



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

NATÁLIA KIMIE MATSUBARA

**EFEITO CARDIOVASCULAR CENTRAL E PERIFÉRICO DO  
ÁCIDO FÓLICO EM RATOS COM HIPERTENSÃO SENSÍVEL  
AO SAL**

NATÁLIA KIMIE MATSUBARA

**EFEITO CARDIOVASCULAR CENTRAL E PERIFÉRICO DO  
ÁCIDO FÓLICO EM RATOS COM HIPERTENSÃO SENSÍVEL  
AO SAL**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, associada Universidade Estadual de Londrina-PR, como requisito para a obtenção de título de mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Gislaine Garcia Pelosi Gomes.

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Matsubara, Natália Kimie.

Efeito cardiovascular central e periférico do ácido fólico em ratos com hipertensão sensível ao sal / Natália Kimie Matsubara. - Londrina, 2017.

42 f. : il.

Orientador: Gislaine Garcia Pelosi Gomes.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências

Fisiológicas - Multicêntrico, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Hipertensão - Tese. 2. Dieta - Tese. 3. Sal - Tese. 4. Ácido fólico - Tese. I. Pelosi Gomes, Gislaine Garcia . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico. III. Título.

NATÁLIA KIMIE MATSUBARA

**EFEITO CARDIOVASCULAR CENTRAL E PERIFÉRICO DO ÁCIDO  
FÓLICO EM RATOS COM HIPERTENSÃO SENSÍVEL AO SAL**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, associada Universidade Estadual de Londrina – PR, como requisito para a obtenção de título de mestre em Ciências Fisiológicas.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Gislaine Garcia  
Pelosi Gomes  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Marli Cardoso Martins Pinge  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Karen Barros Parron Fernandes  
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Londrina, 3 de março de 2017.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gislaïne Garcia Pelosi Gomes por aceitar me orientar novamente, desta vez no mestrado, e pela sua constante orientação, paciência, ensinamentos e disposição.

Agradeço a minha família pelo suporte e compreensão ao longo dessa jornada na pós-graduação e toda a carreira acadêmica. Em especial ao meu irmão Vitor Cesar Matsubara, que me acompanhou nos finais de semana.

Aos meus colegas de laboratório, que compartilharam de seus conhecimentos e experiências comigo, e por me ajudarem sempre que eu precisei. Agradeço também por todos os bons momentos e descontração que me proporcionaram.

Agradeço a Andressa Buseti Martins, por ter me acompanhado novamente, nesses 2 anos de mestrado, por ter me ouvido quando precisei desabafar e por ter compartilhado bons momentos comigo. Obrigada pela paciência.

Agradeço a todos os professores que, passaram por mim nessa jornada e contribuíram para o meu crescimento profissional e por todos os ensinamentos.

Aos técnicos do departamento de Ciências Fisiológicas, que contribuíram na realização dessa dissertação.

A todos os meus amigos pela paciência e compreensão de vocês.

A todos que passaram pela minha vida, seja de maneira breve ou de forma duradoura, pois com certeza contribuíram para que eu chegasse até aqui. Obrigada pelos conselhos e crescimento pessoal.

Por fim, agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo financiamento e por permitirem que este projeto se concretizasse.

MATSUBARA, Natália Kimie. **Efeito cardiovascular central e periférico do ácido fólico em ratos com hipertensão sensível ao sal.** 2017. 42 f. Dissertação de Mestrado (Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

A hipertensão arterial é o principal fator de risco para doenças cardiovasculares, tendo como uma das causas a alta ingestão de sal (NaCl). A substância cinzenta periaquedutal (PAG) é uma estrutura mesencefálica envolvida na função cardiovascular. Sabendo que deficiência de ácido fólico (AF) pode levar a taxas mais elevadas de doenças vasculares, objetivo desse estudo foi investigar o efeito cardiovascular periférico e central (PAGd) do ácido fólico em animais com hipertensão sal sensível. Assim, ratos Wistar foram submetidos ao protocolo de indução de hipertensão, recebendo NaCl (1,8%) por 30 dias (HYP), ou água de torneira (CTR). Ao término do protocolo, parte dos animais dos grupos HYP e CTR foram mantidos sob dieta normossódica por 10 dias (HYP+10 e CTR+10, respectivamente) e sua pressão arterial registrada. No subgrupo dos animais HYP, ao final do tratamento, foi administrado intra-PAGd ácido fólico (3, 9 ou 15nmol/50nL) ou salina (50nL) para registro da pressão arterial. Outro subgrupo dos animais HYP, ao final do tratamento, receberam por via intraperitoneal (ip.) salina ou ácido fólico (5 ou 10 mg/Kg) por 3 dias consecutivos e foram submetidos ao estresse de restrição agudo. A alta ingestão de sódio induziu aumento na pressão arterial média (PAM) ( $P=0,0002$ ). Entretanto, não houve diferenças estatisticamente significantes na frequência cardíaca (FC). O grupo HYP+10 manteve a PAM aumentada após 10 dias de descontinuação da dieta ( $P=0,0221$ ). A microinjeção de AF intra PAGd causou diminuição da PAM em animais hipertensos na dose 9nmol/50nL ( $\Delta$ PAM: Tempo:  $P=0,0844$ ; Tratamento:  $P=0,0064$ ), e 15 nmol/50nL ( $\Delta$ PAM: Tempo:  $P=0,6929$ ; Tratamento:  $P=0,0019$ ). Da mesma forma, a administração ip. de AF por 3 dias causou uma diminuição da PAM em animais hipertensos tanto na dose de 5 mg/Kg ( $P=0,0162$ ) quanto na dose de 10 mg/Kg ( $P=0,0129$ ). Não foram observadas alterações na resposta cardiovascular ao estresse de restrição agudo. Em conclusão, o AF atenua a hipertensão sensível ao sal em ratos de maneira aguda, tanto sistemicamente quanto via PAGd, sugerindo uma possível participação do sistema nervoso central nessa hipertensão e revelando um potencial adjuvante no tratamento da hipertensão.

**Palavras-chave:** Hipertensão. Dieta. Sal. Ácido fólico. PAGd.

MATSUBARA, Natália Kimie. **Central and peripheral cardiovascular effect of folic acid in rats with salt-sensitive hypertension**. 2017. 42 p. Master's Dissertation (Multicentric Program of Post Graduation in Physiological Sciences) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## ABSTRACT

Arterial Hypertension is the main risk factor for cardiovascular diseases, and high salt (NaCl) intake is one of its causes. The dorsal region of periaqueductal gray matter (dPAG) is a mesencephalic structure involved in cardiovascular function. Since folic acid (FA) deficiency may lead to higher rates of vascular diseases, this study investigated the peripheral and central cardiovascular effects of FA and of animals with salt-sensitive hypertension. Rats were submitted to the hypertension induction protocol, receiving NaCl (1.8%) for 30 days (HYP), or water (CTR). At the end of the protocol, part of the animals from HYP and CTR groups were kept on normosodic diet for 10 days (HYP+10 and CTR+10, respectively) and their blood pressure was recorded. On HYP subgroup animals, at the end of treatment, it was administered FA (3, 9 or 15nmol/50nL) or saline (50nL) intra-dPAG for blood pressure recording. Another subgroup of HYP animals, at the end of treatment, received intraperitoneally (ip.) saline or FA (5 or 10 mg/kg) for three consecutive days and they were submitted to acute restraint stress. High salt intake induced an increase of mean arterial pressure (MAP) ( $P=0.0002$ ). However, there were no statistically significant differences in heart rate (HR). The HYP+10 group maintained an increase of MAP after 10 days of diet discontinuation ( $P=0.0221$ ). FA microinjection into dPAG caused a decrease in MAP of hypertensive animals at 9nmol/50nL ( $\Delta$ MAP: Time:  $P=0.0844$ ; Treatment:  $P=0.0064$ ), and 15nmol/50nL doses ( $\Delta$ MAP: Time:  $P=0.6929$ ; Treatment:  $P=0.0019$ ). Similarly, ip. administration of FA for three days induced a decrease in MAP of hypertensive animals at both doses of 5 mg/Kg ( $P=0.0162$ ) and 10 mg/kg ( $P=0.0129$ ). No changes were observed in acute restraint stress cardiovascular response. In conclusion, FA attenuates salt-sensitive hypertension in rats acutely, both systemically and via dPAG, suggesting the possible involvement of central nervous system in this hypertension and revealing its potential adjuvant in treatment of hypertension.

**Key words:** Hypertension. Diet. Salt. Folic acid. dPAG.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 -</b>	Delineamento experimental. ....	17
<b>Figura 2 -</b>	Efeito da dieta com alto teor de sal .....	20
<b>Figura 3 -</b>	Após 10 dias de normalização da dieta .....	22
<b>Figura 4 -</b>	Efeito da administração periférica de ácido fólico .....	24
<b>Figura 5 -</b>	Estresse de restrição agudo .....	26
<b>Figura 6 -</b>	Efeito da microinjeção de ácido fólico .....	28
<b>Figura 7 -</b>	Representação diagramática das secções cerebrais.....	29



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>13</b>
3.1	ANIMAIS E TRATAMENTO EXPERIMENTAL .....	13
3.2	DROGAS .....	13
3.3	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA PARA IMPLANTAÇÃO DA CÂNULA GUIA .....	14
3.4	ANÁLISE DE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES.....	14
3.5	TRATAMENTO PERIFÉRICO .....	15
3.6	ESTRESSE DE RESTRIÇÃO AGUDO .....	16
3.7	MICROINJEÇÃO DE DROGAS .....	16
3.8	HISTOLOGIA .....	16
3.9	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	17
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	18
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>19</b>
4.1	ANIMAIS E TRATAMENTO EXPERIMENTAL .....	19
4.2	EFEITO APÓS 10 DIAS DE NORMALIZAÇÃO DA DIETA.....	21
4.3	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO PERIFÉRICA DE ÁCIDO FÓLICO EM RATOS HIPERTENSOS SAL-SENSÍVEIS.....	23
4.4	EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO PERIFÉRICA DE ÁCIDO FÓLICO EM RATOS HIPERTENSOS SAL-SENSÍVEIS DURANTE O ESTRESSE DE RESTRIÇÃO AGUDO.....	25
4.5	EFEITO DA MICROINJEÇÃO CENTRAL DE ÁCIDO FÓLICO EM RATOS HIPERTENSOS SAL-SENSÍVEIS.....	27
4.5	DETERMINAÇÃO HISTOLÓGICA DOS SÍTIOS DE MICROINJEÇÃO.....	29
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>34</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>35</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O controle da pressão arterial pode ser realizado a longo prazo, através de hormônios como o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA); a curto prazo (via neural), através de núcleos bulbares e suprabulbares; ou ainda, por mecanismos locais. No controle neural, quando há uma mudança na pressão arterial, o mecanismo barorreflexo promove ajustes rápidos por meio de barorreceptores e áreas bulbares (DAMPNEY, 1994; DAMPNEY et al., 2002). Através de integrações com as regiões do núcleo do trato solitário (NTS) e da região ventrolateral caudal do bulbo (CVLM), a região ventrolateral rostral do bulbo (RVLM) modula a saída simpática direcionada para o sistema cardiovascular para ajustes da pressão arterial. Ainda, regiões suprabulbares como a substância cinzenta periaquedutal (PAG), núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), hipotálamo dorsomedial e amígdala possuem projeções para as áreas bulbares, assim influenciando suas respostas cardiovasculares em diferentes situações (DAMPNEY et al., 1994; DAMPNEY et al., 2002).

