

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

**ANDRÉIA MARA MOREIRA**

**EFEITOS DA INIBIÇÃO ENDÓGENA DA PRODUÇÃO DE H<sub>2</sub>S NAS RESPOSTAS  
HOMEOSTÁTICAS INDUZIDAS PELA DIETA HIPERSÓDICA EM RATOS**

Alfenas/MG

2017

**ANDRÉIA MARA MOREIRA**

**EFEITOS DA INIBIÇÃO ENDÓGENA DA PRODUÇÃO DE H<sub>2</sub>S NAS RESPOSTAS  
HOMEOSTÁTICAS INDUZIDAS PELA DIETA HIPERSÓDICA EM RATOS**

Dissertação apresentada como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, Brasil. Área de concentração: Neurociências e Comportamento. Orientadora: Dra. Sílvia Graciela Ruginsk Leitão.

Alfenas/MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Moreira, Andréia Mara.

Efeitos da inibição endógena da produção de H<sub>2</sub>S nas respostas homeostáticas induzidas pela dieta hipersódica em ratos / Andréia Mara Moreira. -- Alfenas/MG, 2017.

75 f. -

Orientadora: Silvia Graciela Ruginsk Leitão.

Dissertação (Mestrado em em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, 2017.

Bibliografia.

1. Sulfeto de Hidrogênio. 2. Sódio na Dieta. 3. Homeostase.  
I. Leitão, Silvia Graciela Ruginsk. II. Título.

CDD-571.75

**ANDRÉIA MARA MOREIRA**

**EFEITOS DA INIBIÇÃO ENDÓGENA DA PRODUÇÃO DE H<sub>2</sub>S NAS RESPOSTAS  
HOMEOSTÁTICAS INDUZIDAS PELA DIETA HIPERSÓDICA EM RATOS**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, Brasil. Área de concentração: Neurociências e Comportamento.

Aprovada em 20 de Novembro de 2017

Prof<sup>a</sup>: Dr<sup>a</sup> Sílvia Graciela Ruginsk Leitão

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 


Prof<sup>a</sup>: Dr<sup>a</sup> Fabiana Lúcio de Oliveira

Instituição: Instituto Federal de Educação,  
Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais

Assinatura: 

Prof<sup>a</sup>: Dr<sup>a</sup> Josie Resende Torres da Silva

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Dedico este trabalho a todos que moram em meu coração e são essenciais a minha existência, em especial, ao Pai supremo: Deus, a Mãe de todos: Nossa Senhora Aparecida, a minha eterna estrela: meu pai Luiz Carlos, ao meu porto seguro: minha mãe Jacira e a minha alegria: meu noivo Jean. Obrigada todos os dias pelo amor de vocês, por acreditarem em meus sonhos e me motivarem nos momentos mais difíceis!

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida e por proporcionar, em grande parte, os recursos necessários para a realização desta pesquisa, com seus laboratórios de Fisiologia, Anatomia, Biologia celular e Bioquímica e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

À Universidade de São Paulo, especialmente o Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, sob a coordenação do Prof<sup>o</sup>. José Antunes Rodrigues pela colaboração na realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Jalile Amin Naves Ventura por me apresentar à fisiologia na minha graduação e ter sido o elo entre minha orientadora e eu, possibilitando esta caminhada, obrigada pelo apoio em cada etapa, você é especial e mora em meu coração.

À Prof<sup>a</sup> Sílvia Graciela Ruginsk Leitão, minha orientadora, primeiramente pela aceitação, assim como pela confiança, por toda dedicação, paciência e disposição em me ensinar, serei eternamente grata, tens um lugar em meu coração para todo o sempre. “Sílvia que Deus te abençoe e que seus sonhos se concretizem.”

Aos meus amigos de laboratório e de vida, Samuel e Marina que me receberam e transmitiram toda dinâmica do Lab. (Laboratório de Ciências Fisiológicas), e juntos formamos o melhor trio, foi ótimo trabalhar e aprender com vocês. Obrigada também pelo companheirismo e diversão. Aos nossos queridos estagiários e parceiros, Ludmila e Mateus, obrigada por todos os frascos identificados e papéis cortados. A todos que passaram pelo Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Médicas da UNIFAL e que lá estão, em especial, Vanusa (pela amizade, preocupação, carinho e inúmeras contribuições, te levarei comigo pra sempre), Vânia (pela ajuda, carinho e até a água com açúcar quando precisei), Prof. Renato e Prof. Giovane (enquanto chefes do laboratório pela confiança, boas conversas e ensinamentos), Felipe (por todas as vezes que saiu correndo para buscar ou conseguir soluções nos outros laboratórios e pela amizade), e todas as outras pessoas que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho.

Aos professores que muito me ensinaram nas disciplinas realizadas durante este processo, contribuindo também para a vida. Especialmente, Prof<sup>a</sup> Juliana Bassalobre Borges (Ju) que me orientou no estágio docente, uma ótima profissional e um grande exemplo de pessoa.

Às secretárias (Antonieta e Adriana) e a coordenação da Pós-Graduação em Biociências pela atenção, cuidado, compreensão e todos os esclarecimentos necessários.

“Os progressos da ciência obedecem à lei da repulsão: para dar um passo em frente, é preciso começar por derrubar o domínio do erro e das falsas teorias.”

Boris Leonidovich Pasternak (1957)

## RESUMO

O sódio ( $\text{Na}^+$ ) é o principal soluto osmoticamente ativo do meio extracelular, bem como constitui o principal íon responsável pela manutenção do volume do líquido circulante, essencial à adequada perfusão dos tecidos. Recentemente, tem sido demonstrada a participação de moduladores gasosos na homeostase deste íon, entre eles o sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ), formado, entre outras vias, por ação da enzima cistationina- $\gamma$ -liase (CSE). Diante disto, o presente estudo visou avaliar a participação do  $\text{H}_2\text{S}$  nas respostas homeostáticas desencadeadas pelo consumo agudo de dieta hipersódica. Após habituação com a ração convencional moída (NUVILAB®), 72 ratos *Wistar* machos adultos foram mantidos durante sete dias com dieta controle [C (0,27% de sódio)] ou hipersódica [S2 (0,54%)/S3 (0,81%)], e tratados com um inibidor da enzima CSE (DL-Propargilglicina, PAG, 25 mg/kg/dia, i.p., Sigma®) ou veículo (soro fisiológico). Ao final deste período, os animais foram eutanasiados por decapitação. Demonstramos que a ingestão, mesmo que aguda, de uma quantidade aumentada de  $\text{Na}^+$  na dieta, em valores que tentam mimetizar as variações no consumo humano (2 a 3 vezes o preconizado) modificou de maneira importante o balanço de água e  $\text{Na}^+$ , com repercussões em ao menos dois eixos neuroendócrinos (hipotálamo-neuro-hipofisário e hipotálamo-hipófise-adrenal). Interessantemente, todas essas respostas adaptativas se desenvolveram mesmo na ausência de alterações comportamentais (aumento reflexo da ingestão de água) e plasmáticas (hiperosmolalidade/hipernatremia) evidentes. Esses achados foram acompanhados pelo desenvolvimento de uma clara resposta inflamatória em elementos tubulares e microvasculares renais, resposta esta extensiva, porém menos intensa, em uma grande artéria sistêmica (aorta). Por sua vez, a inibição da produção endógena de  $\text{H}_2\text{S}$  pela CSE, por meio do tratamento com PAG, preveniu a inflamação induzida pela dieta hipersódica, além de modular a secreção hormonal. Em suma, nossos dados sugerem que o  $\text{H}_2\text{S}$  tenha um papel pró-inflamatório importante, aparentemente contrarregulador do NO, que esteja envolvido nas alterações agudas desencadeadas pelo consumo excessivo de  $\text{Na}^+$ . Essas alterações, se mantidas em longo prazo, podem contribuir para a patogênese de distúrbios locais, principalmente renais, bem como sistêmicos, como a hipertensão arterial.

**Palavras-chave:** Sulfeto de hidrogênio. Dieta hipersódica. Homeostase.



## ABSTRACT

Sodium ( $\text{Na}^+$ ) is the main osmotically active solute of the extracellular fluid, as well as represents the main ion responsible for maintaining the circulating volume, essential for adequate tissue perfusion. Recently, the participation of gaseous modulators in sodium homeostasis has been proposed. Among these gases is hydrogen sulfide ( $\text{H}_2\text{S}$ ), formed, among other routes, by the action of the enzyme cystathionine- $\gamma$ -lyase (CSE). In this context, the present study aimed to evaluate the participation of  $\text{H}_2\text{S}$  in the homeostatic responses triggered by the acute consumption of hypersodic diet. After being habituated with the standard ground food (NUVILAB®), 72 adult male Wistar rats were kept for seven days on a control [C (0.27%  $\text{Na}^+$ )] or hypersodic diet [S2 (0.54%)/S3(0.81%)], and treated with a CSE inhibitor (DL-Propargylglycine, PAG, 25 mg/kg/day, ip, Sigma®) or vehicle (saline). At the end of this period, the animals were euthanized by decapitation. We have shown that the ingestion, even if acute, of an increased amount of  $\text{Na}^+$  in the diet, in values that attempt to mimic the variations in human consumption (2 to 3 times the recommended), significantly modified the  $\text{Na}^+$  and water balance, with repercussions on at least two neuroendocrine axes (hypothalamus-neurohypophysis and hypothalamus-pituitary-adrenal axis). Interestingly, all these adaptive responses evolved even in the absence of evident behavioral changes (reflex increase in water intake) and plasma (hyperosmolality/hyponatremia). These findings were accompanied by the development of a clear inflammatory response in tubular and microvascular renal elements, and an also present but less intense response in a large systemic artery (aorta). In turn, the inhibition of endogenous  $\text{H}_2\text{S}$  production by CSE, through PAG treatment, prevented the inflammation induced by hypersodic diet, in addition to modulating hormone secretion. In summary, our data suggest that  $\text{H}_2\text{S}$  has an important proinflammatory role, apparently counterregulating the actions of NO, which may be involved in acute changes triggered by excessive  $\text{Na}^+$  consumption. These changes, if maintained in the long term, may contribute to the pathogenesis of local, mainly renal, as well as systemic disorders, such as arterial hypertension.

**Key words:** Hydrogen sulfide. Hypersodic diet. Homeostasis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Metabolismo da L-cisteína para biossíntese do sulfeto de hidrogênio (H <sub>2</sub> S)	21
Figura 2 -	Imagens fotográficas dos ambientes de alocação dos animais .....	27
Figura 3 -	Imagens microscópicas (5x) do córtex renal com imunistoquímica para CSE .....	30
Figura 4 -	Região dos cortes histológicos para fixação e inclusão em parafina .....	33
Figura 5 -	Método de análise do diâmetro interno médio da luz do vaso .....	34
Figura 6 -	Processamento do coração para análise morfométrica .....	35
Figura 7 -	Efeitos sobre a homeostase energética .....	38
Figura 8 -	Efeitos sobre a homeostase hidroeletrólítica .....	40
Figura 9 -	Efeitos sobre a massa do rim .....	41
Figura 10 -	Efeitos sobre a inflamação túbulo-intersticial do córtex renal .....	42
Figura 11 -	Efeitos sobre a inflamação nos glomérulos .....	44
Figura 12 -	Efeitos sobre a enzima óxido nítrico sintase induzida (NOS2) .....	46
Figura 13 -	Efeitos sobre a massa de tecidos (neuro)endócrinos .....	48
Figura 14 -	Efeitos sobre as concentrações plasmáticas de hormônios e de nitrato .....	49
Figura 15 -	Efeitos sobre o tecido cardíaco .....	50
Figura 16 -	Efeitos sobre a morfometria da aorta torácica .....	51
Figura 17 -	Efeitos sobre a inflamação vascular sistêmica .....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACTH</b>	- Hormônio adrenocorticotrófico
<b>ANG II</b>	- Angiotensina II
<b>ANP</b>	- Peptídeo natriurético atrial
<b>AVP</b>	- Arginina vasopressina ou hormônio antidiurético (ADH)
<b>C</b>	- Controle (grupo experimental dieta com 0,27% de sódio)
<b>°C</b>	- Graus Celsius
<b>CAT</b>	- Cisteína aminotransferase
<b>CBS</b>	- Cistationina-β-sintase
<b>cm<sup>2</sup></b>	- Centímetro quadrado
<b>CO</b>	- Monóxido de carbono
<b>CRH</b>	- Hormônio liberador de corticotrofina
<b>CSE</b>	- Cistationina-γ-liase
<b>DAB</b>	- Hidrato de tetrahidrocloreto de 3,3'-diaminobenzidina
<b>dL</b>	- Decilitro
<b>ED1</b>	- Anticorpo marcador de macrófagos ativados/monócitos
<b>EPM</b>	- Erro padrão da média
<b>G</b>	- Grama
<b>GMPc</b>	- Monofosfato cíclico de guanosina
<b>H</b>	- Hora
<b>HHA</b>	- Hipotálamo-hipófise-adrenal
<b>HO</b>	- Heme-oxigenase: induzida (HO-1) e constitutiva (HO-2)
<b>H<sub>2</sub>S</b>	- Sulfeto de hidrogênio
<b>i.c.v.</b>	- Intracerebroventricular
<b>IL</b>	- Interleucina
<b>IMC</b>	- Índice de massa corporal
<b>i.p.</b>	- Intraperitoneal
<b>K<sup>+</sup><sub>ATP</sub></b>	- Canal de potássio dependente de trifosfato de adenosina
<b>kg</b>	- Quilograma
<b>LEC</b>	- Líquido extracelular
<b>LIC</b>	- Líquido intracelular

<b>L-NAME</b>	- L-NG-nitroarginina-metil-ester (fármaco inibidor da enzima NOS)
<b>m.c.</b>	- Massa corporal
<b>mg</b>	- Miligrama
<b>mL</b>	- Mililitro
<b>mm</b>	- Milímetro
<b>mmol</b>	- Milimolar
<b>mOsm</b>	- Miliosmol
<b>3-MST</b>	- 3-mercapitopiruvato sulfurtransferase
<b>N</b>	- Número amostral
<b>Na<sup>+</sup></b>	- Sódio
<b>NaCl</b>	- Cloreto de sódio
<b>NaHS</b>	- Hidrossulfeto de sódio (composto químico doador de H <sub>2</sub> S)
<b>nm</b>	- Nanômetro
<b>NO</b>	- Óxido nítrico
<b>NOS</b>	- Óxido nítrico sintase: neuronal (NOS1), endotelial (NOS3) e induzida (NOS2)
<b>NPV</b>	- Núcleo paraventricular
<b>NSO</b>	- Núcleo supra-óptico
<b>OMS</b>	- Organização Mundial da Saúde ou <i>World Health Organization</i> (WHO)
<b>OVLT</b>	- Órgão vasculoso da lâmina terminal
<b>OT</b>	- Ocitocina
<b>PAG</b>	- DL-Propargilglicina (fármaco inibidor da enzima CSE)
<b>pg</b>	- Picograma
<b>rpm</b>	- Rotações por minuto
<b>S2</b>	- Sódio duas vezes (grupo experimental dieta com 0,54% de sódio)
<b>S3</b>	- Sódio três vezes (grupo experimental dieta com 0,81% de sódio)
<b>SFO</b>	- Órgão subfornicial
<b>SNC</b>	- Sistema Nervoso Central
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	- Fator de necrose tumoral-alfa
<b><math>\mu</math>g</b>	- Micrograma
<b><math>\mu</math>L</b>	- Microlitro
<b><math>\mu</math>M</b>	- Micromolar
<b>Vs</b>	- <i>Versus</i> (indicativo de comparação/opositores)

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	REVISÃO DA LITERATURA .....	16
2.1	O controle do volume e da osmolalidade dos líquidos corporais .....	16
2.2	A participação dos moduladores gasosos na homeostase hidroeletrolítica .....	18
2.2.1	<i>Sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S)</i> .....	20
3	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE .....	24
4	OBJETIVOS .....	25
4.1	Objetivo geral.....	25
4.2	Objetivos específicos.....	25
5	METODOLOGIA.....	26
5.1	Animais.....	26
5.2	Seleção e separação de natriófilos .....	27
5.3	Preparo da dieta modificada .....	28
5.4	Tratamento farmacológico .....	28
5.5	Métodos de avaliação.....	31
5.5.1	<i>Método do ponto de congelamento</i> .....	31
5.5.2	<i>Método de quimiluminescência</i> .....	32
5.6.3	<i>Método de radioimunoensaio</i> .....	32
5.6.4	<i>Imunoistoquímica</i> .....	32
5.6.5	<i>Análise morfométrica</i> .....	34
5.6	Análise Estatística.....	35
6	PROCOLOS EXPERIMENTAIS .....	36
6.1	Parâmetros comportamentais e renais .....	36
6.2	Parâmetros endócrinos e plasmáticos.....	36
7	RESULTADOS .....	37
7.1	Efeitos sobre a homeostase energética .....	37
7.2	Efeitos sobre a homeostase hidroeletrolítica .....	39
7.3	Efeitos sobre o tecido renal .....	41
7.4	Efeitos sobre os eixos neuroendócrinos .....	47
7.5	Efeitos sobre o sistema cardiovascular .....	50
8	DISCUSSÃO .....	53

<b>9</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>62</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em média, cerca de 60 a 70% do peso corporal de indivíduos é composto por água, sendo este índice dependente de diversos fatores, entre eles a idade, o gênero e a quantidade de tecido adiposo. Funcionalmente, o organismo tem dois grandes compartimentos líquidos, que são o intracelular (LIC) e o extracelular (LEC), sendo este último subdividido nos meios intersticial e intravascular. O LIC e o LEC são separados por uma membrana semipermeável (a membrana celular) e o meio intravascular é separado do interstício por uma parede capilar.

Cerca de 40% de toda a água do organismo está localizada no LIC, sendo, portanto, neste ambiente aquoso o local de ocorrência da grande maioria das reações químicas necessárias à vida. A água é um solvente polar e, portanto, dissolve facilmente partículas carregadas eletricamente. Assim, ambos os líquidos extra- e intracelular apresentam grande quantidade de íons dissolvidos, sendo o sódio ( $\text{Na}^+$ ) e o cloreto os íons mais abundantes no LEC, e o potássio o cátion mais concentrado no LIC. A distribuição desigual de partículas osmoticamente ativas e cargas determina a geração de gradientes químicos ou elétricos, respectivamente, ou ainda uma combinação das forças, as quais impulsionam o movimento de soluto ou de solvente através da membrana. O movimento de água é passivo e segue o gradiente químico gerado por solutos não permeantes. Desta forma, o movimento de íons, apesar de contínuo, é controlado de maneira precisa por diversos sistemas, uma vez que a concentração iônica, assim como a de outras moléculas biológicas, produz efeitos diretos no volume celular e interfere com diversos processos funcionais.

O cátion  $\text{Na}^+$  é o principal soluto osmoticamente ativo do LEC e constitui um nutriente essencial para a manutenção do volume plasmático, equilíbrio ácido-base, transmissão de impulsos nervosos e a função celular. Normalmente, o principal mecanismo de eliminação de  $\text{Na}^+$  se dá pela excreção urinária, ocorrendo mínimas perdas por meio das fezes e suor.

Embora não esteja bem definido o nível mínimo de ingestão necessária, estima-se que o ideal esteja na faixa de 200-500 mg/dia (HOLBROOK et al., 1984). Entretanto, no Brasil, foi observado por Sarno et al. (2009, 2013) que a quantidade de  $\text{Na}^+$  disponível para consumo nos domicílios manteve-se em média de 4,7 g/pessoa/dia, excedendo a recomendação máxima pela Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO - *World Health Organization*, 2012) que, atualmente, é de ingerir menos de 2 g/dia de  $\text{Na}^+$ , ou menos de 5 g/dia de sal, lembrando que o sal é um mineral formado por cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ).

Em relação à procedência, 74,4% do total do  $\text{Na}^+$  consumido pelos brasileiros provém do sal de cozinha e condimentos à base de sal, seguidos por alimentos processados com adição de sal (18,9 %), alimentos *in natura* ou processados sem adição de sal (4,8 %) e pratos prontos (1,6 %). As Pesquisas de Orçamentos Familiares realizada nos anos de 2008-2009 sugere uma ingestão de  $\text{Na}^+$  subestimada, particularmente na população urbana, na qual a alimentação fora do domicílio atingiu a média de 17,5% do consumo energético (SARNO et al., 2013).

O consumo excessivo de  $\text{Na}^+$  tem sido relacionado diretamente com desenvolvimento de hipertensão arterial e um importante fator de risco para doença cardiovascular, acidente vascular encefálico, doença cardíaca coronariana, e potenciais efeitos adversos como dislipidemias, alterações nos níveis plasmáticos de catecolaminas e de função renal (WHO, 2012). Foi demonstrado que o consumo excessivo de sal altera mecanismos celulares e moleculares, levando à falência cardíaca progressiva (BALDO; RODRIGUES; MILL, 2015). Outros agravos associados incluem câncer gástrico, desenvolvimento de osteoporose, depressão e ansiedade (FRASSETTO et al., 2008; SANDSTRÖM et al., 2016; TSUGANE; SASAZUKI, 2007).

Considerada um problema de saúde pública no Brasil e no mundo, a hipertensão arterial, também conhecida como “pressão alta”, é uma doença crônica controlável e multifatorial (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2014). Em 2001, quase oito milhões de mortes devido ao quadro de hipertensão (LOPEZ et al., 2006). Diversos estudos têm relatado a associação entre a ingestão de  $\text{Na}^+$  e os níveis de pressão arterial (APPEL et al., 2001; CAPPuccio et al., 2006; ERDEM et al., 2010; MOLINA et al., 2003; RODRIGUES et al., 2015). Nesse sentido, o estudo de Perin et al. (2013) com hipertensos associou o consumo elevado de sal às variáveis individuais de sexo masculino, cor branca, baixo nível de escolaridade e de renda mensal, inatividade profissional e às variáveis clínicas: elevado índice de massa corpórea (IMC), pressão arterial sistólica elevada (controle insatisfatório), número de medicações anti-hipertensivas utilizadas e indicadores de hipertrofia ventricular. Além disso, Rodrigues et al. (2015) mostraram em seu estudo que indivíduos obesos tendem a apresentar uma maior ingestão de sal, sugerindo uma relação linear entre o consumo de  $\text{Na}^+$ , ingestão calórica e IMC.

Vários sistemas centrais e periféricos participam do controle do apetite por sódio, entre eles os moduladores gasosos, conforme viremos a expor. Considerando-se que o consumo elevado de  $\text{Na}^+$  pode induzir um status inflamatório em diversos órgãos, incluindo rins e vasos, acredita-se que esta seria uma importante interface pela qual os moduladores



gasosos, particularmente o sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ), poderiam interferir na patogênese de diversos distúrbios associados a esse comportamento apetitivo, como o desenvolvimento de hipertensão arterial. Desta forma, estas evidências, associadas à inexistência de trabalhos na literatura a respeito da participação do sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ ) sobre respostas homeostáticas, nos motivaram a testar experimentalmente essa hipótese.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

O controle fino do volume e da osmolalidade dos meios intra- e extracelular, definido como homeostase hidroeletrolítica, torna-se condição fundamental para a manutenção da vida. Quando alguma alteração central ou periférica é detectada pelos sistemas de monitoramento (osmorreceptores, barorreceptores e sódio-receptores), mecanismos neuroendócrinos, comportamentais e renais seletivos são recrutados para controlar a ingestão e excreção de água e eletrólitos, visando à adequada manutenção das funções orgânicas (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004).

### 2.1 O controle do volume e da osmolalidade dos líquidos corporais

Os osmorreceptores estão localizados periféricamente no trato gastrointestinal e em estruturas encefálicas desprovidas de barreira hematoencefálica, constituídas pela região da lâmina terminal [à qual estão associados o órgão subfornicial (SFO), o órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) e o núcleo pré-óptico mediano], assim como pela área postrema, eminência mediana, região pineal e órgão subcomissural. Recentemente, foi demonstrado que neurônios osmossensíveis do OVLT transduzem a hipertonicidade via canais catiônicos não seletivos do tipo TRPV1 (*type 1 transient receptor potencial vanilloid*) e que a despolarização destas células ocorre independentemente se a redução do volume celular foi causada por pressão osmótica ou aspiração mecânica (CIURA; LIEDTKE; BOURQUE, 2011). Evidências apontam ainda para a existência de um mecanismo sódio-sensível de controle central da osmolalidade, caracterizado pela presença de receptores específicos para este íon no SFO (HIYAMA et al., 2002; 2004). Uma segunda classe de neurônios sensíveis ao Na<sup>+</sup> estaria localizada no núcleo supra-óptico (NSO) do hipotálamo; frente ao estímulo de aumento do conteúdo extracelular de Na<sup>+</sup>, estes neurônios seriam capazes de controlar a permeabilidade da membrana plasmática a este íon, assim como modificar a expressão do gene que codifica o canal de Na<sup>+</sup> presente nestas células (VOISIN; BOURQUE, 2002).

