Efeitos da Elevada Concentração de Sódio no Fenótipo Migratório de Células Endoteliais

Bianca Magnago Torres

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Vitória, Junho de 2017

Efeitos da Elevada Concentração de Sódio no Fenótipo Migratório de Células Endoteliais

Bianca Magnago Torres

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovado em ___/___/____ por:

_____
Drª. Paula Frizera Vassallo – Orientadora, HUCAM/UFES.

_____
Profº. Drº Valério Garrone Barauna – Co-orientador, UFES.

_____
Profª. Drª Nazaré Souza Bissoli, UFES.

_____
Drº Tiago Fernandes, USP.

Universidade Federal do Espírito Santo
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Vitória, Junho de 2017

Torres, Bianca Magnago 1992.

Efeitos do alto sódio no fenótipo migratório de células endoteliais [Vitória] 2017

xii, 74 p., 29,7 cm (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2017)

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

Dedico este trabalho aos meus pais, por acreditarem no meu sonho, pelo exemplo de amor infinito e por me guiarem até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Ele estar sempre presente em minha vida, me guiando, me dando força e coragem para enfrentar os desafios.

Aos meus pais, Alex e Rosi, vocês são as peças chaves da minha vida. Muito obrigada por acreditarem nesse meu sonho. Obrigada pelos conselhos e atenção em cada fase do meu mestrado. Sem vocês esse objetivo nunca seria alcançado. Obrigada pelo imenso amor, carinho e ajuda.

Ao meu esposo, Petterson Correa, obrigada pelo imenso apoio que você me oferece diariamente. Obrigada por ter participado junto comigo tanto nos momentos bons ou ruins, mas sempre me orientando para crescer mais e mais.

À minha orientadora, Drª. Paula Frizera Vassallo, pela oportunidade de cursar e concluir o mestrado, pela enorme ajuda durante esses dois anos, por dividir seu conhecimento comigo, por me ajudar a crescer profissionalmente, pelo total apoio e paciência em todos os momentos. Muito obrigada!!

Ao meu co-orientador, Profº. Drº. Valério Garrone Barauna, obrigada pela ajuda, pelo enorme conhecimento compartilhado, por não só ter me aceitado inicialmente no mestrado, mas também, por me ensinar a ser melhor profissionalmente a cada dia.

Aos meus amigos que contribuíram para que essa caminhada fosse ainda mais alegre. Em especial, Nanda D'Avila, Fernanda Cunha e Thaís Margon, honestamente eu não sei o que eu seria sem vocês! Obrigada pela parceria, conselhos e cuidado! Vocês são incríveis!

A equipe do LEMC! Karol Zuqui, obrigada por tantos conselhos e alegria durante esses anos! Ao Marquinhos, por sempre estar disposto a me ajudar e a me aconselhar! À Renatinha, minha flor, obrigada pelo imenso carinho e apoio! Rebeca Machado, Thiago Oliveira, Wena, Emilly, Marito e Felipe Strela, pessoas maravilhosas que estiveram presentes.

Ao Laboratório de Fisiologia Translacional (UFES) e ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Exercício (USP) pela disposição em ajudar e suporte na realização desse estudo.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Em especial, Profº. Drº. Leonardo dos Santos, obrigada por não apenas estar presente no começo de tudo, mas também pelos conselhos dados nos momentos difíceis que tive, jamais esquecerei suas palavras de apoio e ajuda! A atual coordenadora deste programa de pós-graduação, Profª. Drª. Alessandra Simão Padilha. Aos técnicos, à equipe da secretaria e da limpeza.

Às agências de fomento, CAPES e FAPES.

Muito Obrigada!!

SUMÁRIO

RESUMO....12

ABSTRACT....13

1. INTRODUÇÃO....14

1.1. Hipertensão arterial e elevada concentração de sódio....14

1.2. O endotélio....16

1.3. Migração celular....18

1.4. Sistema Renina Angiotensina (SRA)....20

1.4.1 Receptor AT1....21

1.5. Estresse oxidativo....23

1.6. Moléculas de adesão....24

1.7. *Shear Stress*....25

2. JUSTIFICATIVA....27

3. OBJETIVOS....28

3.1. Objetivo Geral....28

3.2. Objetivos Específicos....28

4. MATERIAL E MÉTODOS:....29

4.1. Cultura Celular....29

4.2. Drogas e Reagentes....30

4.3. Ensaio do Azul de Tripan....30

4.4. Ensaio de Migração Celular....30

4.5. Ensaio do DHE....32

4.6. Atividade da NADPH oxidase 32

4.7. RT-PCR 33

4.8. *Shear Stress* 34

4.9. Análise Estatística 35

5. RESULTADOS 36

5.1. A elevada concentração de sódio não afetou a viabilidade de células endoteliais 36

5.2. Elevada concentração de sódio diminuiu a migração de células endoteliais 37

5.3. Cloreto de Colina não afetou a migração de células endoteliais 38

5.4. A diminuição da migração de células endoteliais induzida pela elevada concentração de sódio está relacionada ao receptor AT1 e NADPH oxidase 40

5.5. Elevada concentração de sódio aumentou a atividade da NADPH oxidase em células endoteliais 42

5.6. Elevada concentração de sódio aumentou a produção de ânion superóxido na qual foi modulado pelo receptor AT1 e NADPH oxidase 43

5.7. Elevada concentração de sódio diminuiu a expressão gênica de moléculas de adesão em células endoteliais 46

5.8. Redução da expressão gênica das moléculas de adesão causada pela elevada concentração de sódio pareceu ser modulada pela NADPH oxidase e parcialmente pelo receptor AT1 46

5.9. Elevada concentração de sódio prejudicou a produção de óxido nítrico em resposta ao *shear stress* em células endoteliais 48

5.10. Receptor AT1 e NADPH oxidase modulam a redução de produção de óxido nítrico em resposta ao *shear stress* causado pela elevada concentração de sódio em células endoteliais 49

6. DISCUSSÃO: 51

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS: 58

8. ANEXO: 59

9. REFERÊNCIAS: 61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do vaso sanguíneo.

Figura 2: Ativação da NADPH oxidase via receptor AT1

Figura 3: Ação do *shear stress* na produção de óxido nítrico.

Figura 4: Imagem representativa da análise de migração celular no programa Image J.

Figura 5: Elevada concentração de sódio não afetou a viabilidade de células endoteliais.

Figura 6: Elevada concentração de sódio diminuiu a migração de células endoteliais

Figura 7: Cloreto de Colina não afetou a migração de células endoteliais.

Figura 8: Candesartan e DPI preveniram a redução de migração de células endoteliais induzidas pela elevada concentração de sódio.

Figura 9: Angiotensina II reduz migração de células endoteliais.

Figura 10: Elevada concentração de sódio aumentou a atividade da NADPH oxidase, que foi prevenida pelo Candesartan e DPI.

Figura 11: Elevada concentração de sódio aumentou a produção de ânion superóxido e antagonista do receptor AT1 e DPI preveniram.

Figura 12: Elevada concentração de sódio induziu a redução da expressão mRNA de moléculas de adesão que pareceu ser modulado pela NADPH oxidase e parcialmente pelo receptor AT1.

Figura 13: Elevada concentração de sódio leva a um prejuízo na produção de óxido nítrico induzido pelo *shear stress* enquanto Candesartan e DPI preveniram essa resposta.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIAÇÕES:

AS: Alto Sódio

O_2^-: Ânion superóxido

Ca^{2+}: Cálcio

CE: Células endoteliais

EAhy.926: Células endoteliais de veia umbilical humana

NaCl: Cloreto de sódio

CT: Controle

DAG: Diacilglicerol

eNOS: Enzima óxido nítrico sintase

EROs: Espécies reativas de oxigênio

PLC: Fosfolipase C

°C: Graus Celsius

H: Hora

IP3: inositol trifosfato

±: Mais ou Menos

<: Menor

µl: Microlitro

µg/ml: Micrograma/mililitro

µM: Micromolar

ml: Mililitros

mM: Milimolar

nm: Nanômetros

NaNO2: Nitrito de Sódio

N: número

NO: Óxido nítrico

eNOS: Óxido nítrico sintase

PECAM: *Platelet/endothelial cell adhesion molecule*

H_2O_2: Peróxido de hidrogênio

%: Porcentagem

PKC: Proteína quina C

RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real

AT1: Receptor AT1

s: Segundo

SS: Shear Stress

SRA: Sistema renina angiotensina

Na+: Sódio

FBS: Soro fetal bovino

ULR: Unidade de luz relativa

U/ml: Unidade/mililitro

RESUMO

INTRODUÇÃO: Migração de células endoteliais (CE) tem papel central na resposta vascular a processos patológicos participando no remodelamento vascular e formação de novos vasos. Elevada concentração de sódio (AS) está associado à doença cardiovascular e disfunção endotelial. Embora já existam estudos demonstrando alterações no endotélio quando exposto ao AS, é importante entender como ele pode impactar no fenótipo migratório de CE e os mecanismos moleculares subjacentes. **OBJETIVO:** Testar a hipótese que AS afeta o fenótipo migratório de CE e investigar os mecanismos envolvidos independente dos fatores hemodinâmicos. **METODOLOGIA:** Foram usadas linhagem de CE de veia umbilical humana (*EA*.hy926). A migração celular foi avaliada pelo método de *Wound-Healing* nas condições: Alto Sódio (AS, NaCl:160mM) e Controle (CT, NaCl:140mM) e com os bloqueadores Candesartan, DPI, Tiron e Alopurinol (N= 5 à 7). A produção de ânion superóxido (O_2^-) foi avaliada pelo DHE. O O_2^- gerado pela atividade da NADPH oxidase foi determinada pelo ensaio de quimioluminescência. A expressão de moléculas de adesão associadas à migração foi analisada pelo RT-PCR. *Shear Stress* foi realizado usando um aparelho rítmico que mimetiza o shear. **RESULTADOS**: A migração foi avaliada a cada duas horas no período de 10hs. O AS reduziu a migração CE em comparação ao CT (CT, 100±14% vs AS,74±5%, $p<0,05$). O uso do Candesartan preveniu a ação do AS (*AS + Candesartan 95±7%), resultado semelhante foi visto com bloqueio da NADPH oxidase (*AS+DPI, 101±12%) (* vs AS, $p<0,05$). A atividade da NADPH estava aumentada quando CE foram expostas ao AS e foi reduzida pelo seu inibidor e bloqueio do receptor AT1 (CT,100±24% vs AS,375±7%; *AS+Candesartan,116±7%, *AS+DPI,110±22%, * vs AS, $p<0,05$). O AS levou ao aumento na produção de O_2^- que também foi inibida pelo bloqueio das mesmas vias (CT, 100±3% vs AS,472±15%, $p< 0,05$). AS diminuiu a expressão de moléculas de adesão via NADPH oxidase (Integrina Alfa V, Integrina Beta 1, Integrina Beta 3, VE- Caderina e PECAM) e parcialmente via receptor AT1 (PECAM). Além disso, AS diminuiu a produção de nitrito através do shear stress e Candesartan e DPI preveniram essa resposta (CT: 100±9%, SS: 503±20%, AS: 69±10%, AS+SS: 134±21% SS+Candesartan: 477±19%, SS+DPI: 498±19%). **CONCLUSÃO:** O estudo demonstrou que o AS reduz a migração de células endoteliais através da redução de expressão de moléculas de adesão via receptor AT1 e aumento da NADPH oxidase.

