortes do prosencéfalo contendo o PVN, OSF e OVLT foi realizada a imunohistoquímica para a proteína c-Fos (marcador de ativação neuronal), para GFAP (astrócitos) e para IBA-1 (micróglia) em ratos controle e em ratos com sobrecarga de NaCl 2% por 7 dias.

Figura 1 - Linha do tempo referente ao protocolo experimental utilizado



Fonte: Autoria própria.

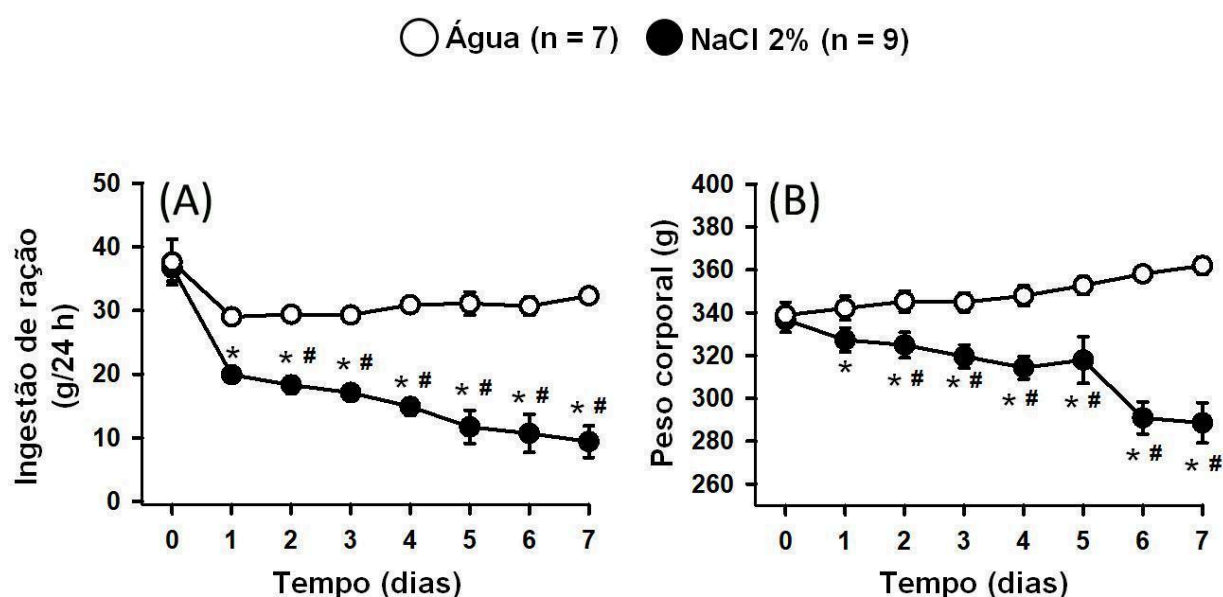
Legenda: Linha do tempo descrevendo todas as etapas referentes ao protocolo experimental, iniciando entre os dias 1 e dia 3, com o período de habituação e coleta de dados basais; seguido do início do protocolo experimental de sobrecarga de sódio com NaCl 2% durante 7 dias completos. Ao final, desse período foram realizadas perfusão, punção cardíaca e marcações imuno-histoquímicas nos animais.

2.2. RESULTADOS

2.2.1. Efeito da sobrecarga de NaCl 2% por 7 dias sobre o peso corporal e ingestão de ração.

No dia 0, todos os animais receberam ração e água *ad libitum* a fim de medirmos os valores basais. No dia 1 da Figura 2, parte dos animais recebeu NaCl 2% como o único líquido, e ambos os grupos tinham ração *ad libitum*. Observamos que o grupo que recebeu a sobrecarga de sódio apresentou a partir do 2º dia, redução da ingestão alimentar e a partir do 3º dia, como consequência, redução do peso corporal.

Figura 2 – Alterações de (A) peso corporal, (B) ingestão de ração em ratos que ingeriram água ou NaCl 2% por 7 dias



Fonte: Autoria própria.