A PAG é uma estrutura mesencefálica envolvida em diversas funções biológicas inclusive na integração das respostas comportamentais e cardiovasculares (HUANG et al., 2000). Huang et al. (2000) descrevem que a PAG, junto com o NTS, controla as funções cardiorrespiratórias por uma via noradrenérgica, demonstrando a importância dessa área na modulação cardiovascular. A PAG é subdividida anatomicamente em quatro colunas longitudinais: a região dorsomedial (dmPAG), dorsolateral (dlPAG), lateral (lPAG) e ventrolateral (vlPAG), que diferem em relação a suas propriedades funcionais, químicas e conexões anatômicas (DAMPNEY et al., 2013). A estimulação química com aminoácidos excitatórios na PAGdm, também conhecida como PAG dorsal (PAGd), evoca respostas pressoras e taquicárdica em ratos (ROSSI et al., 1994; BANDLER et al., 2000), e outros estudos demonstram que a microinjeção de noradrenalina nessa área evoca resposta pressora mediada por liberação periférica de vasopressina (PELOSI & CORRÊA, 2005; PELOSI et al., 2006). Resstel et al. (2008) sugerem em seu estudo que a hipertensão induzida pelo consumo de etanol é mantida pela liberação de vasopressina, já que nesse modelo de hipertensão a diurese é intensa inicialmente. Assim, acredita-se que a PAGd, por atuar principalmente na modulação da resposta pressora no sistema cardiovascular

mediada por liberação de vasopressina, possa estar envolvida na hipertensão sal-sensível, já que este também é um modelo onde a diurese é intensa.

Quando há um desbalanço no controle cardiovascular, diversas doenças podem se desenvolver. A hipertensão arterial é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial. Esta condição é o principal fator de risco para doenças cardiovasculares e leva ao óbito aproximadamente 9,4 milhões de pessoas por ano no mundo, sendo cerca de 1,7 milhões desses óbitos atribuídos ao consumo de sódio (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). A manutenção da pressão arterial elevada resulta em alterações estruturais e funcionais em órgãos alvo como coração, encéfalo, rim e vasos sanguíneos, levando a doenças como hipertrofia ventricular esquerda, angina, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular encefálico (AVE), nefropatia hipertensiva, doença vascular periférica, entre outras (FUCHS et al, 1994).

A hipertensão arterial pode ser classificada em primária ou essencial, onde a causa subjacente ao seu desenvolvimento não é conhecida e não possui causas secundárias (FERRARI & KROZOWSKI, 2000), e secundária, sendo a causa conhecida e podendo ser de origem renal, vascular, endócrina ou neurogênica (SIMONETTI et al., 2002). A hipertensão essencial humana corresponde a cerca de 95% de todos os casos de hipertensão, e é uma doença relacionada com a ingestão do sal, já que sociedades com dieta de baixo teor de sal não possuem hipertensão. No entanto, se essas pessoas migram para uma sociedade de alto consumo de sal, cerca de 30% irá apresentar um aumento significativo na pressão arterial (TOBIAN, 1991; CARRETERO & OPARIL, 2000). Da mesma forma, há determinadas linhagens de ratos que desenvolvem um aumento significativo na pressão arterial quando colocados sob uma dieta de alto teor salino (TOBIAN, 1991). Esses indivíduos são chamados sal-sensíveis, e sua pressão arterial aumenta em 10% ou mais em relação à pressão arterial basal quando ingerem sal (AMODEO & HEIMANN, 1998).

Um achado frequente entre os pacientes sensíveis ao sal com hipertensão essencial é um aumento na retenção de sódio durante dieta rica em sal (CAMPESE, 1994). Ainda, segundo Campese (1994), a elevação relacionada com sal na pressão sanguínea é mantida principalmente por aumento da resistência vascular periférica. Para Poch et al. (2001), este fenótipo é heterogêneo entre os indivíduos e cerca de 50% dos pacientes com hipertensão são sensíveis ao sal.

Além disso, estima-se que 25% dos indivíduos normotensos sejam sal-sensíveis. (WEINBERGER, 1996). Dos Santos et al. (2006) verificaram que ratos Wistar em uma dieta de alto teor de sódio por 4 semanas apresentam aumento da pressão arterial com alterações sítio-específicas na reatividade vascular em resposta à fenilefrina.

Um fator de risco estabelecido para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares é a hiperhomocisteinemia. A hiperhomocisteinemia é o excesso do aminoácido homocisteína (Hcy) no sangue, o qual contém enxofre tóxico que pode induzir disfunção neuronal e morte celular. Ela está bem estabelecida como marcador de risco para doença arterial coronariana (CLARKE et al., 1991; STAMPFER et al., 1992; HANKEY & EIKELBOOM, 1999). O ácido fólico, também conhecido como vitamina B9, é um cofator de reação enzimática essencial para a formação celular, que promove a metilação da Hcy. Folato é a forma desprotonada do ácido fólico, obtida da dieta, enquanto que o ácido fólico é a forma sintética utilizada para fortificar alimentos e suplementos nutricionais (DJUKIC, 2007). A deficiência de ácido fólico resulta em rupturas de cadeia de DNA e hipometilação de DNA através de níveis elevados de Hcy (POGRIBNY et al., 1997). Essa deficiência está relacionada a taxas mais elevadas de doenças vasculares (BOUSHEY et al., 1995). Comprovando esta relação, Stanger et al., (2002) demonstrou que o tratamento com ácido fólico diminui os níveis de Hcy e, por consequência, diminui a reatividade do vaso de resistência à hiperemia reativa pós-isquêmica em pacientes com aterosclerose. A concentração de Hcy aumenta significativamente com a terapia diurética a longo prazo, com depleção dos estoques de folato (TAYLOR et al., 1991; MORROW & GRIMSLEY, 1999), o que pode prejudicar o tratamento. Huo et al. (2015) demonstraram que a terapia com o ácido fólico reduz em 21% o risco primário de acidentes vasculares encefálicos em pacientes hipertensos na China, quando comparado com o tratamento anti-hipertensivo por si só. Portanto, acredita-se que a suplementação de ácido fólico pode diminuir também o aumento da pressão arterial causado pela hipertensão e ser utilizado como tratamento para a mesma.

Ainda, o estresse também tem sido descrito como um fator de risco para doenças cardiovasculares, intensificando respostas simpáticas, contribuindo para o aumento da contratilidade e frequência cardíaca. Inicialmente, a resposta ao estresse objetiva uma adaptação do organismo para uma situação de “luta ou fuga”,

porém a ativação aumenta a secreção de glicocorticóides e intensifica a estimulação simpática, afetando diretamente o sistema cardiovascular (WITTSTEIN, 2012; HERMAN, 2013). Em indivíduos com hipertensão, o estresse pode causar um infarto ou AVE, podendo levar à óbito (FUCHS et al, 1994). Na sociedade atual, o estresse está presente no cotidiano dos indivíduos, o que favorece a importância do combate à hipertensão e outras doenças para evitar o surgimento de novas patofisiologias.

Sabe-se que a hipertensão é uma das principais causas de mortalidade no mundo, e que o alto consumo de sal pode causar essa patologia. Apesar do conhecimento de que o ácido fólico age benéficamente em determinadas patologias cardiovasculares, e que a PAG modula a função cardiovascular, não se conhecem estudos que sugerem o ácido fólico como tratamento para a hipertensão, tampouco a interação dessa vitamina com a PAGd e o estresse. Portanto, o presente estudo avaliou se a administração de ácido fólico em ratos com hipertensão induzida por sal pode reduzir a pressão arterial desses animais em condições basal e de estresse, e se existe a participação da PAG nessa modulação.

## 2. OBJETIVO

### 2.1 GERAL

Avaliar o efeito da administração de ácido fólico sistêmico e intra PAGd em animais com hipertensão sal-sensível sobre parâmetros cardiovasculares.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- I) Induzir a hipertensão sal-sensível em ratos normotensos através da ingestão de NaCl 1,8%
- II) Verificar se a hipertensão se mantém após a retirada da ingestão de NaCl 1,8%
- III) Avaliar o efeito sistêmico do ácido fólico em parâmetros cardiovasculares de ratos com hipertensão induzida por ingestão de NaCl 1,8%
- IV) Avaliar o efeito da administração periférica de ácido fólico em ratos hipertensos sal-sensíveis durante o estresse de restrição agudo
- V) Avaliar o efeito cardiovascular da microinjeção de ácido fólico na PAGd de ratos com hipertensão induzida por ingestão de NaCl 1,8%

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 ANIMAIS E TRATAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados ratos Wistar com 55 dias de idade, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da UEL. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas sob condições padronizadas (temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , sob um ciclo claro-escuro de 12 horas) e água e ração à vontade (CEUA processo n.9067.2015.68).

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais (Fig.1): 1) grupo hipertensão (HYP), onde NaCl (1,8%) foi administrado por 30 dias dissolvido em água potável a vontade (SANTOS et al, 2006; Fig. 1A); 2) grupo controle (CTR), os quais não foram submetidos ao protocolo de hipertensão e não receberam as drogas (Fig. 1A); 3) grupo hipertensão + 10 dias (HYP+10), no qual os animais hipertensos do protocolo de hipertensão receberam água potável por 10 dias após o protocolo (Fig. 1A); 4) grupo hipertensão + droga periférica (HYP+DP), onde os animais deste grupo foram submetidos ao protocolo de hipertensão por sódio 1,8% e receberam por via intraperitoneal (ip.) salina ou ácido fólico em diferentes concentrações por 3 dias consecutivos (5 ou 10 mg/Kg; adaptado de MATTÉ et al., 2006) e passaram pelo estresse de restrição agudo (Fig. 1B); 5) grupo hipertensão + droga central (HYP+DC), onde os animais deste grupo foram submetidos ao protocolo de hipertensão por sódio 1,8% e receberam por via PAGd salina ou ácido fólico em diferentes concentrações de forma aguda (3, 9 ou 15 nmol/50 nL; adaptado de TALLAKSEN et al., 1992; Fig. 1C).

#### 3.2 DROGAS

As drogas tribromoetanol ( $\text{Br}_3\text{CICH}_2\text{OH}$ ; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), uretana ( $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$ ; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e ácido fólico (Sigma-Aldrich; BR) foram diluídas em solução salina (0,9%, NaCl). Estreptomicinas e penicilinas (Pentabiótico®, Fontoura-Wyeth, São Paulo, Brasil) e Flunixinina meglumina (Banamine®, Schering Plough, Brasil) foram utilizados como previsto.