Palavras Chaves: 1. Elevada concentração de sódio 2. Migração celular 3. Célula Endotelial 4. Receptor AT1 5. NADPH oxidase

ABSTRACT

INTRODUCTION: Endothelial cell (EC) migration plays a central role in vascular response to pathological processes involved in vascular remodeling and formation of new vessels. High sodium (HS) is associated with cardiovascular disease and endothelial dysfunction. Although there are already studies showing changes in the endothelium when exposed to HS, it is important to understand how it may impact migratory phenotype of EC and the underlying molecular mechanisms. **OBJECTIVE**: To test the hypothesis that HS affects migratory phenotype of EC and investigate mechanisms involved independently of hemodynamic factors. **METHODS:** Human umbilical vein lineage of endothelial cell (EA.hy926) was used. Cell migration was evaluated by Wound-Healing method in the conditions: High sodium (HS, NaCl:160mM) and Control, (CT, NaCl:140mM) and with Candesartan, DPI, Tiron and Allopurinol blockers (N = 5 to 7). Superoxide anion production (O2-) was evaluated by DHE. O2- generated by NADPH oxidase activity was determined by chemiluminescence assay. Expression of adhesion molecules associated with migration was analyzed by RT-PCR. Shear Stress was performed using a rhythmic shake that mimics the shear. **RESULTS:** Migration was evaluated every two hours in period of 10h. HS reduced EC migration compared to CT (CT, 100 ± 14% vs HS, 74 ± 5%, $p < 0.05$) and Candesartan prevented these findings (* HS + Candesartan, 95 ± 7%), a similar result was seen with NADPH oxidase (* HS + DPI, 101 ± 12%) (* vs. HS, $p<0.05$). NADPH oxidase activity was increased when EC were exposed to HS and it was reduced by its inhibitor and AT1 receptor blocker (CT, 100 ± 24% vs HS, 375 ± 7%; HS + Candesartan, 116 ± 7%, HS + DPI, 110 ± 22%, * vs HS, $p < 0.05$). HS incubation leads to an increase in O_2^- production which was also inhibited by blocking the same pathways (CT, 100 ± 3% vs HS, 472 ± 15%, $p < 0.05$). HS decreased adhesion molecules expression via NADPH oxidase (Integrin Alpha 5, Integrin Beta 1, Integrin Beta 3, VE-Cadherin and PECAM) and partially via AT1 receptor. In addition, HS decreased nitrite production through shear stress and Candesartan and DPI prevented this response (CT: 100 ± 9%, SS: 503 ± 20%, HS: 69 ± 10%, HS + SS: 134 ± 21%). SS + Candesartan: 477 ± 19%, SS + DPI: 498 ± 19%). **CONCLUSION:** This study demonstrated that HS reduces EC migration by reducing adhesion molecules expression via AT1 receptor and increased NADPH oxidase activity.

Key Words: 1. High Sodium. 2. Cell Migration. 3. Endothelial Cell. 4. AT1 Receptor. 5. NADPH oxidase.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hipertensão arterial e elevada concentração de sódio

A hipertensão arterial é conceituada pela presença de níveis tensionais elevados, associados à hipertrofia cardíaca e remodelamento vascular (Berger *et al*., 2015). Essa doença crônica é capaz de causar danos vasculares, associado ao aumento do estresse oxidativo e inflamação, com consequente disfunção endotelial e muitas vezes, culminada com aterosclerose e eventos cardiovasculares. Atualmente, a hipertensão arterial é capaz de afetar no mundo inteiro, cerca de um bilhão de pessoas, sendo considerada como um problema grave na saúde pública (WHO, 2012). Diversos fatores estão envolvidos no desenvolvimento de hipertensão arterial, dentre eles está o consumo excessivo de sal na dieta, que apesar de ser um nutriente fisiologicamente essencial, seu consumo médio da população é bem acima das necessidades fisiológicas e acima do valor recomendado pela Organização mundial da Saúde: 2 (duas) gramas de sódio/dia, o equivalente a 5 gramas de sal/dia (WHO, 2012; WHO, 2013). No Brasil, um estudo avaliou a quantidade diária de sódio consumido pela população brasileira, por meio da análise de dados de aquisição de alimentos, em que foi demonstrado que o consumo médio de sódio por pessoa é de 4,5 gramas, excedendo o consumo mínimo recomendado, além disso, a hipertensão arterial no Brasil apresenta prevalência estimada de 30% na população adulta e responsável por 9,4 milhões de óbitos em todo mundo (Machado, 2015, WHO, 2013; Samo *et al*., 2009). Em Vitória- ES, um estudo realizado em 2003, demonstrou alto consumo de sal diário estimado a partir da excreção urinária de 12 horas entre os participantes, cerca de 12,6 ± 5,8 gramas, apresentando um consumo maior do que o preconizado (del Carmem Bisi Molina, de Sá Cunha, Herkenhoff, &

Mill, 2003). Infelizmente, segundo uma pesquisa em 2014 feita pela Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (VIGITEL), apenas 15,5% das pessoas entrevistadas entendem que existe alto conteúdo de sal nos alimentos (Vigitel Brasil 2014).

O cloreto de sódio (NaCl) é um composto comum na alimentação, que ainda que possa ser consumido em diversas formulações, sua forma de consumo mais tradicional é o sal de cozinha, que contêm o NaCl. Entretanto, mais do que um simples componente presente nos alimentos, o íon sódio (Na+) está relacionado à manutenção da homeostase do fluido biológico. A alta concentração de Na+ pode promover o fluxo osmótico entre os compartimentos intracelular e extracelular, o que pode comprometer a integridade da célula (Paar *et al*., 2015). A alta concentração de sódio também é bem conhecida por sua relação com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, levando a lesão de órgãos alvo, como os rins, coração e vasos sanguíneos. A alta ingestão de sódio tem sido fortemente relacionada à morbidade cardiovascular e remodelamento vascular e estudos tem mostrado que também está associada à disfunção endotelial (Drenjančević-Perić *et al*., 2011). Entretanto, efeitos diretos do sódio independente de suas mudanças hemodinâmicas no contexto cardiovascular ainda são desconhecidos. Além disso, estudos prévios mostraram que AS em cultura celular foi capaz de causar danos celulares. Dentre esses estudos, a sobrecarga do sódio foi capaz de enrijecer as células endoteliais vasculares *in vitro* (Oberleithner *et al*., 2011). Nesse estudo, Oberleithner *et al* relaciona o sódio e o enrijecimento celular, mostrando que o aumento agudo da concentração de sódio (135mM até 160mM) em células endoteliais pode alterar as propriedades mecânicas do endotélio vascular, prejudicando seu funcionamento. Gu e colaboradores mostraram que AS na concentração de 180mM induziu a hipertrofia

de células musculares lisas *in vitro*, além de proporcionar a diminuição da proliferação celular, sugerindo que o aumento da concentração de sódio, afeta a funcionalidade celular (Gu *et al*., 1998). Dmitrieva e colaboradores demonstraram que alta concentração de sódio foi capaz de causar senescência em células HeLa (Dmitrieva *et al*., 2007). Nesse estudo, a concentração de sódio elevada (200mM) em cultura de células pode acelerar a senescência celular e o envelhecimento em razão do dano de DNA e o aumento do estresse oxidativo observado. Esses estudos comprovam que altas concentrações de sódio afetam a integridade celular, entretanto, não há estudos apresentando o efeito da AS no fenótipo migratório de células endoteliais.

1.2. O endotélio

O vaso sanguíneo é constituído por três principais túnicas, a túnica externa, formada principalmente por tecido conjuntivo, a túnica média, composta pela musculatura lisa e a túnica íntima que é constituída por células endoteliais (Figura 1) (Sandoo *et al*., 2011). Em destaque, o endotélio é uma extensa camada tecidual celular em que é capaz de recobrir a face interna dos vasos sanguíneos e coração (Teixeira *et al*., 2014).

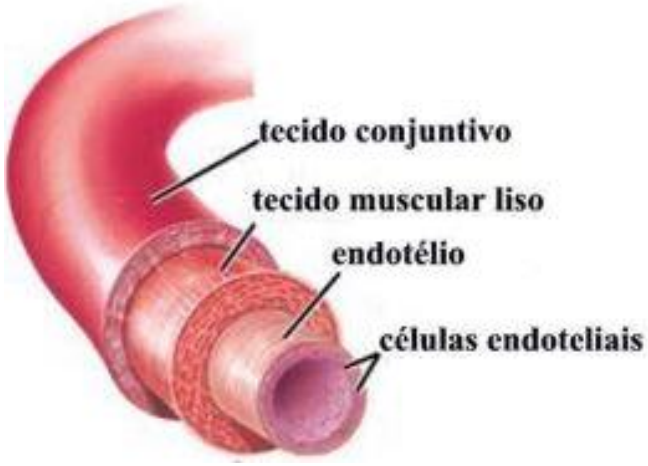


Figura 1: **Estrutura do vaso sanguíneo.** Túnica externa: tecido conjuntivo, túnica média: tecido muscular liso e túnica íntima: endotélio formado por células endoteliais. (Adaptado: Perez E 2009).