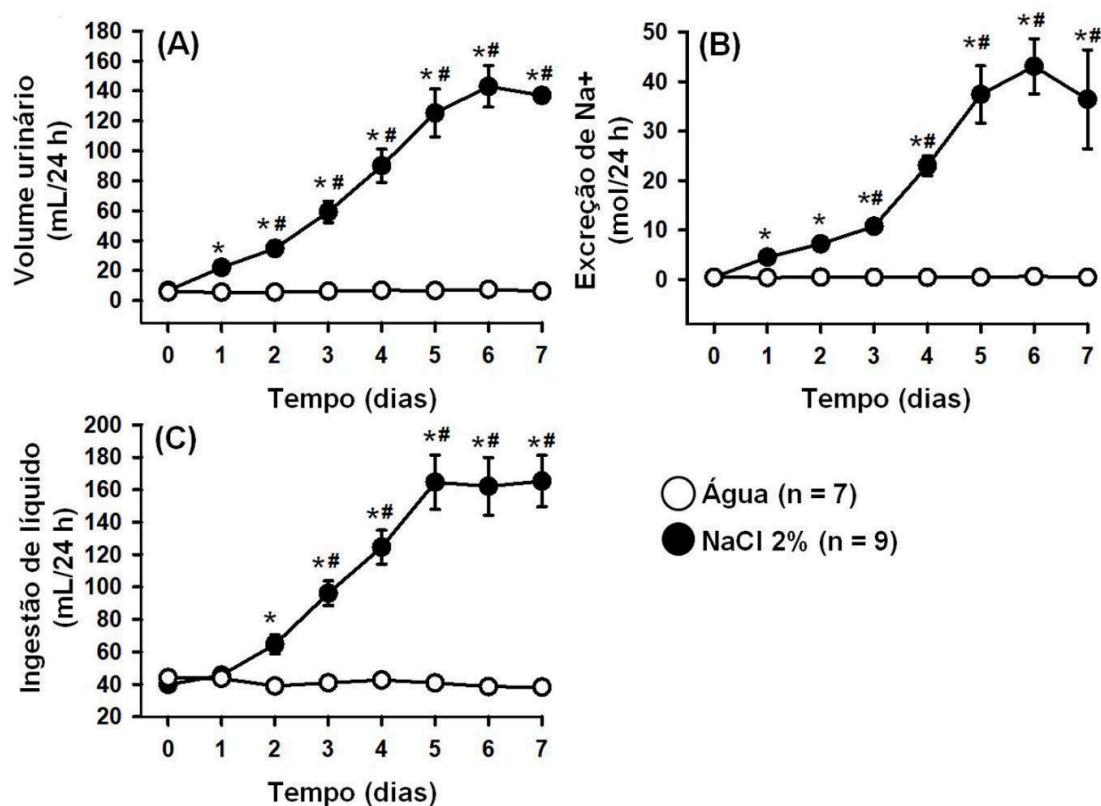
Legenda: Alterações de (A) ingestão de ração e (B) peso corporal em ratos que ingeriram água ou NaCl 2% por 7 dias. No dia 0 todos os animais estavam somente com água, a solução de NaCl 2% foi oferecida com único líquido a partir do dia 1. Dados estão expressos como média $\pm$ EPM; Análise de variâncias de duas vias seguido do teste Student-Newman-Keuls; *p < 0,05 vs. tempo 0; # p < 0,05 vs NaCl 2%.

2.2.2. Efeito da sobrecarga de NaCl 2% por 7 dias sobre o volume urinário, excreção de sódio e ingestão de líquido.

No dia 0, todos os animais receberam ração e água *ad libitum* a fim de medirmos os valores basais. No dia 1 da Figura 3, parte dos animais recebeu NaCl 2% como o único líquido, e ambos os grupos tinham ração *ad libitum*. Observamos que o grupo que recebeu a sobrecarga de sódio apresentou, a partir do 2º dia, aumento no

volume urinário e aumento da excreção urinária de sódio, bem como aumento da ingestão da solução de NaCl 2%.

Figura 3 – Alterações de (A) volume urinário, (B) excreção de sódio e (C) ingestão de líquidos em ratos que ingeriram água ou NaCl 2% por 7 dias



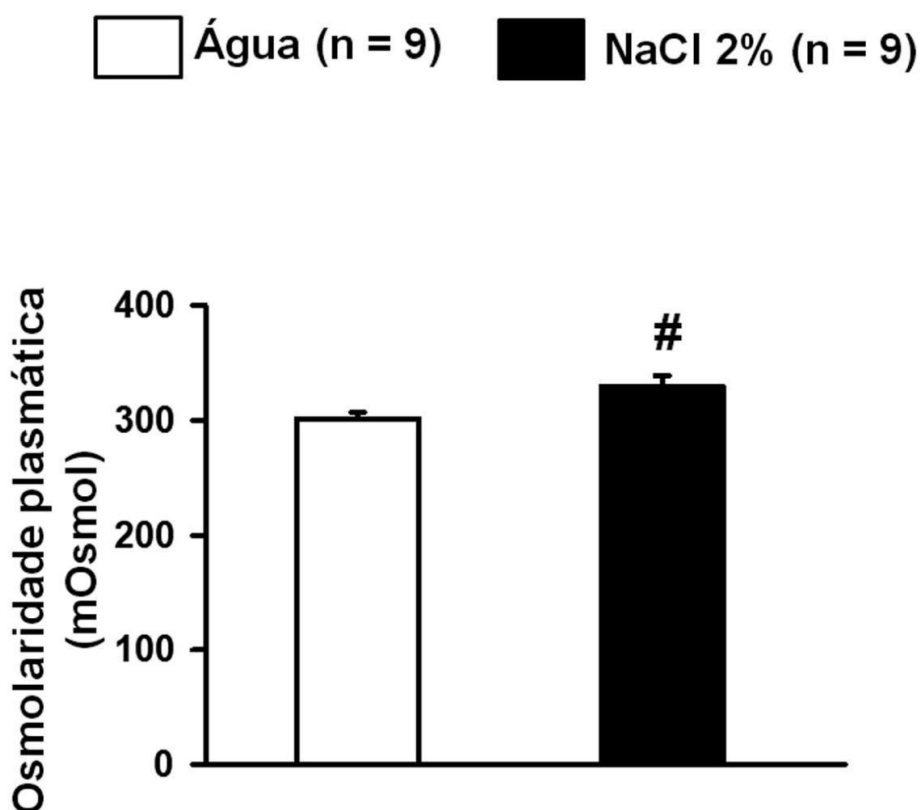
Fonte: Autoria própria.