### 3.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA PARA IMPLANTAÇÃO DA CÂNULA GUIA

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol 2,5% (i.p.; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e fixados em um estereotáxico (Insight, Ribeirão Preto, Brasil). Após anestesia subcutânea no couro cabeludo do rato com xilocaína com vasoconstritor à 2%, o crânio foi exposto cirurgicamente e uma cânula guia de aço inoxidável (23G; 11mm de comprimento) foi implantada. As coordenadas estereotáxicas para implantação da cânula guia na PAGd foram selecionadas a partir dos atlas do cérebro de Paxinos e Watson (2007): Ântero posterior= + 2,7mm em relação à linha interaural; lateral= + 2,5mm em relação à sutura sagital; vertical= - 4,7mm em relação à estrutura óssea da calota craniana; Incisivo, - 3,2; torre inclinada lateralmente em 26°. A cânula foi fixada ao crânio por um parafuso previamente implantado na calota craniana e por uma prótese de resina acrílica autopolimerizável. Um mandril de 0,2mm de diâmetro foi introduzido na cânula para evitar a obstrução da mesma durante o período de recuperação. Como medida profilática, ao final da cirurgia, os animais receberam uma injeção intramuscular de 0,2 ml de pentabiótico veterinário (im.; Fontoura-Wyeth, São Paulo, Brasil) e de analgésico não esteroide, flunixinina meglumina (2,5 mg/kg, sc.; Banamine®, Schering Plough, Brasil). Após a cirurgia os animais foram levados ao biotério para recuperação por 48 h antes de serem submetidos à cirurgia de canulação da artéria femoral.

### 3.4 ANÁLISE DE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES

Os parâmetros cardiovasculares avaliados foram pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). Para verificar se o protocolo de ingestão de NaCl 1,8% causou aumento da PAM, a análise dos parâmetros cardiovasculares foi realizada de forma não invasiva, utilizando um método de registro de pressão por volume, onde a pressão foi obtida através de um transdutor acoplado à cauda do rato e as informações enviadas para um sistema de aquisição de dados denominado CODA (Kent Scientific, Torrington, CT).

Para avaliar a administração das drogas na PAGd no grupo HYP+DC, 48h após a cirurgia estereotáxica os animais foram anestesiados com tribromoetanol (0,25g/Kg, i.p.) para a realização da cirurgia de canulação, na qual é



implantada uma cânula na artéria femoral, para registro da PA e FC. A cânula é constituída de um segmento de polietileno PE-10 (4,5cm) soldado a outro segmento de polietileno PE-50 (13,5cm), previamente preenchida com anticoagulante (heparina a 0,25% em salina) e obstruída com um pino de metal. Após implante, o cateter foi exteriorizado na região dorsal do animal através de um trocar, por via subcutânea, e fixada à pele por sutura cirúrgica. Após a cirurgia, os animais receberam o analgésico flunixinina meglumina (2,5mg/kg, sc.; Banamine®) e foram mantidos em caixas individuais, observando-se um tempo de recuperação de 24 horas para posterior registro da PA e administração das drogas via i.c.

Antes do início do registro da PA, 0,1mL de solução salina com heparina a 0,25% foi injetada no interior das cânulas, para evitar que as mesmas sejam obstruídas pela formação de coágulos. Em seguida, a cânula implantada na artéria femoral foi conectada a um transdutor de PA (UTAH), conectado ao amplificador de sinal (AECAD04F/ AVS Projetos, Brasil), e esse a um sistema de registro computadorizado (AQCAD/ AVS Projetos, Brasil). O registro foi feito com os animais acordados e em livre movimentação em caixas individuais.

Seguidas 24h da cirurgia de canulação da artéria femoral, os animais foram levados para sala de experimentação, onde permaneceram por 1 hora para adaptação às condições ambientais previamente ao experimento.

Para avaliar os parâmetros cardiovasculares no grupo HYP+DP, os animais foram submetidos ao protocolo de canulação da artéria femoral e registro da PA previamente descritos.

Com o objetivo de verificar se a hipertensão permanecia após o término da ingestão de NaCl 1,8%, um grupo de animais recebeu água potável por 10 dias consecutivos. Durante este período, a PA e a FC foram aferidas diariamente no período matutino através do sistema de aquisição de dados CODA (Kent Scientific, Torrington, CT).

### 3.5 TRATAMENTO PERIFÉRICO

Após o registro não invasivo através do CODA para a constatação da hipertensão nos animais, foi realizada a administração de ácido fólico via ip. nas doses de 5 ou 10 mg/Kg ou administrada solução salina no dia seguinte ao registro, no período matutino por 3 dias consecutivos e com intervalo de 24h após cada

administração. Posteriormente à segunda administração, os animais foram submetidos à cirurgia de canulação da artéria femoral como descrito acima. 30 minutos após a última administração, foi realizado o registro da PA através da cânula inserida na artéria femoral durante 15 minutos para avaliar se houve alterações entre os parâmetros cardíacos antes do início das administrações e após a última administração.

### 3.6 ESTRESSE DE RESTRIÇÃO AGUDO

O protocolo de estresse de restrição consistiu na introdução dos animais do grupo HYP+DP em um tubo cilíndrico de plástico (18cm de comprimento; 7cm de diâmetro) durante 1 hora, após 15 minutos de registro da PA basal. Assim, as cânulas foram exteriorizadas na parte superior do tubo, de modo que continuassem conectadas ao transdutor de sinal e, conseqüentemente, o registro não fosse interrompido.

### 3.7 MICROINJEÇÃO DE DROGAS

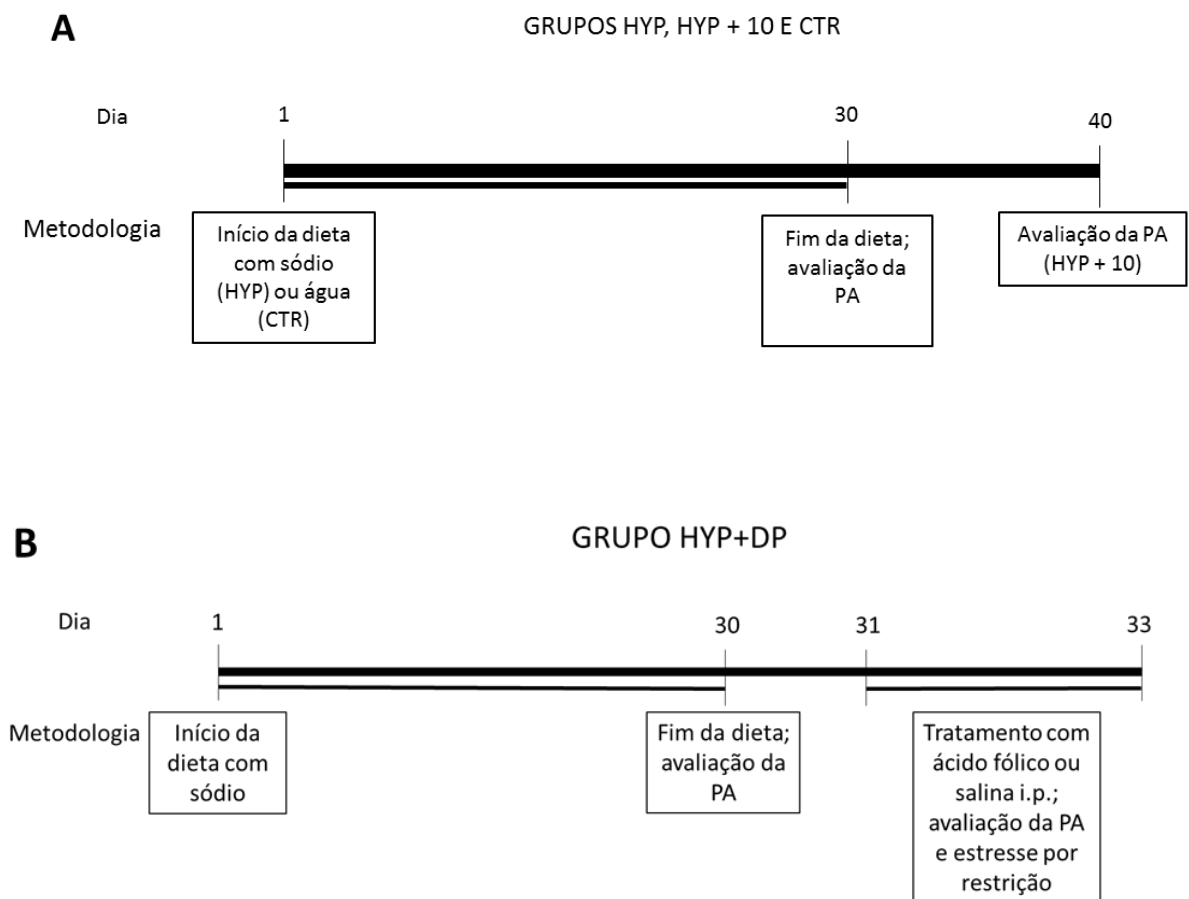
As microinjeções i.c. no grupo HYP+DC foram realizadas após 10 min de registro da PA, com uma agulha de injeção (185 $\mu$ m de diâmetro externo, 33G) introduzida através da cânula guia até que sua ponta estivesse 1mm abaixo da extremidade final da cânula. Um volume de 50nL foi injetado de cada concentração (AF 3 nmol, 9 nmol, 15 nmol ou solução salina) utilizando uma microseringa operada à mão de 1  $\mu$ L (KH7001, Hamilton Co., EUA) conectada a agulha de injeção por um segmento de tubo de polietileno. O volume injetado foi controlado checando o movimento de uma bolha de ar dentro do tubo de polietileno. Após a microinjeção, a PA foi registrada por 20 min.

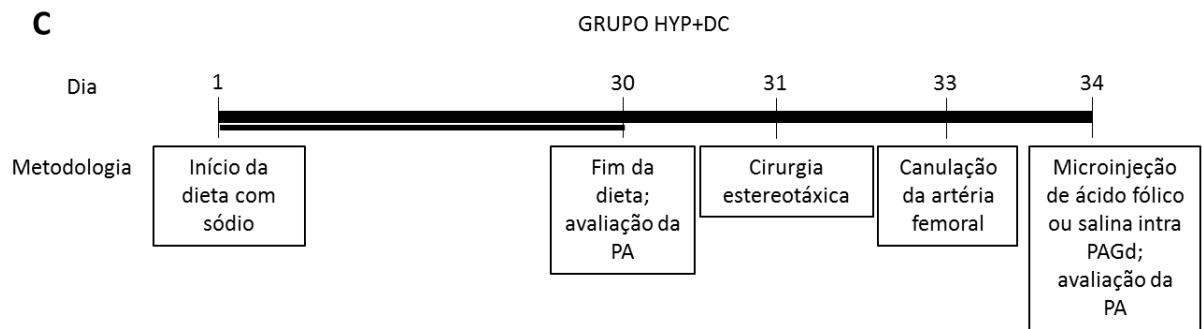
### 3.8 HISTOLOGIA

Após o fim do experimento, os animais do grupo HYP+DC foram anestesiados com Uretana 1,25 g/Kg (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) e 50 nL de azul de Evans 1% foram injetados intra PAGd para marcar o local da microinjeção. O tórax foi cirurgicamente aberto, a aorta descendente foi ocluída, o átrio direito

cortado, e o cérebro foi perfundido com 0,9% de solução salina seguida por formalina a 10% através do ventrículo esquerdo. O cérebro foi retirado, armazenado e cortado posteriormente em secções de 40  $\mu$ m de espessura em criostato (CM1900; Leica, Wetzlar, Alemanha). Os locais das microinjeções foram identificados com o auxílio do atlas de cérebro de rato (PAXINOS & WATSON, 2007).