Em 1977, pela primeira vez, pesquisadores mostraram que o endotélio não era apenas uma camada de células, mas sim, possuía um papel crucial no controle do tônus vascular por meio da produção de componentes vasoativos (Moncada *et al*., 1977). Atualmente, é bem descrito outras funções do endotélio, dentre elas, a regulação da permeabilidade, migração de leucócitos, inflamação, coagulação e participação ativa na manutenção do tônus vascular e da homeostase intravascular, além disso, o endotélio participa na homeostase do sistema cardiovascular capaz de controlar a camada muscular subjacente por liberação de fatores vasodilatadores e vasoconstrictores (Vita, 2011). Dentre as substâncias vasodilatadoras, antiproliferativas e antiagregantes plaquetárias, destacam-se o fator de relaxamento dependente do endotélio (EDRF/NO), fator hiperpolarizante dependente do endotélio (EDHF), prostaciclina e bradicinina, já as substâncias vasoconstrictoras, promotoras

do crescimento celular e ativadoras plaquetárias destacam-se, endotelinas, endoperóxidos cíclicos (prostaglandina H2 e tromboxano A2), leucotrienos, angiotensina II e espécies reativas de oxigênio, essas substâncias atuam equilibradamente para regular o tônus vascular basal e a resposta vasomotora a diferentes estímulos (Vanhoutte *et al*., 2017; Vita, 2011). Além disso, a disfunção endotelial é caracterizada pelo desequilíbrio entre os fatores relaxantes derivados do endotélio que são responsáveis em regular o tônus vascular com os fatores vasoconstritores, além do aumento de agregação plaquetária e da coagulação. A fisiopatologia da disfunção endotelial observada na hipertensão arterial envolve a redução da resposta vasodilatadora devido a menor produção e biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e o aumento das espécies reativas de oxigênio o que caracteriza o efeito do estresse oxidativo (Batista *et al*., 2015).

O endotélio participa também no processo de angiogênese, para a formação de novos vasos sanguíneos, que em resposta a um estímulo ou injúria, tem como objetivo de restaurar a integridade vascular (Borges *et al*., 2012). É importante que na angiogênese ocorra a proliferação de células endoteliais, o remodelamento da matriz extracelular e a formação da estrutura tubular, tendo como destaque, a ação migratória de células endoteliais, visto que essas células diante de uma injúria conseguem se locomover até o vaso danificado para preencher o espaço aberto e consequentemente repará-lo (Michaelis, 2014).

1.3. Migração celular

O movimento da célula endotelial em uma superfície representa a maneira de se locomover e quando a célula consegue se deslocar de um espaço para o outro, pode-se definir essa ação como migração celular. Entretanto, essa função, vai muito

além do fato de se mover, pois, células endoteliais são também capazes de realizar a migração celular com objetivo de promover o crescimento e reparação tecidual durante a vasculogênese e angiogênese respectivamente, sendo assim, a migração de células endoteliais tem um papel fundamental nos processos fisiológicos e patológicos durante a vida (Ammann *et al*., 2015).

Entretanto, para que uma migração endotelial coordenada ocorra, alguns passos são necessários, com isso, é essencial que aconteça o movimento celular efetivo envolvendo transdução de sinal e organização do citoesqueleto para promover a polarização celular e protrusão, formação da adesão e por fim o movimento à jusante (Michaelis, 2014). Todos esses processos são necessários para que a migração de células endoteliais possa ser realizada de maneira adequada. Todavia, anormalidades na migração celular podem estar presentes em doenças cardiovasculares, como consequência disso, a migração de células endoteliais pode ocorrer de maneira desordenada ou existir um prejuízo real na capacidade migratória, com isso, a rápida reconstrução da contínua camada endotelial pode não ser realizada adequadamente (Sun *et al*., 2009).

Além disso, em processos patológicos, como a hipertensão arterial, prejuízos na estrutura e função vascular podem ser observados. A hipertensão leva ao aumento do tônus, além de contribuir para o aumento da permeabilidade e da aderência leucocitária à parede vascular (Batista *et al*., 2015). Com isso, diante uma injúria vascular, à migração de células endoteliais pode não ocorrer de forma coordenada e como consequência, prejudicar a restauração da estrutura vascular (Ammann *et al*., 2015).

1.4. Sistema Renina Angiotensina (SRA)

Já se sabe que a regulação e reabsorção de sódio são moduladas através dos componentes do Sistema Renina angiotensina (SRA) sendo considerado como principal regulador da pressão arterial (Abadir *et al*., 2012). Além disso, existem dois tipos de SRA: o circulante e o local, esse último é descrito mais recentemente e que parece desempenhar papel importante na homeostase circulatória além de estar presente na cultura celular (Sparks *et al*., 2014). O SRA circulante é coordenado através de ações integradas no rim, sistema cardiovascular e sistema nervoso central. Para funcionamento desse sistema inicialmente o angiotensinogênio é produzido pelo fígado, renina que é liberada pelos rins realiza a conversão de angiotensinogênio para angiotensina I, em seguida a ECA (enzima conversora da angiotensina) é a responsável pela conversão de angiotensina I para angiotensina II na qual é encontrada no endotélio vascular de vários órgãos. Uma vez ativada a cascata, angiotensina II é capaz de circular pelo sangue e atuar em receptores específicos, atingindo suas estruturas-alvo: vasos sanguíneos, rins, coração, suprarrenais e o sistema nervoso simpático (Sparks *et al*., 2014).

Entretanto, o SRA local, tem sido descrito em operar de maneira independente do SRA sistêmico, visto que se refere aos mecanismos de formação dos componentes desse sistema baseados no tecido (Campbell, 2014). Embora muitos conceitos diferentes do SRA local tenham sido descritos, uma característica central é a síntese local de componentes SRA incluindo angiotensinogênio e enzimas tais como renina que clivam o angiotensinogênio para produzir peptídos de angiotensina independentemente do SRA em circulação (Campbell, 2014). Esse SRA local pode ser encontrado nos rins, coração, vasos sanguíneos e muitos outros tecidos na qual é capaz de participar na regulação cardiovascular local e na

vasculatura, podendo estar envolvido no remodelamento e tônus vascular (Rahimi *et al*., 2014).

1.4.1 Receptor AT1

O SRA produz peptídeos hormonais que sinalizam através de receptores na superfície celular que são classificados como receptores de angiotensina (Singh *et al*., 2016). Dentre esses receptores destaca-se o receptor AT1 em que é uma proteína integral de membrana, pertencente à família dos receptores com sete domínios transmembrânicos acoplados a proteína G (Barauna, 2009). Esse receptor participa nos principais efeitos cardiovasculares da angiotensina II e sua ativação anormal pode levar ao remodelamento cardiovascular e hipertrofia, inflamação vascular e aterosclerose, disfunção endotelial e estresse oxidativo (Karnik *et al*., 2015). Além disso, já se sabe que angiotensina II pode ativar o receptor AT1 e quando produzida localmente pode induzir a inflamação, contribuir para lesão tecidual através da ativação de vias de sinalização intracelular e até mesmo induzir a apoptose (Miura *et al*., 2011; Benigni *et al*, 2010 Kobori *et al*., 2007). Estudos tem demonstrado que através desse receptor, Angiotensina II pode ativar também vias de sinalização como a Rho/ROCK que contribuem para o remodelamento cardiovascular, inflamação vascular, disfunção endotelial, proliferação e migração de células musculares lisas (Singh et al., 2016; Higuchi et al., 2007). Além disso, Nickenig e colaboradores mostraram que o alto sódio foi capaz de aumentar a expressão gênica do receptor AT1, tanto em ratos *Sprague-Dawley* quanto em cultura de células musculares lisas (Nickenig *et al*., 1999), sugerindo que o aumento de NaCl pode causar o aumento da pressão arterial através do aumento da expressão desse receptor.

Dentre as vias de sinalização que podem ser ativadas pelo receptor AT1, destaca-se a via da NADPH oxidase. Para isso, uma estimulação inicial do receptor AT1 pela angiotensina II resulta na fosforilação da enzima fosfolipase C (PLC) em que é capaz de produzir tanto inositol trifosfato (IP3) quanto diacilglicerol (DAG). DAG juntamente com a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático através do IP3 acarretam na ativação da proteína quinase C (PKC), levando a fosforilação da subunidade p47phox e como consequência, uma ativação inicial da NADPH oxidase que é capaz de produzir o ânion superóxido (O_2^-) (Figura 2) (Fazeli *et al*., 2012).

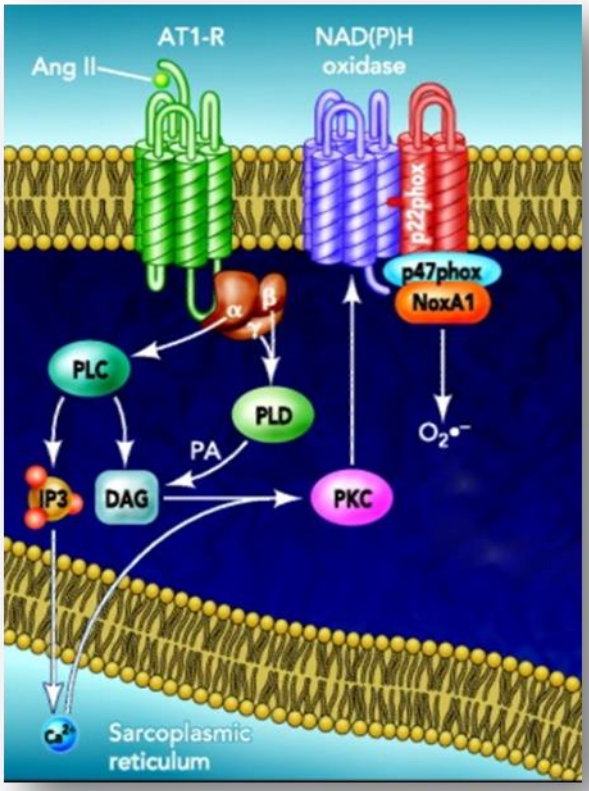


Figura 2: Ativação da NADPH oxidase via receptor AT1: Figura ilustrativa da estimulação da NADPH oxidase via receptor AT1 (AT1-R). Ang II (Angiotensina II), Fosfolipase C (PLC), Inositol trifosfato (IP3), Diacilglicerol (DAG), Cálcio (CA^{2+}), Fosfolipase D (PLD) Proteína quinase C (PKC), ânion superóxido (O^{2-}). Figura adaptada: Alicia N. Lyle 2006.

1.5. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido pelo desequilíbrio entre os sistemas antioxidantes e pró-oxidantes, prevalecendo à ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) sobre células, tecidos e órgãos. A produção de EROs em excesso caracteriza o estresse oxidativo na qual reduz a biodisponibilidade de óxido nítrico, favorece os eventos inflamatórios, além de aumentar a adesão de neutrófilos na parede dos vasos (Schieber *et al*., 2014). As principais fontes de EROs são por via mitocondrial e NADPH oxidase entretanto, Xantina oxidase e ciclooxigenases também são capazes de produzir $O_2^{\cdot -}$ e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que são espécies reativas de oxigênio (Chan *et al*., 2012). Todavia, a principal fonte de produção de EROs via ativação do receptor AT1 é a NADPH oxidase, através da produção de O_2^- (Fazeli *et al*., 2012).