Diferentemente dos osmorreceptores e receptores de Na<sup>+</sup>, os barorreceptores respondem ao estiramento de áreas específicas do sistema circulatório, decorrente de um aumento no volume circulante. Eles estão localizados no seio carotídeo, na parede do arco

aórtico, nas arteríolas renais e na região cardiopulmonar. A estimulação destas terminações ativa o núcleo do trato solitário, localizado na área bulbar do tronco cerebral, estímulo que, posteriormente, atinge o hipotálamo bem como a região ântero-ventral do terceiro ventrículo (AV3V), de forma a modular o comportamento apetitivo.

A hipovolemia e hiperosmolalidade do LEC constituem dois potentes desafios à homeostase hidroeletrólítica, determinando a ativação de respostas neuroendócrinas e renais. Centralmente, estas alterações induzem a despolarização de células especializadas situadas no NSO e núcleo paraventricular (NPV) (OLIET; BOURQUE, 1993). A ocitocina (OT) e a arginina vasopresina (AVP) são peptídeos produzidos pelos neurônios magnocelulares hipotalâmicos e armazenados em seus terminais localizados na neuro-hipófise. Uma vez liberados, estes peptídeos atingem a circulação periférica, exercendo uma série de efeitos sistêmicos.

A AVP também conhecida por hormônio antidiurético (ADH) devido sua principal função na homeostase hidrossalina: a antidiurese, porém este peptídeo também participa de mecanismos termorregulatórios e ajustes cardiovasculares estimulando receptores V1 nos vasos sanguíneos, além de modular a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), via receptores V3 na adeno-hipófise. Por meio de sua ação nos receptores V2 localizados nos rins, a AVP estimula a inserção da proteína aquaporina 2 na membrana luminal das células tubulares do néfron distal, promovendo a reabsorção de água. Foi demonstrado que a inibição do *feedback* negativo, mediado por barorreceptores aórticos, na secreção de AVP é prejudicada pela cronicidade da ingestão elevada de sal, favorecendo o desenvolvimento do quadro hipertensivo por alterações neste circuito homeostático central, pelo aumento da expressão de um fator neurotrófico que impede a sinalização inibitória (CHOE et al., 2015).

A OT, por sua vez, além de participar de mecanismos relacionados ao parto e à lactopiose, inibe o transporte renal de  $\text{Na}^+$  via monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), estimulando a natriurese (BROOKS; PICKFORD, 1958; SOARES et al., 1999). Periféricamente, a OT estimula a secreção do peptídeo natriurético atrial (ANP) pelos cardiomiócitos. O ANP, por sua vez, também inibe o transporte renal de  $\text{Na}^+$ , potencializando a resposta natriurética da OT (ANTUNES-RODRIGUES et al., 1991).

Além da secreção de AVP e dos peptídeos natriuréticos, outros sistemas também são modulados por alterações do volume e osmolalidade do LEC e desempenham função primordial nas respostas homeostáticas. Dentre eles, podemos destacar o sistema renina-angiotensina-aldosterona que, além de participar periféricamente do controle do tônus vascular e da reabsorção de  $\text{Na}^+$ , também está envolvido em respostas comportamentais de

sede e apetite ao  $\text{Na}^+$  desencadeadas centralmente. A angiotensina II (ANG II) estimula a liberação de aldosterona em resposta à hipovolemia, além de apresentar um potente efeito dipsogênico central e modular a resposta hormonal (PHILLIPS; HEININGER; TOFFOLO, 1996; para revisão, ver ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004). Foi demonstrado por Ferguson e Renaud (1986) e também por Lenkei et al (1997) que o SFO possui receptores para ANG II, e que a injeção central desta substância induz aumento da ingestão de água, assim como estimulação da secreção de AVP, OT e ANP, com concomitante aumento na resposta antidiurética e natriurética (CUNNINGHAM; SAWCHENKO, 1991; REIS et al., 2007). Além disso, foi demonstrado que a ingestão de elevados teores de sal favorece os efeitos da aldosterona sobre o coração, induzindo hipertrofia ventricular esquerda na ausência do tratamento anti-hipertensivo (du CAILAR et al., 2010).

## **2.2 A participação dos moduladores gasosos na homeostase hidroeletrolítica**

Mais recentemente, moléculas gasosas de produção endógena foram incorporadas à crescente lista de substâncias capazes de modular as respostas comportamentais, renais e neuroendócrinas desencadeadas por alterações no volume e na osmolalidade do LEC.

Na década de 1990, a descoberta das ações fisiológicas e patológicas do óxido nítrico (NO) em tecidos biológicos deu início a essa nova e promissora linha de pesquisa que investiga a participação dos moduladores gasosos como sinalizadores parácrinos ou autócrinos. O NO é uma molécula simples, produzida pelo Sistema Nervoso Central (SNC) e por tecidos periféricos, sendo altamente difusível, apresentando meia-vida extremamente curta e raio de ação limitado (ZHANG; SNYDER, 1995). O NO é produzido em quantidades equimolares a L-citrulina por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) sobre a L-arginina (PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987). A isoforma neuronal da enzima (nNOS ou NOS1) está presente nos neurônios magnocelulares do NPV e NSO, tendo sua expressão aumentada pela desidratação (BREDET; HWANG; SNYDER, 1990; VILLAR et al., 1994). Já foi demonstrado que a injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de um inibidor não seletivo da NOS [L-NG-nitroarginina-metil-ester (L-NAME)], determina um aumento nas concentrações plasmáticas de AVP e OT (KADEKARO; SUMMY-LONG, 2000), bem como na ingestão de água e  $\text{Na}^+$  (SAAD et al., 2004). Estes eventos neuroendócrinos produzidos pela administração de L-NAME estão associados a um aumento na frequência de disparos e

uma diminuição da eletronegatividade do potencial de repouso dos neurônios magnocelulares (VENTURA et al., 2008). Além disso, Soares et al. (1999) demonstraram que a administração de OT induz aumento significativo na excreção de nitrato, um metabólito do NO, e que a administração prévia de L-NAME é capaz de inibir esta resposta, bem como a natriurese induzida pelo OT. Esses dados, aliados à demonstração da imunorreatividade para as enzimas NOS1 e NOS endotelial (eNOS ou NOS3) em túbulos e arteríolas renais, também apontam o NO como um importante fator no controle do manejo renal de  $\text{Na}^+$ , agindo tanto diretamente no transporte de íons quanto no controle do fluxo sanguíneo nos capilares renais. Entretanto, a isoforma induzida (iNOS ou NOS2), não detectável em condições basais, tem sua expressão aumentada em resposta à inflamação localizada ou difusa provocada por infecção ou dano tecidual. A produção do NO pela via induzida está envolvida em mecanismos imunomoduladores e antitumorais, e foi descrita como tendo efeitos antiviral, antiparasitário e microbicida, tanto que sua indução anormal está envolvida na fisiopatologia de diversas doenças humanas (KLEINERT et al., 2004; PAUTZ et al., 2010).

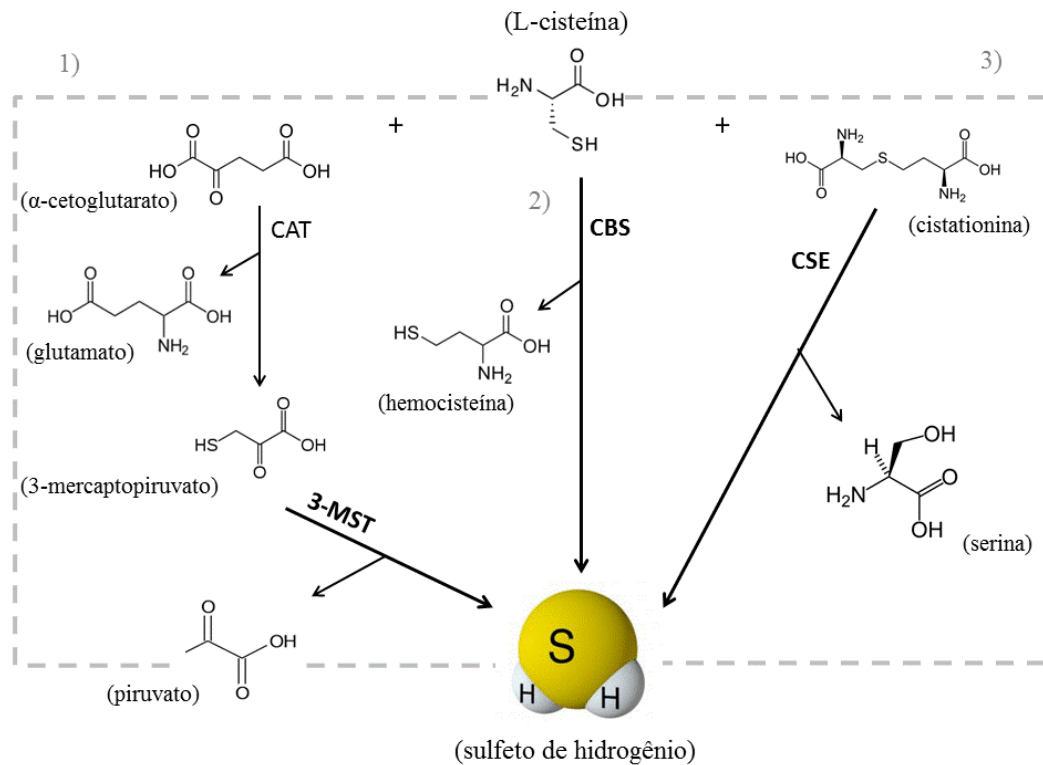
Outro gás que apresenta importante função fisiológica descrita no sistema neuroendócrino é o monóxido de carbono (CO), sintetizado endogenamente por ação da enzima heme-oxigenase (HO) sobre o grupamento heme, reação que tem como produtos CO, biliverdina e ferro (MAINES, 1997). Já foi demonstrado que o CO produzido endogenamente estimula a liberação de AVP (MANCUSO et al., 1997), bem como de OT (KOSTOGLOU-ATHANASSIOU et al., 1996). Além disso, a inibição *in vitro* da enzima HO inibe a liberação de OT induzida pela hiperosmolalidade do meio de incubação (GOMES et al., 2010). Estudos sugerem que os rins apresentem tanto a isoforma induzida (HO-1) quanto a isoforma constitutiva (HO-2) das enzimas formadoras de CO, sendo as mesmas predominantemente expressas na porção medular (HU et al., 1998; ZOU et al., 2000). Nos rins, o CO parece influenciar tanto eventos hemodinâmicos, como o controle do fluxo sanguíneo local (ZOU et al., 2000), quanto ações relacionadas ao transporte de íons e água (JACKSON et al., 2011). Além dos efeitos produzidos individualmente, o CO e o NO parecem interagir no controle da homeostase hidroeletrolítica. Nesse sentido, foi demonstrado por Gomes et al. (2010) que o uso de um inibidor da enzima HO aumenta a produção de L-citrulina (um coproduto da síntese de NO) pelo hipotálamo médio basal *in vitro* em resposta à hiperosmolalidade do meio.

### 2.2.1 Sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ )

Até o momento, poucos estudos na literatura têm se dedicado a elucidar a participação do  $H_2S$  em respostas neuroendócrinas e renais relacionadas à homeostase hidroeletrólítica. Porém, devido à recente descoberta de Mancuso, Navarra e Preziosi, (2010) que o  $H_2S$  pode interagir com o NO e o CO, gasomoduladores estes que já foram mais estudados e apresentam efeitos pronunciados sobre os sistemas do balanço de água e  $Na^+$ , existe um grande interesse e perspectiva neste sentido em relação ao  $H_2S$ . Atualmente, é conhecido o envolvimento das três moléculas (NO, CO e  $H_2S$ ) em processos fisiológicos essencialmente semelhantes, como vasodilatação, angiogênese, remodelação vascular, proliferação, processos de sinalização endotelial pró- e anti-inflamatória e apoptose (LI; HSU; MOORE, 2009; LUNA-VÁZQUEZ et al., 2016; OOSTERHUIS et al., 2015). Contudo, os mecanismos de interação entre os gasomoduladores ainda não estão claros (GADALLA; SNYDER, 2010).

O  $H_2S$  é uma molécula de vida curta com meia-vida de alguns minutos, alta permeabilidade em membranas lipídicas e facilmente se difunde através das membranas celulares (ZAICHKO et al., 2014). Sintetizado ativamente pelos tecidos a partir da L-cisteína por ação de duas enzimas principais, a cistationina- $\gamma$ -liase (CSE) e a cistationina- $\beta$ -sintase (CBS). Tanto a expressão quanto a atividade enzimática destas isoformas podem ser moduladas por outras moléculas sinalizadoras, como o cálcio, bem como por fatores circulantes, como a insulina, o glucagon e os glicocorticoides (MANCUSO; NAVARRA; PREZIOSI, 2010). Recentemente, Shibuya et al. (2009a) demonstraram no SNC de camundongos *knockout* para CBS a existência de outra enzima geradora de  $H_2S$ , a 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase (3-MST) que age em conjunto à cisteína aminotransferase (CAT) para produzir o  $H_2S$ .

As principais fontes de  $H_2S$  endógeno se metabolizam em reações de transaminação e dessulfurização com a participação de enzimas dependentes de piridoxal-5'-fosfato. As enzimas CAT e 3-MST são citoplasmáticas e mitocondriais, enquanto as enzimas CSE e CBS parecem ser exclusivamente citoplasmáticas (LI; ROSE; MOORE, 2011). As três principais vias da biossíntese de  $H_2S$  estão sumarizadas na Figura 1, apresentada a seguir.

Figura 1 – Metabolismo da L-cisteína para biossíntese do sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S)

Legenda: 1) Transaminação pela CAT: cisteína aminotransferase seguida de hidrodessulfurização por 3-MST: 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase; 2) Hidrodessulfurização pela CBS: cistationina-β-sintase; 3) Hidrodessulfurização por CSE: cistationina-γ-liase.

Fonte: Adaptada pela autora de Łowicka e Beltowski (2007); Hu et al. (2011); Liu, Yan e Bian (2011).

A produção endógena de H<sub>2</sub>S já foi demonstrada no SNC de roedores por Warena et al. (1989), e também de humanos por Goodwin et al. (1989), em concentrações relativamente altas variando de 50-160 μM, sugerindo que este gás possa de fato desempenhar a função de neuromodulador (ABE; KIMURA, 1996). De fato, já foi descrito que o H<sub>2</sub>S suprime a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), efeito similar ao observado em resposta a um ativador da enzima CBS (DELLO RUSSO et al., 2000). Recentemente, Khademullah e Ferguson (2013) demonstraram por meio de ensaio eletrofisiológico de células hipotalâmicas (magnocelulares, parvocelulares neuroendócrinas e parvocelulares pré-autonômicas), que a adição de um doador de H<sub>2</sub>S, o hidrossulfeto de sódio (NaHS), ao banho produz um efeito dose-dependente de despolarização em cerca de 80% destas células, efeito este mediado pelo fechamento de canais de potássio.

Os primeiros relatos na literatura a respeito das ações do H<sub>2</sub>S descrevem principalmente sua toxicidade, porém já é sabido que, em concentrações baixas, o H<sub>2</sub>S na verdade protege o organismo contra o estresse oxidativo (KIMURA; KIMURA, 2004). Nesse sentido, um estudo demonstrou que o uso experimental de um inibidor da enzima CSE, a DL-Propargilglicina (PAG), gerou um efeito protetor sobre a nefrotoxicidade induzida por

adriamicina, uma droga quimioterápica (FRANCESCATO et al., 2011b). Em concentrações elevadas, contudo, foi demonstrado que o H<sub>2</sub>S estimula a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (YAN et al., 2006). Gao et al. (2015) sugerem que o H<sub>2</sub>S gera proteção contra a neurotoxicidade da corticosterona por modular positivamente o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), além de inibir o estresse no retículo endoplasmático (XIAO et al., 2016). No entanto, a eficiência dos mecanismos de metabolização (por oxidação na mitocôndria ou por metilação no citoplasma) e eliminação do H<sub>2</sub>S (o que ocorre principalmente por excreção renal) raramente permite que as concentrações deste gás se elevem muito acima do normal, ou se o fazem é por um curto período de tempo, mesmo na presença de um doador (WANG, 2002; WALLACE, 2007).

Existe um padrão diferencial na expressão das rotas enzimáticas formadoras de H<sub>2</sub>S. As enzimas CBS e CSE são expressas em diversos tecidos, incluindo o fígado, os rins e o SNC, porém admite-se que a CSE tenha distribuição predominantemente periférica, enquanto a enzima CBS é a principal produtora de H<sub>2</sub>S no encéfalo, com expressão demonstrada no hipocampo, cerebelo, córtex cerebral e tronco encefálico (ABE; KIMURA, 1996). As enzimas 3-MST e CAT, por sua vez, foram localizadas em neurônios e no endotélio vascular (SHIBUYA et al., 2009a; 2009b). Os estudos de Bos et al. (2013) confirmaram que a enzima CSE é a principal produtora de H<sub>2</sub>S no rim, com expressão abundante nos glomérulos e na região túbulo-intersticial em humanos. Esses autores também observaram que a CBS não é diferencialmente expressa durante o processo de transplante e nem está associada ao efeito protetor do H<sub>2</sub>S no pós-transplante (lesão isquemia-reperusão).

Outra evidencia é a de que o H<sub>2</sub>S está envolvido na inflamação e na mediação da hipernocicepção inflamatória (CUNHA et al., 2008; SZABÓ, 2007). O estudo de Dal-Secco et al. (2008) sugere que durante a resposta inflamatória, o H<sub>2</sub>S pode provocar maior rolamento e aderência de neutrófilos, bem como sua locomoção por um mecanismo dependente de canais de potássio sensíveis a trifosfato de adenosina (K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>), caracterizando um efeito pró-inflamatório deste gás. Neste sentido, Francescato et al. (2011a) demonstraram que o H<sub>2</sub>S favorece a lesão renal induzida por cisplatina, uma droga antineoplásica, pois a administração de PAG (um inibidor da enzima CSE) promoveu redução no dano renal (efeito protetor). Adicionalmente, Bhatia et al. (2005) demonstraram que o pré-tratamento com PAG reduziu o edema na pata traseira causado por carragenina.

Por outro lado, Wang et al. (2013) demonstraram um papel anti-inflamatório do H<sub>2</sub>S na aterosclerose, visto que a lipoproteína de baixa densidade (LDL) suprimiu a expressão de CSE e produção de H<sub>2</sub>S em macrófagos, e o uso de doadores gerou uma consistente redução



na adesão de macrófagos e da produção de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), bem como aboliu a sinalização de citocinas pró-inflamatórias. Ademais, o pré-tratamento com o doador de H<sub>2</sub>S suprimiu a adesão de leucócitos induzidos por aspirina e reduziu a formação de edema na pata induzido por carragenina, sendo que a inibição da enzima CSE melhorou a adesão/infiltração e aumentou o edema (ZANARDO et al., 2006). No mesmo sentido em um modelo de lesão renal obstrutiva, no qual se observou redução do nível plasmático de H<sub>2</sub>S e da expressão de CSE no tecido renal; neste mesmo estudo, após a administração de NaHS, a fibrose renal foi inibida, resultando em um efeito benéfico do H<sub>2</sub>S (SONG et al., 2014). Esse efeito poderia ser explicado pelo aumento da indução de angiogênese pelo H<sub>2</sub>S, observado por outros autores (PAPAPETROPOULOS et al., 2009).

Em suma, admite-se que o H<sub>2</sub>S seja, de fato, um importante mediador na inflamação. Contudo, a produção reduzida de H<sub>2</sub>S está relacionada tanto a respostas pró- quanto anti-inflamatórias. Essa ambiguidade de efeitos refere-se possivelmente aos diferentes níveis de H<sub>2</sub>S encontrados nos tecidos, uma vez que não é raro dentro dos sistemas biológicos que determinados mediadores exerçam funções completamente antagônicas e efeitos dose-dependentes, como é o caso também dos outros gases, NO e CO, bem como dos glicocorticoides, importantes moduladores da função imune.

Nesse sentido, considerando que a concentração de H<sub>2</sub>S nos tecidos é maior que seus níveis circulantes, a vasomodulação induzida por H<sub>2</sub>S também ocorre de maneira dose-dependente: em concentrações fisiologicamente baixas (aproximadamente 50  $\mu$ M no plasma), o H<sub>2</sub>S tem função vasodilatadora, induzida pela possível abertura de canais de K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> nas células musculares lisas. Contudo, este gás pode causar vasoconstrição em concentrações ainda menores, por diminuição de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e inibição da produção e biodisponibilidade do NO, reforçando mais uma vez a interação entre os gasomoduladores (KASINATH, 2014; LIU; YAN; BIAN, 2011; LUNA-VÁZQUEZ et al., 2016; ZHAO et al., 2001). Confirmando a vasorregulação dose-dependente, o estudo de Yang et al. (2008) reportou normalização da pressão arterial após a administração de NaHS, sendo o quadro hipertensivo induzido pela prévia administração de PAG. O efeito vasodilatador foi abolido tanto com o uso do inibidor do canal K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> quanto com a inibição da enzima CSE por PAG (YASUDA et al., 2016). Interessantemente, o estudo de Kubo et al. (2007) mostrou que a incubação com NaHS produziu relaxamento nas aortas em que foi retirada a camada endotelial, bem como nas aortas que continham o endotélio intacto mas na presença de inibidores de NOS, sugerindo novamente interação entre as vias de sinalização intracelular dos gasomoduladores.

### 3 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A hipertensão arterial é uma doença multifatorial, muitas vezes de causa desconhecida. Porém, entre os fatores de risco modificáveis que contribuem para o desenvolvimento deste agravo estão, além da prática de exercícios, fatores nutricionais, entre eles o controle da ingestão de  $\text{Na}^+$ . O brasileiro consome entre duas a três vezes a quantidade de sal recomendada pela OMS, que é de 5g/dia (SARNO et al., 2009; 2013). Além de ter reflexos diretos sobre o volume do LEC, o consumo elevado de  $\text{Na}^+$  aparentemente produz alterações vasculares que contribuem para o processo inflamatório desencadeador de diversas doenças cardiovasculares. Nesse sentido, Zhou et al. (2013) demonstraram, em indivíduos saudáveis, que mesmo em curto prazo (sete dias), o aumento da ingestão de  $\text{Na}^+$  para 15g/kg de alimento pode induzir a expansão de monócitos ( $\text{CD14}^{++}$  e  $\text{CD16}^+$ ), bem como induzir o aumento de agregados de monócito-plaquetas, o que pode ser a base celular da inflamação e do aumento no potencial risco tromboembólico em órgãos-alvo. Entretanto, essas condições não foram ainda suficientes para induzir alterações nos níveis de pressão arterial.

Porém, apesar destas evidências, pouco se sabe sobre quais sistemas seriam envolvidos, tampouco sobre a cronologia dos eventos que ocorreriam nos sistemas renal e circulatório em resposta ao consumo aumentado de  $\text{Na}^+$ . Diante das evidências que mostram que o  $\text{H}_2\text{S}$  apresenta importantes ações sítio-específicas nos rins e no sistema circulatório, buscamos elucidar os possíveis efeitos fisiológicos da inibição farmacológica da síntese endógena do  $\text{H}_2\text{S}$  pela CSE, relacionados aos sistemas que regulam o balanço de água e  $\text{Na}^+$ , frente ao consumo alimentar aumentado de  $\text{Na}^+$  durante um curto período de tempo, mimetizando variações sazonais no consumo deste cátion. Nossa hipótese é que o  $\text{H}_2\text{S}$  previna e/ou atrase o desenvolvimento das alterações agudas renais e cardiovasculares induzidas pelo consumo elevado de  $\text{Na}^+$  na dieta, de forma que a inibição experimental da enzima CSE precursora de sua produção endógena, especialmente, nos tecidos periféricos, favoreceria os efeitos da dieta hipersódica em induzir tais alterações.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

O presente trabalho investigou o efeito da inibição farmacológica da síntese endógena do H<sub>2</sub>S pela enzima CSE nas respostas homeostáticas comportamentais, renais e neuroendócrinas desencadeadas pela ingestão aguda de alto teor de Na<sup>+</sup> na dieta.