### 3.9 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL





**Fig.1.** Delineamento experimental dos grupos HYP, CTR, HYP+10 (A), HYP+DP (B) e HYP+DC (C).

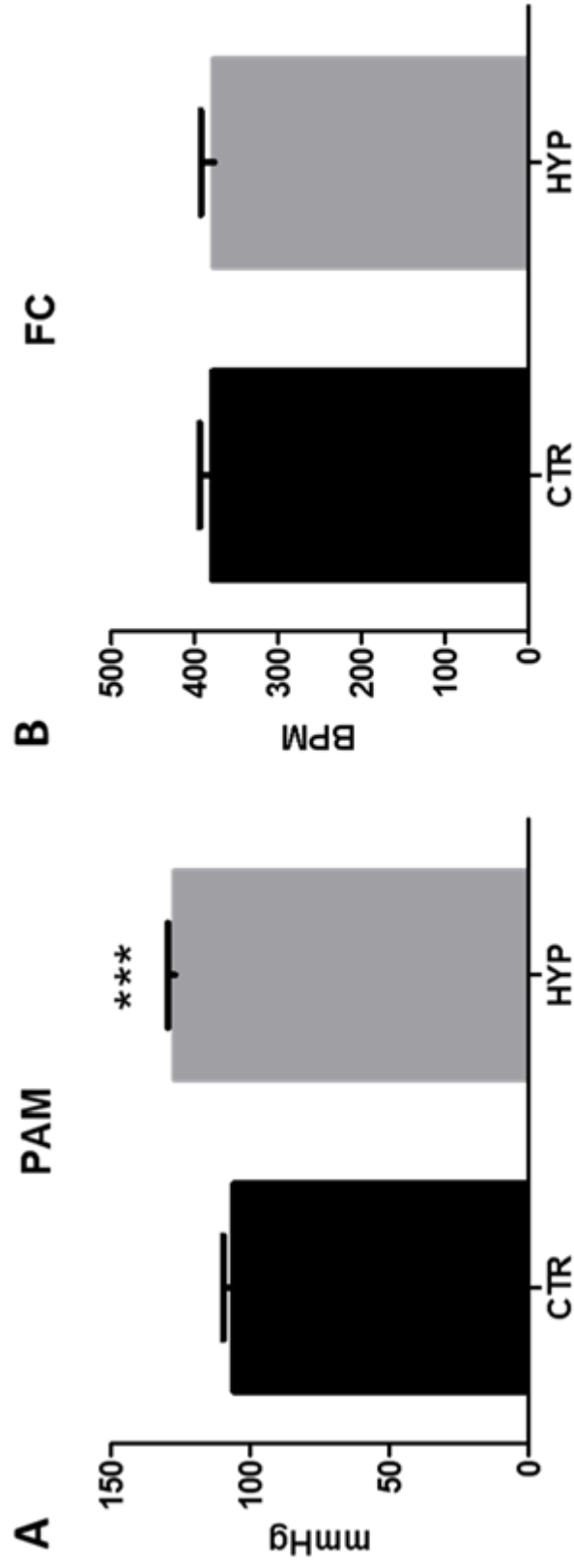
### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises de normalidade dos dados foram realizadas por meio do teste Shapiro-Wilk. O teste t de Student foi utilizado para comparar os parâmetros cardiovasculares do grupo HYP e CTR, do grupo HYP+10 e CTR+10 e do grupo HYP+DP. Para a análise do grupo HYP+DC e do estresse de restrição do grupo HYP+DP foi utilizada análise temporal com o teste de variância ANOVA de duas vias e pós-teste de Bonferroni. O software GraphPad Prism 6.0 foi utilizado para as análises estatísticas. Significância de 5% ( $P < 0,05$ ) foi considerado para todos os testes aplicados.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA

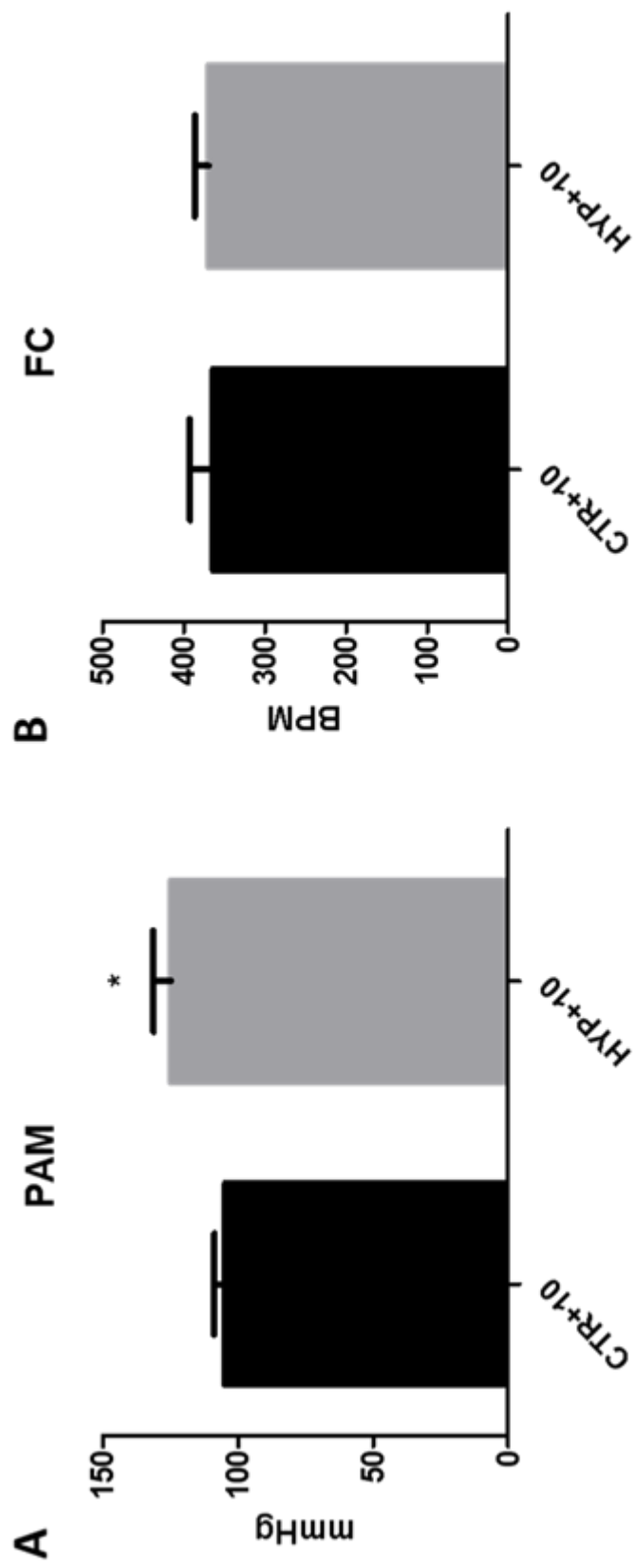
A ingestão de NaCl 1,8% induziu um aumento na PAM quando comparado ao grupo controle (HYP:  $127,2 \pm 2,5$  mmHg, n=10; CTR:  $106 \pm 3,8$  mmHg, n=7, P= 0,0002, Fig. 2A). Entretanto, não houve diferenças significativas na FC quando comparados ambos os grupos (HYP:  $377,1 \pm 16$  BPM, n=10; CTR:  $379,1 \pm 15,1$  BPM, n=7, P= 0,9331, Fig. 2B).



**Fig.2.** Efeito da dieta com alto teor de sal (HYP, n=10) ou água (CTR, n=7) em ratos machos sobre a pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B). \*\*\* $p < 0,001$ , teste  $t$  de Student não pareado, comparado ao grupo controle.

#### 4.2 EFEITO DA INGESTÃO DE NaCl 1,8% APÓS 10 DIAS DE NORMALIZAÇÃO DA DIETA

O grupo HYP+10 manteve a PAM aumentada mesmo após 10 dias de descontinuação da dieta, quando comparado ao grupo controle (HYP:  $124,9 \pm 6,5$  mmHg,  $n=7$ ; CTR:  $104,9 \pm 4$  mmHg,  $n=7$ ,  $P=0,0221$ , Fig. 3A). Assim como nos animais hipertensos, não houve diferença significativa na FC entre o grupo HYP+10 e CTR+10 (HYP:  $369,9 \pm 16,8$  BPM,  $n=7$ ; CTR:  $363,8 \pm 10,9$  BPM,  $n=7$ ,  $P=0,7666$ , Fig. 3B).