Legenda: Alterações de (A) volume urinário, (B) excreção de sódio e (C) ingestão de líquidos em ratos que ingeriram água ou NaCl 2% por 7 dias. No dia 0 todos os animais estavam somente com água, a solução de NaCl 2% foi oferecida com único líquido a partir do dia 1. Dados estão expressos como média $\pm$ EPM; Análise de variâncias de duas vias seguido do teste Student-Newman-Keuls; *p < 0,05 vs. tempo 0; # p < 0,05 vs NaCl 2%.

2.2.3. Efeito do tratamento de 7 dias com sobrecarga de NaCl 2% sobre a osmolaridade plasmática.

Ao final do tratamento, animais que receberam sobrecarga de sódio apresentaram aumento significativo da osmolaridade plasmática quando comparado aos animais que beberam água no mesmo período (Figura 4).

Figura 4 – Alterações na osmolaridade plasmática em ratos que ingeriram água ou NaCl 2% por 7 dias



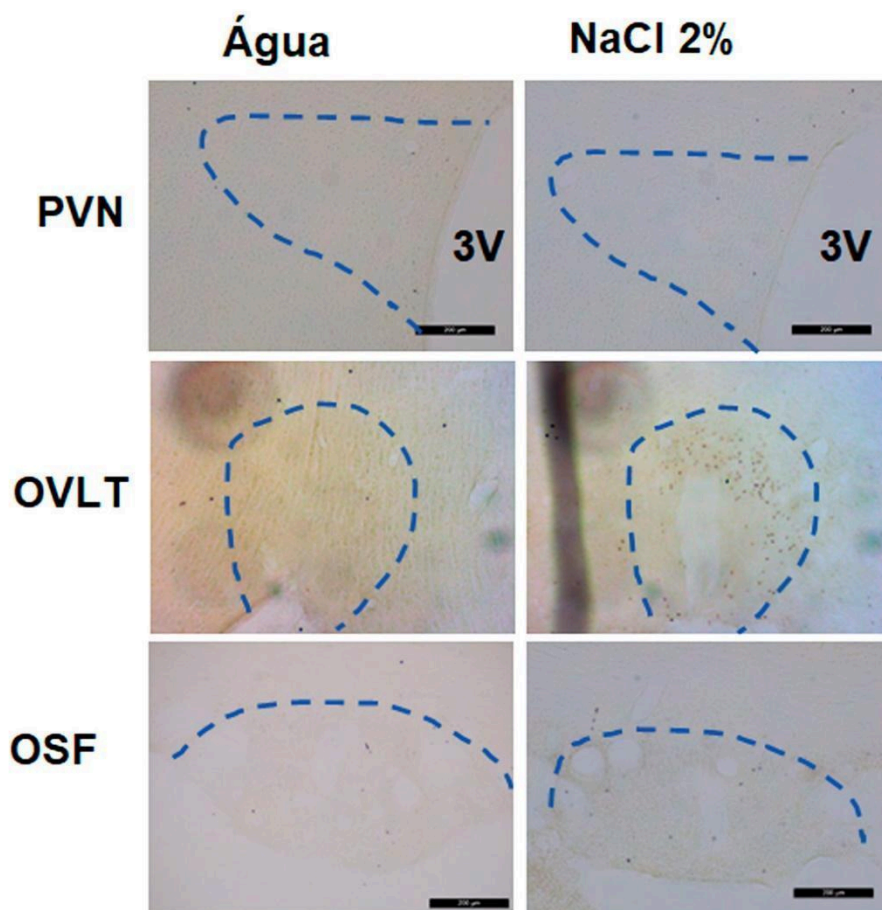
Fonte: Autoria própria.

Legenda: Alterações na osmolaridade plasmática em ratos que ingeriram água ou NaCl 2% por 7 dias. A medida da osmolaridade plasmática foi feita no final do 7º dia de ingestão. Dados estão expressos como média $\pm$ EPM; teste t de Student; # $p < 0,05$ vs NaCl 2%.