### 4.2 Objetivos específicos

Foram avaliados, em animais submetidos à dieta hipersódica durante sete dias, os efeitos do tratamento periférico diário com um inibidor da enzima CSE (PAG, 25 mg/kg/dia, i.p.), sobre:

- a) a ingestão alimentar e a variação da massa corporal;
- b) a ingestão hídrica, bem como o volume urinário, osmolalidade urinária e concentração urinária de nitrato;
- c) a glicemia casual, a osmolalidade plasmática, e as concentrações plasmáticas de nitrato e dos hormônios AVP, OT e corticosterona;
- d) a massa dos seguintes tecidos: hipófise, adrenal, rim, coração, tecido adiposo branco epididimal e tecido adiposo marrom;
- e) a imunorreatividade para ED1 (antígeno presente em macrófagos ativados/monócitos);
- f) a imunorreatividade para NOS2 (enzima óxido nítrico sintase induzida);
- g) a morfometria cardiovascular.

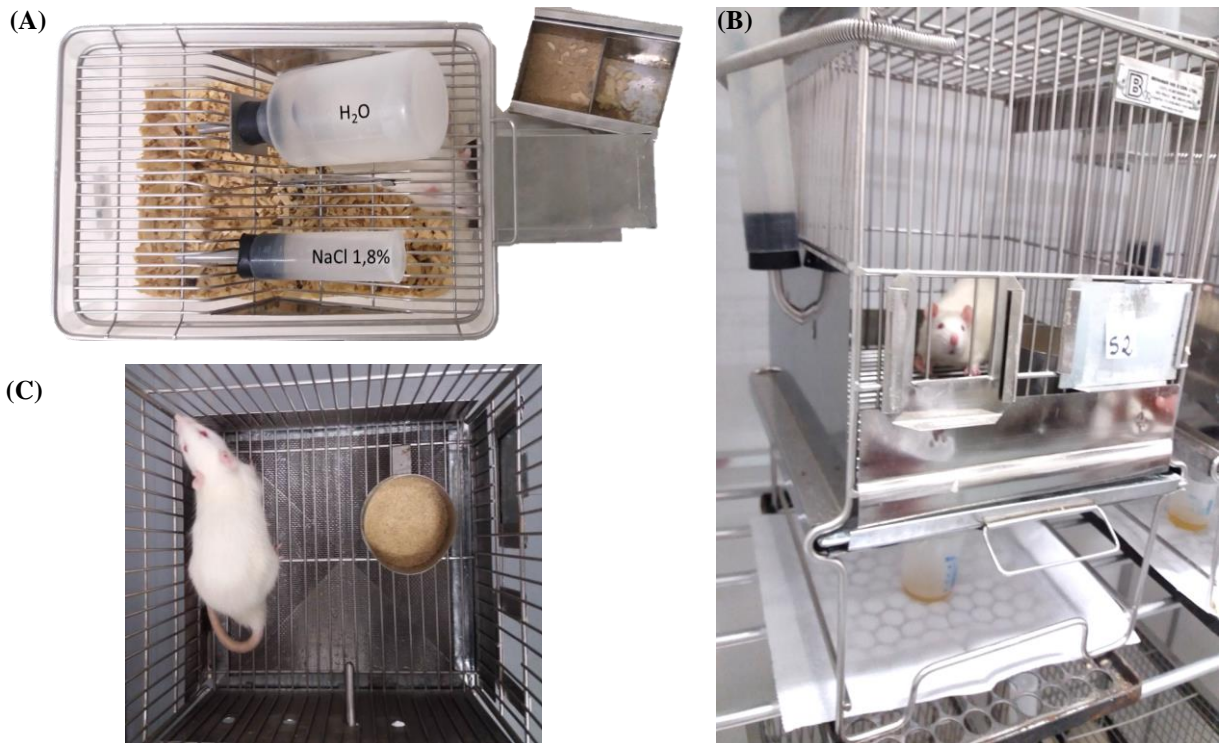
## 5 METODOLOGIA

Em busca de alcançar os objetivos propostos utilizamos dos materiais e métodos descritos nesta seção.

### 5.1 Animais

Para a realização deste estudo, foram utilizados 99 ratos *Wistar* machos adultos, obtidos do Biotério da Universidade Federal de Alfenas (MG, Brasil), com peso inicial de 180-200g. Do total de 99 animais, 27 ratos foram excluídos do estudo. Destes, 9 animais foram considerados natriófilos, 6 fizeram parte de um primeiro projeto piloto e 12 do experimento dose-resposta para o tratamento farmacológico (doses não utilizadas de 50 e 10 mg/kg, conforme descrito a seguir). Os animais foram mantidos em ambiente com luz (ciclo claro/escuro de 12 h), temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e umidade ( $55 \pm 10\%$ ) controladas. Para adaptação à dieta triturada e avaliação da preferência ao sal, os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno individuais e para as avaliações comportamentais e renais, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas de aço inox também individuais, ambas com livre acesso a água filtrada e ração triturada (FIGURA 2). Os procedimentos foram realizados no período compreendido entre 8h00 e 12h00 e conduzidos em acordo ao “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” (NIH Publicação N° 85-23, revisado 1996) e aos princípios éticos da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL; acessado de <<http://www.cobea.org.br>> em 26/11/2013). Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da UNIFAL, sob o Protocolo CEUA n° 613/2015 (ANEXO A).

Figura 2 – Imagens fotográficas dos ambientes de alocação dos animais



Legenda: (A): Gaiola de polipropileno individual mostrando o livre acesso a água (H<sub>2</sub>O), solução salina (NaCl 1,8%) e ração controle triturada; (B): Gaiola metabólica individual mostrando o bebedouro graduado contendo a água e o coletor de urina; (C): Vista superior da gaiola metabólica mostrando o livre acesso à água e ração triturada.

Fonte: Da autora.

## 5.2 Seleção e separação de natriófilos

Previamente ao início do experimento, foi realizada a seleção dos natriófilos, uma vez que estes têm predileção natural ao consumo de sal, o que também acontece em indivíduos da espécie humana. Para tanto, durante dois dias foi ofertada, além da água, uma solução salina preparada com NaCl 1,8% (FIGURA 2A) e o apetite ao Na<sup>+</sup> foi avaliado. Foram excluídos dos experimentos aqueles animais cuja ingestão da solução salina foi superior a duas vezes o valor da média.

### 5.3 Preparo da dieta modificada

Para o preparo da dieta hipersódica ou com alto teor de  $\text{Na}^+$ , foi utilizada como base a ração peletizada convencional NUVILAB® triturada em máquina industrial (Grão de Ouro – Alfenas), de forma a possibilitar a adição de sal de forma homogênea. Conforme especificado pelo rótulo do fabricante a ração controle (designada dieta C) contem 0,27% de  $\text{Na}^+$ , tendo sido preparadas por adição de sal rações hipersódicas com o dobro (dieta S2, 0,54%) e o triplo do teor de  $\text{Na}^+$  (dieta S3, 0,81%). O teor aumentado de  $\text{Na}^+$  não se mostrou aversivo pelos animais, uma vez que os mesmos mantiveram o mesmo padrão de ingestão alimentar verificado no grupo C (dados do projeto piloto não apresentados).

Anteriormente ao início do experimento com as dietas modificadas, todos os animais permaneceram com a ração controle triturada por pelo menos 48 horas para habituação. O período total de consumo das dietas hipersódicas foi de sete dias.

### 5.4 Tratamento farmacológico

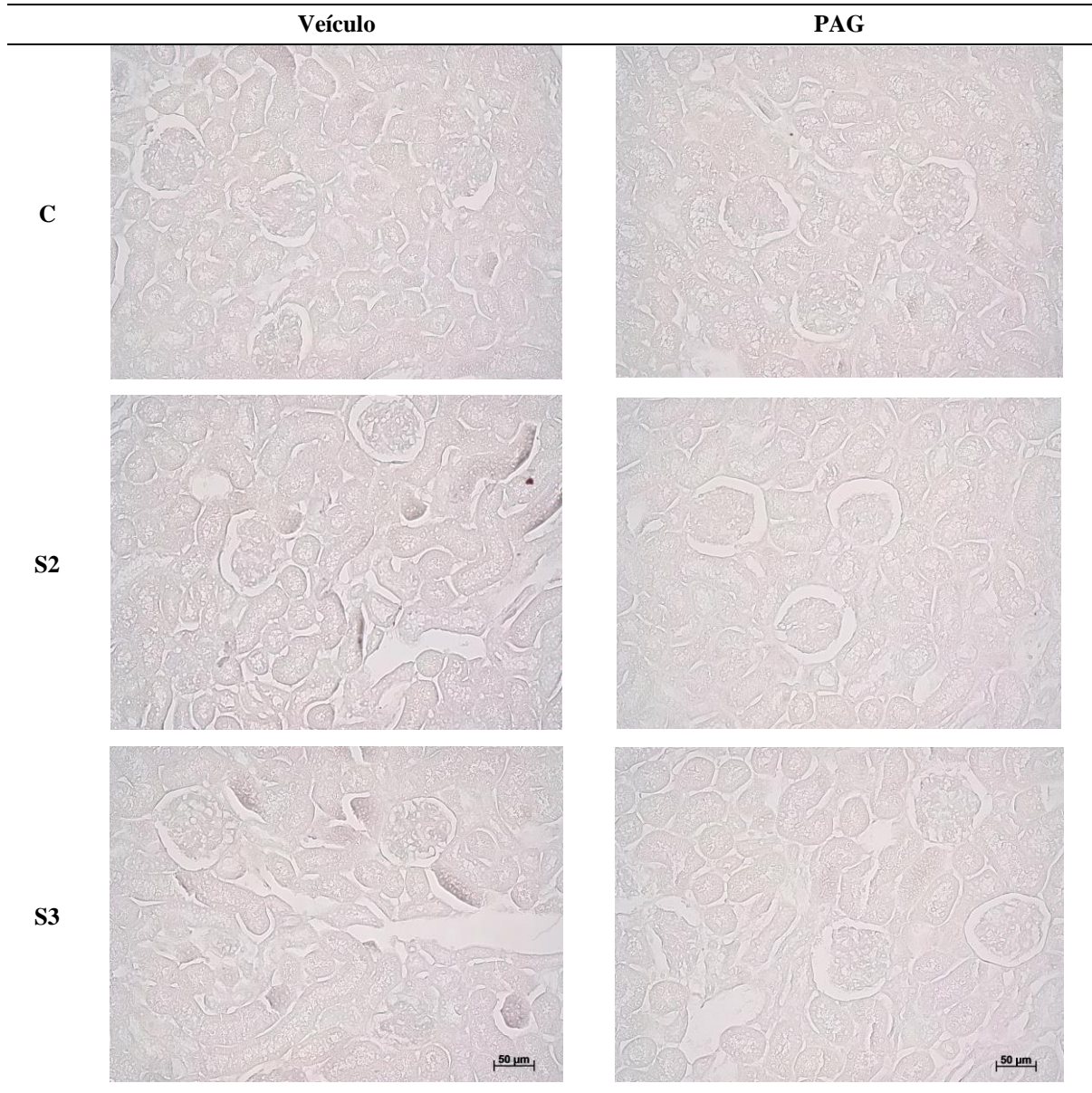
Como ferramenta farmacológica, foi utilizado um inibidor da enzima CSE [DL-Propargilglicina (PAG), P7888, Sigma-Aldrich®], 25 mg/kg/dia, diluído em veículo (soro fisiológico, NaCl 0,9%). A droga foi administrada intraperitonealmente (i.p.) na frequência de uma vez ao dia, no final da tarde (17h), uma hora antes do início do ciclo escuro (período de atividade dos roedores), durante sete dias. De acordo com estudos, a PAG, também é conhecida por PPG, tem peso molecular de 113,11 e exerce a função de inibidor enzimático seletivo para CSE (ASIMAKOPOULOU et al., 2013; ZAICHKO et al., 2014) e irreversível (WANG, 2012). Consistente com o seu papel inibitório, estudos demonstraram que com uma semana de tratamento, a PAG inibiu completamente a produção *in vitro* de  $\text{H}_2\text{S}$  por células renais (CANDELA; VELMURUGAN; WHITE, 2016; WESSELING et al., 2015). Além de a PAG ser a mais utilizada para inibição da produção de  $\text{H}_2\text{S}$  via CSE *in vivo*, é bem absorvida e rapidamente atravessa as membranas biológicas (REED, 1995; SUM et al., 2009).

A dosagem para uso *in vivo* neste estudo foi estabelecida com base em um experimento dose-resposta, que avaliou as doses de 50, 25 e 10 mg/kg/dia. Cada grupo deste experimento foi composto por dois animais, totalizando 18 ratos. Os dados comportamentais

deste experimento (não apresentados) foram determinantes para a escolha da dose, visto que o tratamento com PAG 50 mg/kg/dia demonstrou um efeito tóxico, evidente a partir do quarto dia de tratamento, com a abolição completa da ingestão alimentar, sendo que esta dose foi utilizada por Guo et al. (2012) duas vezes ao dia durante quatro dias, não reportando nenhuma intercorrência. Outros estudos utilizaram a dosagem de 50 mg/kg em administração única e aguda. No entanto os animais que receberam as dosagens menores (10 e 25 mg/kg/dia) mostraram um comportamento semelhante. Visto que a dose de 37,5 mg/kg/dia tem sido apontada como eficaz para gerar inibição máxima da produção endógena de H<sub>2</sub>S, atingindo a concentração na circulação de 5 mmol/L (ROY et al., 2012; YAN; DU; TANG, 2004). Desta forma, com base em nossos achados e relatos da literatura, optamos pela dose intermediária, de 25 mg/kg/dia.

De modo a comprovar a inibição seletiva da função enzimática pela administração de PAG na dose de 25 mg/kg/dia, realizamos a marcação por imunistoquímica da enzima CSE no tecido renal, este foi fixado em solução de Methacarn e incluído em parafina (ver subseção 5.6.4 IMUNOISTOQUÍMICA). Utilizamos o anticorpo primário monoclonal *mouse anti-rat* CTH (F-1) (cistationina- $\gamma$ -liase ou CSE, 1:1000, sc-374249, Santa Cruz Biotechnology®) *overnight*, anticorpo secundário biotinizado *donkey anti-mouse* (1:200, 715065150, Jackson Immuno Research®) e revelação com DAB (0,05%, D5637, Sigma-Aldrich®) intensificado com cloreto de cobalto 1%. Imagens microscópicas com aumento de 5 vezes de cortes histológicos representativos de cada grupo experimental são apresentadas abaixo na Figura 3, na qual observamos aumento da imunorreação para CSE (região mais escurecidas em roxo) nos grupos veículos com adição de sódio (S2 e S3) e a ausência da marcação nos grupos tratados com PAG, mostrando que a inibição pela PAG na dosagem de 25 mg/kg/dia foi efetiva na inibição da CSE.

Figura 3 – Imagens microscópicas (5x) do córtex renal com imunistoquímica para CSE



Legenda: Veículo = grupo que recebeu soro fisiológico, volume equivalente; PAG = grupo tratamento com DL-Propargilglicina, 25 mg/kg/dia, i.p.; C = grupo dieta controle com 0,27% de sódio; S2 = grupo dieta hipersódica com o dobro de sódio 0,54%; S3 = grupo dieta hipersódica com o triplo de sódio 0,81%.

Nota: A marcação de CSE se mostra em regiões mais escurecidas em roxo, encontradas especialmente, nos grupos de dieta S2 e S3 tratados com veículo.

Fonte: Da autora.



## 5.5 Métodos de avaliação

Todos os experimentos foram realizados em gaiolas metabólicas individuais. Foram avaliados os comportamentos diários de variação da massa corporal, ingestão alimentar, volume ingerido das soluções e volume urinário excretado. A partir de amostras de urina 24h, foram avaliados os seguintes parâmetros:

- a) osmolalidade urinária pelo método do ponto de congelamento;
- b) concentração de nitrato urinário pelo método de quimiluminescência, com amostras dos dias 1, 3 e 7.

Após os sete dias do início da oferta de dieta hipersódica e da inibição endógena da produção de H<sub>2</sub>S com PAG, todos os animais foram eutanasiados por decapitação para coleta do sangue e dos tecidos. A partir do sangue coletado do tronco, foi realizada a glicemia casual ou aleatória, medida realizada a qualquer hora do dia, utilizando fitas reativas e o monitor *Accu-chek Performa*, Roche®. O restante do sangue coletado em tubo heparinizado, o qual foi centrifugado a 3000 rpm, 4 °C, por 20 minutos. O plasma foi separado e utilizado para as seguintes dosagens:

- a) osmolalidade plasmática pelo método do ponto de congelamento;
- b) concentração plasmática de nitrato pelo método de quimiluminescência;
- c) concentração plasmática hormonal (AVP, OT e corticosterona) pelos métodos de radioimunoensaios específicos.

A massa de todos os tecidos foi corrigida por 100 g de massa corporal (m.c.) e analisada comparativamente entre os grupos experimentais. O rim esquerdo, o coração e um fragmento de 1 cm da aorta torácica foram separados para:

- a) imunoistoquímica para ED1;
- b) análise morfométrica.

### 5.5.1 Método do ponto de congelamento

As dosagens das osmolalidades foram realizadas a partir de aproximadamente 25 µL de urina ou plasma com o uso do *The Advanced® Micro-Osmometer Model 3320*.

### **5.5.2 Método de quimiluminescência**

Alíquotas de 50 µL de urina ou plasma foram desproteinizadas com 100 µL de etanol e mantidas a -20 °C por 30 minutos. A seguir, foram centrifugadas (10000 rpm, 5 minutos, 4°C) para separação de 100 µL do sobrenadante e o conteúdo de nitrato foi determinado em um analisador quimiluminescente (*Sievers 280 NO Analyzer*). Como o NO é um gás de meia-vida extremamente curta, a dosagem de um de seus metabólitos, neste caso o nitrato, foi utilizada como ferramenta metodológica para determinar de maneira indireta a produção urinária ou plasmática de NO.

### **5.6.3 Método de radioimunoensaio**

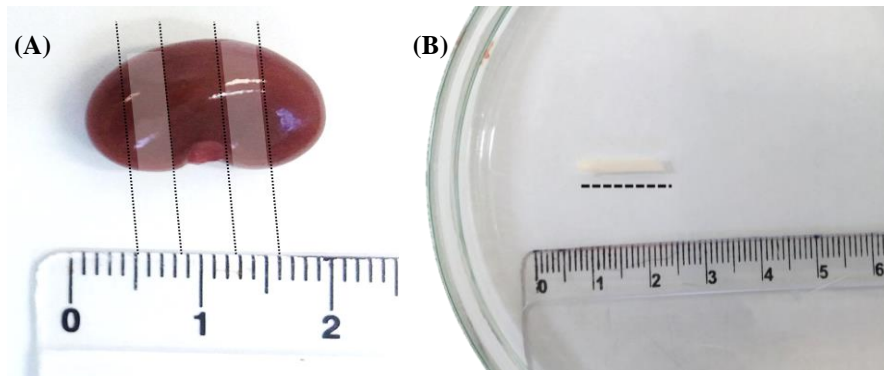
As dosagens hormonais foram realizadas com o apoio do Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, sob a coordenação do Prof. José Antunes Rodrigues. As amostras necessitaram passar por processos prévios de extração: para as dosagens de AVP e de OT, amostras de 1 mL de plasma foram extraídas com 2 mL de acetona e 2 mL de éter de petróleo; para as dosagens de corticosterona, amostras de 25 µL de plasma foram extraídas com 1 mL de álcool etílico absoluto. Em seguida, as amostras extraídas foram submetidas à radioimunoensaios específicos, com duração de 2 a 4 dias, dependendo do hormônio a ser dosado.

### **5.6.4 Imunoistoquímica**

Após a eutanásia e a determinação da massa, o rim direito foi dividido por dois cortes, realizados acima e abaixo da região do hilo, com aproximadamente 2 mm de espessura, conforme representado na Figura 4A. Os cortes frescos foram transferidos para solução de Methacarn (metanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético glacial 10%). Para avaliação vascular foi realizada uma secção de aproximadamente 10 mm de comprimento do

segmento distal da aorta torácica (FIGURA 4B), o qual foi imediatamente transferido para solução de paraformaldeído 4%.

Figura 4 – Região dos cortes histológicos para fixação e inclusão em parafina



Legenda: (A): Tecido renal, (B): Tecido vascular, aorta torácica.  
Fonte: Da autora.

Os tecidos frescos permaneceram em solução fixadora durante 24 h em agitação leve e temperatura ambiente. Em seguida, foram transferidos para solução de álcool 70% e levados para processo tradicional de inclusão em parafina.

Cortes histológicos foram realizados com espessura de 7  $\mu\text{m}$ , utilizando um micrótomo manual (Yidi®). Os cortes foram posicionados sequencialmente em quatro lâminas replicadas revestidas com gelatina e devidamente identificadas. Em seguida, as lâminas foram desparafinizadas, reidratadas e processadas, sendo que para a marcação de NOS2 foi necessário realizar a recuperação antigênica com Tampão Citrato - pH 6 (ácido cítrico 10 nm e Tween 20 à 0,05 %) durante 30 minutos a 55-65 °C.

Para o procedimento imunoistoquímico, mantivemos as lâminas incubadas *overnight*, em câmara úmida e temperatura ambiente com um dos seguintes anticorpos primários: 1) *mouse anti-rat* ED1 (monoclonal, 1:1000, MCA341GA, AbD Serotec®). Este anticorpo reage com antígeno citoplasmático presente em macrófagos ativado residentes e derivados de monócitos sanguíneos, expresso predominantemente na membrana lisossomal e levemente na membrana citoplasmática (DAMOISEAUX et al., 1994; DIJKSTRA et al., 1985); 2) *rabbit anti-rat* NOS2 (policlonal, 1:500, SC-650, Santa Cruz Biotechnology®). Após incubação por 1 h em anticorpo secundário biotilado (*donkey anti-mouse*, 1:200, 715065150, Jackson Immuno Research® ou *donkey anti-rabbit*, 1:200, 711065152, Jackson Immuno Research®), os cortes foram incubados com o complexo avidina-biotina-peroxidase (1:200, PK-6100, Vector Laboratories®). A revelação foi realizada com DAB 0,05% (Hidrato de tetrahydroclorato de 3,3'-diaminobenzidina, D5637, Sigma-Aldrich®) intensificado com

sulfato de níquel 1% para a marcação de células ED1+ e sem intensificador para NOS2. Os cortes foram contrastados, respectivamente, com eosina (citoplasma) e hematoxilina (nuclear), seguindo o processo de desidratação e montagem com lamínula e Entellan.

Cortes representativos foram fotografados utilizando uma câmera fotográfica digital AxioCam ICc3 acoplada ao microscópio Zeiss® e o programa de computador AxioVision versão 4.8.2 (2010). O resultado da coloração de imunoperoxidase para ED1 foi obtido pela contagem do número de células positivas no córtex renal, região túbulo-interstício (nº/área) e microvascular (nº/glomérulo), realizada de forma aleatória, manual e às cegas. Para a imunorreação da NOS2, a quantificação do sinal foi realizada por meio do *Software Image J*, com parâmetros definidos a partir da imunorreatividade no grupo controle (dieta C + tratamento veículo). O valor expresso de cada amostra representa a média da avaliação sobre três cortes por animal.

### 5.6.5 Análise morfométrica

As imagens da aorta torácica (aumento de 2,5x) permitiram a análise do diâmetro interno médio da luz do vaso, obtido pelo o quociente:

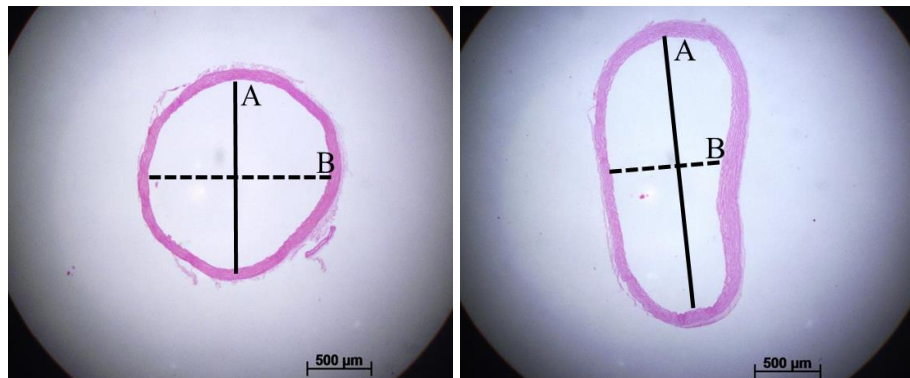
$$\frac{(A+B)}{2}$$

onde:

A: diâmetro 1;

B: diâmetro 2, sendo ambos separados por ângulos de 90° (FIGURA 5).