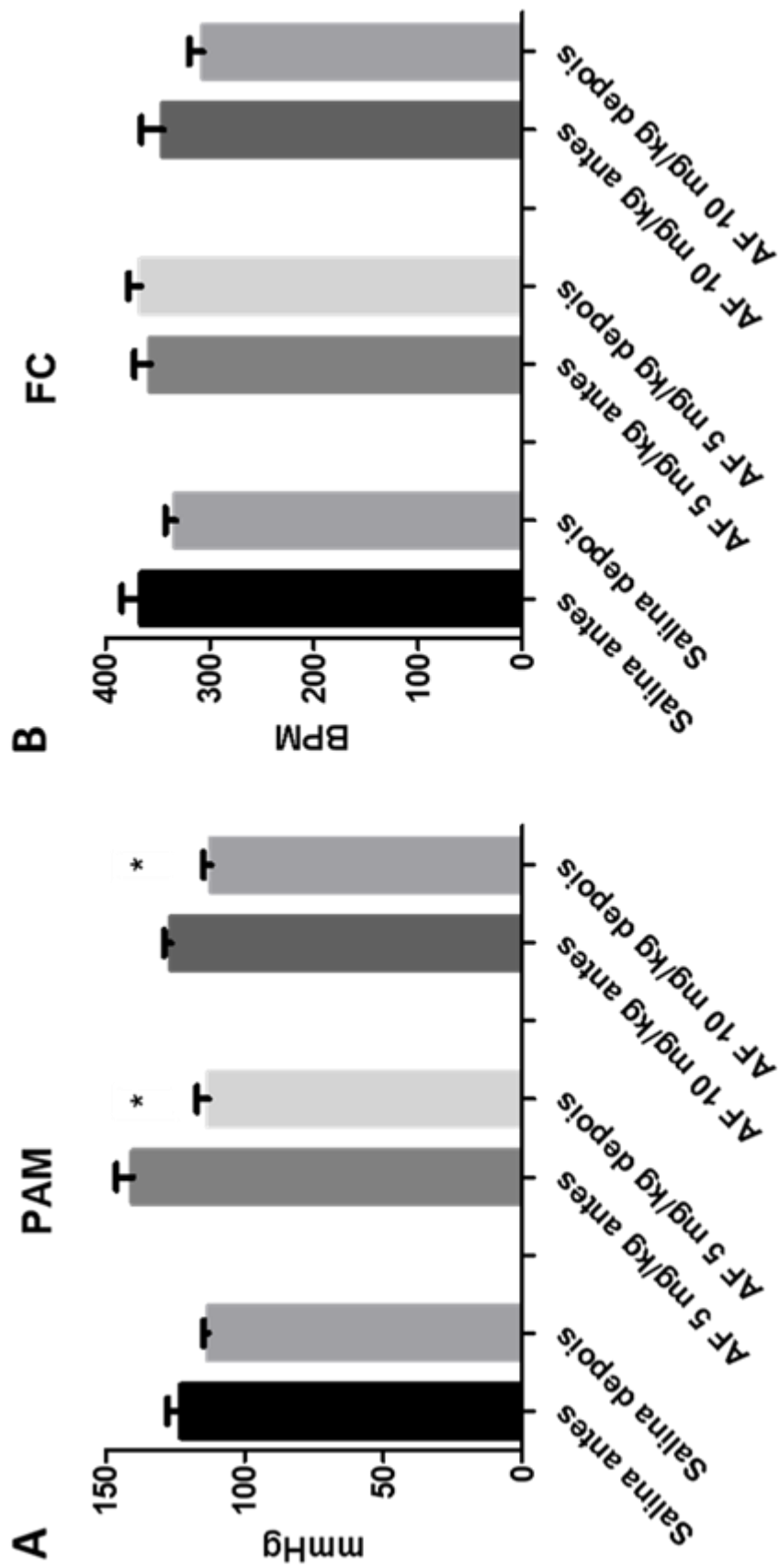


**Fig.3.** Efeito da dieta com alto teor de sal (HYP+10, n=7) ou água (CTR+10, n=7) 10 dias após o final da dieta, em ratos machos, sobre a pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B). \* $p < 0,05$ , teste  $t$  de Student não pareado, comparado ao grupo controle.



### 4.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO PERIFÉRICA DE ÁCIDO FÓLICO EM RATOS HIPERTENSOS SAL-SENSÍVEIS

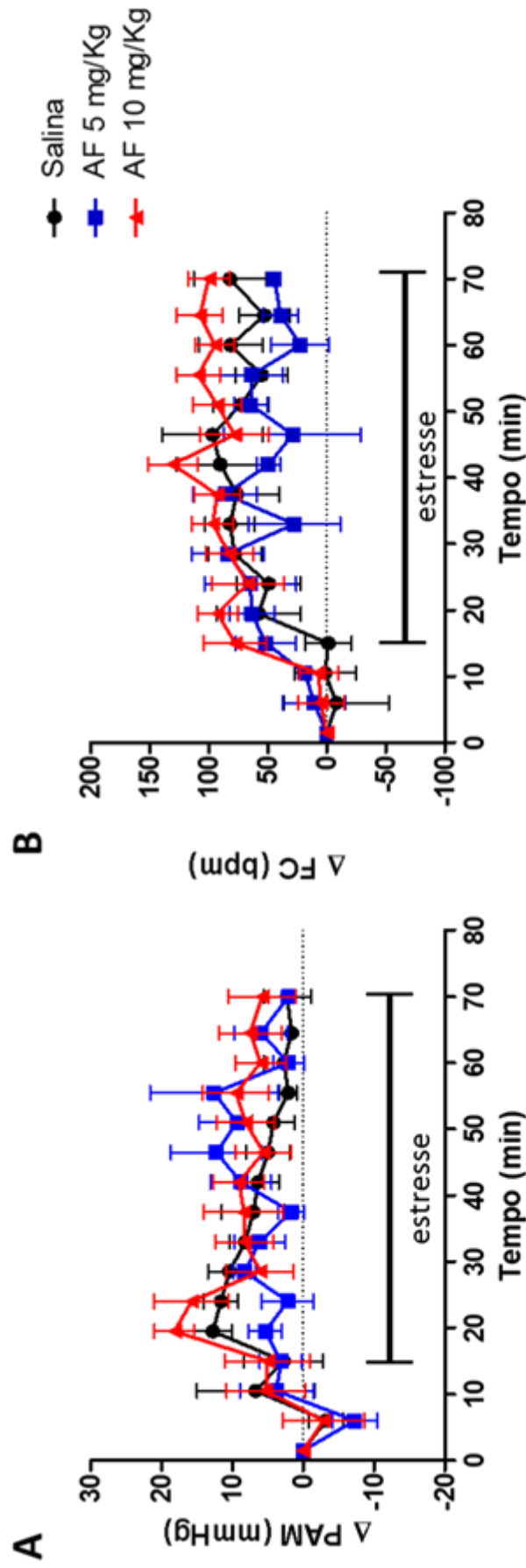
A administração ip. de ácido fólico por 3 dias causou uma diminuição da PAM em animais hipertensos quando comparados os valores antes do início das administrações e depois da última administração, tanto na dose de 5 mg/Kg (AF 5 mg/Kg antes:  $140 \pm 6$  mmHg; AF 5 mg/Kg depois:  $113 \pm 4,1$  mmHg,  $n=8$ ,  $P=0,0162$ , Fig. 4A) quanto na dose de 10 mg/Kg (AF 10 mg/Kg antes:  $126,6 \pm 2,4$  mmHg; AF 10 mg/Kg depois:  $112 \pm 2,8$  mmHg,  $n=8$ ,  $P= 0,0129$ , Fig. 4A). Já a administração de solução salina não causou diminuição estatisticamente significativa na PAM dos animais hipertensos (Salina antes:  $123 \pm 4,8$  mmHg; Salina depois:  $113 \pm 1,7$  mmHg,  $n=7$ ,  $P= 0,1156$ , Fig 4A). Assim como nos demais grupos, não houve alterações significantes na FC dos animais hipertensos tratados (AF 5 mg/Kg antes:  $357 \pm 15$  bpm; AF 5 mg/Kg depois:  $366 \pm 12$  bpm,  $n=8$ ,  $P=0,6407$ ; AF 10 mg/Kg antes:  $345 \pm 21$  bpm; AF 10 mg/Kg depois:  $306 \pm 13$  bpm,  $n=8$ ,  $P= 0,1982$ , Fig. 4B) e salina (Salina antes:  $366 \pm 18$  bpm; Salina depois:  $333 \pm 9,8$  bpm,  $n=7$ ,  $P= 0,1219$ , Fig 4B).



**Fig.4.** Efeito da administração de ácido fólico por 3 dias em animais hipertensos sal-sensíveis nas doses de 5 mg/Kg (n=8), 10 mg/Kg (n=8) ou salina (n=7) sobre a pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) antes do início das administrações e depois da última administração. \* $p < 0,05$ , teste  $t$  de Student pareado.

#### 4.4 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO PERIFÉRICA DE ÁCIDO FÓLICO EM RATOS HIPERTENSOS SALSENSÍVEIS DURANTE O ESTRESSE DE RESTRIÇÃO AGUDO

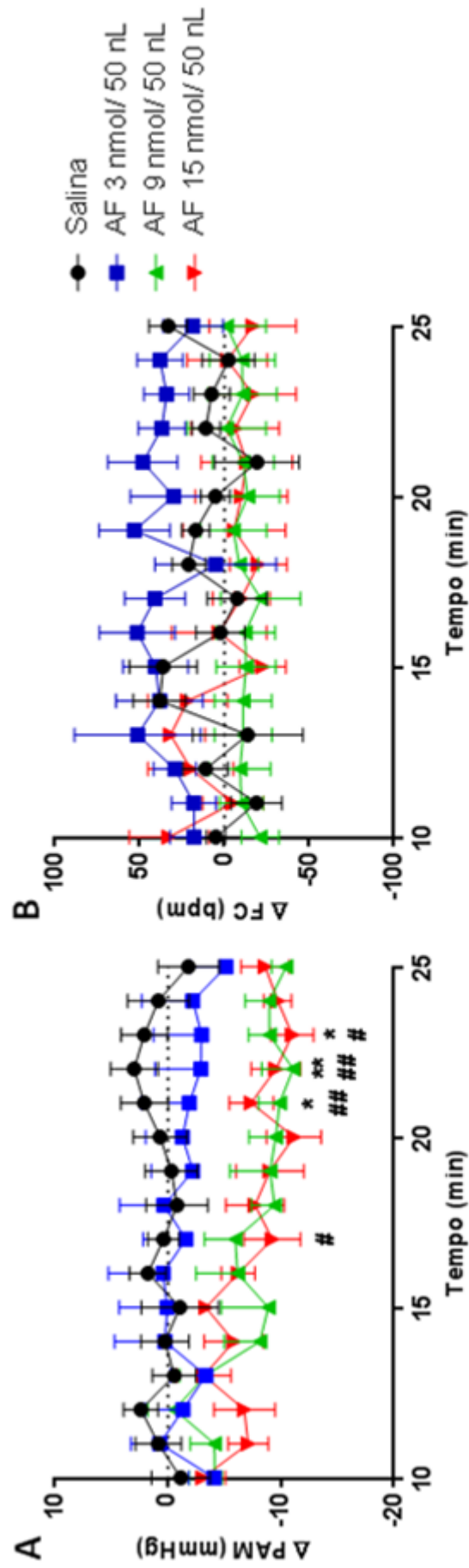
A administração ip. de ácido fólico por 3 dias não alterou a resposta ao estresse de restrição agudo na  $\Delta$ PAM em animais hipertensos tanto na dose de 5 mg/Kg (AF 5 mg/Kg: Tempo:  $F(8, 120) = 2,3$ ,  $P = 0,0058$ ; Interação:  $F(8,120) = 1,1$ ,  $P = 0,3668$ ; Tratamento:  $F(1,8) = 0$ ,  $n = 4$ ,  $P = 0,9193$ , Fig. 5A) quanto na dose de 10 mg/Kg (AF 10 mg/Kg: Tempo:  $F(8, 165) = 4,3$ ,  $P < 0,0001$ ; Interação:  $F(8,165) = 0,5$ ,  $P = 0,9485$ ; Tratamento:  $F(1,11) = 0,3$ ,  $n = 7$ ,  $P = 0,6091$ , Fig. 5A) quando comparados ao grupo salina. Do mesmo modo, não foram observadas alterações na  $\Delta$ FC desses animais (AF 5 mg/Kg: Tempo:  $F(8, 120) = 19,9$ ,  $P < 0,0001$ ; Interação:  $F(8,120) = 1,4$ ,  $P = 0,1703$ ; Tratamento:  $F(1,8) = 0,1$ ,  $n = 4$ ,  $P = 0,78$ ; AF 10 mg/Kg: Tempo:  $F(8, 165) = 8,3$ ,  $P < 0,0001$ ; Interação:  $F(8,165) = 0,9$ ,  $P = 0,5065$ ; Tratamento:  $F(1,11) = 0,8$ ,  $n = 7$ ,  $P = 0,3847$ , Fig. 5B) quando comparados ao grupo salina.