Em condições normais, as células possuem alguns sistemas para a eliminação dessas EROs, como por exemplo os sistemas: 1) enzimático (superóxido dismutase, catalase), 2) não enzimático (Vitamina C e E), 3) sistema de incorporação dos radicais livres nas bases nitrogenadas, por meio das bases hidroxilas do DNA e 4) enzimas de reparo de DNA, esses sistemas são também conhecidos como antioxidantes, que são capazes de diminuir a produção das EROs e assim reparar os danos celulares (Ma *et al*., 2008). Em condições patológicas, a integridade da célula endotelial pode ser comprometida através do aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, afetando algumas funções celulares incluindo a redução da capacidade migratória (Desideri *et al*., 2003). Além disso, essas espécies reativas de oxigênio têm sido implicadas em dano celular, necrose e apoptose devido seus efeitos oxidantes diretos em proteínas e DNA, além de

diminuírem a expressão gênica de importantes moléculas de adesão, como as integrinas (Elahi *et al*., 2009; Manrique *et al*., 2009; Sedeek *et al*., 2009).

1.6. Moléculas de adesão

Moléculas de adesão participam ativamente durante a migração celular e dentre as principais moléculas de adesão nas células endoteliais, destacam-se: i- Integrinas, ii- VE-caderina (VE- Endotelial vascular) e iii- PECAM (molécula de adesão celular endotelial/ plaqueta). A família integrina promove a ligação matriz extracelular-célula e é a principal mediadora da adesão da célula endotelial durante a migração. Além disso, as integrinas são heterodímeros transmembrânicos compostos pelas subunidades alfa e beta, que controlam a migração celular pela regulação das vias de sinalização intracelular (Campbell *et al*., 2011). VE-Caderina é exclusiva do endotélio, e essa proteína é considerada como um marcador endotelial, sua expressão promove agregação celular e motilidade celular (Giannotta *et al*., 2013). Por outro lado, PECAM é uma importante molécula de adesão para a ligação célula-célula, sua baixa expressão pode prejudicar essa interação e comprometer a integridade celular, pois, se a célula não estiver fortemente ligada à outra, a capacidade de células endoteliais em formar uma monocamada confluente pode ser afetada e consequentemente a sobrevivência celular também (Lertkiatmongkol *et al*., 2016). Em células endoteliais, moléculas de adesão são importantes para sua sobrevivência e quando essas células perdem o contato célula-célula ou célula-matriz extracelular, elas podem evoluir para evento apoptótico, podendo evoluir para morte celular (Vicente-Manzanares *et al*., 2009).

Lamari demonstrou que o estresse oxidativo em células endoteliais (Eahy.926) é capaz de afetar a expressão de moléculas de adesão,

consequentemente, prejudicando assim a adesão celular (Lamari *et al*., 2007). Neste estudo foi demonstrado o efeito negativo causado pelo estresse oxidativo na expressão gênica de importantes moléculas de adesão (integrina alfa 5 e alfa V) em células endoteliais.

1.7. *Shear Stress*

Shear Stress (SS) ou estresse de cisalhamento é uma força mecânica sobre a superfície do endotélio e que pode modular a regulação do tônus vascular, resposta inflamatória e estimular a produção de óxido nítrico (Cecchi *et al*., 2011). Brevemente, para a liberação de NO pelo SS é necessário que ocorra a ativação de canais para cálcio sensíveis a tensão de cisalhamento (SAC) promovida pelo sangue, quando há esse aumento da tensão, há a abertura desses canais, possibilitando o influxo de cálcio para as células endoteliais. Com isso, ocorre o aumento da concentração de cálcio intracelular, o que ativa a enzima do nítrico sintase endotelial (eNOS). A eNOS é responsável pela conversão de L-arginina para L-citrulina e NO (Figura 3) (Tousolis *et al*., 2012).

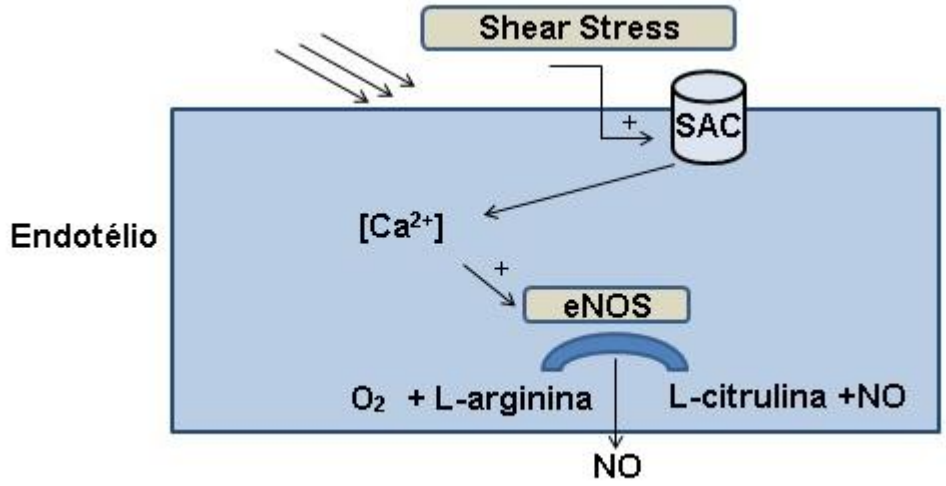


Figura 3: Ação do *shear stress* na produção de óxido nítrico: canais para cálcio sensíveis a tensão de cisalhamento (SAC), [Ca^{2+}] cálcio; eNOS: enzima do nítrico sintase endotelial, $O_{2:}$ Oxigênio.

Um endotélio íntegro consegue responder ao SS e desempenhar um papel protetor vascular principalmente por meio da produção do NO o que possibilita um equilíbrio fisiológico para manutenção ideal do tônus vascular. Além disso, a principal via de metabolismo do NO é a oxidação gradual para nitrito, onde se mantêm estável durante várias horas e têm sido amplamente utilizado como um índice de atividade endotelial sintase como medida indireta de rotina dos níveis de NO (Kleinbongard *et al*., 2003). Esse vasodilatador é considerado por estar envolvido no relaxamento vascular, exercendo um potente efeito antiaterogênico, prevenindo a adesão e agregação plaquetária, tendo um papel chave para a proteção do vaso sanguíneo (Teixeira *et al*., 2014).

2. JUSTIFICATIVA

A ingestão elevada de sal tem sido associada ao desenvolvimento de hipertensão arterial e outras doenças cardiovasculares, além de complicações como a insuficiência renal, acidente vascular cerebral e hipertrofia cardíaca (Ha *et al*., 2014). Além disso, o alto consumo de sal agrava a evolução de doenças cardiovasculares sendo desta forma um fator crítico para morbidade e mortalidade destes pacientes. Apesar de já existirem alguns trabalhos sobre o efeito direto da AS sobre o fenótipo e função de células, o efeito da elevada concentração de sódio sobre o fenótipo migratório de células endoteliais ainda não foi estudado, como também os mecanismos moleculares que possam estar presentes nos efeitos encontrados.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Testar a hipótese de que a elevada concentração de sódio afeta o fenótipo migratório de células endoteliais e investigar os mecanismos moleculares envolvidos nesse efeito independente dos fatores hemodinâmicos.

3.2. Objetivos Específicos

Investigar a viabilidade celular na alta concentração de sódio em cultura de células endoteliais;

Avaliar o efeito migratório na alta concentração de sódio em cultura de células endoteliais;

Estudar o efeito da participação do receptor AT1 na migração de células endoteliais incubadas com elevada concentração de sódio;

Estudar o efeito espécies reativas de oxigênio na migração celular incubadas com elevada concentração de sódio por meio do Tiron;

Verificar a participação da NADPH oxidase na migração de células endoteliais incubadas com elevada concentração de sódio;

Verificar a participação das moléculas de adesão associadas à migração de células endoteliais incubadas com elevada concentração de sódio;

Avaliar o efeito da elevada concentração de sódio em células endoteliais no fenótipo do *Shear Stress* e sua possível participação na produção do óxido nítrico.

4. MATERIAL E MÉTODOS:

4.1. Cultura Celular

Linhagem de células endoteliais de veia umbilical humana (EAhy.926) foi comercialmente obtidas pelo ATCC (*American Type Culture Collection* -ATCC, Rockville, MD). Células endoteliais (CE) foram cultivadas em meio *DMEM high glucose* suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), penicilina 100U/ml e estreptomicina 100U/ml em uma estufa umidificada a 37ºC e 5% de CO_2. Antes de realizar os estímulos, as células endoteliais foram submetidas a um processo denominado *starving*, na qual foram mantidas em meio de cultura com menor porcentagem de FBS (0,5%), com o objetivo de colocar todas as células na mesma fase do ciclo celular. A osmolaridade do sódio no meio do controle (CT) foi de 140mM e o meio com elevada concentração de sódio (AS) foi preparado pela adição de Cloreto de Sódio (NaCl) com uma concentração final de 160mM. Todos os reagentes foram comprados da *Sigma Chemical Co.* (Sigma-Aldrich, MO, USA). Quando adicionamos sódio no meio de cultura alteramos a osmolaridade do meio e do sódio assim, para excluirmos o efeito da osmolaridade do meio, adicionamos *mannitol*, como controle osmótico, visto que é um composto quimicamente inerte e não tóxico. A quantidade de manitol adicionada ao meio de cultura chegou à mesma osmolaridade do meio onde foi adicionado sódio. A osmolaridade do meio não foi medida, somente a osmolaridade do sódio no meio.

4.2. Drogas e Reagentes

Cloreto de Colina (1M), usado para excluir a participação do cloreto, Candesartan (1µM), bloqueador do receptor AT1 (AT1), DPI (100nM) flavoproteína inibidor difenileno-iodônico, Alopurinol, bloqueador da Xantina Oxidase (100µM) e Tiron (100µM), varredor de espécies reativas de oxigênio. Todos os inibidores foram adicionados no meio de cultura 30 minutos antes do estímulo com o alto sódio.

4.3. Ensaio do Azul de Tripan

A marcação pelo azul de tripan foi usada para determinar a viabilidade de células endoteliais (Zungu *et al*., 2009). Brevemente, $65x10^4$ CE foram cultivados em placa de cultura celular de seis poços, incubados até alcançarem a confluência de 90% e então o soro *starving* com 0,5% FBS durante a noite foi realizado. CE foram incubados com AS e CT por 24 e 72 horas. A proporção em volume utilizada do reagente azul de tripan foi de 1:1 em relação ao volume de células. A porcentagem de células marcadas em azul foi obtida usando o microscópio com a câmera de *Neubauer* com quatro áreas.