2.2.4. Imunohistoquímica para análise qualitativa da ativação neuronal (marcado com Fos) no PVN, OVLT e OSF de ratos tratados com sobrecarga de sódio por 7 dias.

Observou-se a marcação de Fos no OVLT de ratos com sobrecarga de sódio (Figura 5), quando comparado com os ratos que ingeriram água no mesmo período. Entretanto, essa ativação neuronal não ocorreu no PVN e no OSF.

Figura 5 – Corte coronal do prosencéfalo mostrando a marcação imunohistoquímica da proteína Fos que ingeriram água ou NaCl 2% por 7 dias



Fonte: Autoria própria.

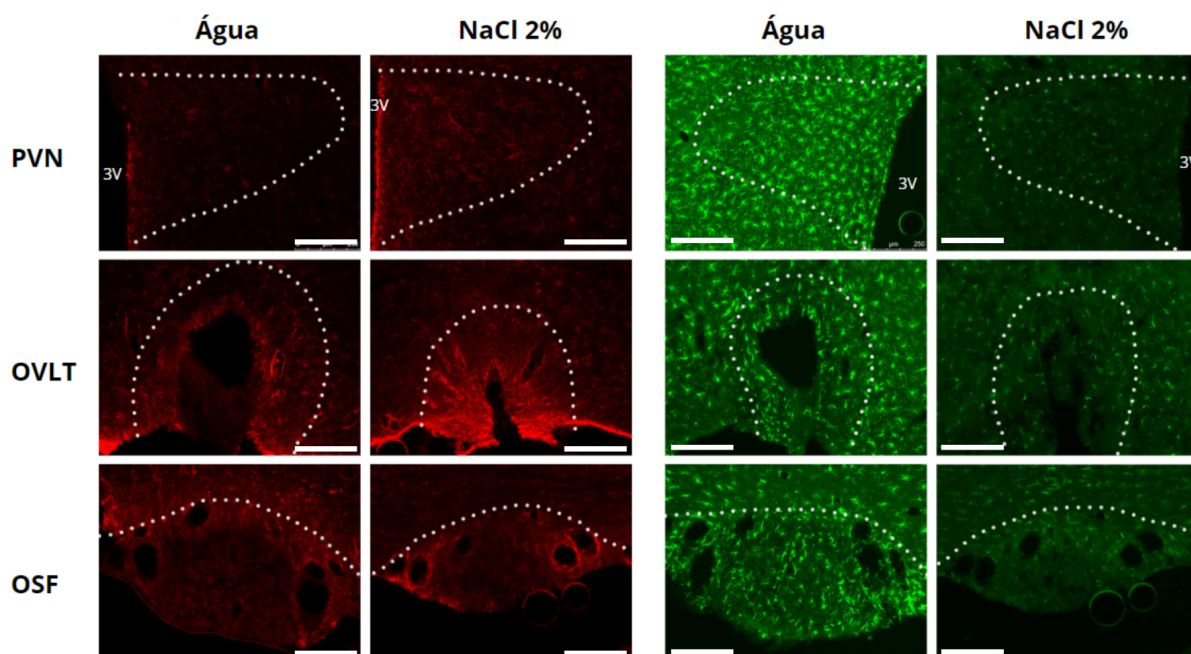
Legenda: Corte coronal (30 μ m) do prosencéfalo mostrando a marcação imunohistoquímica da proteína Fos que ingeriram água ou NaCl 2% por 7 dias. Cada ponto marrom é a marcação nuclear da proteína Fos. As linhas pontilhadas representam o limite anatômico das áreas. Imagens com 10x de aumento; barra de escala = 200 μ m. Abreviaturas: PVN, núcleo paraventricular do hipotálamo; OVLT, órgão vasculoso da lâmina terminal; OSF, órgão subfornical.

2.2.5. Ativação de astrócitos (marcado com GFAP) ou de micróglia (marcação com IBA-1) no PVN, OVLT e OSF de ratos tratados com sobrecarga de sódio por 7 dias.

A figura 6 mostra em vermelho a marcação para astrócitos e em verde para micróglias. Na Figura 7 temos a quantificação. Os astrócitos foram quantificados pelo quanto seus prolongamentos se espalham pelo encéfalo (astroglíose) e, portanto,

quantificados em escala de cinza por seção. Cada seção tem 30 μm e como citado nos métodos, foi selecionado 1 corte a cada 120 μm . Já as micróglias foram contadas uma a uma manualmente. Observamos que houve uma leve astrogliose no PVN (aumento percentual de 30%) e uma astrogliose mais significativa no OVLT (aumento percentual de 109%) nos ratos experimentais quando comparados ao grupo controle, enquanto houve uma tendência a redução das micróglias no PVN (redução percentual de 29%), no OVLT (redução percentual de 56%) e no OSF (redução percentual de 26%) nos ratos experimentais quando comparados ao grupo controle. No OSF não houve astrogliose em nenhum dos grupos analisados e uma redução de micróglias foi observada nos três núcleos dos ratos experimentais (Figura 7).