**Fig. 5.** Análise temporal dos valores de variação de pressão arterial ( $\Delta$ PAM, A) e variação de frequência cardíaca ( $\Delta$ FC, B) durante o estresse de restrição agudo nos animais do grupo AF 5 mg/Kg (n=4), AF 10 mg/Kg (n=7) e salina (n=6). Os pontos representam as médias e as barras representam E.P.M. Teste ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Bonferroni.  $p > 0,05$ , comparado ao grupo controle.

#### 4.5 EFEITO DA MICROINJEÇÃO CENTRAL DE ÁCIDO FÓLICO EM RATOS HIPERTENSOS SAL-SENSÍVEIS

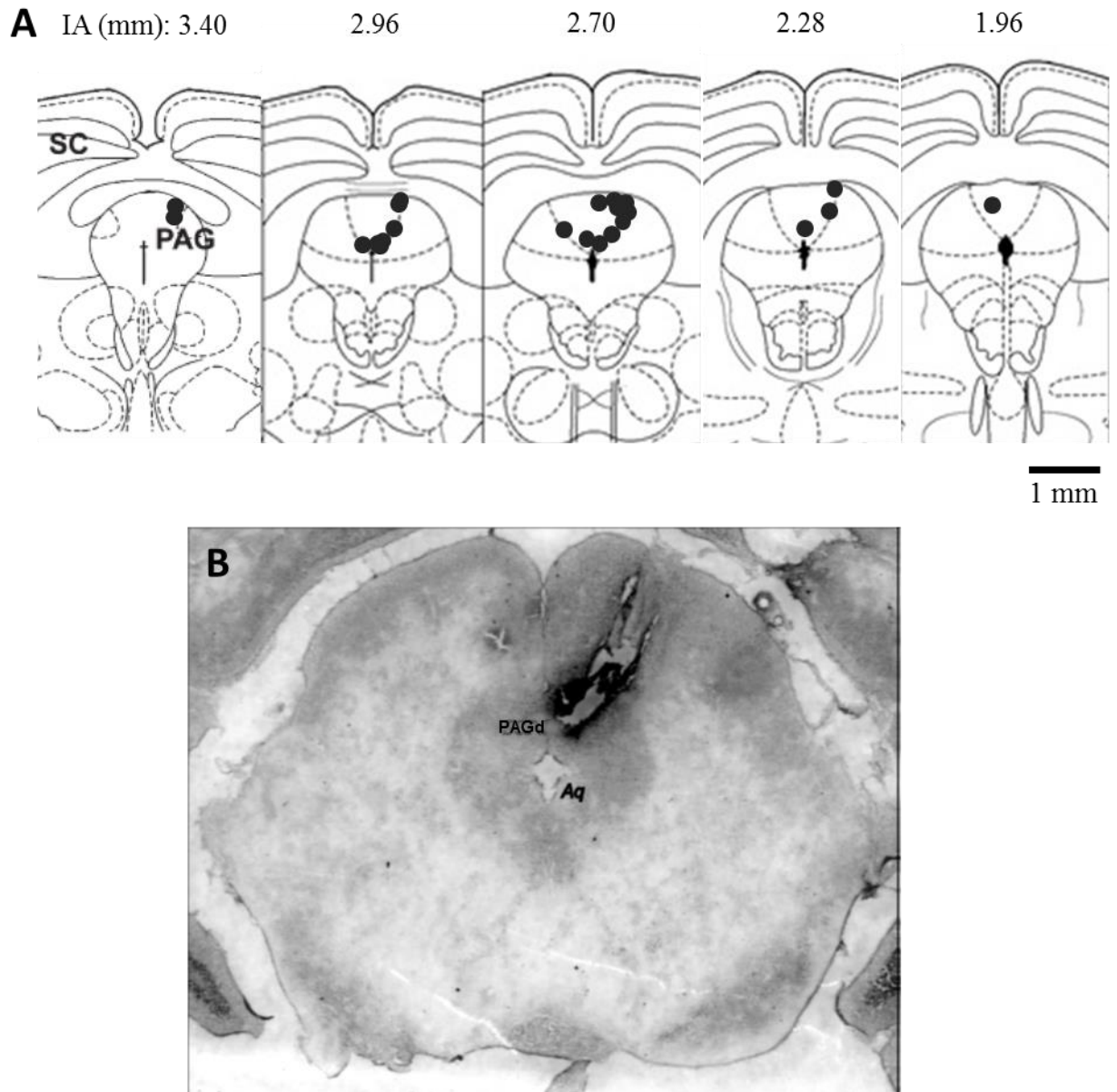
A microinjeção de ácido fólico na PAGd causou diminuição da PAM em animais hipertensos na dose de 9nmol/ 50 nL ( $\Delta$ PAM: Tempo:  $F(15, 150)= 1,6$ ,  $P=0,0844$ ; Interação:  $F(15,150)= 1,5$ ,  $P= 0,118$ ; Tratamento:  $F(1,10)= 11,8$ ,  $n=6$ ,  $P= 0,0064$ ), assim como na dose de 15 nmol/ 50 nL ( $\Delta$ PAM: Tempo:  $F(15, 135)= 0,8$ ,  $P=0,6929$ ; Interação:  $F(15,135)= 1,6$ ,  $P= 0,0728$ ; Tratamento:  $F(1,9)= 18,9$ ,  $n=5$ ,  $P= 0,0019$ ), quando comparado com animais hipertensos que receberam microinjeção de salina ( $n=6$ , Fig. 6A). Já a dose de 3 nmol/ 50nL não foi suficiente para causar alterações significativas na pressão arterial ( $\Delta$ PAM: Tempo:  $F(15, 150)= 0,7$ ,  $P=0,7542$ ; Interação:  $F(15,150)= 0,5$ ,  $P= 0,9356$ ; Tratamento:  $F(1,10)= 0,4$ ,  $n=6$ ,  $P= 0,5289$ , Fig. 6A). O ácido fólico não alterou a FC dos animais hipertensos nas doses de 3 nmol/ 50 nL ( $\Delta$ FC: Tempo:  $F(15, 165)= 0,8$ ,  $P=0,6393$ ; Interação:  $F(15,165)= 1,3$ ,  $P= 0,2265$ ; Tratamento:  $F(1,11)= 3,2$ ,  $n=6$ ,  $P= 0,2575$ ), 9 nmol/ 50nL ( $\Delta$ FC: Tempo:  $F(15, 150)= 1,1$ ,  $P=0,3727$ ; Interação:  $F(15, 150)= 0,7$ ,  $P= 0,7234$ ; Tratamento:  $F(1,10)= 1,5$ ,  $n=5$ ,  $P= 0,2484$ ) e 15 nmol/ 50 nL ( $\Delta$ FC: Tempo:  $F(15, 135)= 1$ ,  $P=0,4137$ ; Interação:  $F(15, 135)= 1,4$ ,  $P= 0,1395$ ; Tratamento:  $F(1,9)= 0,3$ ,  $n=4$ ,  $P= 0,5913$ ) quando comparados com o grupo salina ( $n=7$ , Fig. 6B).



**Fig.6.** Mudanças na pressão arterial média ( $\Delta$ PAM; A) e frequência cardíaca ( $\Delta$ FC; B) ao longo do tempo (min) evocadas pela microinjeção de ácido fólico (AF) nas concentrações de 3 (n=6), 9 (n=5-6) e 15 (n=4-5) nmol/ 50nL e salina (n=6-7) intra PAGd em ratos machos com hipertensão sal-sensível. Os pontos representam as médias e as barras representam E.P.M. Teste anova de duas vias seguido de pós-teste de Bonferroni. #, \*p<0,05, comparado ao grupo controle.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO HISTOLÓGICA DOS SÍTIOS DE MICROINJEÇÃO

Diagramas ilustrando os sítios de microinjeção na PAGd dos animais utilizados no presente estudo, assim como uma fotomicrografia da secção coronal do cérebro de um rato representativo do grupo indicando o sítio de microinjeção na PAGd estão presentes na figura 7A e 7B.



**Fig.7A.** Representação diagramática das secções cerebrais de ratos (Paxinos & Watson, 1998) apresentando a distribuição dos sítios de microinjeções (círculos pretos) na PAGd. SC= colículo superior; PAG= substância cinzenta periaquedutal; IA= distância da linha interaural. **B.** Fotomicrografia da secção cerebral indicando o sítio de microinjeção na PAGd. Aq= aqueduto; PAGd= substância cinzenta periaquedutal dorsal.

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que mesmo após 10 dias da retirada do NaCl 1,8% da dieta, os animais sal-sensíveis hipertensos continuam com a PA elevada, e que o ácido fólico diminui a PA dos animais hipertensos, além da participação da PAGd nessa modulação.

Dos Santos et al. (2006) demonstraram em seu estudo que a ingestão de NaCl (1,8%) juntamente com a água por 30 dias é capaz de induzir uma hipertensão sensível ao sal em ratos Wistar saudáveis, sem alteração da FC. O presente estudo confirmou tais dados. Entretanto, não se conhecem estudos que indiquem por quanto tempo essa hipertensão é mantida mesmo após a retirada do NaCl. Para demonstrar que o tempo entre o final da dieta hiperssódica e o dia do tratamento com ácido fólico não interfere nos resultados, a PA dos animais hipertensos foi aferida após 10 dias do final da dieta. Mesmo após 10 dias, os animais hipertensos continuam com a PA elevada, confirmando a hipótese de que não há interferência do tempo na hipertensão e tratamento com ácido fólico nesses animais.

O ácido fólico é uma vitamina B solúvel em água não produzido pelo organismo, sendo necessária sua ingestão através dos alimentos, já que é considerado um nutriente essencial para a síntese de nucleotídeos de purina e timina e para a síntese de metionina a partir de Hcy, sendo essencial fundamental para a formação celular (FRISO & CHOI, 2002). Por ser um aminoácido contendo enxofre tóxico que pode induzir disfunção neuronal e morte celular, os níveis de Hcy devem ser mantidos baixos (POGRIBNY et al., 1997). Sabe-se que a Hcy está relacionada a doenças vasculares (BOUSHEY et al., 1995), e que o ácido fólico pode diminuir seus níveis, diminuindo a reatividade do vaso de resistência de pacientes com aterosclerose (STANGER et al., 2002). O presente estudo demonstrou a relação do ácido fólico com a hipertensão sal sensível, além disso o ácido fólico microinjetado na PAGd, uma área de integração de funções cardiovasculares e comportamentais, levou a uma atenuação da PAM dos animais hipertensos. Forman et al. (2005) observaram em mulheres hipertensas tratadas com ácido fólico a 0,5 mg/d, juntamente com a vitamina B6, durante 4 anos, a diminuição da PA. Devido à co-administração das vitaminas, estes autores não comprovaram a relação do ácido fólico com a diminuição da hipertensão, mas



sugerem a redução da Hcy como responsável por essa queda na PA. No presente estudo foi realizada somente a administração de ácido fólico, o que além de corroborar com o estudo de Forman et al. (2005), confirma a ligação entre o ácido fólico e a hipertensão. Outro estudo, realizado por Van Dijk et al. (2001), observaram após dois anos de suplementação de ácido fólico a 0,5 mg/d em indivíduos saudáveis a redução da PA e melhora dos resultados de eletrocardiograma de esforço, demonstrando o benefício da suplementação de ácido fólico no sistema cardiovascular inclusive de indivíduos normotensos. Stanger et al. (2003) apresentam como consenso que indivíduos com risco cardiovascular devem ser suplementados com doses de 0,2 a 0,8 mg/dia de ácido fólico por um período de 4 a 6 semanas. No presente estudo as doses administradas foram de 5 mg/Kg e 10 mg/Kg por um período de 3 dias. Apesar da dose acima da recomendada, a suplementação com ácido fólico é considerada segura, pois sua toxicidade é extremamente baixa mesmo com uso prolongado, como visto por Selhub et al. (1993) em estudo com suplementação de 10mg/dia por 5 anos, onde não observaram efeitos adversos.