4.4. Ensaio de Migração Celular

A migração celular foi realizada pelo método *Wound-Healing* (Fan *et al*., 2000). Resumidamente, $65x10^4$ CE foram cultivadas em uma placa de meio de cultura de seis poços, incubadas por 24 horas até as células chegarem à confluência de 100% e então o *starving* foi realizado durante a noite com soro a 0,5% FBS. Para o experimento foi realizado risco com a ponteira (P10) no fundo de cada poço de maneira a ficar um espaço vazio sem células para avaliar a migração e então AS e

CT foi adicionado. O registro foi realizado a cada duas horas, por um período de 10 horas na mesma área usando o microscópio com a objetiva de 10x e imagens foram capturadas usando uma câmera digital (BEL Eurekam). A área da migração celular foi analisada usando *Image J software* 1.44p (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, disponível em http://imagej.nih.gov/ij). Nesse programa é possível delimitar a área que a célula migrou, para isso, a imagem tirada de cada hora da migração é analisada individualmente no programa. Em seguida, utiliza-se a ferramenta de delimitação de área que é feita manualmente e está representada na figura abaixo como a linha amarela (indicada pela seta). Por fim, o programa Image J calcula em pixels a área interna a marcação dessa linha amarela (área representada pelo “X”). Assim, temos o valor da área migrada em pixels.

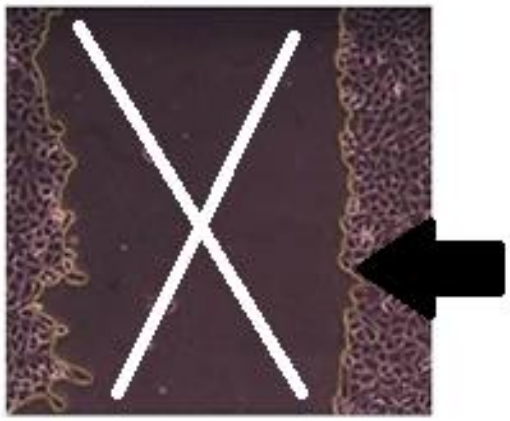


Figura 4: Imagem representativa da análise de migração celular no programa Image J: Seta aponta a linha amarela que delimita a área. O “x” representa a área interna da marcação da área migrada.

4.5. Ensaio do DHE

A marcação fluorescente do diidroetídio (DHE) foi usada para avaliar a produção do ânion superóxido (Furieri *et al*., 2010). Brevemente, $65x10^4$ CE foram cultivadas em uma placa de meio de cultura de seis poços, incubadas por 24 horas até as células chegarem à confluência de 90% e então o *starving* foi realizado durante a noite com soro a 0,5% FBS. CE foram incubadas por 10 horas com meio CT e AS. CE foram incubadas com DHE 10µM e DAPI 20µg/ml por 30 min à 37ºC. Imagens foram adquiridas usando um microscópio invertido fluorescente (Leica DM 2500) com objetiva 20x e capturadas usando uma câmera digital (Leica DFC 310 FX). Dados foram obtidos pela mensuração da intensidade de fluorescência vermelha na emissão de 546nm e comprimento de onda 610nm, normalizado pelo número total de células marcadas pelo DAPI e quantificadas usando o programa *Image J.*

4.6. Atividade da NADPH oxidase

O ânion superóxido gerado pela atividade da NADPH oxidase foi determinado usando um ensaio de quimiluminescência (Simone *et al*., 2014). Resumidamente, $200x10^4$ de CE foram cultivadas em uma garrafa de cultura celular (T25), incubadas até atingirem 90% de confluência e *starving* foi realizado durante a noite com soro a 0,5% FBS. CE foram incubadas por 10 horas com meio CT e AS. CE foram tripsinizadas e então homogenizadas em um *lysis buffer* (50mM KH2PO4, 1mM ácido etileno glicol tetracético, 150mM sucrose, pH=7.4). A reação foi iniciada com adição da lucigenina 5µM. Depois da leitura, NADPH 100µM foi adicionado em cada amostra e uma segunda análise foi realizada. Emissão de *photons* foi mensurada em unidade de luz relativa (ULR) a cada 1s no período de 1 minuto em um GloMax

20/20 *Single Tube Luminometer* (Madison, USA). Dados foram expressos como unidade arbitrária de luminescência por segundo.

4.7. RT-PCR

Expressão de mRNA foi detectado e quantificado pela reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real (RT-PCR) (Zovico *et al*., 2016). Brevemente, $200x10^4$ de células endoteliais foram cultivadas em uma garrafa de cultura celular (T25), incubadas até atingirem 90% de confluência e o *starving* foi realizado durante a noite com soro a 0,5% FBS. CE foram incubadas por 10 horas com meio CT e AS. RNA total foi isolado das células usando o reagente TRIZOL de acordo com as instruções do produtor (Invitrogen Life Technologies USA). Sequências dos primers usados para PCT-RT foram as seguintes: PECAM, 5'-CACAGATGAGAACCACGCCT-3' e 5'-GGCCCCTCAGAAGACAACAT-3'; VE-Caderina, 5'-ATGAGATCGTGGTGGAAGCG-3' e 5'-TGTGTACTTGGTCTGGGTGAAG-3'; Integrina Alfa V, 5'-TGCCAGGGTCTTTCTACCTCT-3' e 5'- GGGTGCCTAGGAGCATTTGT-3'; Integrina Alfa 5, 5'- TGGCCTTCGGTTTACAGTCC-3' e 5'- GGAGAGCCGAAAGGAAACCA-3'; Integrina Beta 1, 5'- GCCGCGCGGAAAAGATGAAT-3' e 5'-CACAATTTGGCCCTGCTTGTA-3'; Integrina Beta 3, 5'-CGAGTGCCTCTGTGGTCAAT-3' e 5'- AGAAGTCGTCACACTCGCAG-3'; Integrina Beta 5, 5'- GCGGACTTAAAATGGTGCCC-3' e 5'- CCCGAGCACCTCATGCTTAC-3'. A expressão da ciclofilina A (5'-TGGCAAGCATGTTGGGTCTTTGGGAG-3' e 5-GGTGATCTTCTTGCTGGTCTGCCATTC-3') foi usada como um controle interno. A concentração das amostras de RNA total foi quantificada usando o espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, USA). A integridade foi

verificada através de eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0.5 µg/mL de brometo de etídeo. Foi realizada curva padrão para os primers utilizados. Para o cálculo da expressão gênica, o método de ciclo *comparative threshold* (Ct) foi usado para análise dos dados, Ct indica o número de ciclo fracional que a quantidade do alvo amplificado atinge um limiar fixo, e o ΔCt é a diferença no ciclo limite para o alvo (CRP3/MLP) e referência (285 ou ciclofilina). Os níveis de expressão gênica de CRP3/MLP foram obtidos pelo $2^{-\Delta\Delta CT}$; onde ΔΔCt é o valor ΔCt subtraído do ΔCt da amostra. A expressão dos genes alvos foi quantificada pelo SYBRgreen PCR Master Mix (Applied Biosystem CA, USA). A expressão relativa dos mRNA foi realizada pelo PCT-RT em ABI PRISM 7500 *Sequence Detection System* (Applied Biosystem).

4.8. *Shear Stress*

SS foi realizado usando um aparelho rítmico que mimetiza o *shear* como previamente descrito (Oberleithner *et al*., 2007). Brevemente, $65x10^4$ CE foram cultivadas em uma placa de cultura (P35), incubadas até atingirem 90% de confluência e o *starving* foi realizado durante a noite com soro a 0,5% FBS. CE foram incubadas por 10 horas com meio CT e AS. Depois do tratamento, CE foram expostas ao *shear stress* por 20 minutos. Placas controle permaneceram por 20 minutos em temperatura ambiente sem realizar o *shear.* Meio de cultura foi coletado para análise de nitrito. Óxido nítrico mensurado foi obtido pela reação de Griess (Bassaneze *et al*., 2010). Em resumo, 100µl do sobrenadante da cultura celular foi adicionado a 100µl do reagente Griess (1% sulfanilamida com 0,1 % de alfa-naftil etilenodiamina, preparado no momento de uso). Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, a absorbância de cada amostra foi determinada em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 540nm. A concentração de nitrito

das amostras foi determinada a partir de uma curva padrão de $NaNO_2$. Os dados de nitrito foram obtidos na concentração de micro molar (µM) e apresentados em valores % Controle.

4.9. Análise Estatística

Dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Diferença estatística foi avaliada usando ANOVA uma ou duas vias seguido como pós-teste Bonferroni com múltiplas comparações quando apropriado. Análise estatística e construção dos gráficos foram realizados com um programa de computador denominado Prisma *GraphPad* versão 6.0 para Windows (*GraphPad Software*, La Jolla, California, USA). Diferença estatística foi considerada como $p<0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. A elevada concentração de sódio não afetou a viabilidade de células endoteliais

A análise de morte celular é feita quantificando o número de células marcadas pelo corante azul. Células foram incubadas com AS no período de 24 e 72 horas (h) e células positivas foram contadas. Na figura 5, a análise mostrou que 99% das células permaneceram viáveis em ambos os tempos de incubação. Assim, AS não prejudica a viabilidade de células endoteliais.

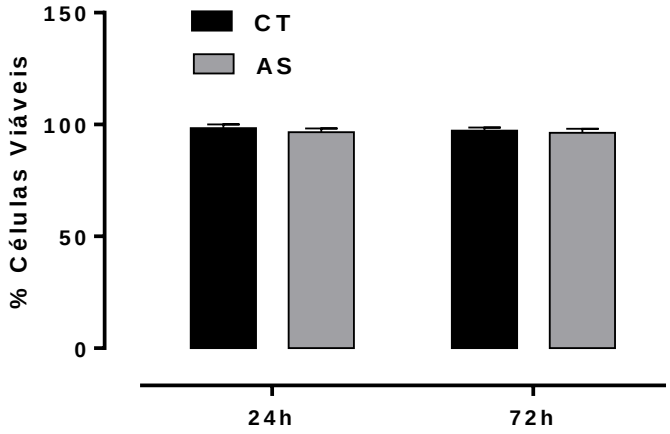
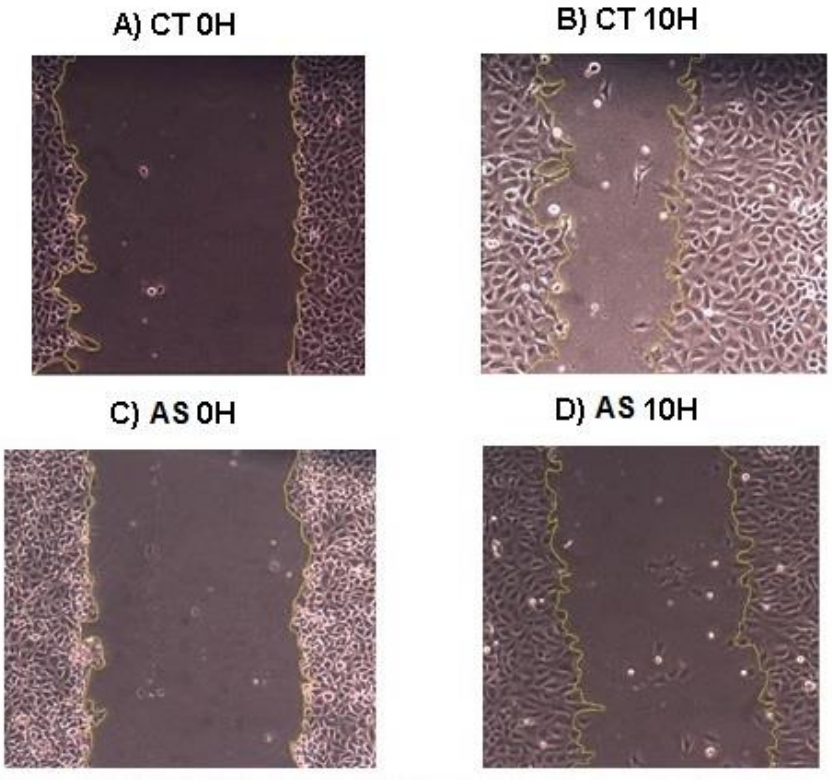


Figura 5: A elevada concentração de sódio não afetou a viabilidade de células endoteliais: Células endoteliais foram expostas ao AS e CT por 24 e 72 horas e em seguida avaliado mortalidade celular pelo Azul de Tripan. AS, meio com elevada concentração de sódio (160mM); CT, Controle (140mM). Dados foram representados como média ± EPM, (n=5).