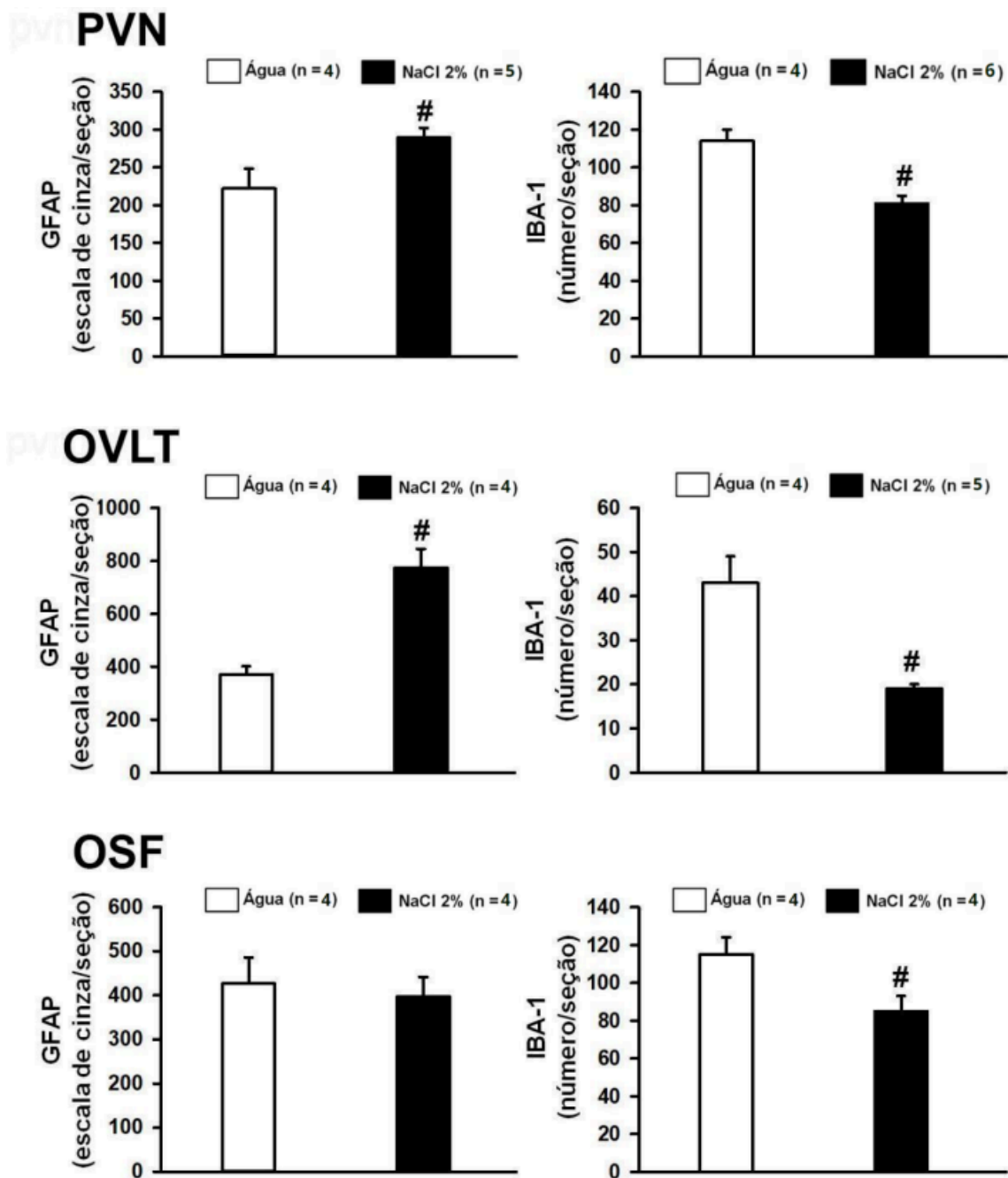
Figura 6 – Corte coronal do prosencéfalo mostrando a marcação imunohistoquímica dos astrócitos com GFAP (vermelho) ou de micróglia com IBA-1 (verde) em ratos que ingeriram água ou NaCl 2% por 7 dias



Fonte: Autoria própria.

Legenda: Corte coronal (30 μm) do prosencéfalo mostrando a marcação imunohistoquímica dos astrócitos com GFAP (vermelho) ou de micróglia com IBA-1 (verde) em ratos que ingeriram água ou NaCl 2% por 7 dias. As linhas pontilhadas representam o limite anatômico das áreas. Barra de escala = 250 μm . Abreviaturas: PVN, núcleo paraventricular do hipotálamo; OVLT, órgão vascular da lâmina terminal; OSF, órgão subfornical.