Figura 5 – Método de análise do diâmetro interno médio da luz do vaso

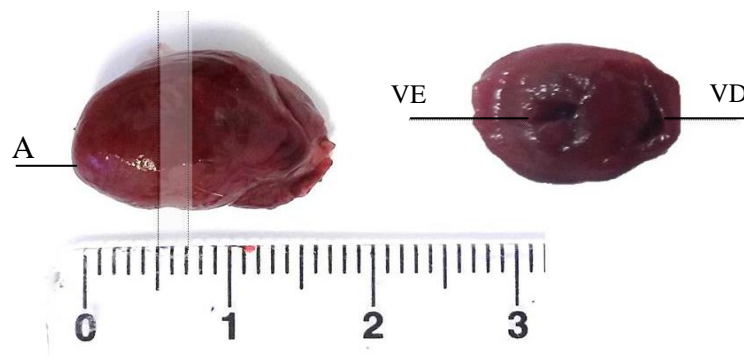


Legenda: Imagem da aorta torácica (2,5x), A: diâmetro 1, B: diâmetro 2.  
Fonte: Da autora.

Também avaliamos a espessura da parede vascular (aumento de 20 x), utilizando o *Software Image J*.

No tecido cardíaco fresco foi realizado um corte com aproximadamente 2 mm de espessura à 5 mm do ápice cardíaco, de acordo com a Figura 6. Os cortes foram fotografados para análise da espessura das paredes dos ventrículos e a medida foi determinada através do *Software Image J*.

Figura 6 – Processamento do coração para análise morfométrica



Legenda: A: ápice cardíaco, VE: Ventrículo esquerdo, VD: Ventrículo direito.

Fonte: Da autora.

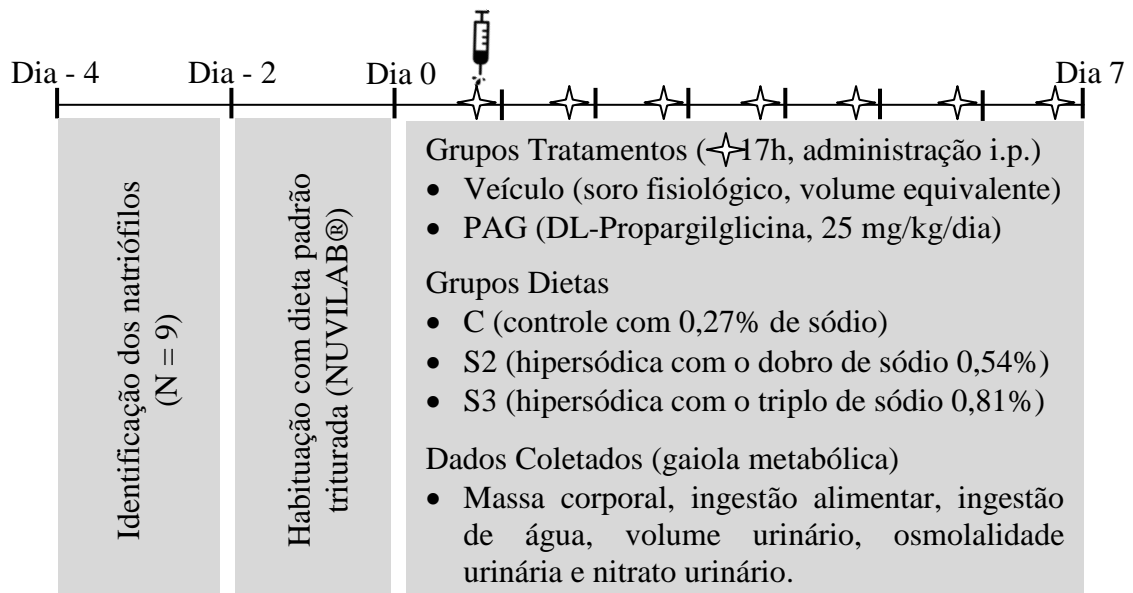
## 5.6 Análise Estatística

Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Todos os dados, uma vez que adquiram padrão de distribuição normal, foram analisados por meio de teste de variância de duas vias (*Two-way ANOVA*) seguido pelo pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni, considerando-se como variáveis o modelo experimental dieta (C/S2/S3) e o tratamento (veículo/PAG). O nível de significância adotado foi de  $p \leq 0,05$ , com intervalo de confiança de 95%. Para a montagem dos gráficos e análises estatísticas, foi utilizado o programa GraphPad Prism 6 Project (GraphPad Software Inc., CA, USA).

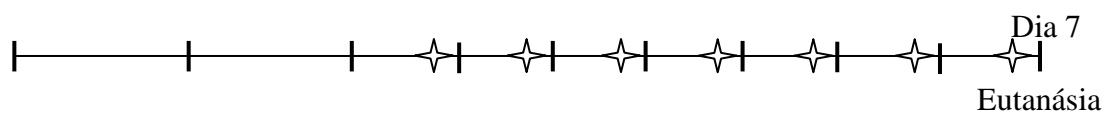
## 6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Os 72 animais efetivamente utilizados foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos, o que resultou em um número amostral (N) de 12 ratos *Wistar* machos adultos por grupo experimental. Abaixo se encontram sumarizadas as linhas temporais dos procedimentos em cada um dos protocolos experimentais realizados.

### 6.1 Parâmetros comportamentais e renais



### 6.2 Parâmetros endócrinos e plasmáticos



#### Coleta dos tecidos

- Hipófise, tecido adiposo branco, tecido adiposo marrom, adrenal, rim, aorta e coração.

#### Coleta do sangue do tronco

- Glicemia casual, osmolalidade plasmática, nitrato plasmático e dosagem hormonal plasmática (AVP, OT e corticosterona).

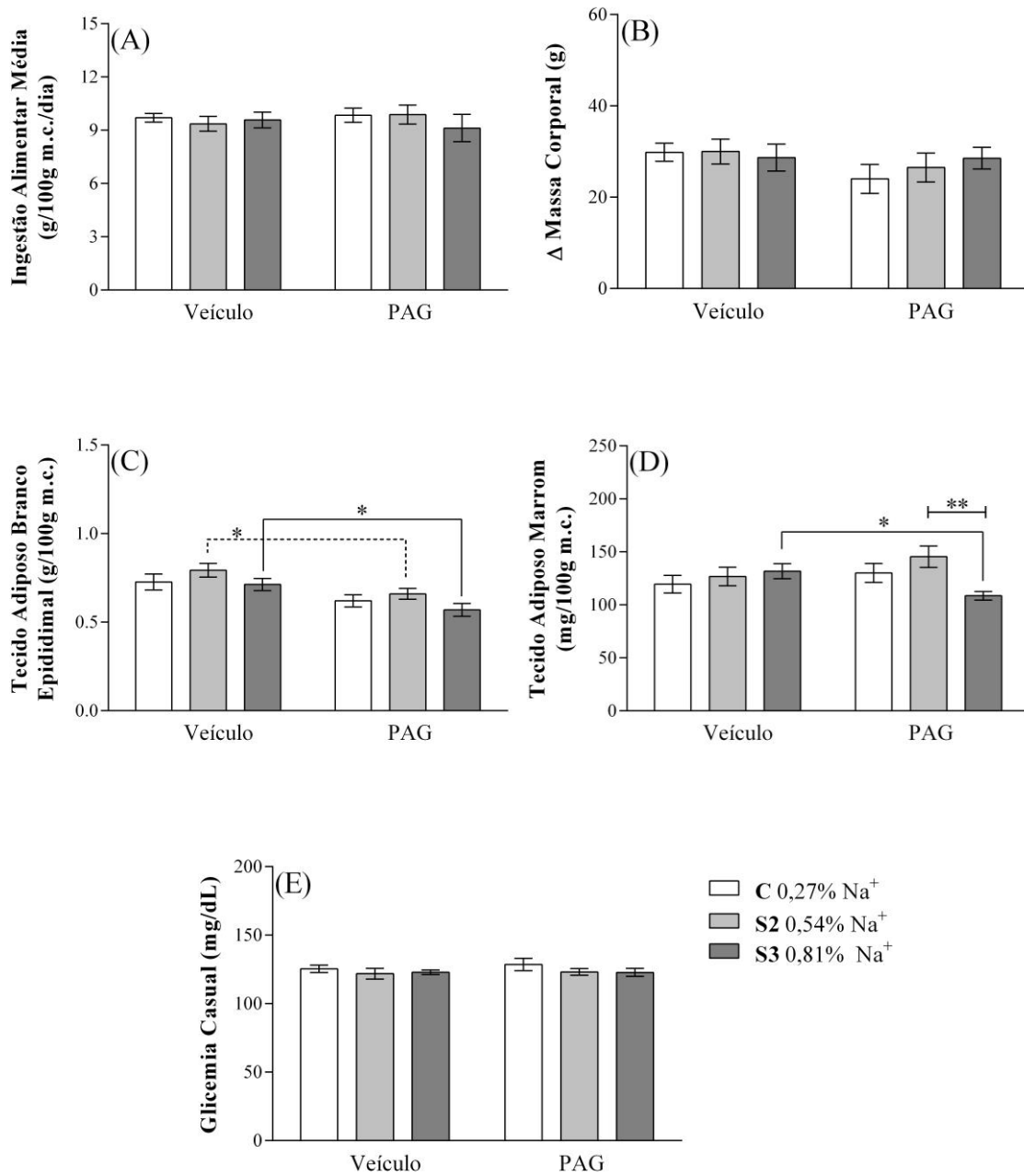
## 7 RESULTADOS

Após a análise estatística dos dados, os resultados apresentados a seguir, foram expressos em média  $\pm$  EPM de cada grupo experimental (N = 12 animais/grupo). Sendo que foram comparados os três tipos de dieta: C, S2 e S3; e os dois tipos de tratamento: veículo (tratados com soro fisiológico, ou considerados sem tratamento) e PAG (tratados com inibidor da CSE/H<sub>2</sub>S, na dosagem de 25mg/kg/dia, i.p.), bem como a interação destas variáveis (dieta/tratamento) sobre o efeito investigado.

### 7.1 Efeitos sobre a homeostase energética

Na Figura 7A, observa-se que nem a variável dieta [ $F_{(2, 66)} = 0,37$ ] tampouco o tratamento com PAG [ $F_{(1, 66)} = 1,66$ ] induziram alteração significativa sobre a ingestão alimentar. Da mesma forma, a variação da massa corporal não foi afetada pela dieta [ $F_{(2, 65)} = 0,20$ ] ou pelo tratamento [ $F_{(1, 65)} = 1,92$ ] (FIGURA 7B). No entanto, a Figura 7C demonstra efeito da dieta hipersódica [ $F_{(2, 65)} = 2,71$ ] e do tratamento [ $F_{(1,65)} = 18,01$ ,  $p < 0,0001$ ] sobre a massa do tecido adiposo branco epididimal, que se mostrou substancialmente reduzido na nos animais tratados com PAG comparados com os tratados com veículos, tanto para o grupo dieta S2 ( $0,79 \pm 0,04$  vs  $0,66 \pm 0,03$  g/100g m.c.,  $p < 0,05$ ) quanto S3 ( $0,71 \pm 0,03$  vs  $0,57 \pm 0,03$  g/100g m.c.,  $p < 0,05$ ). De acordo com a Figura 7D, houve interação entre as variáveis tratamento e dieta na massa do tecido adiposo marrom [ $F_{(2, 66)} = 3,79$ ,  $p < 0,05$ ], havendo redução na massa deste tecido com a PAG entre os grupos de dieta S3 ( $131,76 \pm 7,00$  vs  $108,54 \pm 4,02$  mg/100g m.c.,  $p = 0,05$ ) e na comparação entres os grupos S2 e S3 tratados com PAG ( $145,46 \pm 10,05$  vs  $108,54 \pm 4,02$  mg/100g m.c.,  $p < 0,01$ ). Na análise da glicemia casual (FIGURA 7E), não foi observada nenhuma alteração significativa em relação à dieta [ $F_{(2, 48)} = 1,25$ ] ou ao tratamento [ $F_{(1, 48)} = 0,29$ ].

Figura 7 – Efeitos sobre a homeostase energética



Legenda: (A): Ingestão alimentar média, N/grupo = 11-12; (B): Variação da massa corporal, N/grupo = 11-12; (C): Tecido adiposo branco epididimal, N/grupo = 11-12; (D): Tecido adiposo marrom, N/grupo = 12; (E): Glicemia casual, N/grupo = 8-10. Veículo = grupo que recebeu soro fisiológico, volume equivalente; PAG = grupo tratamento com DL-Propargilglycina, 25 mg/kg/dia, i.p.; C = grupo dieta controle com 0,27% de sódio; S2 = grupo dieta hipersódica com o dobro de sódio 0,54%; S3 = grupo dieta hipersódica com o triplo de sódio 0,81%.

Notas: Valores expressos como média ± EPM. Análise por *Two-way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

Fonte: Da autora.

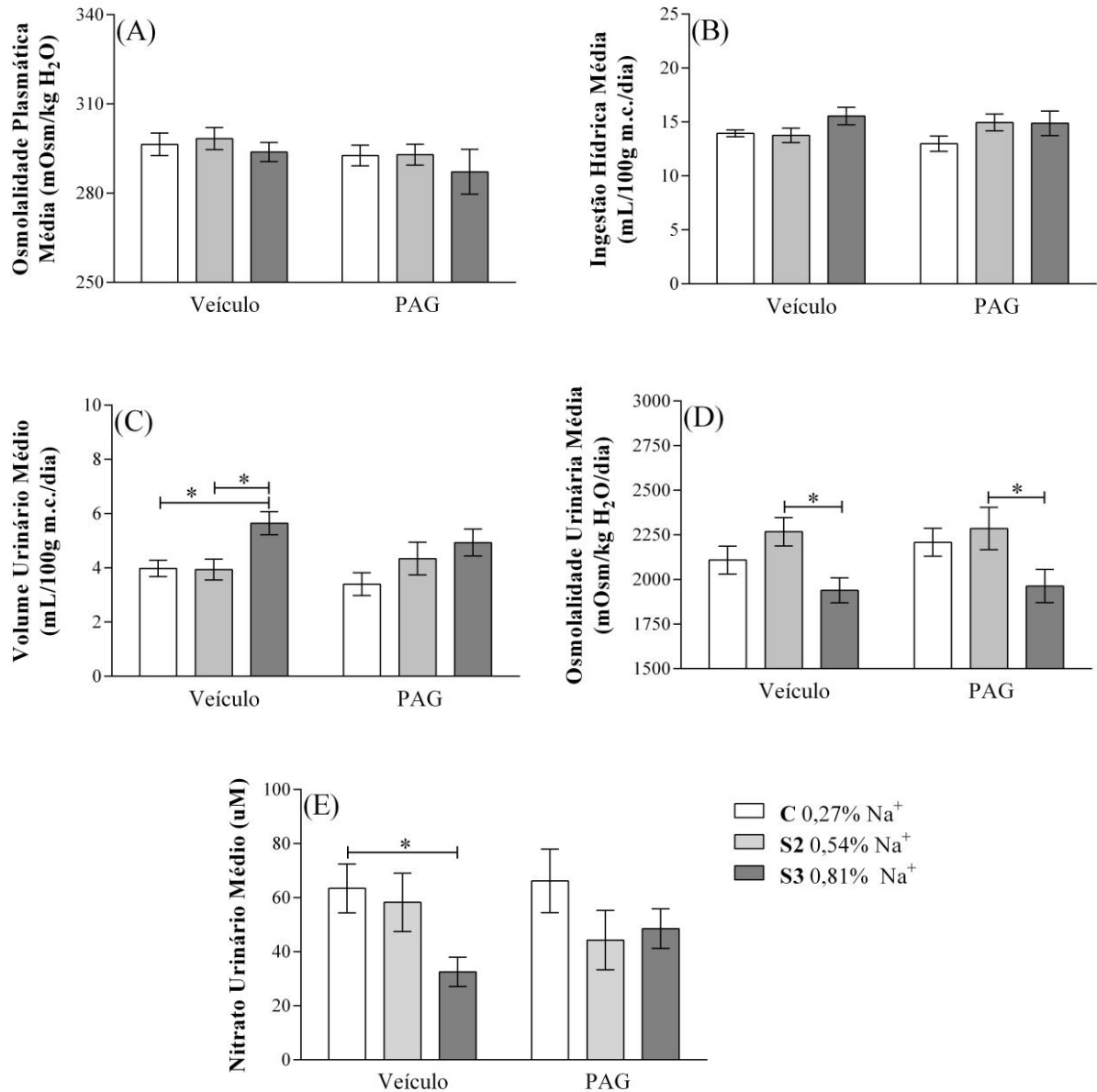


## 7.2 Efeitos sobre a homeostase hidroeletrólítica

Não foi detectada alteração significativa na osmolalidade plasmática, como pode ser analisado pela Figura 8A, em relação às variáveis dieta [ $F_{(2, 65)} = 0,72$ ] e tratamento [ $F_{(1, 65)} = 2,07$ ]. A dieta [ $F_{(2, 64)} = 2,59$ ] e o tratamento [ $F_{(1, 64)} = 0,05$ ] também não induziram alteração significativa na ingestão hídrica (FIGURA 8B). Contudo, podemos observar na Figura 8C que, apesar de o volume urinário não ter sido alterado pelo tratamento [ $F_{(1, 64)} = 0,66$ ], a dieta hipersódica foi determinante para produzir efeitos nesta variável [ $F_{(2, 64)} = 6,74$ ,  $p < 0,05$ ], aumentando esse parâmetro no grupo S3 veículo comparado aos grupos de dieta C e S2, respectivamente ( $3,98 \pm 0,29$  e  $3,94 \pm 0,38$  vs  $5,64 \pm 0,42$  mL/100g m.c./dia,  $p < 0,05$ ).

Da mesma forma, o tratamento não determinou alterações significativas na osmolalidade urinária [ $F_{(1, 64)} = 0,44$ ], mas a dieta alterou este parâmetro de maneira significativa [ $F_{(2, 64)} = 7,10$ ,  $p = 0,001$ ], notadamente ao compararmos os grupos S2 e S3 não tratados, ou tratados com veículo, ( $2267 \pm 79$  vs  $1939 \pm 70$  mOsm/kg H<sub>2</sub>O/dia,  $p < 0,05$ ) e os S2 e S3 tratados com PAG ( $2285 \pm 118$  vs  $1963 \pm 93$  mOsm/kg H<sub>2</sub>O/dia,  $p < 0,05$ ) (FIGURA 8D). Com relação ao nitrato urinário, representado na Figura 8E, o tratamento também não induziu alteração significativa [ $F_{(1,59)} = 0,04$ ], porém a dieta hipersódica reduziu significativamente a concentração urinária deste metabólito [ $F_{(2, 59)} = 3,34$ ,  $p < 0,05$ ], principalmente os grupos tratados com veículo e submetidos à dieta C comparada ao S3 ( $63,41 \pm 9,05$  vs  $32,55 \pm 5,39$   $\mu$ M,  $p = 0,05$ ).

Figura 8 – Efeitos sobre a homeostase hidroeletrolítica



Legenda: (A): Osmolalidade plasmática, N/grupo = 11-12; (B): Ingestão hídrica, N/grupo = 11-12; (C): Volume urinário, N/grupo = 11-12; (D): Osmolalidade urinária, N/grupo = 11-12; (E): Nitrato urinário, N/grupo = 10-12. Veículo = grupo que recebeu soro fisiológico, volume equivalente; PAG = grupo tratamento com DL-Propargilglicina, 25 mg/kg/dia, i.p.; C = grupo dieta controle com 0,27% de sódio; S2 = grupo dieta hipersódica com o dobro de sódio 0,54%; S3 = grupo dieta hipersódica com o triplo de sódio 0,81%.

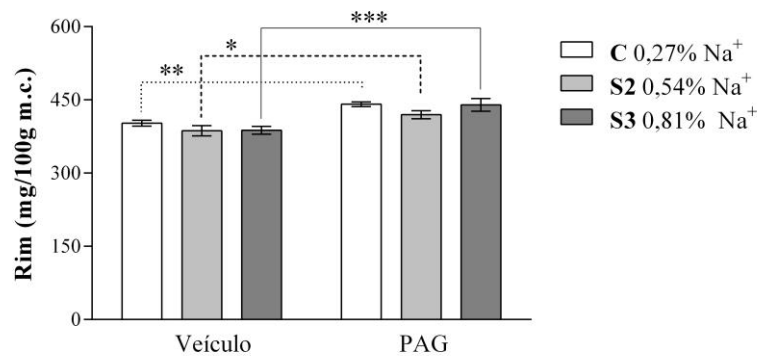
Notas: Valores expressos como média ± EPM. Análise por *Two-way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni; \* p ≤ 0,05.

Fonte: Da autora.

### 7.3 Efeitos sobre o tecido renal

Os efeitos da dieta sobre o índice renal, representados na Figura 9, não foram significativos [ $F_{(2, 66)} = 2,17$ ]. Contudo, o tratamento induziu aumento expressivo da massa renal [ $F_{(1, 66)} = 32,01$ ,  $p < 0,0001$ ], manifestado na comparação entre todos os grupos tratados com veículos e os tratados com PAG, entre as dietas C ( $402,31 \pm 6,18$  vs  $441,04 \pm 4,55$  mg/100g m.c.,  $p < 0,01$ ), S2 ( $386,72 \pm 10,62$  vs  $419,56 \pm 8,37$  mg/100g m.c.,  $p < 0,05$ ) e S3 ( $387,62 \pm 8,03$  vs  $439,55 \pm 13,04$  mg/100g m.c.,  $p < 0,001$ ).

Figura 9 – Efeitos sobre a massa do rim



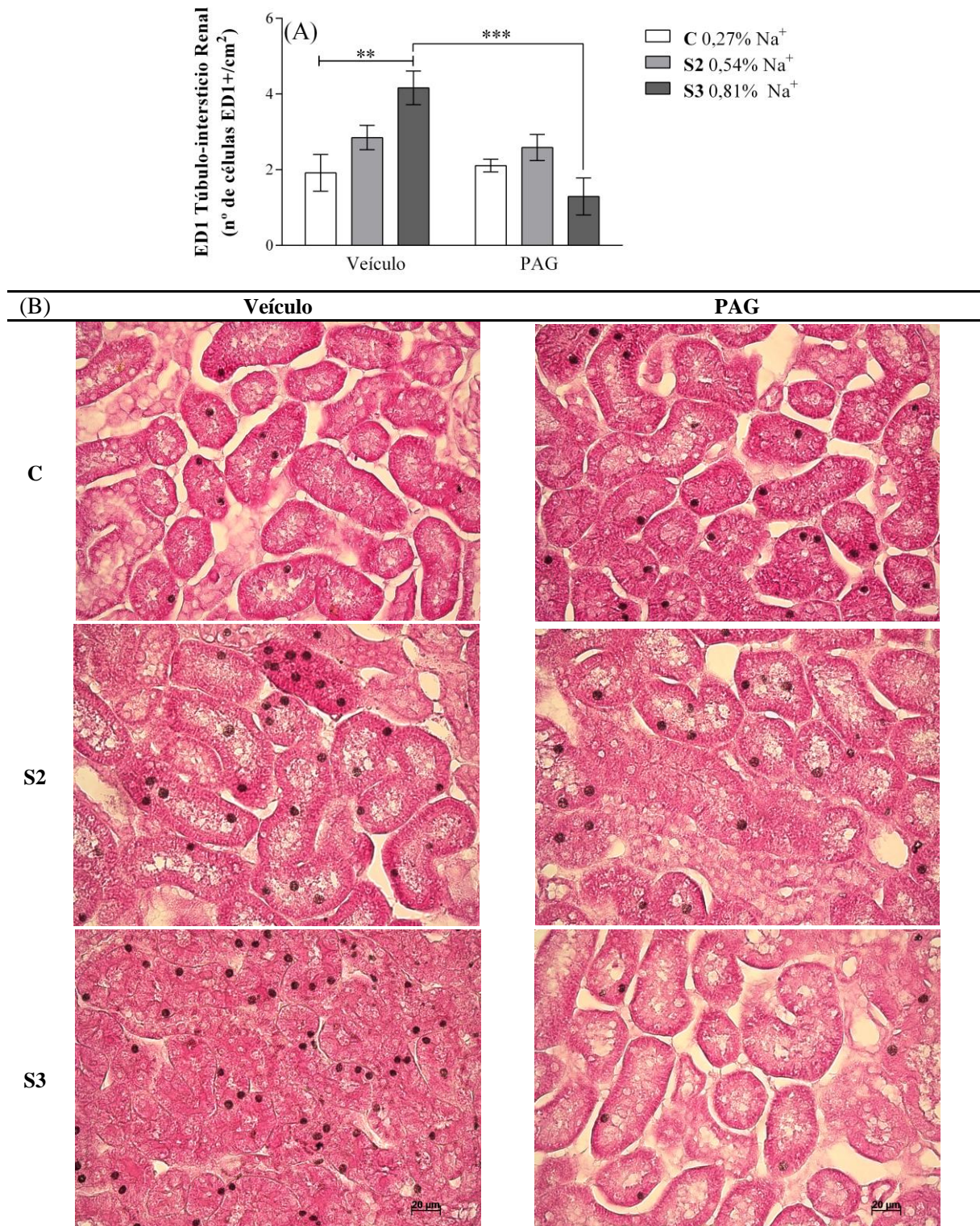
Legenda: N = 12/grupo. Veículo = grupo que recebeu soro fisiológico, volume equivalente; PAG = grupo tratamento com DL-Propargilglicina, 25 mg/kg/dia, i.p.; C = grupo dieta controle com 0,27% de sódio; S2 = grupo dieta hipersódica com o dobro de sódio 0,54%; S3 = grupo dieta hipersódica com o triplo de sódio 0,81%.