O estresse de restrição é um modelo que promove uma situação de estresse inevitável para o animal, levando a um aumento na PA e taquicardia através de respostas neuroendócrinas e cardiovasculares (MCDUGALL et al., 2000). O presente estudo não observou uma relação entre o ácido fólico e estresse em animais hipertensos sal-sensíveis tratados sistemicamente. Light et al. (1983) sugerem em seu estudo que o estresse está relacionado à retenção renal de sódio em pacientes do sexo masculino de risco hereditário para hipertensão e pacientes com PA limítrofe. Em indivíduos com hipertensão sal-sensível, acredita-se que esta retenção possa causar maiores danos aos rins, já que a retenção sódica já existe nessa patologia. Não se conhecem estudos sobre a utilização ácido fólico em animais ou indivíduos hipertensos em situação de estresse, tornando o presente estudo pioneiro nesta avaliação e impossibilitando maiores discussões.

Não se sabe por quais mecanismos o ácido fólico reduziu a PA dos animais hipertensos. Acredita-se que possa ser através da diminuição dos níveis de Hcy, aumento dos níveis de óxido nítrico (NO) e/ ou por mecanismos epigenéticos. A Hcy é um importante fator contribuinte para a fisiopatologia da hipertensão devido à participação deste no remodelamento vascular, disfunção endotelial e estresse oxidativo (YILDIRIM et al., 2015).

O estresse oxidativo pode ser descrito como um processo de lesão causada às células pela oxidação de macromoléculas resultantes da formação aumentada de EROs e/ou diminuição da reserva de antioxidantes (ZALBA et al., 2001). Uma produção aumentada de EROs causa perda de biodisponibilidade de NO, o que prejudica a função endotelial (PANZA et al., 1990). Além disso, o aumento de EROs pode estimular a hipertrofia e hiperplasia da musculatura lisa vascular, estando relacionada à hipertensão (GRIENGLING et al., 2000). O ácido fólico pode ter efeitos benéficos na pressão sanguínea, aumentando a síntese de NO nas células endoteliais (STROES et al., 2000). O estudo de Pravenec et al. (2013) demonstrou que a deficiência de ácido fólico por 4 semanas acarretou em aumento do estresse oxidativo e da pressão sistólica em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). O ácido fólico parece atuar aumentando a biodisponibilidade da Tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), um cofator da síntese de NO, favorecendo com isso o acoplamento de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e o subsequente aumento na produção de •NO (ZHANG et al., 2014). Desta forma, o ácido fólico pode estar modulando a PA através da diminuição do estresse oxidativo através do aumento indireto de NO, sendo esse estresse oxidativo causado ou não pelo aumento da Hcy.

Já a epigenética é definida como o estudo das alterações hereditárias na expressão do gene que ocorrem sem uma alteração na sequência de DNA. Diversos dados na literatura já associam a metilação com a hipertensão arterial sal-sensível (MU et al., 2011; POJOGA et al., 2011; LIU et al., 2014; WANG et al., 2014). Smolarek et al. (2010) encontraram, em amostras de DNA sanguíneo de pacientes com hipertensão essencial em diferentes estágios, que o nível de 5mC do DNA é diminuído e correlaciona-se com o grau de hipertensão. Além disso, a metilação tem sido associada a vários biomarcadores, incluindo a Hcy (INGROSSO et al., 2003). Uma vez que a Hcy pode ser metilada à metionina por transferência de um grupo metil a partir de 5-metil tetrahydrofolato, o folato pode diminuir os níveis de Hcy, resultando na restauração dos níveis de metilação do DNA e expressão de genes correspondente (YAKUBU et al., 2016).

O presente estudo possui algumas limitações que devem ser consideradas. O tratamento dos ratos com NaCl a 1,8% através da ingestão de água aumenta a volemia desses animais, e por consequência, o volume urinário, tornando a manutenção das gaiolas e a reposição do bebedouro um trabalho diário para evitar

estresse nos animais. Além disso, por ser um fenótipo heterogêneo, somente cerca de 50% dos animais normotensos são sal-sensíveis (WEINBERGER, 1996; POCH et al., 2001) , sendo assim, após 30 dias de tratamento, os animais considerados sal-resistentes, ou seja, aqueles que não apresentaram 10% de elevação da PA em relação à PA basal (AMODEO & HEIMANN, 1998), foram excluídos desse projeto. Algumas questões permaneceram acerca dos mecanismos da hipertensão sal-sensível, tornando necessária a avaliação da metilação global desses animais e algumas dosagens, como de estresse oxidativo, além de verificar a participação dos hormônios reguladores da PA nesse modelo.

Com base nos dados descritos, sugere-se que o ácido fólico possa se tornar um grande aliado clínico na redução da hipertensão, especialmente a hipertensão sal-sensível, como demonstrado no presente estudo. Porém novos estudos são necessários para elucidar mecanismos envolvidos na hipertensão sal-sensível e por quais vias o ácido fólico reduz a PA desses animais.

## **6. CONCLUSÃO**

Em resumo, pode-se concluir que o ácido fólico atenua a hipertensão sensível ao NaCl em ratos Wistar de maneira aguda, tanto sistemicamente quanto via PAGd, sugerindo a participação do sistema nervoso central nessa hipertensão. Novos estudos são necessários para investigar por quais mecanismos o ácido fólico atua na hipertensão sal-sensível, revelando um potencial adjuvante no tratamento da hipertensão.

## 7. REFERÊNCIAS

AMODEO, C. & HEIMANN, J. C. Revisão/ Atualização em hipertensão arterial: o fenômeno da sensibilidade ao sal. **J. Bras. Nefrol.** 30 (1): 68-73, 1998.

BANDLER, R.; KEAY, K. A.; FLOYD, N.; PRICE, J. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. **Brain Res Bull**, 53(1): 95-104, 2000.

BOUSHEY, C. J.; BERESFORD, S. A. A.; OMENN, G. S.; MOTULSKY, A. G. A Quantitative Assessment of Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Vascular Disease: Probable Benefits of Increasing Folic Acid Intakes. **JAMA**, 274: 1049-1057, 1995.

CAMPESE, V. M. salt sensitivity in hypertension: renal and cardiovascular implications. **Hypertension**, 3: 531-550, 1994.

CARRETERO, O. A. & OPARIL, S. Essential Hypertension. Part I: Definition and Etiology. **Circulation**. 101: 329-335, 2000.

CLARKE, R.; DALY, L.; ROBINSON, K.; NAUGHTEN, E.; CAHALANE, S.; FOWLER, B.; GRAHAM, I. Hiperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. **N Engl J Med**, 324: 1149-1155, 1991.

DAMPNEY, R. A. L. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiological Reviews**, 74 (2): 323-350, 1994.

DAMPNEY, R. A. L.; COLEMAN, M. J.; FONTES, M. A. P.; HIROOKA, Y.; HORIUCHI, J.; LI, Y.; POLSON, J. W.; POTTS, P. D.; TAGAWA, T. Central mechanisms underlying short- and long-term regulation of the cardiovascular system. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, 29: 261–268, 2002.

DAMPNEY, R. A. L.; FURLONG, T. M.; HORIUCHI, J.; IIGAYA, K. Role of dorsolateral periaqueductal grey in the coordinated regulation of cardiovascular and respiratory function. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, 175: 17-25, 2013.

- DJUKIC, A. Folate-responsive neurologic diseases. **Pediatr Neurol**, 37: 387-397, 2007.
- DOS SANTOS, L.; GONÇALVES, M. V.; VASSALLO, D. V.; OLIVEIRA, E. M.; ROSSONI, L. V. Effects of high sodium intake diet on the vascular reactivity to phenylephrine on rat isolated caudal and renal vascular beds: Endothelial modulation. **Life Sciences**, 78: 2272-2279, 2006.
- FEN WANG, F.; DEMURA, M.; CHENG, Y.; ZHU, A.; KARASHIMA, S.; YONEDA, T.; DEMURA, Y.; MAEDA, Y.; NAMIKI, M.; ONO, K.; NAKAMURA, Y.; SASANO, H.; AKAGI, T.; YAMAGISHI, M.; SAIJOH, K.; TAKEDA Y. Dynamic CCAAT/Enhancer Binding Protein–Associated Changes of DNA Methylation in the Angiotensinogen Gene. **Hypertension**, 63: 281-288, 2014.
- FERRARI, P. & KROZOWSKI, Z. Role of the 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in blood pressure regulation. **Kidney International**. 54 (4): 1374-1381, 2000.
- FRISO, S & CHOI, S. W. Gene-Nutrient Interactions and DNA Methylation. **J. Nutr.** 132: 2382S–2387S, 2002.
- FORMAN, J. P.; RIMM, E. B.; STAMPFER, M. J.; CURHAN, G. C. Folate intake and the risk of incident hypertension among US women. **JAMA**, 293 (3): 320-329, 2005.
- FUCHS, F. D.; MOREIRA, L. B.; MORAES, R. S.; BREDEMEIER, M.; CARDOZO, S. C. Prevalência de hipertensão arterial sistêmica e fatores associados na região urbana de porto alegre. Estudo de base populacional. **Arq Bras Cardiol**. 63 (6): 473-479, 1994.
- GOMES, M. V. M. & PELOSI, G. G. Epigenetic vulnerability and the environmental influence on health. **Experimental Biology and Medicine**, 238: 859–865, 2013.
- GRIENDLING, K. K.; MASUKO, D. S.; FUKAI, U. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circ Res**, 86: 494-501, 2000.
- HANKEY, G. J. & EIKELBOOM, J. W. Homocysteine and vascular disease. **The Lancet**, 354 (9176): 407-413, 1999.

HERMAN, J.P. Neural control of chronic stress adaptation. **Frontiers in Behavioural Science**, 7: 1-12, 2013.

HUANG, Z. G.; SUBRAMANIAN, S. H.; BALNAVE, R. J.; TURMAN, A. B.; MOI, C. C. Roles of periaqueductal gray and nucleus tractus solitarius in cardiorespiratory function in the rat brainstem. **Respir Physiol**, 120: 185–195, 2000.