Figura 7 – Quantificação da astrogliose (GFAP) e do número de micróglia (IBA-1) no PVN, núcleo paraventricular do hipotálamo; OVLT, órgão vasculoso da lâmina terminal; OSF, órgão subfornical de ratos que ingeriram água ou NaCl 2% por 7 dias



Fonte: Autoria própria.

Legenda: Quantificação da astrogliose (GFAP) e do número de micróglia (IBA-1) no PVN, núcleo paraventricular do hipotálamo; OVLT, órgão vasculoso da lâmina terminal; OSF, órgão subfornical de ratos que ingeriram água ou NaCl 2% por 7 dias. Dados estão expressos como média $\pm$ EPM; teste t de Student, # $p < 0,05$ vs NaCl 2%.

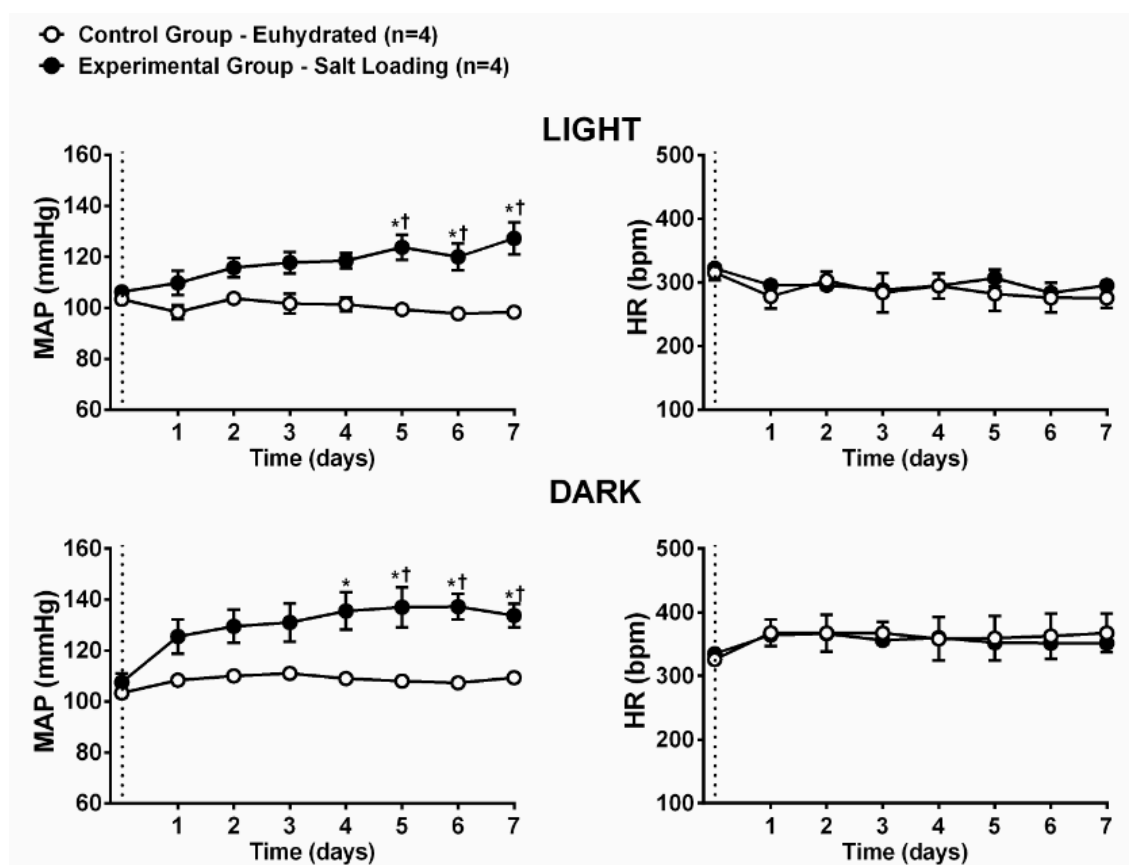
2.3. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi demonstrado que a partir do segundo dia de tratamento com a sobrecarga de sódio houve um aumento significativo da osmolaridade plasmática, ingestão de fluidos, excreção urinária e excreção de sódio em ratos SS (sensíveis ao sódio, ou seja, corresponde ao grupo experimental) quando comparado com o grupo controle que possuía apenas água para beber.

A redução do peso corporal médio dos animais tratados com a sobrecarga de sódio em relação aos animais do grupo controle, está relacionada diretamente com a menor ingestão de ração também observada no grupo SS. A maior ingestão de NaCl 2% era esperada, uma vez que houve um aumento da osmolaridade plasmática decorrente da sobrecarga de sódio que estimulou mecanismos de sede. Porém, como os animais possuíam somente solução salina para beber, ocorreu um aumento progressivo da ingestão de sódio hipertônico e consequentemente, houve um aumento da excreção de sódio e do volume urinário.