Notas: Valores expressos como média ± EPM. Análise por *Two-way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Fonte: Da autora.

De acordo com a Figura 10A, houve interação significativa entre a dieta e o tratamento sobre a marcação de macrófagos ativados/monócitos na região túbulo-interstício do córtex renal [ $F_{(2, 18)} = 8,81$ ,  $p < 0,01$ ], sendo este efeito manifestado por aumento de células ED1+ na comparação entre os grupos de dieta C e S3 tratados com veículo ( $1,91 \pm 0,48$  vs  $4,16 \pm 0,44$  números de células ED1+/cm<sup>2</sup>,  $p < 0,01$ ), bem como por uma redução expressiva na marcação destas células nos animais tratados com PAG, na comparação entre os grupos de dieta S3 não tratados (veículo) e tratado (PAG), respectivamente ( $4,16 \pm 0,44$  vs  $1,29 \pm 0,49$  números de células ED1+/cm<sup>2</sup>,  $p < 0,001$ ). Estes resultados foram apresentados de maneira qualitativa na Figura 10B, que evidencia a presença clara de resposta inflamatória com a ingestão da dieta S3, pela marcação de células ED1+ (ponto pretos), sendo este efeito inibido pelo tratamento com PAG.

Figura 10 – Efeitos sobre a inflamação túbulo-intersticial do córtex renal



Legenda: (A): Número de células ED1+ no interstício renal, N/grupo = 4; (B): Imagens microscópicas (40x) do interstício renal com marcação de células ED1+ representativas de cada grupo. Veículo = grupo que recebeu soro fisiológico, volume equivalente; PAG = grupo tratamento com DL-Propargilglicina, 25 mg/kg/dia, i.p.; C = grupo dieta controle com 0,27% de sódio; S2 = grupo dieta hipersódica com o dobro de sódio 0,54%; S3 = grupo dieta hipersódica com o triplo de sódio 0,81%.

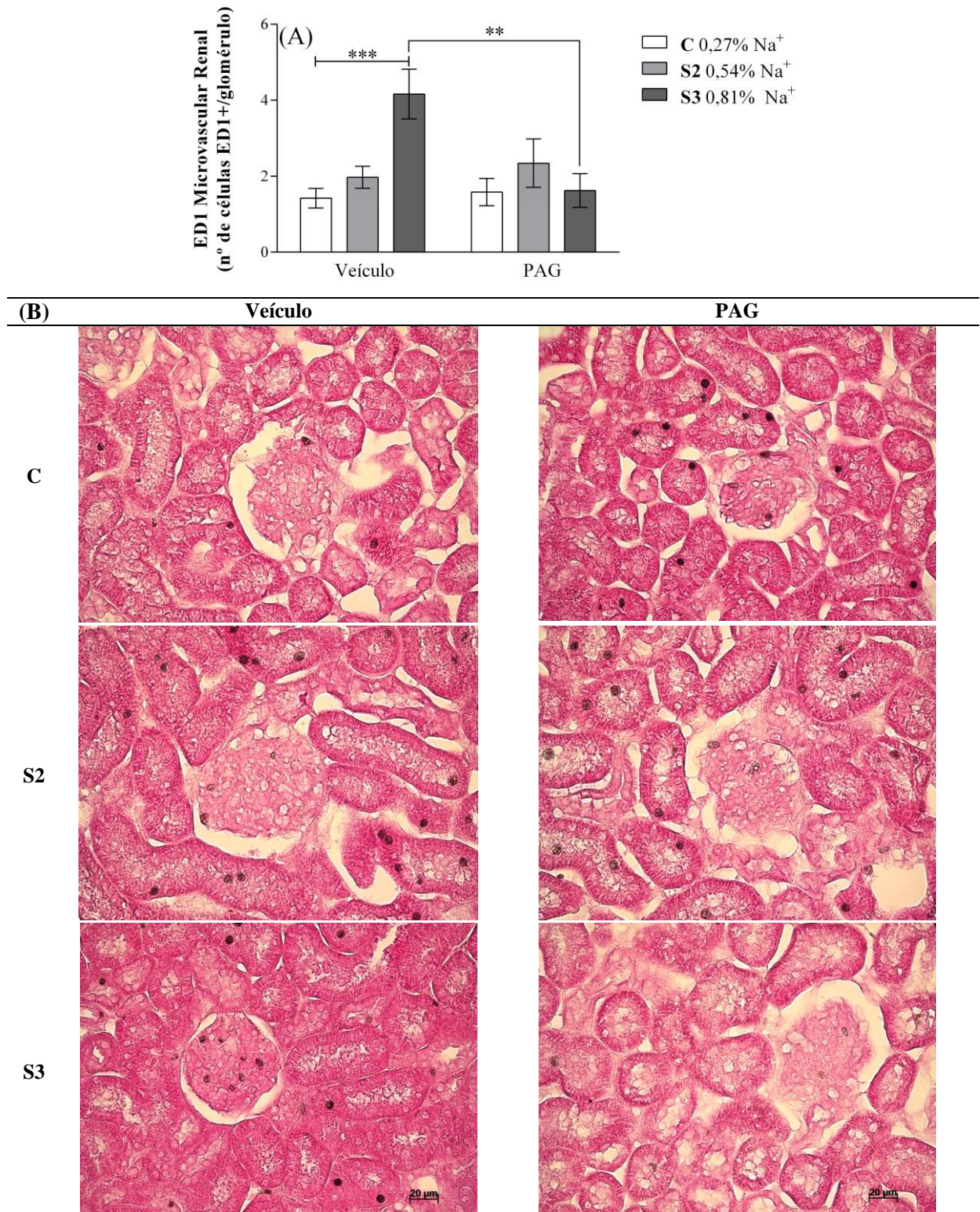
Notas: Valores expressos como média  $\pm$  EPM. Análise por *Two-way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Células ED1+ são apresentadas pela marcação como pontos pretos presentes nos cortes histológicos.

Fonte: Da autora.

Na avaliação da imunorreação para células ED1+ nos componentes microvasculares dos néfrons (glomérulos), detectamos efeito significativo de interação entre as variáveis dieta e tratamento [ $F_{(2, 21)} = 6,62$ ,  $p < 0,01$ ], manifestado por um aumento significativo no número de macrófagos ativados/monócitos induzido pela dieta S3 comparada ao C ( $1,42 \pm 0,25$  vs  $4,16 \pm 0,65$  número de células ED1+/glomérulo,  $p < 0,001$ ), bem como por uma redução notável neste respectivo grupos com o tratamento de PAG ( $4,16 \pm 0,66$  vs  $1,62 \pm 0,45$  números de células ED1+/glomérulo,  $p = 0,001$ ). A representação qualitativa dos achados inflamatórios nos glomérulos é apresentada na Figura 11B.



Figura 11 – Efeitos sobre a inflamação nos glomérulos



Legenda: (A): Número de células ED1+ na microvasculatura renal, N/grupo = 4-5; (B): Imagens microscópicas (40x) da região de glomérulos com marcação de células ED1+ representativas de cada grupo. Veículo = grupo que recebeu soro fisiológico, volume equivalente; PAG = grupo tratamento com DL-Propargilglicina, 25 mg/kg/dia, i.p.; C = grupo dieta controle com 0,27% de sódio; S2 = grupo dieta hipersódica com o dobro de sódio 0,54%; S3 = grupo dieta hipersódica com o triplo de sódio 0,81%.

Notas: Valores expressos como média  $\pm$  EPM. Análise por *Two-way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Células ED1+ são apresentadas pela marcação de pontos pretos.

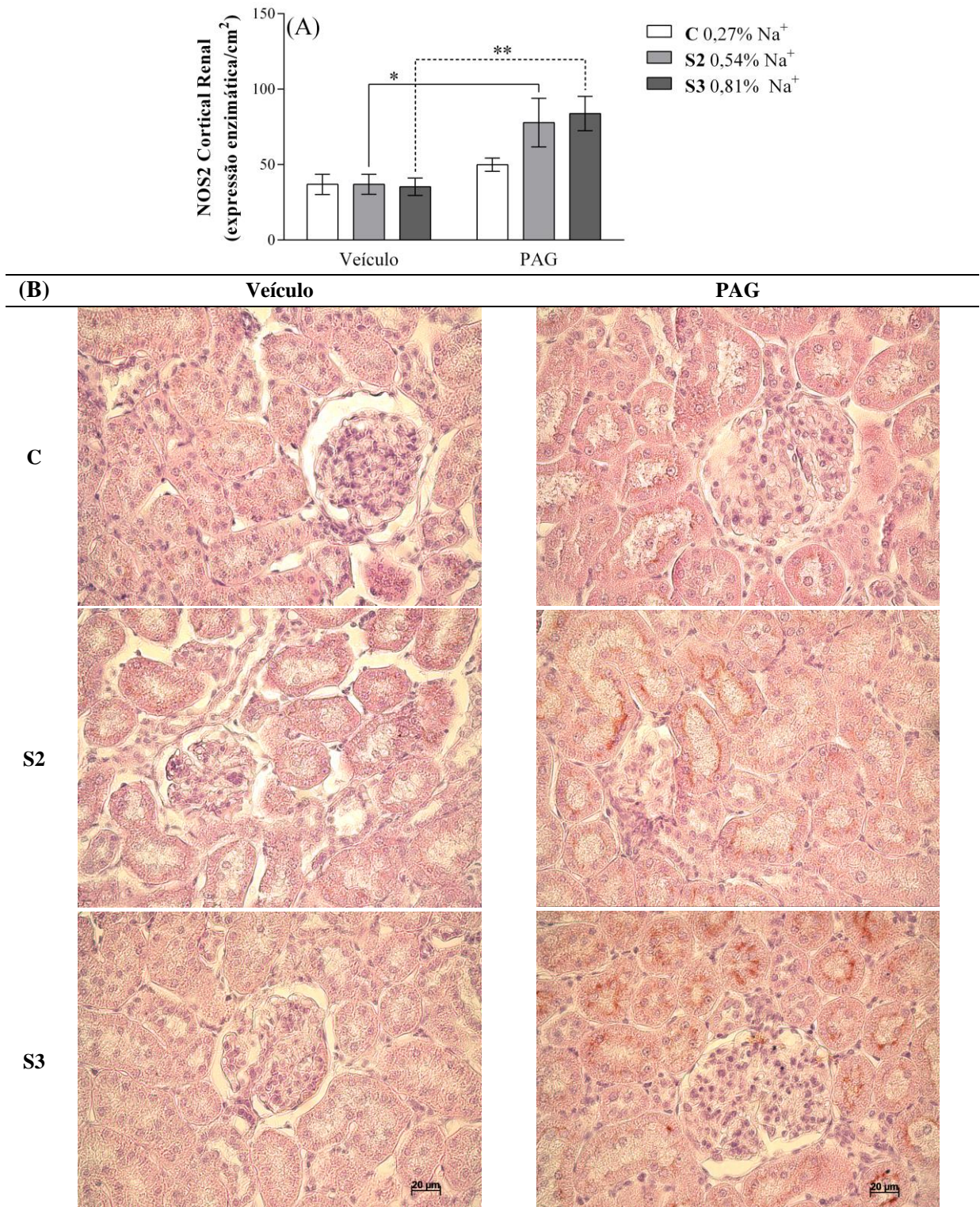
Fonte: Da autora.

Na tentativa de elucidar a interação entre os gasomoduladores H<sub>2</sub>S e NO na indução dos efeitos renais frente a dieta hipersódica, avaliamos os efeitos destes procedimentos sobre a marcação para a enzima NOS2, conforme demonstrado na Figura 12.

Assim, o tratamento com PAG aumentou expressivamente a presença da NOS2 [ $F_{(1,22)} = 19,16, p < 0,001$ ], especialmente na comparação entre não tratados (veículos) e tratados (PAG), dos grupos dieta S2 ( $36,94 \pm 6,63$  vs  $77,80 \pm 16,16$  expressão enzimática/cm<sup>2</sup>,  $p < 0,05$ ) e S3 ( $35,27 \pm 5,75$  vs  $83,78 \pm 11,36$  expressão enzimática/cm<sup>2</sup>,  $p < 0,01$ ). Contudo, a dieta, avaliada como fator isolado, não induziu alteração significativa neste parâmetro [ $F_{(2,22)} = 1,74$ ] (FIGURA12A). Estes achados foram representados de maneira qualitativa na Figura 12B, que mostra a marcação para a NOS2 em marrom.



Figura 12 – Efeitos sobre a enzima óxido nítrico sintase induzida (NOS2)



Legenda: (A): Expressão da NOS2 no córtex renal, N/grupo = 4-5; (B): Imagens microscópicas (40x) do córtex renal com marcação de NOS2 representativas de cada grupo. Veículo = grupo que recebeu soro fisiológico, volume equivalente; PAG = grupo tratamento com DL-Propargilglicina, 25 mg/kg/dia, i.p.; C = grupo dieta controle com 0,27% de sódio; S2 = grupo dieta hipersódica com o dobro de sódio 0,54%; S3 = grupo dieta hipersódica com o triplo de sódio 0,81%.

Notas: Valores expressos como média ± EPM. Análise por *Two-way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . A marcação da expressão de NOS2 é apresentada pela coloração em marrom nos cortes histológicos.

Fonte: Da autora.

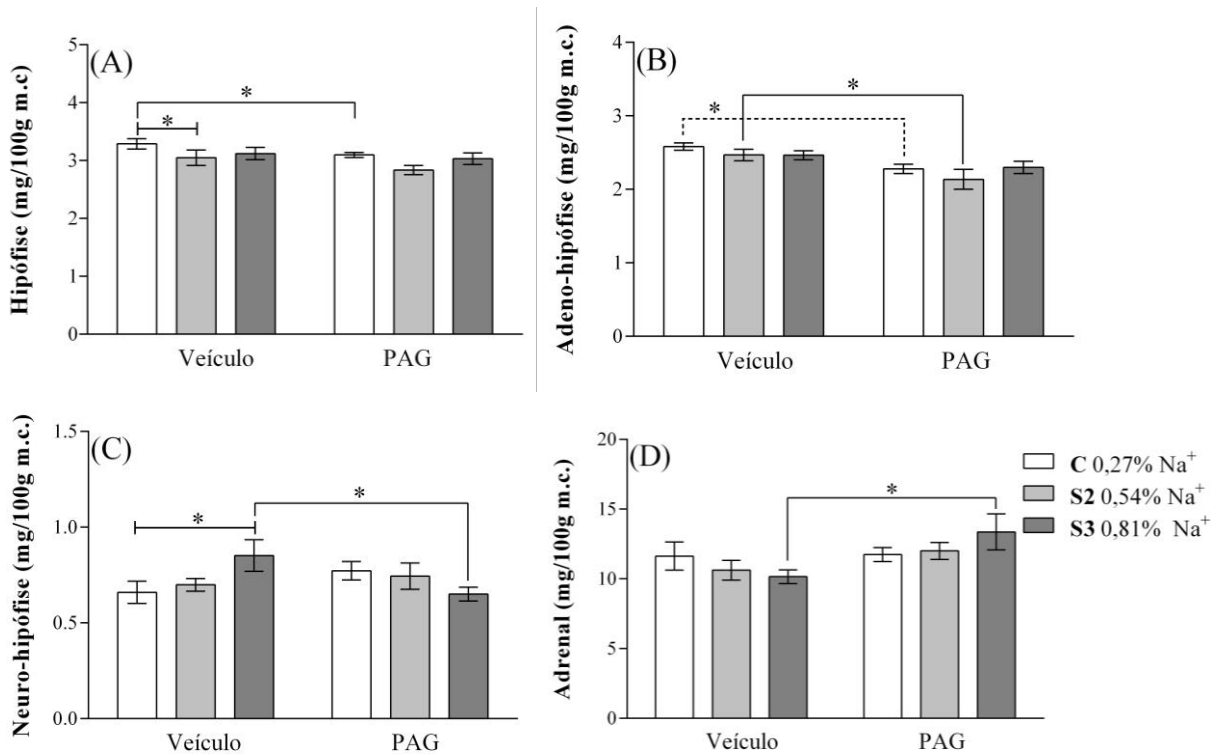


#### 7.4 Efeitos sobre os eixos neuroendócrinos

De acordo com a Figura 13A, a dieta reduziu significativamente a massa total da hipófise [ $F_{(2, 65)} = 3,48$ ,  $p < 0,05$ ], especificamente na comparação entre os grupos tratados com veículos submetidos à dieta C e S2, respectivamente ( $3,28 \pm 0,09$  vs  $3,04 \pm 0,13$  mg/100g m.c.,  $p = 0,05$ ). O tratamento PAG reduziu este parâmetro [ $F_{(1, 65)} = 4,53$ ,  $p < 0,05$ ], estritamente na comparação entre os grupos de dieta C não tratado e tratado ( $3,28 \pm 0,09$  vs  $3,09 \pm 0,04$  mg/100g m.c.,  $p = 0,05$ ). Na separação dos tecidos da hipófise anterior e posterior, o tratamento PAG mostrou-se significativo na redução da massa da adeno-hipófise [ $F_{(1, 64)} = 14,93$ ,  $p < 0,001$ ], notadamente quando comparados os grupos veículo e PAG das dietas C ( $2,58 \pm 0,05$  vs  $2,27 \pm 0,06$  mg/100g m.c.,  $p < 0,05$ ) e S2 ( $2,46 \pm 0,07$  vs  $2,13 \pm 0,13$  mg/100g m.c.,  $p < 0,05$ ), ainda que a dieta não tenha alterado consideravelmente esta variável [ $F_{(2, 64)} = 1,16$ ] (FIGURA 13B). Conforme observado na Figura 13C, a interação da dieta com o tratamento produziu efeitos significativos sobre a massa da neuro-hipófise [ $F_{(2, 64)} = 4,00$ ,  $p < 0,05$ ]; quando comparamos os grupos de dieta C e S3 veículo, detectamos um aumento substancial da massa neuro-hipofisária com o consumo da dieta hipersódica ( $0,66 \pm 0,05$  vs  $0,85 \pm 0,08$  mg/100g m.c.,  $p = 0,05$ ), entretanto observamos uma redução desta massa na comparação entre os grupos de dieta S3, tratados com veículo e PAG, respectivamente ( $0,85 \pm 0,08$  vs  $0,65 \pm 0,03$  mg/100g m.c.,  $p = 0,05$ ).

Adicionalmente, o tratamento com PAG levou a um aumento significativo da massa da glândula adrenal [ $F_{(1, 66)} = 5,46$ ,  $p < 0,05$ ], especialmente na comparação entre os grupos submetidos à dieta S3 tratados com veículo e PAG, respectivamente ( $10,15 \pm 0,49$  vs  $13,36 \pm 1,29$  mg/100g m.c.,  $p < 0,05$ ), não havendo efeito significativo da dieta sobre este parâmetro [ $F_{(2, 66)} = 0,17$ ] (FIGURA 13D).

Figura 13 – Efeitos sobre a massa de tecidos (neuro)endócrinos



Legenda: (A): Hipófise total, N/grupo = 11-12; (B): Adeno-hipófise, N/grupo = 10-12; (C): Neuro-hipófise, N/grupo = 11-12; (D): Glândula adrenal, N/grupo = 12. Veículo = grupo que recebeu soro fisiológico, volume equivalente; PAG = grupo tratamento com DL-Propargilglicina, 25 mg/kg/dia, i.p.; C = grupo dieta controle com 0,27% de sódio; S2 = grupo dieta hipersódica com o dobro de sódio 0,54%; S3 = grupo dieta hipersódica com o triplo de sódio 0,81%.

Notas: Valores expressos como média  $\pm$  EPM. Análise por *Two-way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni; \*  $p \leq 0,05$ .

Fonte: Da autora.

Com relação às dosagens hormonais, a Figura 14A nos traz os efeitos da dieta e tratamento sobre as concentrações plasmáticas de AVP, na qual observamos que houve uma interação significativa entre as variáveis dieta e tratamento para este parâmetro [ $F_{(2,18)} = 5,22$ ,  $p = 0,01$ ], manifestada por aumento da concentração plasmática deste hormônio na comparação entre os grupos de dieta C e S3 tratados com veículo ( $0,69 \pm 0,27$  vs  $1,52 \pm 0,15$  pg/mL,  $p = 0,01$ ), bem como na comparação entre os grupos de dieta S2 e S3, veículos, ( $0,80 \pm 0,23$  vs  $1,52 \pm 0,15$  pg/mL,  $p < 0,05$ ). Verificamos também uma redução do nível plasmático de AVP no grupo S3 tratado com PAG, em relação ao grupo S3 veículo ( $1,52 \pm 0,15$  vs  $0,95 \pm 0,07$  pg/mL,  $p = 0,05$ ).

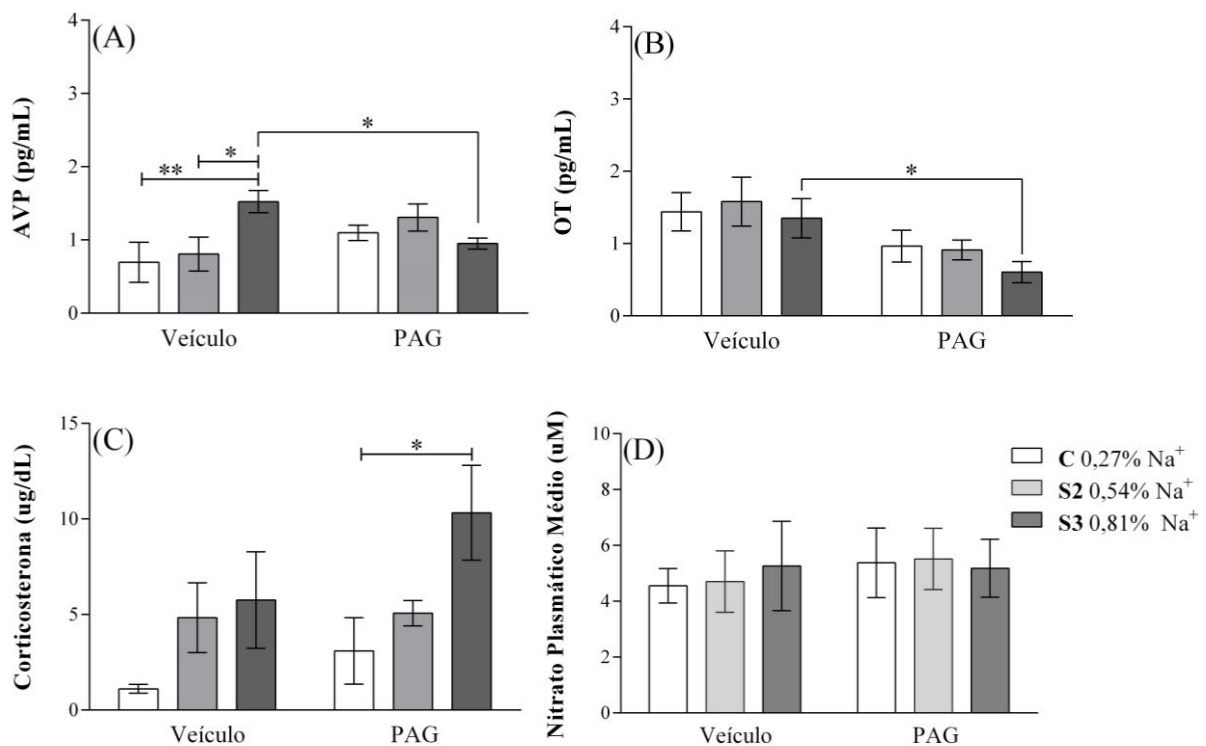
A Figura 14B demonstra os efeitos dos mesmos estímulos sobre a secreção de OT. Observou-se, nesta variável, efeito não significativo da dieta [ $F_{(2,18)} = 0,71$ ], e efeito positivo para o tratamento [ $F_{(1,18)} = 10,26$ ,  $p < 0,01$ ]. Que foi manifestado por uma redução

considerável nas concentrações plasmáticas de OT no grupo S3 tratado com PAG, quando comparado ao grupo S3 que recebeu veículo ( $1,35 \pm 0,27$  vs  $0,60 \pm 0,14$  pg/mL,  $p = 0,05$ ).