HUO, Y.; LI, J.; QIN, X.; HUANG, Y.; WANG, X.; GOTTESMAN, R. F.; TANG, G.; WANG, B.; CHEN, D.; HE, M.; FU, J.; CAI, Y.; SHI, X.; ZHANG, Y.; CUI, Y.; SUN, N.; LI, X.; CHENG, X.; WANG, J.; YANG, X.; YANG, T.; XIAO, C.; ZHAO, G.; DONG, Q.; ZHU, D.; WANG, X.; GE, J.; ZHAO, L.; HU, D.; LIU, L.; HOU, F. Efficacy of Folic Acid Therapy in Primary Prevention of Stroke Among Adults With Hypertension in China. The CSPPT Randomized Clinical Trial. **JAMA**, 313 (13): 1325-1335, 2015.

INGROSSO, D.; CIMMINO, A.; PERNA, A. F.; MASELLA, L.; DE SANTO, N. G.; DE BONIS, M. L.; VACCA, M.; D'ESPOSITO, M.; D'URSO, M.; GALLETTI, P.; ZAPPIA, V. Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinaemia in patients with uraemia. **Lancet**, 361: 1693–99, 2003.

LIGHT, K. C.; KOEPKE, J. P.; OBRIST, P. A.; WILLIS, P. W. Psychological stress induces sodium and fluid retention in men at high risk for hypertension. **Science**, 220 (4595): 429-431, 1983.

LIU, Y; LIU, P.; YANG, C.; COWLEY JR, A. W.; LIANG, M. Base-Resolution Maps of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine in Dahl S Rats Effect of salt and Genomic Sequence. **Hypertension**, 63: 827-838, 2014.

MATTÉ, C.; DURIGON, E.; STEFANELLO, F. M.; CIPRIANI, F.; WAJNER, M.; WYSE, A. T. S. Folic acid pretreatment prevents the reduction of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and butyrylcholinesterase activities in rats subjected to acute hyperhomocysteinemia. **Int. J. Devl Neuroscience**, 24: 3–8, 2006.

MCDOUGALL, S. J; PAULL, J. R. A; WIDDOP, R. E; LAWRENCE, A. J. Differential cardiovascular responses in Wistar-Kyoto and Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**, 35: 126-129, 2000.

MORROW, L. E. & GRIMSLEY, E. W. Long-term diuretic therapy in hypertensive patients: effects on serum homocysteine, vitamin B6, vitamin B12, and red blood cell folate concentrations. **Southern Medical Journal**, 92 (9): 866-870, 1999.

MU, S. Y.; SHIMOSAWA, T.; ORUGRA, S.; WANG, H.; UETAKE, Y.; KAWAKAMI-MORI, F.; MARUMO, T.; YATOMI, Y.; GELLER, G. S.; TANAKA, H.; FUJITA, T. Epigenetic modulation of the renal  $\beta$ -adrenergic-WNK4 pathway in salt-sensitive hypertension. **Nature Med**, 17 (5): 573-580, 2011.

PANZA, J. A.; QUYYUMI, A. A.; BRUSH, J. E.; EPSTEIN, S. E. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. **N Engl J Med**, 323: 22-27, 1990.

PAXINOS, G. & WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Sixth Edition. **Elsevier Academic Press**, 170: 547–612, 2007.

PELOSI, G.G.; CORRÊA, F. M. A. Cardiovascular effects of noradrenaline microinjected into the dorsal periaqueductal gray area of unanaesthetized rats. **Eur J Neurosci**, 22: 3188–3194, 2005.

PELOSI, G. G.; PERES-POLON, V. L.; CORRÊA, F. M. A. Pressor effects of the injection of noradrenaline into different cerebroventricular spaces in unanesthetized rats. **Neurosci Lett**, 397: 165–169, 2006.

POCH, E.; GONZÁLEZ, D.; GINER, V.; BRAGULAT, E.; COCA, A.; SIERRA, A. Molecular basis of salt sensitivity in human hypertension: evaluation of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms. **Hypertension**, 38: 1204-1209, 2001.

POGRIBNY, I. P.; MILLER, B. J.; JAMES, S. J. Alterations in hepatic p53 gene methylation patterns during tumor progression with folate/methyl deficiency in the rat **Cancer Letters**, 115: 31-38, 1997.

POJOGA, L. H.; WILLIAMS, J. S.; YAO, T. M.; KUMAR, A.; RAFFETTO, J. D.; DO NASCIMENTO, G. R.; RESLAN, O. M.; ADLER, G. K.; WILLIAMS, G. H.; SHI, Y.; KHALIL, R. A. Histone demethylase LSD1 deficiency during high-salt diet is



associated with enhanced vascular contraction, altered NOcGMP relaxation pathway, and hypertension. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 301: H1862–H1871, 2011.

PRAVENEK, M.; KOZICH, V.; KRIJT, J.; SOKOLOVÁ, J.; ZÍDEK, V.; LANDA, V.; SIMÁKOVÁ, M.; MLEJNEK, P.; SILHAVY, J.; OLIYARNYK, O.; KAZDOVÁ, L.; KURTZ, T. W. Folate deficiency is associated with oxidative stress, increased blood pressure, and insulin resistance in Spontaneously Hypertensive Rats. **Am J Hypert**, 26 (1): 135-140, 2013.

RESSTEL, L. B. M.; SCOPINHO, A. A.; SILVA, A. L.; RODRIGUES, J. A.; CORRÊA, F. M. A. Increased Circulating Vasopressin May Account for Ethanol-induced Hypertension in Rats. **Am J Hypert**, 21: 930-935, 2008.

ROSSI, F.; MAIONE, S.; BERRINO, L. Periaqueductal gray area and cardiovascular function. **Pharmacol Res**, 29: 27–36, 1994.

SELHUB, J.; JACQUES, P. F.; WILSON, P. W. F.; RUSH, D.; ROSENBERG, I. H. Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. **JAMA**, 270: 2693-2698, 1993.

SIMONETTI, J. P.; BATISTA, L.; CARVALHO, L. R. Hábitos de saúde e fatores de risco em pacientes hipertensos. **Revista Latino-Americana de Enfermagem. Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/ Universidade de São Paulo**, 10(3): 415-422, 2002.

SMOLAREK, I.; WYSZKO, E.; BARCISZEWSKA, A. M.; NOWAK, S.; GAWRONSKA, I.; JABLECKA, A.; BARCISZEWSKA, M. Z. Global DNA methylation changes in blood of patients with essential hypertension. **Med Sci Monit**, 16(3): 149-155, 2010.

STAMPFER, M. J.; MALINOW, M. R.; WILLETT, W. C. NEWCOMER, L. M.; UPSON, B.; ULLMANN, D.; TISHLER, P. V.; HENNEKENS, C. H. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. **JAMA**, 268 (7): 877-881, 1992.

STANGER, O.; SEMMELROCK, H.; WONISCH, W.; BOS, U.; PABST, E.; WASCHER, T. C. Effects of Folate Treatment and Homocysteine Lowering on Resistance Vessel Reactivity in Atherosclerotic Subjects. **JPET**, 303:158–162, 2002.

STANGER, O.; HERRMANN, W.; PIETRZIK, K.; FOWLER, B.; GEISEL, J.; DIERKES, J.; WEGER, M. DACH-LIGA homocystein (German, Austrian and Swiss Homocysteine Society): consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations. **Clin Chem Lab Med**, 41 (11): 1392-1403, 2003.

STROES, E. S. G.; VAN FAASSEN, E. E.; YO, M.; MARTASEK, P. BOER, P.; GOVERS, R. RABELINK, T. J. Folic acid reverts dysfunction of endothelial nitric oxide synthase. **Circ Res**, 86: 1129-1134, 2000.

TALLAKSEN, C. M.; BØHMER, T.; BELL, H. Concentrations of the water-soluble vitamins thiamin, ascorbic acid, and folic acid in serum and cerebrospinal fluid of healthy individuals. **Am J Clin Nutr**, 56 (3): 559-564, 1992.

TAYLOR, L. M.; DEFRANG, R. D.; HARRIS, E. J.; PORTER, J. M. The association of elevated plasma homocyst(e)ine with progression of symptomatic peripheral arterial disease. **J Vasc Surg**, 13 (1): 128-136, 1991.

TOBIAN, L. Salt and hypertension: lessons from animal models that relate to human hypertension. **Hypertension**, 17: I-52-I-58, 1991.

VAN DIJK, R. A. J. M.; RAUWERDA, J. A.; STEYN, M.; TWISK, J. W. R.; STEHOUWER, C. D. A. Long-term homocysteine-lowering treatment with folic acid plus pyridoxine is associated with decreased blood pressure but not with improved brachial artery endothelium-dependent vasodilation or carotid artery stiffness: a 2-year, randomized, placebo-controlled trial. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 21: 2072-2079, 2001.

WANG, F.; DEMURA, M.; CHENG, Y.; ZHU, A.; KARASHIMA, S.; YONEDA, T.; DEMURA, Y.; MAEDA, Y.; NAMIKI, M.; ONO, K.; NAKAMURA, Y.; SASANO, H.; AKAGI, T.; YAMAGISHI, M.; SAIJOH, K.; TAKEDA, Y. Dynamic CCAAT/enhancer binding protein-associated changes of DNA methylation in the angiotensinogen gene. **Hypertension**, 63: 281-288, 2014.

WEINBERGER, M. H. Salt sensitivity of blood pressure in humans. **Hypertension**, 27: 481-490, 1996.

WITTSTEIN, I. S. Stress cardiomyopathy: A syndrome of catecholamine-mediated myocardial stunning? **Cell Molecular Neurobiology**, 32: 847-857, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. A global brief on hypertension. **WHO**, 2013.

YAKUBU, T.; OKWY-NWEKE, C. P.; OKORIE, J. N.; MADUFORO, A. N. Epigenetics Processes And Diet. **IOSR-JDMS**, 15(3): 63-69, 2016.

YILDIRIM, A.; KELES, F.; ÖZDEMİR, G.; KOSGER, P. UÇAR, B.; ALATAS, Ö.; KILIÇ, Z. Homocysteine levels in normotensive children of hypertensive parents. **Anatol J Cardiol**, 15: 1008-1013, 2015.

YU MU, S. Y.; SHIMOSAWA, T.; OGURA, S.; WANG, H.; UETAKE, Y.; KAWAKAMI-MORI, F.; MARUMO, T.; YATOMI, Y.; GELLER, D. S.; TANAKA, H.; & FUJITA, T. Epigenetic modulation of the renal  $\beta$ -adrenergic–WNK4 pathway in salt-sensitive hypertension. **Nature Medicine**, 17(5): 573-581, 2011.

ZALBA, G.; JOSÉ, G. S.; MORENO, M. U.; FORTUÑO, M. A.; FORNTUÑO, A.; BEAUMONT, F. J.; DÍEZ, J. Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. **Hypertension**, 38: 1395-1399, 2001.

ZHANG, C.; WANG, Z. Y.; QIN, Y. Y.; YU, F. F.; ZHOU, Y. H. Association between B vitamins supplementation and risk of cardiovascular outcomes: a cumulative metaanalysis of randomized controlled trials. **PLoS One.**, 9: e107060, 2014.