5.2. Elevada concentração de sódio diminuiu a migração de células endoteliais

Nós investigamos os efeitos da AS no fenótipo migratório de células endoteliais pelo ensaio *Wound-Healing.* A figura 6A mostra uma imagem representativa do experimento com AS na migração nos tempos de 0 e 10 horas. Fotos foram capturadas por período de 10 horas em intervalos de 2 em 2 horas. Os dados representam a área migrada para cada intervalo de tempo comparado com o controle. AS diminuiu a migração de células endoteliais a partir do ponto de 4 horas e permaneceu reduzida durante todos os outros pontos analisados (4h; CT, 100±8% vs. AS, 65±6%; 10h; CT, 100±14 % vs. AS, 74±5% - figura 6B), sugerindo que o aumento da concentração extracelular de sódio, afeta a migração de células endoteliais. A partir destes dados, foi escolhido o tempo de 10 horas depois do estímulo com AS para realização de todos os experimentos da migração contidos neste trabalho.

a)



b)

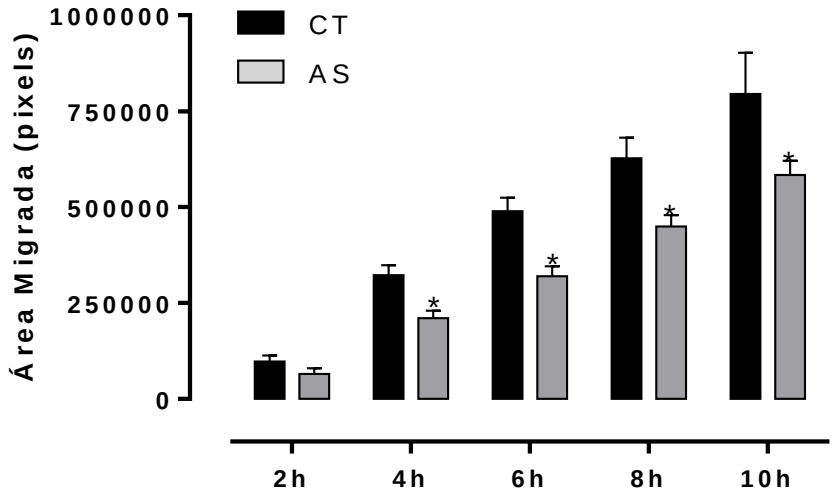


Figura 6: Elevada concentração de sódio diminuiu a migração de células endoteliais: A) Imagens representativas da migração de células endoteliais nos tempos de 0 e 10 horas. A marcação em amarelo delimita a área da migração celular. B) Migração de células endoteliais por 10 horas com AS. AS; meio com elevada concentração de sódio (160mM); CT, Controle (140mM). Dados são representados como média ± EPM, *p<0.05 vs. Controle; (n=5).

5.3. Cloreto de Colina não afetou a migração de células endoteliais

O cloreto de sódio adicionado ao meio de cultura para a condição AS, eleva a concentração de ambos os íons sódio e cloreto no meio. Para sabermos se o efeito visto até o momento pode ser explicado exclusivamente pelo sódio, realizamos a migração com o Cloreto de Colina à 1M. A figura 7 mostra que o cloreto de colina não levou a redução na migração celular quando comparado ao meio controle quando avaliado até 10 horas de experimento. Esse resultado comprova que a ação da alta concentração de NaCl observada na migração celular é devido

ao sódio e não ao cloreto. A adição do *mannitol* não provocou alterações na migração de células endoteliais no meio controle, sugerindo que AS diminui a migração celular de forma independente da pressão osmótica, ou seja, o efeito observado na migração não é pela osmolaridade e sim pela adição do sódio.

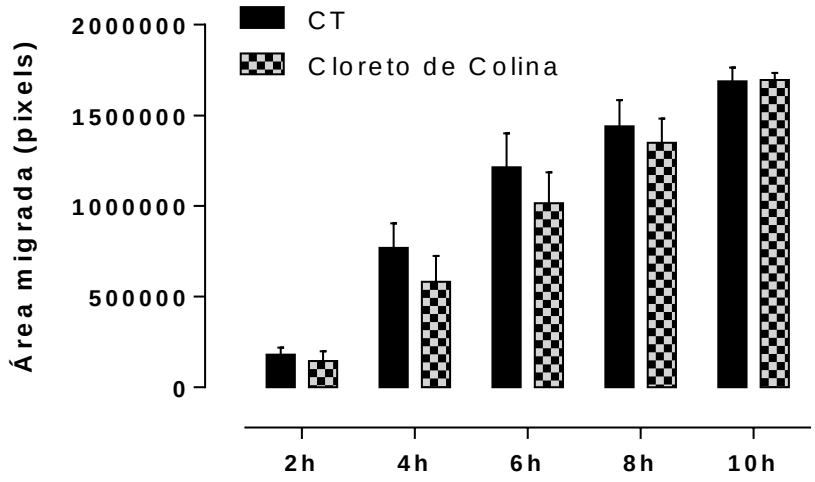


Figura 7: Cloreto de Colina não afetou a migração de células endoteliais. Células incubadas por 10 horas (Controle e Cloreto de Colina). Análise a cada 2 horas. Dados são representados como média ± EPM; (n=5).

5.4. A diminuição da migração de células endoteliais induzida pela elevada concentração de sódio está relacionada ao receptor AT1 e NADPH oxidase

Nós testamos as vias que poderiam estar envolvidas na redução da migração induzida pelo AS, com isso, nosso primeiro passo pela identificação da via foi realizar o bloqueio do receptor AT1, por meio do Candesartan. A figura 8 mostra que o antagonista do receptor AT1 preveniu a redução de migração induzida pelo AS em células endoteliais (CT, 100±8%; AS, 66±11% e AS + Candesartan, 95±7%). Dentre as diferentes vias ativação pela estimulação do receptor AT1, uma delas é a via do estresse oxidativo principalmente pela NADPH oxidase, então nosso próximo passo foi avaliar a participação de EROs. Para tal, células foram pré-incubadas com varredor de EROs, TIRON e esse inibidor também preveniu o prejuízo na migração induzida pelo AS (CT, 100±8%; AS, 66±11% e AS+Tiron, 86±7% - figura 8). Visto que a NADPH oxidase é a principal fonte intracelular de EROs e está relacionado a ativação do receptor AT1, nós inibimos a NADPH oxidase com DPI. A migração de células endoteliais reduzida pelo AS foi prevenida pela pré-incubação com DPI (CT, 100±8%; AS, 66±11% e AS+DPI, 101±12%- figura 8). Entretanto, DPI pode inibir tanto a NADPH oxidase quanto a Xantina Oxidase. Desta forma, para confirmar o papel exclusivo da NADPH oxidase, foi utilizado o alopurinol, um inibidor específico da Xantina Oxidase. A incubação com alopurinol foi incapaz de prevenir a redução de migração causada pelo AS no tempo de 10 horas (CT, 100±8%; AS, 66±11%; AS+Alopurinol, 47±6%- figura 8). Esses dados sugerem que a via da NADPH oxidase parece ser responsável pela a geração de EROs causada pelo AS, e não Xantina Oxidase, tendo papel importante na redução da migração de células endoteliais pelo AS.

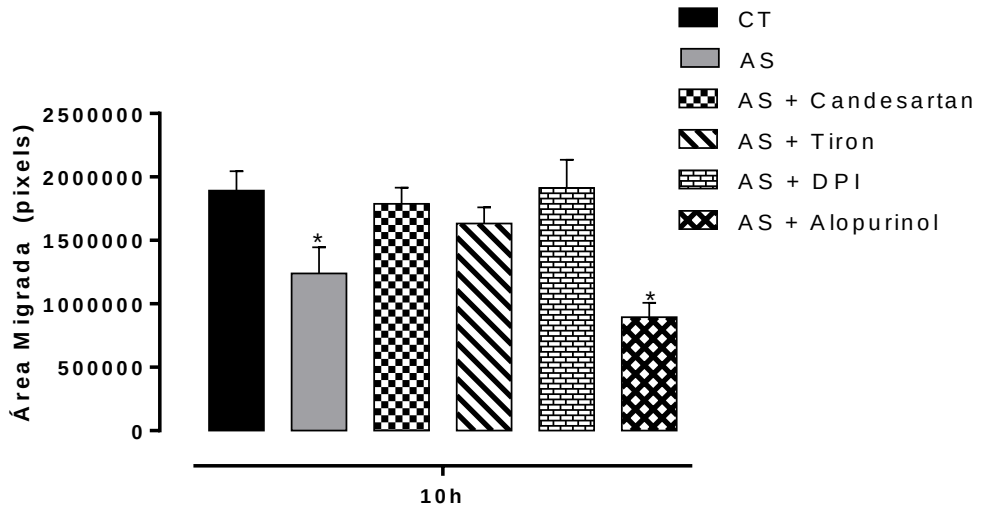


Figura 8: Candesartan e DPI preveniram a redução de migração de células endoteliais induzidas pela elevada concentração de sódio: Antagonista do receptor AT1, Candesartan (1µM); varredor de EROs, Tiron (100µM); DPI (100nM) e Alopurinol (100µM). Inibidores foram incubados 30 minutos antes do AS. AS, meio com elevada concentração de sódio (160mM); CT, Controle (140mM). Dados são representados como média ± EPM. *p<0.05 vs. Controle (n=5).