Por outro lado, o tratamento não alterou a concentração plasmática de corticosterona [ $F_{(1,18)} = 2,38$ ] (FIGURA 14C), porém observamos um aumento estatisticamente significativo neste parâmetro em resposta à dieta [ $F_{(2,18)} = 5,46$ ,  $p = 0,01$ ], principalmente na comparação entre os grupos de dieta C e S3 tratados com PAG ( $3,09 \pm 1,73$  vs  $10,32 \pm 2,48$  µg/dL,  $p < 0,05$ ).

Em relação ao metabólito do NO em nível plasmático, não detectamos alterações da concentração de nitrato no que se refere à dieta [ $F_{(2,47)} = 0,02$ ] e nem ao tratamento [ $F_{(1,47)} = 0,58$ ], conforme demonstrado na Figura 14D.

Figura 14 – Efeitos sobre as concentrações plasmáticas de hormônios e de nitrato



Legenda: (A): Hormônio AVP (arginina vasopressina), N/grupo = 4; (B): Homônimo OT (ocitocina), N/grupo = 4; (C): Hormônio corticosterona, N/grupo = 4; (D): Nitrato plasmático, N/grupo = 8-10. Veículo = grupo que recebeu soro fisiológico, volume equivalente; PAG = grupo tratamento com DL-Propargilglicina, 25 mg/kg/dia, i.p.; C = grupo dieta controle com 0,27% de sódio; S2 = grupo dieta hipersódica com o dobro de sódio 0,54%; S3 = grupo dieta hipersódica com o triplo de sódio 0,81%.

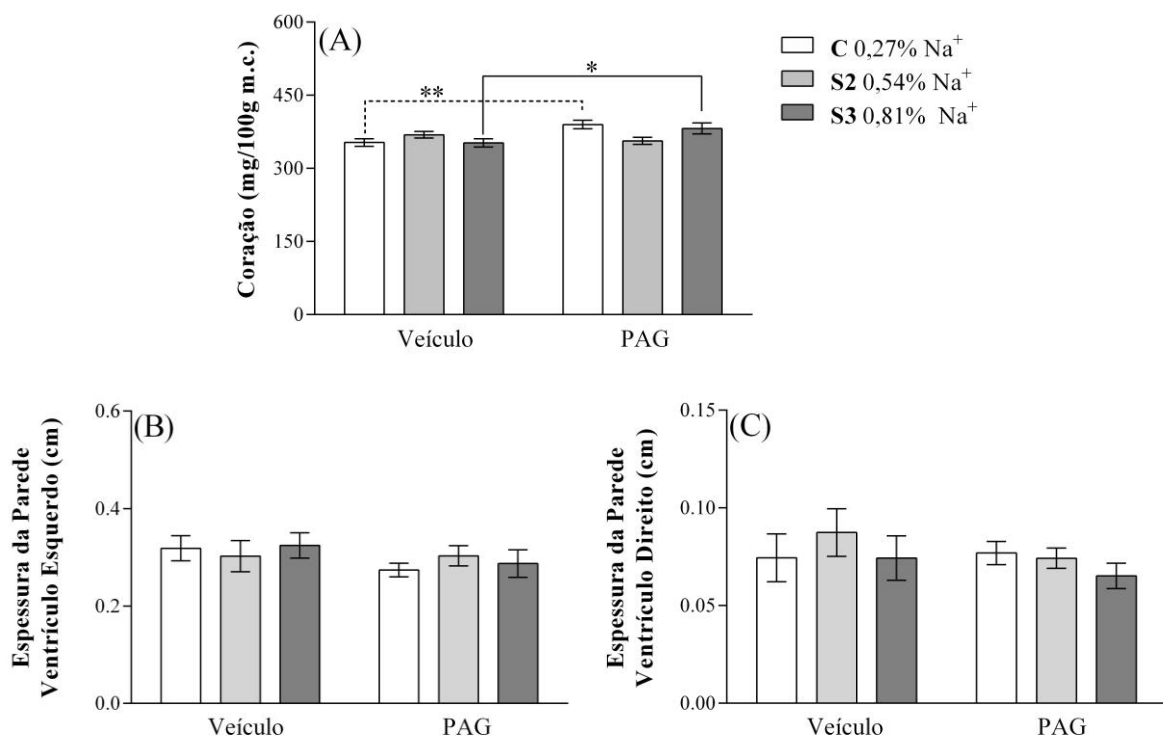
Notas: Valores expressos como média  $\pm$  EPM. Análise por *Two-way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Fonte: Da autora.

## 7.5 Efeitos sobre o sistema cardiovascular

Conforme demonstrado na Figura 15A, embora a dieta não tenha sido capaz de induzir alteração notável na massa cardíaca [ $F_{(2, 64)} = 0,52$ ], o tratamento induziu aumento significativo nesta variável [ $F_{(1, 64)} = 6,65$ ,  $p = 0,01$ ], quando comparamos os grupos tratados com veículo e com PAG, respectivamente, submetidos à dieta C ( $353,08 \pm 7,87$  vs  $389,92 \pm 8,81$  mg/100g m.c.,  $p = 0,01$ ) e S3 ( $352,08 \pm 8,44$  vs  $381,97 \pm 11,31$  mg/100g m.c.,  $p < 0,05$ ). No entanto, a dieta [ $F_{(2, 50)} = 0,08$ ] e o tratamento [ $F_{(1, 50)} = 1,79$ ] não modificaram a espessura da parede ventricular esquerda (FIGURA 15B) e ainda menos, a parede ventricular direita [ $F_{(2, 50)} = 0,74$  e  $F_{(1, 50)} = 0,80$ ] (FIGURA 15C).

Figura 15 – Efeitos sobre o tecido cardíaco



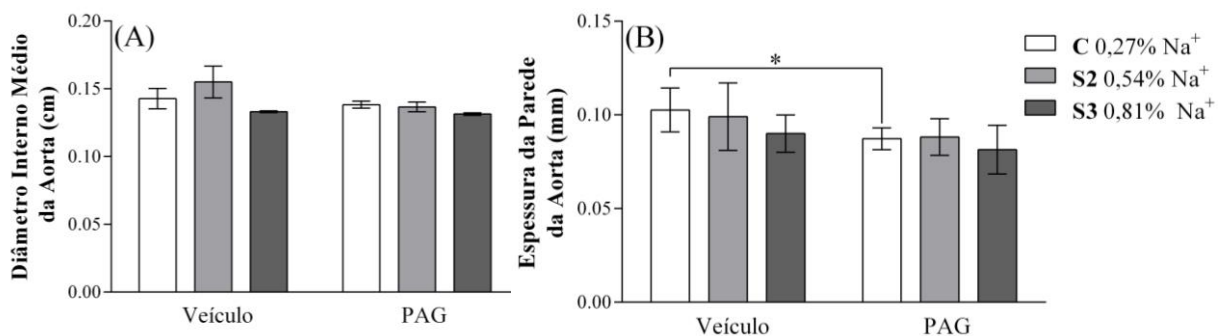
Legenda: (A): Massa do coração, N/grupo = 11-12; (B): Espessura da parede ventricular esquerda, N/grupo = 9-10; (C): Espessura da parede ventricular direita, N/grupo = 9-10. Veículo = grupo que recebeu soro fisiológico, volume equivalente; PAG = grupo tratamento com DL-Propargilglicina, 25 mg/kg/dia, i.p.; C = grupo dieta controle com 0,27% de sódio; S2 = grupo dieta hipersódica com o dobro de sódio 0,54%; S3 = grupo dieta hipersódica com o triplo de sódio 0,81%.

Notas: Valores expressos como média  $\pm$  EPM. Análise por *Two-way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

Fonte: Da autora.

Da mesma forma, não detectamos alteração significativa no diâmetro interno médio da luz da aorta torácica (FIGURA 16A), seja em resposta à dieta [ $F_{(2,18)} = 2,65$ ] ou ao tratamento [ $F_{(1,18)} = 2,82$ ]. A variação do teor de  $\text{Na}^+$  na dieta também não produziu efeito significativo sobre a espessura da parede aórtica [ $F_{(2,18)} = 1,38$ ], embora o tratamento com PAG, por si só, tenha reduzido a parede deste grande vaso sistêmico [ $F_{(1,18)} = 5,64$ ,  $p < 0,05$ ], visivelmente na comparação entre as dietas C ( $0,103 \pm 0,006$  vs  $0,087 \pm 0,003$  mm,  $p = 0,05$ ) (FIGURA 16B).

Figura 16 – Efeitos sobre a morfometria da aorta torácica



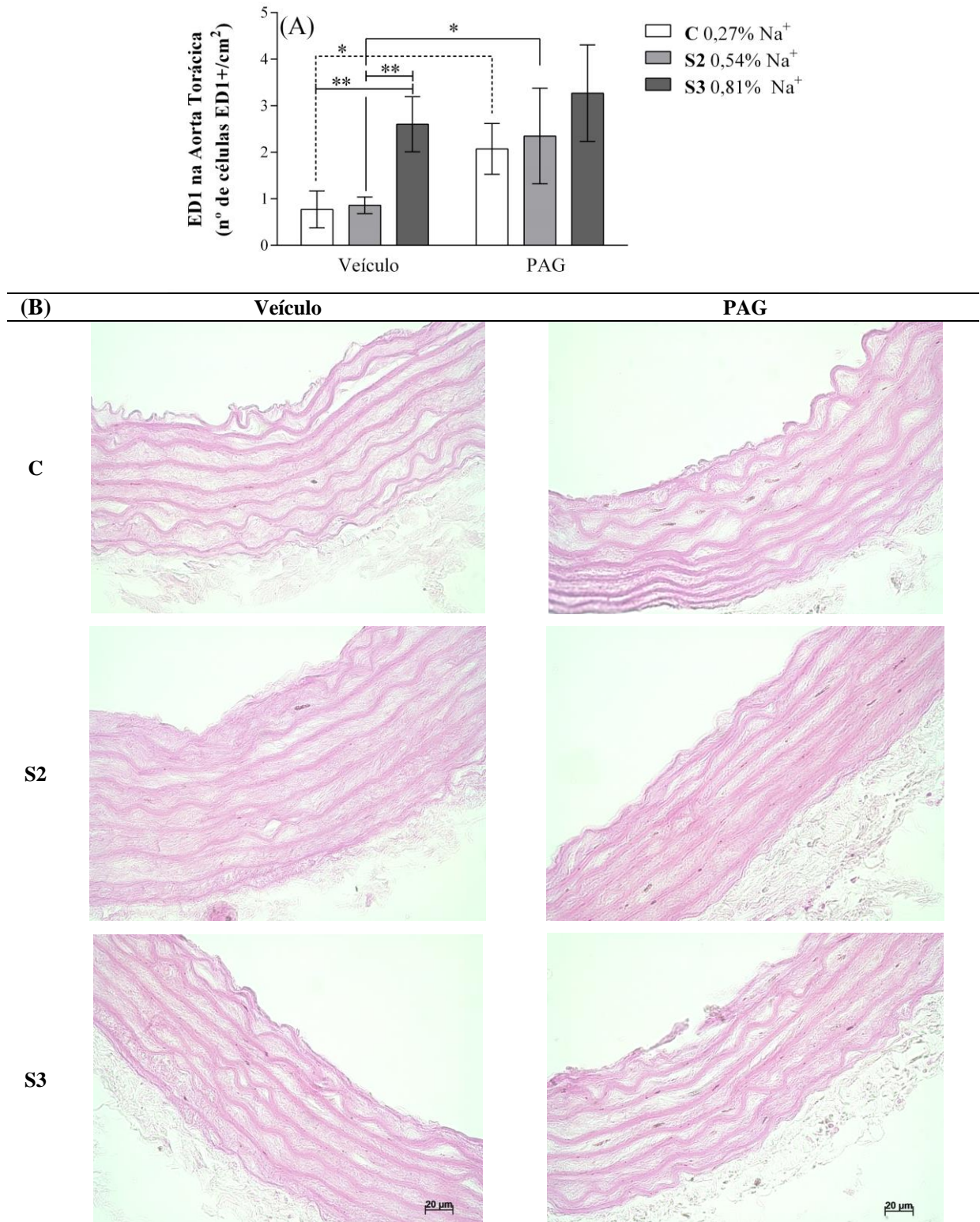
Legenda: (A): Diâmetro interno médio da luz da aorta, N/grupo = 4; (B): Espessura da parede da aorta, N/grupo = 4. Veículo = grupo que recebeu soro fisiológico, volume equivalente; PAG = grupo tratamento com DL-Propargilglicina, 25 mg/kg/dia, i.p.; C = grupo dieta controle com 0,27% de sódio; S2 = grupo dieta hipersódica com o dobro de sódio 0,54%; S3 = grupo dieta hipersódica com o triplo de sódio 0,81%.

Notas: Valores expressos como média  $\pm$  EPM. Análise por *Two-way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. \*  $p \leq 0,05$ .

Fonte: Da autora.

A Figura 17A, apresentada a seguir, mostra que, apesar de não terem sido detectadas alterações na morfometria aórtica em resposta à dieta, o consumo elevado de  $\text{Na}^+$  na dieta aumentou significativamente o número de células ED1+ na aorta torácica [ $F_{(2,18)} = 11,01$ ,  $p < 0,001$ ], especialmente visível na comparação entre os grupos de dieta C e S2 comparados ao S3 tratados com veículo, respectivamente ( $0,77 \pm 0,19$  e  $0,86 \pm 0,09$  vs  $2,60 \pm 0,29$  número de células ED1+/cm<sup>2</sup>,  $p < 0,01$ ). Também observamos efeito do tratamento nesta variável [ $F_{(1,18)} = 16,08$ ,  $p < 0,001$ ], ao compararmos os grupos veículo e PAG submetidos à dieta C ( $0,77 \pm 0,20$  vs  $2,07 \pm 0,27$  número de células ED1+/cm<sup>2</sup>,  $p = 0,05$ ) e S2 ( $0,86 \pm 0,09$  vs  $2,35 \pm 0,51$  número de células ED1+/cm<sup>2</sup>,  $p < 0,05$ ). Na Figura 17B, estes resultados encontram-se representados qualitativamente.

Figura 17 – Efeitos sobre a inflamação vascular sistêmica



Legenda: (A): Número de células ED1+ no tecido da aorta torácica, N/grupo = 4; (B): Imagens microscópicas (40x) da aorta torácica com marcação de células ED1+ representativas de cada grupo. Veículo = grupo que recebeu soro fisiológico, volume equivalente; PAG = grupo tratamento com DL-Propargilglicina, 25 mg/kg/dia, i.p.; C = grupo dieta controle com 0,27% de sódio; S2 = grupo dieta hipersódica com o dobro de sódio 0,54%; S3 = grupo dieta hipersódica com o triplo de sódio 0,81%.

Notas: Valores expressos como média ± EPM. Análise por *Two-way* ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . Células ED1+ são apresentadas pela marcação como pontos pretos.

Fonte: Da autora.

## 8 DISCUSSÃO

No presente estudo, mostramos a ingestão de dieta hipersódica, notadamente no grupo S3, por curto período de tempo (sete dias), já foi suficiente para gerar alterações estatisticamente significativas no volume urinário, na osmolalidade urinária e na concentração urinária de nitrato, bem como induzir um estado inflamatório tanto no rim (microvasculatura e túbulos-interstício) quanto, em menor proporção, em uma artéria de grande calibre (aorta). Ademais, a dieta hipersódica promoveu aumento na massa da neuro-hipófise, o que foi acompanhado por aumento da secreção de AVP. Por outro lado, não observamos efeitos da variação do conteúdo de  $\text{Na}^+$  na dieta sobre a homeostase energética, sobre a secreção de corticosterona ou sobre a expressão da enzima NOS2 no rim. Para mais, demonstramos que a inibição farmacológica da produção endógena de  $\text{H}_2\text{S}$  pela via enzimática da CSE, por meio da administração i.p. de PAG em uma dosagem de 25 mg/kg/dia, promoveu redução das massas das reservas adiposas, modificou a excreção de nitrato urinário, diminuiu o *status* inflamatório renal, porém aumentando os índices renal e cardíaco. Além disso, o tratamento com PAG inibiu a ativação do eixo hipotálamo-neuro-hipofisário (secreção de AVP e OT) induzida pela variação do  $\text{Na}^+$  na dieta, bem como apresentou um efeito aparentemente estimulatório sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), uma vez que aumentou a massa da glândula adrenal e promoveu uma hiperfunção da mesma, já que encontramos elevados níveis plasmáticos de corticosterona. Ficou clara também a ação do  $\text{H}_2\text{S}$  em inibir a produção renal de NO via NOS2, uma vez que o tratamento com PAG permitiu o aumento da expressão desta enzima.

Inicialmente, com relação à homeostase energética (FIGURA 7), nossos dados não confirmam a hipótese proposta por Rodrigues et al. (2015) de que exista uma relação linear entre o IMC, ingestão calórica e consumo de  $\text{Na}^+$ , uma vez que não detectamos alteração significativa na ingestão alimentar média e variação da massa corporal. O estudo de Baubrand et al. (2014), que compara grupos com ingestão adequada e alta de  $\text{Na}^+$ , também não apontou alteração na ingestão alimentar ou no IMC, porém observou maior incidência de hipertensão e síndromes metabólicas nos indivíduos com ingestão aumentada de  $\text{Na}^+$ . Neste sentido, o estudo de Feng et al. (2009) sugeriu que o  $\text{H}_2\text{S}$  pode ser um novo regulador da resistência à insulina, pois no tecido adiposo branco epididimal de ratos a enzima CSE é expressa e na presença de  $\text{H}_2\text{S}$  os adipócitos inibem a absorção de glicose, tanto basal quanto estimulada por insulina, de forma dose-dependente. Por outro lado, embora disfunções relacionadas à

secreção de insulina tenham sido relatadas em animais tratados com PAG no estudo de El-Sayed et al. (2016), em nosso estudo não verificamos alterações na glicemia casual dos animais, independentemente do tratamento. Ainda que, nossos resultados apontam uma importante redução do tecido adiposo de forma inespecífica, visto que reduziu tanto tecido adiposo branco epididimal quanto tecido adiposo marrom, nos grupos de dieta hipersódica quando tratados com PAG, sugerindo que a inibição da CSE, conseqüentemente da produção endógena do H<sub>2</sub>S, possa ter alterado o metabolismo lipídico. Corroborando com nossos achados, foi demonstrado por Tsai et al. (2015) que o uso de doador NaHS estimulou a adipogênese (por aumentar o tamanho e o número de gotículas de lipídeos nos adipócitos maduros), prejudicando a lipólise nestas células, e que o uso de inibidor PAG reduziu o acúmulo de lipídeos. Por outro lado, nossos resultados confrontam outros dados publicados anteriormente, que demonstraram que o baixo teor de H<sub>2</sub>S está relacionado a níveis ainda menores do hormônio anti-inflamatório adiponectina, o que favoreceria o estresse oxidativo verificado no modelo de diabetes (EL-SAYED et al., 2016; JAIN et al., 2012; LIU et al., 2015). A gordura marrom está relacionada com os efeitos benéficos sobre a saúde, já que contribui para uma maior queima de calorias, desempenhando importante papel na termogênese e no equilíbrio energético, inclusive na homeostase da glicose (STANFORD et al., 2013). Neste sentido o estudo de Orava et al. (2011) demonstrou que, em resposta à secreção de insulina, o tecido adiposo marrom exibe alta captação de glicose e, quando ativado pelo frio, dissipa a energia de modo dependente da perfusão.

Em relação à homeostase hidroeletrólítica, contudo, as evidências experimentais sobre a participação do H<sub>2</sub>S apresentadas pelo presente estudo são bem mais amplas. Em relação ao comportamento apetitivo específico para o sal, Cornélio et al. (2012) apontam que esta variável é afetada por diversos determinantes, dentre eles os aspectos motivacionais e hedônicos, ou seja, relacionados à sensação de prazer. Acredita-se que o Na<sup>+</sup> contribua, até certo ponto, para aumentar a palatabilidade dos alimentos. A partir de certo limite, porém, ele se torna aversivo, o que não ocorreu no presente modelo, uma vez que a ingestão alimentar não foi alterada nos grupos que receberam as preparações hipersódicas. Entretanto, seria esperado que aumentos na ingestão de Na<sup>+</sup> levassem a aumentos proporcionais na ingestão de líquidos e, conseqüentemente, no volume urinário excretado (MILLS; WARD, 1975). Nosso trabalho comprovou apenas em partes essa teoria, uma vez que a ingestão hídrica não aumentou nos grupos que receberam dieta hipersódica, porém detectamos aumento do volume urinário médio, principalmente em resposta à dieta S3 (FIGURA 8), permanecendo tal desequilíbrio entre ingestão e excreção de água nos permite supor que os animais podem vir a



desenvolver um quadro de desidratação, o que não estava presente visto que não encontramos alteração na massa corporal. Sabemos que o principal estímulo para o aumento da ingestão hídrica em resposta à dieta hipersódica seria o aumento da osmolalidade plasmática, que também não estava alterada em nosso estudo no momento da eutanásia (período da manhã), mas podemos sugerir que se elevou em algum momento, já que detectamos aumento no nível plasmático de AVP, especialmente no grupo veículo submetido à dieta S3, servindo também como um parâmetro para sobrecarga salina (MUHSIN; MOUNT, 2016). No trabalho desenvolvido por Nicco, Bankir e Bouby (2003), a alta ingestão de sal induziu um aumento acentuado tanto na ingestão de água como na excreção urinária, produzindo também diminuição reflexa da osmolalidade urinária. De acordo com nossos achados, a literatura trás que o aumento do volume urinário é quase sempre associado à osmolalidade urinária reduzida, uma vez que a excreção aumentada de  $\text{Na}^+$  pode induzir, por efeito osmótico, a permanência de água no lúmen renal, estimulando sua excreção e aumentando o *clearance* de água livre (CHEUNG PASITPORN et al., 2016). Essa regulação da excreção urinária de  $\text{Na}^+$  e água é controlada, entre outros fatores, pela secreção dos hormônios OT e AVP, que são produzidos no hipotálamo e armazenados na neuro-hipófise (VISCONTI et al., 2017), conforme discutiremos mais adiante.