Dados da literatura demonstram que a elevada ingestão de sódio promove aumento da osmolaridade plasmática e esse desbalanço homeostático leva a ativação de regiões prosencefálicas desprovidas de barreira hematoencefálica, como o OSF e OVLT, que quando ativados estimulam também o PVN¹⁴. O PVN, por sua vez, ativa importantes regiões do controle cardiovascular no tronco (o NTS e o RVL) ocasionando, assim, a ativação de outras regiões que promovem o aumento da atividade nervosa simpática, aumentando a pressão arterial¹². Resultados, os quais a autora deste trabalho teve colaboração direta, mas não fazem parte de seu projeto de iniciação científica, mostraram que a sobrecarga de sódio (NaCl 2%) promoveu aumento da pressão arterial (Figura 8). Esse aumento esteve associado ao incremento na ingestão de sódio ao longo dos dias, o qual aumentou a osmolaridade plasmática, como demonstrado no presente trabalho.

Figura 8 – Pressão arterial média (MAP) e de frequência cardíaca (HR) durante o ciclo claro-escuro de ratos que ingeriram água ou NaCl 2% por 7 dias



Fonte: Autoria própria.

Legenda: Alterações de pressão arterial (MAP) e de frequência cardíaca (HR) durante o ciclo claro-escuro de ratos que ingeriram água ou NaCl 2% por 7 dias. Dados estão expressos como média $\pm$ EPM; Análise de variâncias de duas vias seguido do teste Student-Newman-Keuls; *p < 0,05 vs. tempo 0; # p < 0,05 vs NaCl 2% (Dados dos Drs. Aline Mourão e Roberto Pontes e da aluna de IC Maria Carolina Di Palma).

Os fatores que explicam o aumento da pressão arterial durante o aumento da osmolaridade plasmática são a maior atividade nervosa simpática e a secreção de vasopressina^{12,22}. Tem sido discutido mais recentemente que a ingestão aumentada de sódio pode levar também a uma neuroinflamação²¹. De fato, quando a citocina inflamatória TNF-alfa é injetada diretamente no PVN ocorre aumento da pressão arterial associada a um aumento da atividade nervosa simpática²³. A partir disso, o presente estudo buscou analisar como se dava a neuroinflamação durante a sobrecarga de sódio. Primeiramente, foi observado que houve um aumento sustentado

na ativação neuronal (Fos) no OVLT em ratos que ingeriram NaCl 2% cronicamente. Porém, não houve alterações no PVN, diferentemente do que pode ser observado em outros estudos, tal como o estudo de *Mitchell* e colaboradores²⁰. Deve ser levado em consideração que no estudo mencionado a sobrecarga de sódio utilizada representava uma solução com 4% de sódio, o que pode ter gerado um maior estímulo osmótico ao ponto de manter ainda a ativação no PVN.

Por fim, o presente estudo pode ser considerado inédito por ter demonstrado que das três áreas estudadas, duas delas possuíam astrogliose, mostrando que houve uma neuroinflamação no OVLT e no PVN. No entanto, um dado considerado surpreendente foi a redução no número de micróglia nas três regiões estudadas. Não é possível afirmar se essa redução seria uma possível compensação do sistema imune residente no SNC a fim de controlar a quantidade de citocinas inflamatórias.

3. CONCLUSÃO

Concluindo, foi demonstrado que a sobrecarga de sódio provoca aumento da osmolaridade plasmática, aumento da excreção urinária, além de uma maior ingestão de fluidos. As marcações imunohistoquímicas sugeriram também maior ativação neuronal de uma importante região do controle cardiovascular, no entanto não se sabe ao certo o porquê de não haver marcações do PVN com Fos, além da redução da ativação de micróglias. Porém, um dado inédito na literatura é a astrogliose no PVN e no OVLT nos ratos do grupo experimental. Para um maior detalhamento da pesquisa e dos dados obtidos seria interessante a análise dessa neuroinflamação observada a partir de outras técnicas calculando diretamente as citocinas pró-inflamatórias, além de analisar a neuroinflamação em regiões do tronco que também se relacionam com o sistema nervoso simpático, como o RVL e o NTS.