Como controle positivo para verificar se o resultado encontrado com a alta concentração de sódio estaria de acordo com a adição de Angiotensina II, visto que esse peptídeo é capaz de ativar o receptor AT1, realizamos uma migração adicionando Angiotensina II no meio de cultura, obtendo concentrações finais 10^{-9}M, 10^{-7}M e 10^{-6}M. A presença da Angiotensina II no meio de cultura fez com que a migração de células endoteliais diminuísse nos tempos de 4 h (CT: 100 ± 1%; ANG II 10^{-9}M: 73 ± 1%; ANG II 10^{-7}M: 51 ± 3% e ANG II 10^{-6}M: 39 ± 3%) e 10 h (CT: 100 ± 2%; ANG II 10^{-9}M: 66 ± 2%; ANG II 10^{-7}M: 49 ± 3% e ANG II 10^{-6}M: 41 ± 2%) quando comparado com o controle (Figura 9).

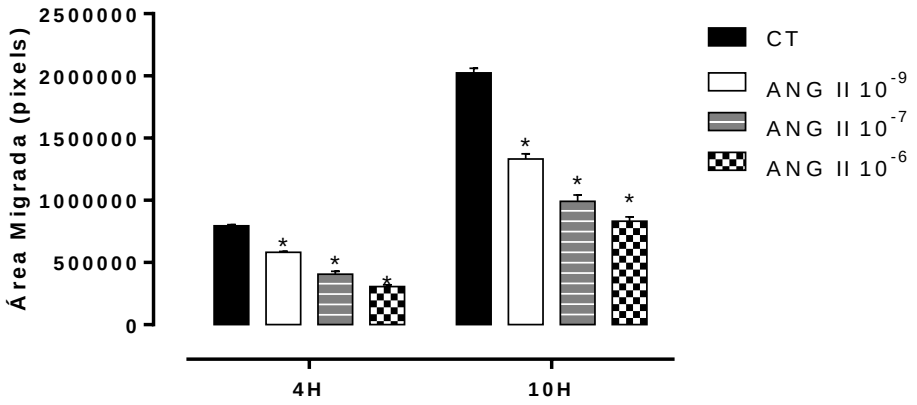


Figura 9: Angiotensina II reduz migração de células endoteliais: CT, Controle (140mM); ANG II (angiotensina II) nas concentrações de 10^{-9}M, 10^{-7}M e 10^{-6}M. Dados são representados como média ± EPM. *p<0.05 vs. Controle (n=5).

5.5. Elevada concentração de sódio aumentou a atividade da NADPH oxidase em células endoteliais

Para confirmarmos o papel da NADPH oxidase, sua atividade foi mensurada. A figura 10 mostra que a atividade da NADPH oxidase aumentou no AS comparado com o controle. Tanto o bloqueador do receptor AT1 quanto o inibidor da NADPH oxidase aboliram completamente a atividade aumentada da NADPH oxidase induzida pelo AS (CT, 100±24%; AS, 375±7%; AS+Candesartan, 116±7% e AS+DPI: 110±22%).

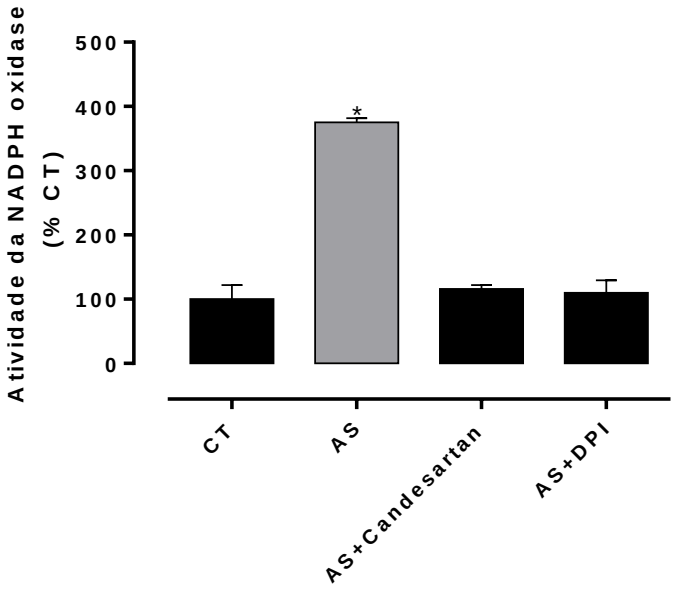


Figura 10: Elevada concentração de sódio aumentou a atividade da NADPH oxidase, que foi prevenida pelo Candesartan e DPI: Células endoteliais foram expostas por 10 horas ao AS. Inibidores foram incubados 30 minutos antes do AS. AS, meio com elevada concentração de sódio (160mM); CT, Controle (140mM) Candesartan (1μM), DPI (100nM). Dados são representados como média ± EPM, *p<0.05 vs. controle (n=5).

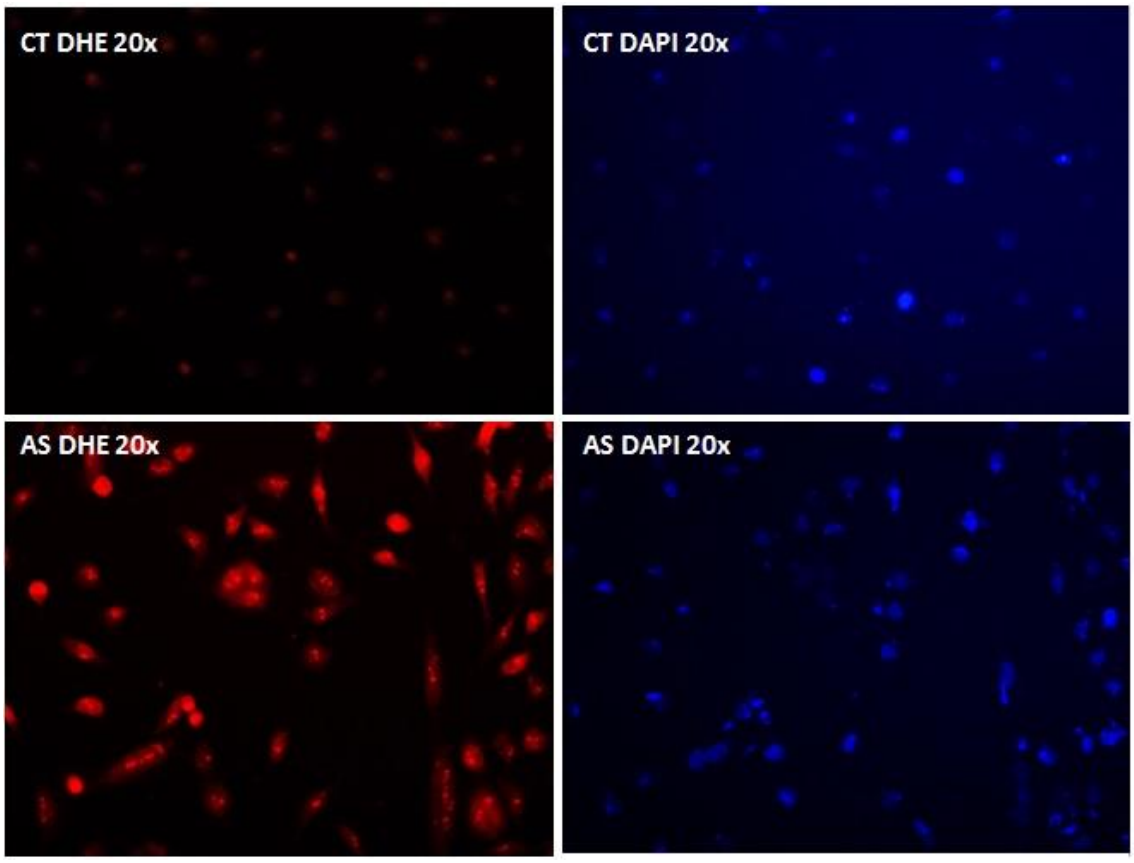
5.6. Elevada concentração de sódio aumentou a produção de ânion superóxido na qual foi modulado pelo receptor AT1 e NADPH oxidase

Uma vez que a atividade da NADPH oxidase estava aumentada, nós mensuramos a produção de O_2^- em células endoteliais expostas ao AS. A figura 11A mostra imagem representativa da produção de ânion superóxido aumentada induzida pelo AS em células endoteliais. Como mostrado na figura 11B, células endoteliais expostas ao AS mostraram uma maior produção de O_2^-, observado pelo

aumento da fluorescência em vermelho nessas células comparado com o controle (CT, 100±3% vs. AS, 472±15%).

Semelhante ao resultado observado com a atividade da NADPH oxidase, tanto o bloqueador do receptor AT1, Candesartan, quanto inibidor da NADPH oxidase, DPI, inibiram a produção de ânion superóxido (AS+Candesartan, 98±6% e AS+ DPI, 99±4%, figura 11B). Por outro lado, Alopurinol, inibidor específico da Xantina oxidase, não inibiu a produção de ânion superóxido (AS+Alopurinol, 501± 19%), sugerindo novamente que o receptor AT1 e NADPH oxidase participam do processo de produção de ânion superóxido e consequentemente da redução de migração de células endoteliais.

a)



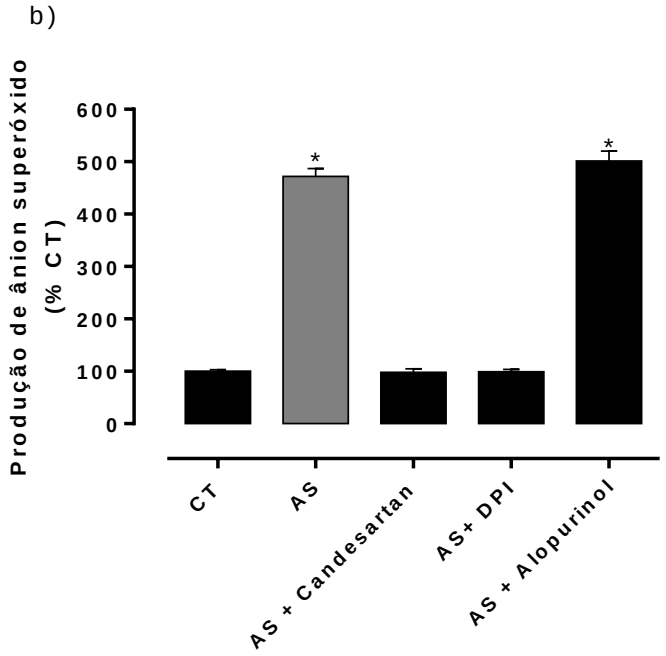


Figura 11: Elevada concentração de sódio aumentou a produção de ânion superóxido e antagonista do receptor AT1 e DPI preveniram: A) Fotos representativas do Controle (CT) e AS (160mM) (Ensaio do DHE). Produção de O_2^- é avaliada pela marcação das células endoteliais em vermelho fluorescente. Imagens foram adquiridas usando um microscópio invertido fluorescente com objetiva de 20x. Núcleo celular foi marcado com DAPI. B) Células endoteliais foram incubadas com AS por 10 horas. Em seguida, células endoteliais foram então incubadas com DHE 10µM e DAPI 20µg/ml no meio de cultura celular por 30 minutos à 37ºC. Inibidores foram incubados 30 minutos antes do AS. AS meio com elevada concentração de sódio (160mM); Controle (140mM) Candesartan (1µM), DPI (100nM) e Alopurinol (100µM). Dados são representados como média ± EPM. *p<0.05 vs. Controle (n=5).