Há evidências de que a excreção urinária de  $\text{Na}^+$  também se correlacione inversamente com a produção renal de NO, e conseqüentemente de nitrato. Isso porque, em nível renal, o NO, por meio de seu segundo mensageiro GMPc, estimula a reabsorção de  $\text{Na}^+$  (SOARES et al., 1999). Em nosso estudo, podemos notar que no grupo S3 tratado com veículo existe uma relação direta entre nitrato e osmolalidade urinária (ambos notadamente menores), e um padrão inverso na relação entre nitrato e volume urinário, conforme observamos na Figura 8, comprovando que, de fato, o NO possa participar das respostas para ajustar a ingestão de  $\text{Na}^+$  à sua excreção renal. Em relação à possível interação entre NO e  $\text{H}_2\text{S}$  para determinar esta resposta, o estudo desenvolvido por Wesseling et al. (2015) demonstrou que a administração de PAG reduziu os metabólitos urinários de NO ao aumentar, na verdade, a produção renal de CO. Esse efeito foi mediado por indução na expressão de HO-1, sugerindo que o a ação do  $\text{H}_2\text{S}$  sobre a produção local de NO seja indiretamente mediada pelo CO, reforçando a possibilidade de interação entre os três gases. De fato, foi comprovado que em macrófagos isolados o efeito inibitório do  $\text{H}_2\text{S}$  sobre a produção de NO é mediado pela produção de CO pela via da HO-1 (OH et al., 2006). Este dado é corroborado pelo presente estudo, uma vez que a inibição da produção endógena do

H<sub>2</sub>S, com a administração de PAG, provocou redução do número de macrófagos ativados (FIGURAS 10 e 11) e aumento da expressão NOS2 (FIGURA 12) no tecido renal.

Outro resultado interessante encontrado no presente estudo, demonstrado na Figura 9, foi o aumento da massa renal nos animais tratados com PAG, independentemente da dieta. Este achado corrobora com relatos anteriores de Oosterhuis et al. (2015), os quais demonstraram que a administração da PAG em ratos aumentou o índice renal e a proliferação de células tubulares corticais internas, além de reduzir a hipertensão, a inflamação (número de macrófagos) e o grau de lesão glomerular e tubular renal induzida por ANG II. Dentre vários fatores que possam ter aumentado a massa do rim, o edema pode estar incluído, pois existe relato de que a administração de PAG aumentou o edema pulmonar induzido por isquemia-reperfusão do membro inferior por regulação negativa da expressão de aquaporina-1 e -5 (QI et al., 2014). A existência de edema não ficou clara em nosso estudo pela análise qualitativa das imagens. Ademais, Zhou et al. (2013) demonstraram que o nível aumentado de ingestão de sal na dieta, apenas por sete dias, está associado à ativação da imunidade inata (atividade de monócitos) e inflamação de órgãos-alvo, o que se observa também em nosso estudo, pela presença de células ED1+ (macrófagos ativados/monócitos) nos ratos que receberam a dieta S3 (FIGURAS 10 e 11). Assim, a redução da ingestão de Na<sup>+</sup> é acompanhada da redução na produção de citocinas pró-inflamatórias interleucina-6 (IL) e IL-23, juntamente com uma maior capacidade de síntese da citocina anti-inflamatória IL-10 (YI et al., 2015). Dados esses que corroboram com nossos achados imunistoquímicos para a contagem de células ED1+, que se mostrou estatisticamente maior tanto nos glomérulos quanto nos túbulos-interstício renal daqueles animais que ingeriram as dietas hipersódicas durante sete dias, sendo este efeito inibido pelo tratamento com PAG.

Em suma, nossos achados são consistentes com aqueles que demonstram uma atividade predominantemente pró-inflamatória do H<sub>2</sub>S, visto que a microvasculatura renal tende a ser lesada em uma relação estreita entre consumo de Na<sup>+</sup>, produção aumentada de H<sub>2</sub>S e inflamação local. Como demonstrado por Li et al. (2005) em modelo experimental de choque endotóxico induzido por lipopolissacarídeo, grandes quantidades de TNF- $\alpha$  foram detectados após administração de NaHS, corroborando seu poder pró-inflamatório. Nesse sentido, na presença de NaHS, o H<sub>2</sub>S melhorou a adesão/rolamento de leucócitos na microcirculação mesentérica, restaurou a migração dos neutrófilos para o foco infeccioso e melhorou a sobrevivência na sepse grave por um mecanismo dependente de canal de K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> (SPILLER et al., 2010). Por outro lado, Francescato et al. (2011a; 2011b) mostraram em seus estudos que o dano renal induzido tanto por cisplatina quanto por adriamicina foi reduzido

pela PAG, este efeito protetor foi associado à diminuição da produção de H<sub>2</sub>S e a restrição do estresse oxidativo e da inflamação local, uma vez que preveniu o influxo de neutrófilos, macrófagos, linfócitos T e diminuiu o número de células apoptóticas. Também foi reportado que a PAG reduziu significativamente os níveis dos mediadores pró-inflamatórios IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , proteína-1 quimiotática de monócitos e proteína-2 inflamatória de macrófagos em pulmão e fígado de ratos (ZHANG et al., 2007). E finalmente, os dados de outro estudo imunoistoquímico corroboraram nossos achados, demonstrando que o tratamento com PAG reduziu a infiltração de macrófagos/monócitos (marcação de ED1+), em paralelo à redução da lesão túbulo-intersticial (FRANCESCATO et al., 2012).

Para avaliar os efeitos do H<sub>2</sub>S sobre parâmetros endócrinos que também influenciam a função renal, estimamos a massa da neuro-hipófise, a qual mostrou-se estatisticamente aumentada nos animais que receberam a dieta S3, o que foi acompanhado pelo aumento da concentração plasmática de AVP (FIGURAS 13 e 14). Em contrapartida, o tratamento PAG reduziu a massa da neuro-hipófise e as concentrações plasmáticas de ambos os hormônios, AVP e OT, sugerindo que o H<sub>2</sub>S participe da integridade da via hipotálamo-neuro-hipófise. Neste sentido, um estudo que utilizou o modelo de privação hídrica por 24h mostrou aumento das enzimas geradoras de H<sub>2</sub>S no hipotálamo médio basal *in vitro* e redução da ingestão de água. E após a administração i.c.v. de um doador de H<sub>2</sub>S, observou aumento das concentrações plasmáticas de AVP, OT e corticosterona, em paralelo a uma redução do conteúdo de nitrato/nitrito no homogeneizado de células do hipotálamo (COLETTI et al., 2015). Em conjunto, esses dados confirmam nossos achados, mostrando que o H<sub>2</sub>S favorece a secreção hormonal em resposta a diferentes modelos de alteração do balanço de Na<sup>+</sup>.

Além disso, verificamos aumento da massa da adrenal no grupo S3 tratado com PAG, sugerindo interferência do H<sub>2</sub>S também com a atividade do eixo HHA. De fato, embora em nosso estudo a ingestão de dieta hipersódica não tenha afetado significativamente os níveis plasmáticos de corticosterona, a secreção deste hormônio elevou-se significativamente nos animais S3 tratados com PAG. Segundo Mancuso, Navarra e Preziosi (2010), o eixo HHA é responsável pela resposta adaptativa ao estresse, iniciada centralmente pela liberação de AVP e CRH que leva a secreção de ACTH pela hipófise, e este estimula a liberação de glicocorticoide pela glândula adrenal, o qual tem ação, entre outros fatores, sobre a resposta imune (PEDERSEN; RUIQIAN; MARK, 2001). No ano de 2000, Dello Russo et al. já haviam reportado que um precursor indireto da formação de H<sub>2</sub>S reduziu a liberação de CRH *in vitro* estimulada por potássio e elevou os níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL). Por outro lado, a droga não teve efeito na função do eixo HHA *in vivo*, já que não afetou a

secreção basal de CRH, mas inibiu o aumento de glicocorticoides induzido pelo estresse. Outro estudo relatou níveis plasmáticos aumentados de corticosterona após injeção i.c.v. de NaHS, (GINA; SAMSON, 2014). Lou et al. (2008) relataram que o pré-tratamento com H<sub>2</sub>S aumentou os níveis de ACTH e corticosterona plasmáticos. Em nosso estudo, o aumento na massa da adrenal relacionou-se de maneira direta com o aumento da produção de glicocorticoides, no caso corticosterona. Porém, a não redução nas massas da hipófise total e da adeno-hipófise nos animais S3 tratados com PAG *versus* veículo (FIGURA 13), o que seria esperado frente ao mecanismo de retroalimentação negativa, demonstra uma possível falha na integridade desta alça. Esse resultado é intrigante, uma vez que, em teoria, a PAG teria pouca ou nenhuma ação sobre o SNC, posto que a CSE seja pobremente expressa neste tecido (BRONOWICKA-ADAMSKA; ZAGAJEWSKI; WRÓBEL, 2015). Dessa forma, sugerimos que os efeitos do H<sub>2</sub>S sobre o eixo HHA observados em nosso estudo podem ter se iniciado de alguma forma na periferia, e não centralmente, como sugerem alguns autores.

Em nosso estudo também avaliamos a presença de nitrato no plasma, de forma a obter uma medida indireta da produção de NO pelas células endoteliais, resultante das interações do Na<sup>+</sup> com a vasculatura e indução de estresse oxidativo local. Embora não tenhamos observado alterações nas concentrações plasmáticas de nitrato em resposta à dieta hipersódica ou ao tratamento, os dados sugerem que tais modificações em nível vascular sistêmico ainda não estejam ocorrendo, apesar das alterações na microcirculação renal (glomérulos). Já foi reportado que a PAG reduz a produção endotelial de NO, supostamente por modulação negativa da NOS2 vascular (LIN et al., 2016). Meng, Adaikan e Srilatha (2013) confirmaram que o uso de NaHS aumentou a produção de NO por aumento da atividade da NOS2. Outro estudo mostrou a capacidade do NO em induzir a produção endógena de H<sub>2</sub>S pelas células musculares lisas de artérias, via expressão de CSE (ZHAO et al., 2001). Dessa forma, acredita-se que também nos leitos vasculares o NO e o H<sub>2</sub>S ajam como contrarreguladores.

Os achados renais do consumo agudo de Na<sup>+</sup> são importantes e podem ter impacto no sistema cardiovascular, uma vez que os rins recebem uma grande parte do débito cardíaco. Embora não tenhamos em nosso estudo aferido a pressão arterial dos animais, sabendo-se da existência da relação entre o consumo de Na<sup>+</sup> e aumento dos níveis pressóricos, a maior parte dos estudos que investigam a hipertensão gerada pelo consumo elevado de Na<sup>+</sup> utilizam modelos crônicos ou minimamente subcrônicos de indução da hipertensão. Por exemplo, o estudo de Huang et al. (2015) utilizou um teor de 8% de NaCl na dieta durante oito semanas para induzir hipertensão, observando uma regulação para baixo da via CSE/H<sub>2</sub>S no tecido

renal, o que difere da resposta pró-inflamatória do H<sub>2</sub>S encontrada nos nossos animais mediante o consumo agudo da dieta hipersódica. Assim, presumimos que o curto período de ingestão da dieta hipersódica (sete dias) não seria suficiente para promover a hipertensão nos animais, hipótese esta confirmada pelo estudo de Zhou et al. (2013) em humanos.

Adicionalmente, não observamos hipertrofia ventricular e nem alteração importante da luz aórtica. Nesse sentido, Forechi et al. (2015) demonstraram, em modelo experimental, que a ingestão de dieta com alto teor de Na<sup>+</sup> após infarto aumentou a mortalidade e a remodelação ventricular, com deposição de colágeno e aumento da secção transversa. Em estudos recentes, a administração de PAG causou hipertrofia cardíaca (EL-SAYED et al., 2016) e aboliu o efeito cardioprotetor de uma terapia gênica miocárdica contra isquemia (DAS et al., 2015). Em nosso trabalho, verificamos alteração na massa do tecido cardíaco, mas não foi possível afirmar a existência de hipertrofia com a avaliação da espessura das paredes ventriculares, seja relacionada à dieta hipersódica ou ao tratamento (FIGURA 15). Ao caracterizarmos os efeitos vasculares, observados nas Figuras 16 e 17, não encontramos alterações no diâmetro interno médio, embora tenhamos encontrado um discreto efeito de redução na espessura da parede da aorta torácica em animais tratados com PAG.

Porém, apesar destes achados morfométricos negativos, encontramos um resultado surpreendente na parede aórtica em relação à presença de infiltrado de células inflamatórias por imunohistoquímica, tanto no grupo de dieta S3 quanto nos grupos tratados com PAG. Embora a enzima CSE expressa nas células lisas musculares seja a principal produtora de H<sub>2</sub>S na aorta torácica, a presença das células ED1+ induzida por PAG, diferentemente do rim, pode ser justificada pela produção de H<sub>2</sub>S por meio da ação das enzimas 3-MST e CAT, presentes também no endotélio vascular (SHIBUYA et al., 2009b). Achados consistentes na literatura sugerem que deficiência na expressão de CSE ou o baixo nível de H<sub>2</sub>S podem ser considerados como fatores de risco e biomarcadores para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, dentre elas a aterosclerose, visto que a produção endógena do H<sub>2</sub>S via CSE protege o tecido vascular pela redução da proliferação vascular da túnica íntima, inibição da expressão de moléculas de adesão e do estresse oxidativo (LEUCKER et al., 2017; MANI et al., 2013).

Neste sentido, foi comprovado que, em condições patológicas como a hipercolesterolemia, a expressão de HO-1 se assemelha ao padrão de expressão diminuída de CSE na túnica média, embora não tenha sido encontrada a 3-MST em nenhuma amostra de artéria coronária, a CBS foi localizada na túnica externa (MERZ et al., 2017). Também a hemocisteína, um aminoácido presente no plasma relacionado ao desenvolvimento de doenças

cardiovasculares, pode desencadear respostas inflamatórias em macrófagos por meio da inibição da sinalização CSE/H<sub>2</sub>S (LI et al., 2015). O envolvimento da formação excessiva de NO, por associação da produção pelas NOS3 e NOS2, contribui para a disfunção vascular endotelial induzida pelo tratamento com doxorubicina, droga quimioterápica (OLUKMAN et al., 2009). Lin et al. (2016) sugerem que o H<sub>2</sub>S pode inibir o desenvolvimento de aterosclerose reduzindo a área de lesão aórtica, o acúmulo de lipídeos, o infiltrado de macrófagos e a proliferação celular por regulação ascendente de NO, estes efeitos se mostraram opostos com o uso da PAG. Apesar de não termos encontrado imunoreatividade a NOS2 em nossas amostras de aorta (dados não apresentados), em conjunto aos dados da literatura esses resultados novamente mostram a interação dos gasomoduladores nas respostas fisiopatológicas.

## 9 CONCLUSÃO

Concluimos que a ingestão, mesmo que aguda, de uma quantidade aumentada de  $\text{Na}^+$  na dieta, em valores que tentam mimetizar as variações no consumo humano (2 a 3 vezes o preconizado) modificou de maneira importante o balanço de água e  $\text{Na}^+$ , com repercussões em ao menos dois eixos neuroendócrinos (hipotálamo-neuro-hipofisário e HHA). Interessantemente, todas essas respostas adaptativas se desenvolveram mesmo na ausência de alterações comportamentais (aumento reflexo da ingestão de água) e plasmáticas (hiperosmolalidade/hipernatremia) evidentes. Esses achados foram acompanhados pelo desenvolvimento de uma clara resposta inflamatória em elementos tubulares e microvasculares renais, resposta esta extensiva, porém menos intensa, em uma grande artéria sistêmica. Por sua vez, a inibição da produção endógena de  $\text{H}_2\text{S}$  pela CSE, por meio do tratamento com PAG, preveniu a inflamação induzida pela dieta hipersódica, além de modular a secreção hormonal. Em suma, nossos dados sugerem que o  $\text{H}_2\text{S}$  tenha um papel pró-inflamatório importante, aparentemente contrarregulador do NO, que esteja envolvido nas alterações agudas desencadeadas pelo consumo excessivo de  $\text{Na}^+$ . Essas alterações, se mantidas em longo prazo, podem contribuir para a patogênese de distúrbios locais, principalmente renais, bem como sistêmicos, como a hipertensão arterial.

## REFERÊNCIAS

ABE, K.; KIMURA, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *The Journal of Neuroscience*, Washington, USA, v. 16, p. 1066–1071, 1996.

ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Lesions of the hypothalamus and pituitary inhibit volume-expansion-induced release of atrial natriuretic peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, Boston Interactive, Washington, USA, v. 88, n. 7, p. 2956-60, 1991. doi:10.1073/pnas.88.7.2956

ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiological Reviews*, American Physiological Society, San Diego, CA, USA, v. 84, p. 169-208, 2004. doi:10.1152/physrev.00017.2003

APPEL, L.J. et al. Effects of reduced sodium intake on hypertension control in older individuals: results from the Trial of Nonpharmacologic Interventions in the Elderly (TONE). *Archives of JAMA - Internal Medicine*, American Medical Association, USA, v. 161, n. 5, p. 685-693, 2001. doi:10.1001/archinte.161.5.685

ASIMAKOPOULOU, A. et al. Selectivity of commonly used pharmacological inhibitors for cystathionine  $\beta$  synthase (CBS) and cystathionine  $\gamma$  lyase (CSE). *British Journal of Pharmacology*, British Pharmacological Society, London, UK, v. 169, n. 4, p. 922-932, 2013. doi:10.1111/bph.12171

BALDO, M.P.; RODRIGUES, S.L.; MILL, J.G. High salt intake as a multifaceted cardiovascular disease: new support from cellular and molecular evidence. *Heart Failure Reviews*, Springer Science/Business Media New York, USA, v. 20, n. 4, p. 461-474, 2015. doi:10.1007/s10741-015-9478-7.

BAUDRAND, R. et al. High sodium intake is associated with increased glucocorticoid production, insulin resistance and metabolic syndrome. *Clinical endocrinology*, Australia, v. 80, n. 5, p. 677-684, 2014. doi:10.1111/cen.12225

BHATIA, M. et al. Hydrogen sulphide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw oedema in the rat. *British Journal of Pharmacology*. British Pharmacological Society, London, UK, v. 145, n. 2, p. 141-144, 2005. doi:10.1038/sj.bjp.0706186

BOS, E.M. et al. Cystathionine  $\gamma$ -Lyase Protects against Renal Ischemia/Reperfusion by Modulating Oxidative Stress. *Journal American Society of Nephrology*, USA, v. 24, p. 759-770, 2013. doi:10.1681/asn.2012030268



BREDT, D.S.; HWANG, P.M.; SNYDER, S.H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role of nitric oxide. *Nature*. v. 347, p. 768-770, 1990. doi:10.1038/347768a0

BRONOWICKA-ADAMSKA, P.; ZAGAJEWSKI, J.; WRÓBEL, M. An application of RP-HPLC for determination of the activity of cystathionine  $\beta$ -synthase and  $\gamma$ -cystathionase in tissue homogenates. *Nitric Oxide*, v. 46, p. 186-191, 2015. doi:10.1016/j.niox.2014.09.159

BROOKS, F.P.; PICKFOD, M. The effect of posterior pituitary hormones on the excretion of electrolytes, in dogs. *The Journal of Physiology*, Physiological Society, London, UK, v. 142, p. 468-493, 1958. doi:10.1113/jphysiol.1958.sp006031

du CAILAR, G. et al. Dietary sodium, aldosterone, and left ventricular mass changes during long-term inhibition of the renin-angiotensin system. *Hypertension*, Am. Heart Association, Dallas, USA, v. 56, n. 5, p. 865-870, 2010. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.159277

CANDELA, J.; VELMURUGAN, G.V.; WHITE, C. Hydrogen sulfide depletion contributes to microvascular remodeling in obesity. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. v. 310, p. H1071-H1080, 2016. doi:10.1152/ajpheart.00062.2016

CAPPUCCIO, F.P. et al. A community programme to reduce salt intake and blood pressure in Ghana [ISRCTN88789643]. *BioMed Central- BMC Public Health*. London, UK, v. 6, n. 1, 2006. doi:10.1186/1471-2458-6-13

CHEUNGPASITPORN, W. et al. Short-term tolvaptan increases water intake and effectively decreases urinary calcium oxalate, calcium phosphate and uric acid supersaturations. *The Journal of Urology*, American Urological Association Education and Research, USA, v. 195, n. 5, p. 1476-1481, 2016. doi:10.1016/j.juro.2015.11.027

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*, Elsevier, Cambridge, UK, v. 85, n. 3, p. 549-560, 2015. doi:10.1016/j.neuron.2014.12.048

CIURA, S.; LIEDTKE, W.; BOURQUE, C.W. Hypertonicity sensing in organum vasculosum lamina terminalis neurons: a mechanical process involving TRPV1 but not TRPV4. *Journal of Neuroscience*. Society for Neuroscience, Washington, USA, v. 31, n. 41, p. 14669-14676, 2011. doi:10.1523/JNEUROSCI.1420-11.2011

COLETTI, R. et al. Effects of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) on water intake and vasopressin and oxytocin secretion induced by fluid deprivation. *Hormones and Behavior*, Elsevier, USA, v. 67, p. 12-20, 2015. doi:10.1016/j.yhbeh.2014.11.008

CORNÉLIO, M.E. et al. Behavioural determinants of salt consumption among hypertensive individuals. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, British Dietetic Association, Germany, v. 25, p. 334-344, 2012. doi:10.1111/j.1365-277X.2012.01238.x

CUNHA, T.M. et al. Dual role of hydrogen sulfide in mechanical inflammatory hypernociception. *European Journal of Pharmacology*. Elsevier, v. 590, n. 1, p. 127-135, 2008. doi:10.1016/j.ejphar.2008.05.048

CUNNINGHAM, E.T.Jr.; SAWCHENKO, P.E. Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion. *Trends in Neurosciences*, Elsevier, USA, v. 14, n. 9, p. 406-11, 1991. doi:10.1016/0166-2236(91)90032-P

DAL-SECCO, D. et al. Hydrogen sulfide augments neutrophil migration through enhancement of adhesion molecule expression and prevention of CXCR2 internalization: role of ATP-sensitive potassium channels. *The Journal of Immunology*. Am Assoc Immunol, Rockville, MD. 181, n. 6, p. 4287-4298, 2008. doi: 10.4049/jimmunol.181.6.4287

DAMOISEAUX, J.G.M.C. et al. Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. *Immunology*. British Soc Immunol, v. 83, n. 1, p. 140-147, 1994.

DAS, A. et al. Hydrogen sulfide mediates the cardioprotective effects of gene therapy with PKG-I $\alpha$ . *Basic Research in Cardiology*, Springer-Verlag, Germany, v. 110, n. 4, p. 1-12, 2015. doi: 10.1007/s00395-015-0500-y

DELLO RUSSO, C. et al. Evidence that hydrogen sulphide can modulate hypothalamo-pituitary-adrenal axis function: In vitro and in vivo studies in the rat. *Journal of Neuroendocrinology*. Blackwell Science, v. 12, p. 225-233, 2000. doi: 10.1046/j.1365-2826.2000.00441.x

DIJKSTRA, C.D. et al. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. In: Klaus G.G.B. (eds) *Microenvironments in the Lymphoid System*, Springer, Boston, MA. p. 409-419, 1985. doi:10.1007/978-1-4613-2463-8\_50

EL-SAYED, S.S. et al. Cystathionine- $\gamma$  lyase-derived hydrogen sulfide mediates the cardiovascular protective effects of moxonidine in diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*. Elsevier, v. 783, p. 73-84, 2016. doi:10.1016/j.ejphar.2016.04.054

ERDEM, Y. et al. The relationship between hypertension and salt intake in Turkish population: SALTURK study. *Blood Pressure*. Taylor & Francis, UK, v. 19, n. 5, p. 313-318, 2010. doi:10.3109/08037051003802541

FENG, X. et al. Hydrogen sulfide from adipose tissue is a novel insulin resistance regulator. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier, v. 380, n. 1, p.153-159, 2009. doi:10.1016/j.bbrc.2009.01.059

FERGUSON, A.V.; RENAUD, L.P. Systemic angiotensin acts at subfornical organ to facilitate activity of neurohypophysial neurons. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, American Physiological Society, San Diego, CA, USA, v. 251, n. 4 Pt 2, p. R712-717, 1986.

FORECHI, L. et al. Effects of high and low salt intake on left ventricular remodeling after myocardial infarction in normotensive rats. *Journal of the American Society of Hypertension*. v. 9, n. 2, p. 77-85, 2015. doi:10.1016/j.jash.2014.11.006

FRANCESCATO, H.D.C. et al. Inhibition of hydrogen sulphide formation reduces cisplatin-induced renal damage. *Nephrology Dialysis Transplantation*, Oxford University Press, UK, v. 26, n. 2, p. 479-488, 2011a. doi:10.1093/ndt/gfq447

FRANCESCATO, H.D.C. et al. Role of endogenous hydrogen sulfide on renal damage induced by adriamycin injection. *Archives of Toxicology*, Springer-Verlag, v. 85, n. 12, p. 1597-1606, 2011b. doi:10.1007/s00204-011-0717-y

FRANCESCATO, H.D.C. et al. Effect of endogenous hydrogen sulfide inhibition on structural and functional renal disturbances induced by gentamicin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Brasil, v. 45, n. 3, p. 244-249, 2012. doi:10.1590/S0100-879X2012007500016

FRASSETTO, L.A. et al. Adverse effects of sodium chloride on bone in the aging human population resulting from habitual consumption of typical American diets. *The Journal of Nutrition*. Am Soc Nutrition, v. 138, n. 2, p. 419S-422S, 2008.