REFERÊNCIAS

- ¹ MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigitel Brasil 2019**: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. 1. ed. Brasília: Editora MS, 2020. Cartilha.
- ² THRASHER, T. N.; KEIL, L. C.; RAMSAY, D. J. Sodium balance and aldosterone during dehydration and rehydration in the dog. **American Journal of Physiology**, Rockville, v. 247, p. 76-831 jul. 1984.
- ³ DENTON, D. Thirst: Physiological and Psychological Aspects. *In*: DENTON, D. **Mineral appetite: an overview**. Edição: David J. Ramsay e David Booth. Londres: Springer-Verlag London Limited, 1991. cap. 8, p. 131-146.
- ⁴ BOURQUE, C. W. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. **Nature Reviews Neuroscience**, Nova Iorque, v. 9, p. 519-531, mai. 2008.
- ⁵ BAINS, J. S.; FERGUSON, A. V. Paraventricular nucleus neurons projecting to the spinal cord receive excitatory input from the subfornical organ. **American Journal of Physiology**, Rockville, v. 268, p. 625-633, mar. 1995.
- ⁶ SMITH, P. M.; FERGUSON, A. V. Circulating signals as critical regulators of autonomic state--central roles for the subfornical organ. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Rockville, v. 299, p. 405-415, mai. 2010.
- ⁷ FERGUSON, A. V.; DAY, T. A.; RENAUD, L. P. Subfornical organ stimulation excites paraventricular neurons projecting to dorsal medulla. **American Journal of Physiology**, Rockville, v. 247, p. 1088-1092, dez. 1984.
- ⁸ FERGUSON, A. V.; DAY, T. A.; RENAUD, L. P. Subfornical organ efferents influence the excitability of neurohypophyseal and tuberoinfundibular paraventricular nucleus neurons in the rat. **Neuroendocrinology**, Basileia, v. 39, p. 423-428, mar. 2008.
- ⁹ SAPER, C. B.; LEVISOHN, D. Afferent connections of the median preoptic nucleus in the rat: anatomical evidence for a cardiovascular integrative mechanism in the anteroventral third ventricular (AV3V) region. **Brain Research**, Londres, v. 288, n. 1-2, p. 21-31, dez. 1983.
- ¹⁰ BADOER, E. Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus that project to the rostral ventrolateral medulla are not activated by hypotension. **Brain Research**, Londres, v. 801, n. 1-2, p. 224-227, ago. 1998.

- ¹¹ SAPER, C. B.; LOEWY, A. D.; SWANSON, L. W.; COWAN, W. M. Direct hypothalamo-autonomic connections. **Brain Research**, Londres, v. 117, p. 305-312, nov. 1976.
- ¹² TONEY, G. M.; CHEN, Q. H.; CATO, M. J.; STOCKER, S. D. Central osmotic regulation of sympathetic nerve activity. **Acta Physiologica Scandinavica**, Texas, v. 177, p. 43-55, dez. 2002.
- ¹³ STOCKER, S. D.; MADDEN, C. J.; SVED, A. F. Excess dietary salt intake alters the excitability of central sympathetic networks. **Physiology & Behavior**, Pensilvânia, v. 100, p. 519-524, jul. 2010.
- ¹⁴ BLANCH, G. T.; *et al.* Inhibitory mechanism of the nucleus of the solitary tract involved in the control of cardiovascular, dipsogenic, hormonal, and renal responses to hyperosmolality. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Rockville, v. 304, p. 531-542, abr. 2013.
- ¹⁵ SHI, P., *et al.* Brain microglial cytokines in neurogenic hypertension. **Hypertension**, Florida, v. 56, p. 297-303, ago. 2010.
- ¹⁶ SHI, P.; RAIZADA, M. K.; SUMNERS, C. Brain cytokines as neuromodulators in cardiovascular control. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Florida, v. 37, p. 52-57, fev. 2010.
- ¹⁷ AGARWAL, D.; WELSCH, M. A.; KELLER, J. N.; FRANCIS, J. Chronic exercise modulates RAS components and improves balance between pro- and anti-inflammatory cytokines in the brain of SHR. **Basic Research in Cardiology**, Louisiana, v. 106, p. 1069-1085, nov. 2012.
- ¹⁸ RUCKER, A. J.; RUDEMILLER, N. P.; CROWLEY, S. D. Salt, Hypertension, and Immunity. **Annual Review of Physiology**, Carolina do Norte, v. 80, p. 283-307, nov. 2017.
- ¹⁹ CHOE, K. Y., *et al.* High salt intake increases blood pressure via BDNF-mediated downregulation of KCC2 and impaired baroreflex inhibition of vasopressin neurons. **Neuron**, Massachusetts, v. 85, p. 549-560, jan. 2015.
- ²⁰ MITCHELL, N.C.; GILMAN, T. L.; DAWS, L. C.; TONEY, G. M. High salt intake enhances swim stress-induced PVN vasopressin cell activation and active stress coping. **Psychoneuroendocrinology**, Texas, v. 93, p. 29-38, jul. 2018.
- ²¹ JI, L. L. *et al.* Differential effects of water deprivation and rehydration on Fos and FosB/DeltaFosB staining in the rat brainstem. **Experimental Neurology**, Texas, v. 203, n. 2, p. 445-456, fev. 2007.

²² SPERETTA, G. F. *et al.* Importance of AT1 and AT2 receptors in the nucleus of the solitary tract in cardiovascular responses induced by a high-fat diet. **Hypertension Research**, Florida, v. 42, p. 439-449, jan. 2019.

²³ MOURÃO, A. A. *et al.* Local ionotropic glutamate receptors are required to trigger and sustain ramping of sympathetic nerve activity by hypothalamic paraventricular nucleus TNF α . **American Journal of Physiology**, Rockville, v. 321, n. 3, p. 580-591, sep. 2021.