GADALLA, M.M.; SNYDER S.H. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. *Journal of Neurochemistry*. International Society for Neurochemistry, v. 113, n. 1, p. 14-26, 2010. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06580.x

GAO, S. et al. H<sub>2</sub>S protects PC12 cells against toxicity of corticosterone by modulation of BDNF-TrkB pathway. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. Oxford University Press, UK, v. 47, n. 11, p. 915-924, 2015. doi:10.1093/abbs/gmv098

GINA, Y.; SAMSON, W. Central action of hydrogen sulfide (703.1). *The FASEB Journal*. Federation of American Societies for Experimental Biology, USA, v. 28, n. 1, 2014.

GOMES, D.A. et al. Carbon monoxide and nitric oxide modulate hyperosmolality-induced oxytocin secretion by the hypothalamus in vitro. *Bioscience Reports*. Biochemical Society, London, UK, v. 30, n. 5, p. 351-357, 2010. doi:10.1042/BSR20090010

GOODWIN, L.R. et al. Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports. *Journal of Analytical Toxicology*. Oxford University Press, UK, v.13, p. 105-109, 1989. doi:10.1093/jat/13.2.105

GUO, X. et al. Down-regulation of hydrogen sulfide biosynthesis accompanies murine interstitial cells of Cajal dysfunction in partial ileal obstruction. *PLoS one*. San Francisco, CA, UK, v. 7, n. 11, p. e48249, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0048249

HIYAMA, T.Y. et al.  $\text{Na}_x$  channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nature Neuroscience*. v. 4, p. 511-512, 2002. doi:10.1038/nn856

HIYAMA, T.Y. et al. The subfornical organ is the primary locus of sodium-level sensing by  $\text{Na}_x$  sodium channels for the control of salt intake behavior. *Journal of Neuroscience*. Society Neuroscience, Washington, USA, v. 24, p. 9276-9281, 2004. doi:10.1523/JNEUROSCI.2795-04.2004

HOLBROOK, J.T. et al. Sodium and potassium intake and balance in adults consuming self-selected diets. *The American Journal of Clinical Nutrition*. American Society for Nutrition, Rockville, MD, v. 40, n. 4, p. 786-793, 1984.

HU, L.F. et al. Hydrogen sulfide: neurophysiology and neuropathology. *Antioxidants & Redox Signaling*. v. 15, n. 2, p. 405-419, 2011. doi:10.1089=ars.2010.3517

HU, Y. et al. Expression and distribution of heme oxygenase-2 mRNA and protein in rat kidney. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. Histochemical society, MD, USA, v. 46, p. 249-256, 1998. doi:10.1177/002215549804600214

HUANG, P. et al. Down-regulated CBS/ $\text{H}_2\text{S}$  pathway is involved in high-salt-induced hypertension in Dahl rats. *Nitric Oxide*. Elsevier, v. 46, p. 194-203, 2015.

IBGE. *Pesquisa Nacional de Saúde 2013: Percepção do estado de saúde, estilo de vida e doenças crônicas: Brasil, grandes regiões e unidades da federação*. Rio de Janeiro, Brasil, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2014.

JACKSON, K.E. et al. Inhibition of heme oxygenase augments tubular sodium reabsorption. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. v. 300, n. 4, p. F941-F946, 2011.

JAIN, S.K. et al. Relationship between hydrogen sulfide levels and HDL-cholesterol, adiponectin, and potassium levels in the blood of healthy subjects. *Atherosclerosis*. Elsevier, v. 225, n. 1, p. 242-245, 2012. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.08.036

KADEKARO, M.; SUMMY-LONG, J.Y. Centrally produced nitric oxide and the regulation of body fluid and blood pressure homeostasis. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. Australia, v. 27, p. 450-459, 2000. doi:10.1046/j.1440-1681.2000.03264.x

KASINATH, B.S. Hydrogen sulfide to the rescue in obstructive kidney injury. *Kidney International*. National Center for Biotechnology Information, Rockville, DM, USA, v. 85, n. 6, p. 1255-1258, 2014. doi:10.1038/ki.2013.529

KHADEMULLAH, C.S.; FERGUSON, A.V. Depolarizing actions of hydrogen sulfide on hypothalamic paraventricular nucleus neurons. *PLoS One*. San Francisco, CA, UK, v. 8, n. 5, p. 64495, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0064495

KIMURA, Y.; KIMURA, H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *The FASEB Journal*. USA, v. 18, p. 1165-1167, 2004. doi:10.1096/fj.04-1815fje

KLEINERT, H. et al. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *European J Pharmac*. Elsevier, v. 500, p. 255-266, 2004. doi:10.1016/j.ejphar.2004.07.030

KOSTOGLU-ATHANASSIOU, I. et al. Oxytocin release is inhibited by the generation of carbon monoxide as a neuromodulator. *Molecular Brain Research*. Elsevier, v. 42, p. 301-306, 1996. doi:10.1016/S0169-328X(96)00137-4

KUBO, S. et al. Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: Contribution to dual modulation of vascular tension. *Toxicology*. Elsevier, v. 232, n. 2, p. 138-146, 2007. doi:10.1016/j.tox.2006.12.023

LENKEI, Z. et al. Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. *Frontiers in Neuroendocrinology*. v. 18, n. 4, p. 383-439, 1997.

LEUCKER, T.M. et al. Cystathionine  $\gamma$ -lyase protects vascular endothelium: a role for inhibition of histone deacetylase 6. *Am J Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. Am Physiological Soc, v. 312, p. H711-H720, 2017. doi:10.1152/ajpheart.00724.2016

LI, J.J. et al. Homocysteine Triggers Inflammatory Responses in Macrophages through Inhibiting CSE-H<sub>2</sub>S Signaling via DNA Hypermethylation of CSE Promoter. *International Journal of Molecular Sciences*. v. 16, p. 12560-12577, 2015. doi:10.3390/ijms160612560

LI, L. et al. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *The FASEB Journal*. v. 19, n. 9, p. 1196-1198, 2005. doi:10.1096/fj.04-3583fje

LI, L.; HSU, A.; MOORE, P.K. Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation - a tale of three gases!. *Pharmacology & Therapeutics*, Elsevier, v. 123, p. 386-400, 2009. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.05.005

LI, L.; ROSE P.; MOORE, P.K. Hydrogen Sulfide and Cell Signaling. *Annual. Rev. Pharmacol. Toxicol.* University of Sussex, Brighton, UK, v. 51, p. 169-187, 2011. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010510-100505

LIN, Y. et al. Hydrogen sulfide inhibits development of atherosclerosis through up-regulating protein S-nitrosylation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS, v. 83, p. 466-476, 2016. doi:10.1016/j.biopha.2016.07.003

LIU, Y. et al. Adiponectin stimulates autophagy and reduces oxidative stress to enhance insulin sensitivity during high-fat diet feeding in mice. *Diabetes*. Am Diabetes Association, USA, v. 64, n. 1, p. 36-48, 2015. doi:10.2337/db14-0267

LIU, Y.H.; YAN, C.D.; BIAN, J.S. Hydrogen sulfide: a novel signaling molecule in the vascular system. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. USA, v. 58, n. 6, p. 560-569, 2011. doi:10.1097/FJC.0b013e31820eb7a1

LOPEZ, A.D. et al. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *The LANCET*. v. 367, n. 9524, p. 1747-1757, 2006.

LOU, L.X. et al. Hydrogen sulphide-induced hypothermia attenuates stress-related ulceration in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. v. 35, n. 2, p. 223-228, 2008. doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04812.x

ŁOWICKA, E.; BEŁTOWSKI, J. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) - the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacological Reports: PR*. v. 59, n. 1, p. 4-24, 2007.

LUNA-VÁZQUEZ, F.J. et al. Role of Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide in the Vasodilator Effect of Ursolic Acid and Uvaol from Black Cherry *Prunus serotina* Fruits. *Molecules*. v. 21, n. 1, p. 78, 2016. doi:10.3390/molecules21010078

MAINES, M.D. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. Palo Alto, CA, USA, v. 37, p. 517-554, 1997.

MANCUSO, C. et al. Activation of heme oxygenase and consequent carbon monoxide formation inhibits the release of arginine vasopressin from rat hypothalamic explants. Molecular linkage between heme catabolism and neuroendocrine function. *Molecular Brain Research*. Elsevier, v. 50, p. 267-6, 1997. doi:10.1016/S0169-328X(97)00197-6

MANCUSO, C.; NAVARRA, P.; PREZIOSI, P. Roles of nitric oxide, carbon monoxide, and hydrogen sulfide in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Journal of Neurochemistry*, v. 113, n. 3, p. 563-75, 2010. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06606.x

MANI, S. et al. Decreased Endogenous Production of Hydrogen Sulfide Accelerates Atherosclerosis. *Circulation*. Am Heart Association, Dallas, USA, v. 127, p. 2523-2534, 2013. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002208

MENG, J.; ADAIKAN, P.G.; SRILATHA, B. Hydrogen sulfide promotes nitric oxide production in corpus cavernosum by enhancing expression of endothelial nitric oxide synthase. *Intern J Impotence Research*. v. 25, n. 3, p. 86-90, 2013. doi:10.1038/ijir.2012.39

MERZ, T. et al. Cardiovascular disease and resuscitated septic shock lead to the downregulation of the H<sub>2</sub>S-producing enzyme cystathionine- $\gamma$ -lyase in the porcine coronary artery. *Intensive Care Medicine Experimental*. Springer open, v. 5, n. 17, p. 12, 2017. doi:10.1186/s40635-017-0131-8

MILLS, I.H.; WARD, P.E. The relationship between kallikrein and water excretion and the conditional relationship between kallikrein and sodium excretion. *The Journal of Physiology*. Physiological Society, UK, v. 246, n. 3, p. 695, 1975. doi:10.1113/jphysiol.1975.sp010911

MOLINA, M.D.C.B. et al. Hipertensão arterial e consumo de sal em população urbana. *Rev. Saúde Pública*. Faculdade de SP, Brasil, v. 37, n. 6, p. 743-50, 2003.

MUHSIN, S.A.; MOUNT, D.B. Diagnosis and treatment of hypernatremia. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. Elsevier, v. 30, n. 2, p. 189-203, 2016. doi:10.1016/j.beem.2016.02.014

NICCO, C.; BANKIR, L.; BOUBY, N. Effect of salt and water intake on epithelial sodium channel mRNA abundance in the kidney of salt-sensitive Sabra rats. *Cl Exp. Pharmacology and Physiology*. v. 30, n. 12, p. 963-965, 2003. doi:10.1111/j.1440-1681.2003.03941.x

OH, G.S. et al. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor- $\kappa$ B via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier, v. 41, n. 1, p. 106-119, 2006. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.03.021

OLIET, S.H.; BOURQUE, C.W. Mechanosensitive channels transduce osmosensitivity in supraoptic neurons. *Nature*. Springer, v.22364, n.6435, p. 341-3, 1993. doi:10.1038/364341a0

OLUKMAN, M. et al. Reversal of doxorubicin-induced vascular dysfunction by resveratrol in rat thoracic aorta: Is there a possible role of nitric oxide synthase inhibition?. *Anadolu Kardiyol Derg.* v. 9, p. 260-266, 2009.

OOSTERHUIS, N.R. *et al.* DL-propargylglycine reduces blood pressure and renal injury but increases kidney weight in angiotensin-II infused rats. *Nitric Oxide*. Elsevier, v. 49, p. 56-66, 2015. doi:10.1016/j.niox.2015.07.001

ORAVA, J. et al. Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. *Cell Metabolism*. Elsevier, USA, v. 14, n. 2, p. 272-279, 2011. doi:10.1016/j.cmet.2011.06.012

PALMER, R.M.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. Springer, v. 327, p. 524-6, 1987. doi:10.1038/327524a0

PAPAPETROPOULOS, A. et al. Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Nat Academy of Sci/Boston Interactive, v. 106, n. 51, p. 21972-21977, 2009. doi:10.1073/pnas.0908047106

PASTERNAK, B.L. *Doktor Jivago*. Feltrinelli, Itália, 1957.

PAUTZ, A. et al. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide*. Elsevier, v. 23, p. 75-93, 2010. doi:10.1016/j.niox.2010.04.007

PEDERSEN, W.A.; RUIQIAN, W.; MARK, P.M. Impact of aging on stress-responsive neuroendocrine systems. *Mechanisms of Ageing and Development*. Elsevier, v. 122, n. 9, p. 963-983, 2001. doi:10.1016/S0047-6374(01)00250-0

PERIN, M.S. et al. Caracterização do consumo de sal entre hipertensos segundo fatores sociodemográficos e clínicos. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*. Redalyc, Universidade de SP, Brasil, v. 21, n. 5, p. 1013-1021, 2013.

PHILLIPS, M.I.; HEININGER, F.; TOFFOLO, S. The role of brain angiotensin in thirst and AVP release induced by hemorrhage. *Regulatory Peptides*. Elsevier B.V, v. 66, p. 3-11, 1996. doi:10.1016/0167-0115(96)00088-2



QI, Y.C. et al. H<sub>2</sub>S protecting against lung injury following limb ischemia-reperfusion by alleviating inflammation and water transport abnormality in rats. *Biomedical and Environmental Sciences*. Elsevier, v. 27, n. 6, p. 410-418, 2014. doi:10.3967/bes2014.070

REED, D.J. Cystathionine. *Methods Enzymol.* Elsevier, v. 252, p. 92-102, 1995. doi:10.1016/0076-6879(95)52012-0

REIS, W.L. et al. Central nitric oxide blocks vasopressin, oxytocin and atrial natriuretic peptide release and antidiuretic and natriuretic responses induced by central angiotensin II in conscious rats. *Exp Physiol.* v. 92, n. 5, p. 903-11, 2007. doi:10.1113/expphysiol.2007.037911

RODRIGUES, S.L. et al. Relationship between salt consumption measured by 24-h urine collection and blood pressure in the adult population of Vitória (Brazil). *Brazilian J Medical and Biological Research.* v. 48, n. 8, p. 728-735, 2015. doi:10.1590/1414-431X20154455

ROY, A. et al. Interdependency of cystathione  $\gamma$ -lyase and cystathione  $\beta$ -synthase in hydrogen sulfide-induced blood pressure regulation in rats. *American Journal of Hypertension*. Oxford University Press, UK, v. 25, n. 1, p. 74-81, 2012. doi:10.1038/ajh.2011.149

SAAD, W.A. et al. Interaction between supraoptic nucleus and septal area in the control of water, sodium intake and arterial blood pressure induced by injection of angiotensin-II. *Pharmacol Biochem Behavior.* v. 77, p. 667-674, 2004. doi:10.1016/j.pbb.2004.01.013

SANDSTRÖM, Y.K. et al. Psychiatric comorbidities in patients with hypertension-a study of registered diagnoses 2009-2013 in the total population in Stockholm County, Sweden. *Journal of Hypertension.* 2016. doi:10.1097/HJH.0000000000000824

SARNO, F. et al. Estimativa de consumo de sódio pela população brasileira, 2002-2003. *Rev. Saúde Pública.* v. 43, n. 2, p. 219-225, 2009. doi:10.1590/S0034-89102009005000002

SARNO, F. et al. Estimativa de consumo de sódio pela população brasileira, 2008-2009. *Rev. Saúde Pública.* Faculdade de Medicina USP, Brasil, v. 47, n. 2, p. 571-578, 2013.

SHIBUYA, N. et al. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxidants & Redox Signaling.* USA, v. 11, n. 4, p. 703-714, 2009a. doi:10.1089/ars.2008.2253

SHIBUYA, N. et al. Vascular Endothelium Expresses 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase and Produces Hydrogen Sulfide. *The Journal of Biochemistry.* Oxford University Press/behalf of the Japanese Biochemical Society. v. 46, n. 5, p. 623-626, 2009b. doi:10.1093/jb/mvp111

SOARES, T.J. et al. Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of GMPc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. National Academy of Sciences, v. 96, p. 278-283, 1999. doi:10.1073/pnas.96.1.278

SONG, K. et al. Hydrogen sulfide inhibits the renal fibrosis of obstructive nephropathy. *Kidney International*. v. 85, n. 6, p. 1318-1329, 2014. doi:10.1038/ki.2013.449

SPILLER, F. et al. Hydrogen sulfide improves neutrophil migration and survival in sepsis via K<sup>+</sup> ATP channel activation. *American J Respiratory and Critical Care Medicine*. Am Thoracic Soc, v. 182, n. 3, p. 360-368, 2010. doi:10.1164/rccm.200907-1145OC

STANFORD, Kristin I. et al. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clinical Investigation*. v. 123, n. 1, p. 215-223, 2013. doi:10.1172/JCI62308

SUM, Q. et al. Structural Basis for the Inhibition Mechanism of Human Cystathionine  $\gamma$ -Lyase, an Enzyme Responsible for the Production of H<sub>2</sub>S. *The J Biological Chemistry*. Am Soc Biochem Mol Bio, v. 284, p. 3076-3085, 2009. doi:10.1074/jbc.M805459200

SZABÓ, C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature Reviews Drug Discovery*. v. 6, n. 11, p. 917-935, 2007. doi:10.1038/nrd2425

TSAI, C.Y. et al. Hydrogen sulfide promotes adipogenesis in 3T3L1 cells. *PloS one*. San Francisco, CA, UK, v. 10, n. 3, p. e0119511, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0119511

TSUGANE, S.; SASAZUKI, S. Diet and the risk of gastric cancer: review of epidemiological evidence. *Gastric Cancer*. Springer, v.10, n.2, p.75-83, 2007. doi:10.1007/s10120-007-0420-0

VENTURA, R.R. et al. Nitric oxide modulates the firing rate of the rat supraoptic magnocellular neurons. *Neuroscience*. Elsevier, v. 155, n. 2, p. 359-65, 2008.

VILLAR, M.J. et al. Nitric oxide synthase increases in hypothalamic magnocellular neurons after salt loading in the rat. An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Brain Research*. Elsevier, v. 644, p. 273-281, 1994. doi:10.1016/0006-8993(94)91690-X

VISCONTI, L. et al. The Myth of Water and Salt: From Aquaretics to Tenapanor. *Journal of Renal Nutrition*. National Kidney Foundation, 2017. doi:10.1053/j.jrn.2017.06.005

VOISIN, D.L.; BOURQUE, C.W. Integration of sodium and osmosensory signals in vasopressin neurons. *Trends in Neuroscience*. Elsevier, v. 25, p. 199-205, 2002.

WALLACE, J.L. Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drugs. *Trends in Pharmacological Sciences*. v. 28, n. 10, p. 501-505, 2007. doi:10.1016/j.tips.2007.09.003

WANG, X.H. et al. Dysregulation of cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE)/hydrogen sulfide pathway contributes to ox-LDL-induced inflammation in macrophage. *Cellular Signaling*. Elsevier, v. 25, n. 11, p. 2255-2262, 2013. doi:10.1016/j.cellsig.2013.07.010

WANG, R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiological Rev.* Am Physiological Soc, v. 92, p. 791-896, 2012. doi:10.1152/physrev.00017.2011

WANG, R. Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter?. *The FASEB J.* v. 16, n. 13: p. 1792-1798, 2002. doi:10.1096/fj.02-0211hyp

WARENYCIA, M.W. et al. Acute hydrogen sulfide poisoning. Demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels. *Biochemistry Pharmacology*. Elsevier, v. 38, p. 973-981, 1989. doi:10.1016/0006-2952(89)90288-8

WESSELING, S. et al. Beneficial effects of diminished production of hydrogen sulfide or carbon monoxide on hypertension and renal injury induced by NO withdrawal. *British Journal of Pharmacology*. 172, n. 6, p. 1607-1619, 2015. doi:10.1111/bph.12674

WHO. *Guideline: Sodium intake for adults and children*. Geneva, USA, World Health Organization. 2012. Disponível em: <[http://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sodium\\_intake\\_printversion.pdf](http://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sodium_intake_printversion.pdf)>. Acessado em: 9/dez/2015.

XIAO, F. et al. Hydrogen sulfide inhibits MPP<sup>+</sup>-induced aldehyde stress and endoplasmic reticulum stress in PC12 cells: involving upregulation of BDNF. *Experimental Cell Research*. Elsevier, v. 348, n. 1, p. 106-114, 2016. doi:10.1016/j.yexcr.2016.09.006

YAN, S.K. et al. Effects of hydrogen sulfide on homocysteine-induced oxidative stress in vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier, v. 351, p. 485-491, 2006. doi:10.1016/j.bbrc.2006.10.058

YAN, H.; DU, J.; TANG, C. The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier, v. 313, n. 1, p. 22-27, 2004. doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.081

YANG, G. et al. H<sub>2</sub>S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine  $\gamma$ -lyase. *Science*. American Association for the Advancement of Science, Washington, USA, v. 322, n. 5901, p. 587-590, 2008. doi:10.1126/science.1162667

YASUDA, Y. et al. High oxygen modifies vasodilator effect of cysteine via enhanced oxidative stress and thromboxane production in the rat mesenteric artery. *Pflügers Archiv-European J Physiol*, Springer, v. 468, n. 9, p. 1555-64, 2016. doi:10.1007/s00424-016-1857-y

YI, B. et al. Effects of dietary salt levels on monocytic cells and immune responses in healthy human subjects: a longitudinal study. *Translational Research*. Elsevier, v. 166, n. 1, p. 103-110, 2015. doi:10.1016/j.trsl.2014.11.007

ZAICHKO, N.V. et al. Hydrogen sulfide: metabolism, biological and medical role. *The Ukrainian Biochemical Journal*. v. 86, n. 5, p. 5-25, 2014.

ZANARDO, R.C. et al. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *The FASEB Journal*. v. 20, n. 12, p. 2118-2120, 2006. doi:10.1096/fj.06-6270fje

ZHANG, H. et al. Hydrogen sulfide acts as an inflammatory mediator in cecal ligation and puncture-induced sepsis in mice by upregulating the production of cytokines and chemokines via NF- $\kappa$ B. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. Am Physiological Soc, v. 292, n. 4, p. L960-L971, 2007. doi:10.1152/ajplung.00388.2006

ZHANG, J.; SNYDER, S.H. Nitric oxide in the nervous system. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. Palo Alto, CA, USA, v. 35, p. 213-33, 1995. doi:10.1146/annurev.pa.35.040195.001241

ZHAO, W. et al. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *The EMBO Journal*. v. 20, p. 6008-6016, 2001. doi:10.1093/emboj/20.21.6008

ZHOU, X. et al. Variation in dietary salt intake induces coordinated dynamics of monocyte subsets and monocyte-platelet aggregates in humans: implications in end organ inflammation. *PloS one*. San Francisco, CA, UK, v. 8, n. 4, p. e60332, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0060332

ZOU, A.P. et al. Expression and actions of heme oxygenase in the renal medulla of rats. *Hypertension*. Am Heart Association, Dallas, USA, v. 35, p. 342-347, 2000. doi:10.1161/01.HYP.35.1.342

## ANEXO

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética para Uso de Animais



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Universidade Federal de Alfenas . Unifal-MG**  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 . Alfenas/MG . CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 06 de março de 2015.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sílvia Graciela Ruginsk Leitão

Prezada Professora,

O projeto sob a sua coordenação, registrado sob o nº 613/2015, intitulado “Participação de vias de síntese endógena do modulador gasoso sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) nas respostas homeostáticas induzidas por alterações da osmolalidade *in vitro* e *in vivo*”, com início previsto para 03/2015 e término previsto para 28/02/2017 foi avaliado pela CEUA em reunião ordinária de 05/03/2015 e Aprovado.

Informamos que um relatório final deverá ser enviado a CEUA em até 30 dias após o término da pesquisa. O modelo do relatório será disponibilizado em breve no site da CEUA/UNIFAL.

Atenciosamente,

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Estela R. Oliveira  
Presidente do CEUA/UNIFAL-MG