5.7. Elevada concentração de sódio diminuiu a expressão gênica de moléculas de adesão em células endoteliais

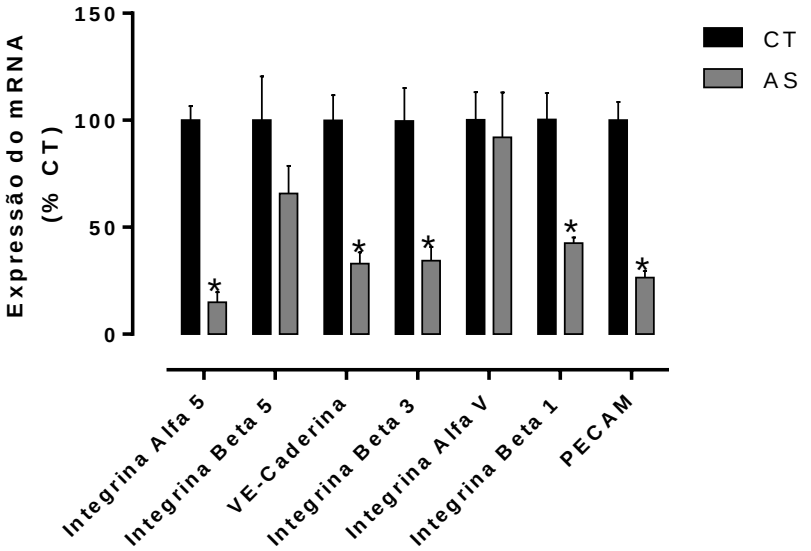
Uma vez que moléculas de adesão são componentes importantes para uma migração celular adequada e que ânion superóxido é capaz de interferir na adesão celular, nosso próximo passo foi analisar a expressão de moléculas de adesão. Na figura 12A mostra uma significante diminuição na expressão gênica de moléculas de adesão (Integrina Alfa 5, VE-Caderina, Integrina Beta 3, Integrina Beta 1 e PECAM), quando células endoteliais foram expostas por 10 horas ao AS (Integrina alfa 5: CT: 100±7%, AS:15±5%; VE-Caderina: CT: 100±12%, AS: 33±5%; Integrina Beta 3: CT:100±15%, AS: 34±6%; Integrina Beta 1: CT: 100±12%, AS: 43±3%; PECAM: CT: 100±9%, AS: 26±3%), sugerindo que a redução na migração de células endoteliais observada no AS poderia também ser explicada pela redução das moléculas de adesão.

5.8. Redução da expressão gênica das moléculas de adesão causada pela elevada concentração de sódio pareceu ser modulada pela NADPH oxidase e parcialmente pelo receptor AT1

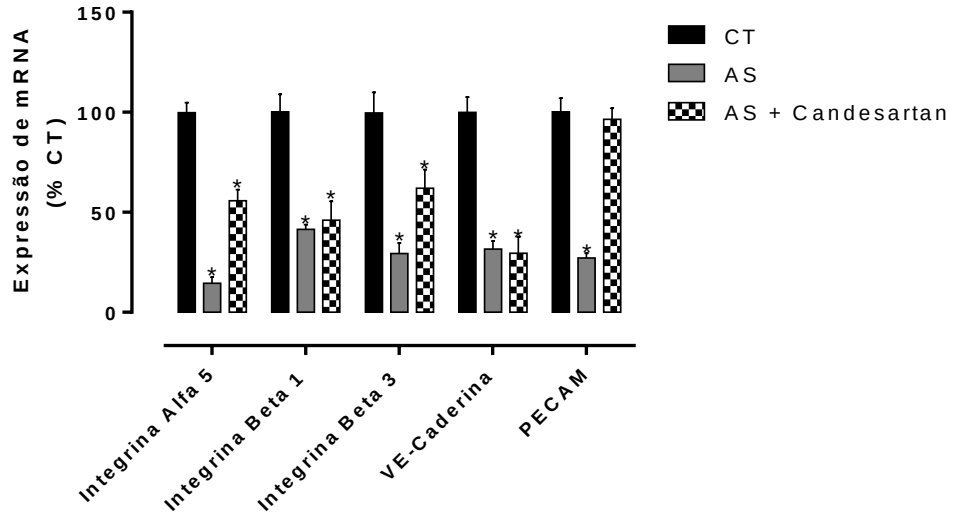
Através do bloqueio do receptor AT1 pelo Candesartan (figura 12B), nós observamos que apenas a redução na expressão de PECAM foi prevenida (CT: 100±7%, AS: 27±2% e AS + Candesartan: 96±6%). Entretanto, a inibição da NADPH oxidase pelo DPI (figura 12C) foi capaz de prevenir a redução de expressões gênicas de todas as moléculas de adesão avaliadas (Integrina Alfa 5: CT: 100±5%, AS: 15±3% e AS+DPI: 81±11%; Integrina Beta 1: CT: 100±9%, AS: 42±2% e AS+ DPI: 98±6%; Integrina Beta 3: CT: 100±10%, AS: 29±5% e AS+DPI: 79±2%; VE-Caderina: CT: 100±8%, AS: 32±4% e AS+ DPI: 84±2%; PECAM: CT: 100±7%, AS:

27±2% e AS+DPI: 84±2%), sugerindo que o estresse oxidativo modula a redução da expressão gênica das moléculas de adesão quando as células endoteliais são incubadas com o AS.

a)



b)



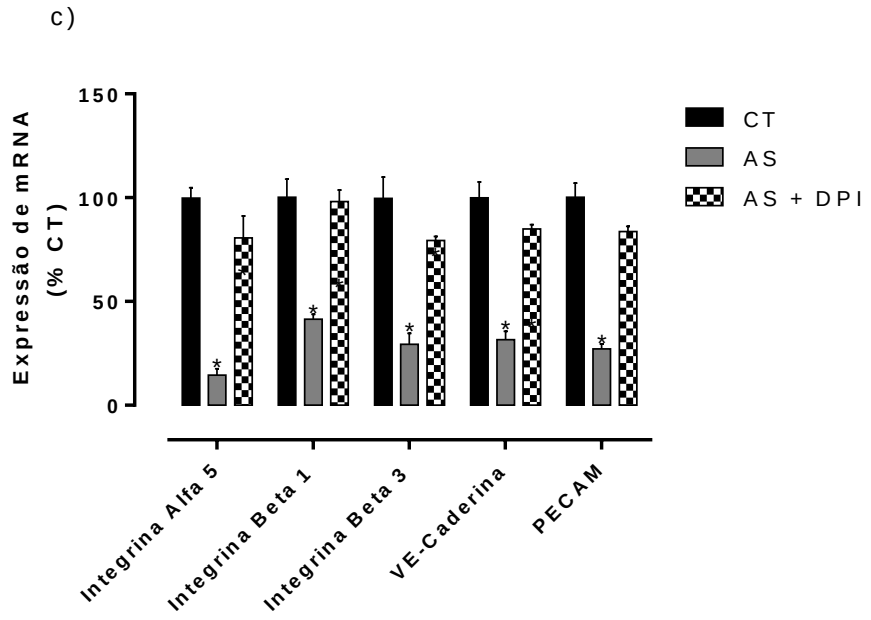


Figura 12: Elevada concentração de sódio induziu a redução da expressão mRNA de moléculas de adesão que pareceu ser modulado pela NADPH oxidase e parcialmente pelo receptor AT1: A) Expressão gênica das moléculas de adesão reduzida em células endoteliais incubadas com AS no período de 10 horas. B) Candesartan preveniu apenas a expressão de PECAM C) DPI preveniu a expressão gênica das moléculas de adesão. Inibidores foram incubados 30 minutos antes do AS. AS, meio com elevada concentração de sódio (160mM); CT, Controle, (140mM) Candersatan (1µM), DPI (100nM) e Alopurinol (100µM). Dados são representados como média ± EPM. *p<0.05 vs. Controle (n=5).

5.9. Elevada concentração de sódio prejudicou a produção de óxido nítrico em resposta ao *shear stress* em células endoteliais

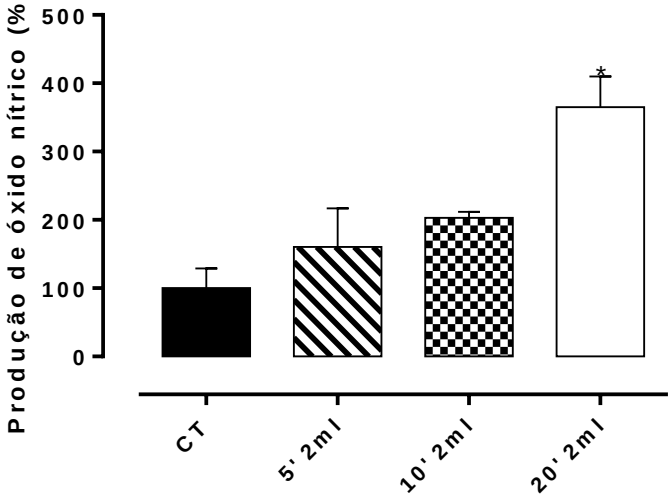
Um breve protocolo foi feito para a escolha do tempo ideal de *SS* para avaliar a produção de NO através da dosagem do nitrito. Foi realizada inicialmente a dosagem de nitrito do controle (sem *shear stress*) e das células expostas ao *shear* nos tempos crescentes de: 5, 10 e 20 minutos em um volume de 2 ml. Na figura 13A vimos que o tempo de 20 minutos foi o que aumentou significantemente a produção

de nitrito em relação ao controle (CT: 100±29%, 5’ 2ml: 161±56%, 10’ 2ml: 203±9%, 20’ 2ml: 365±45%). Com isso, o tempo de 20 minutos foi estabelecido. Em seguida nós analisamos se o AS poderia alterar a resposta das células endoteliais ao SS e se a produção de NO poderia estar afetada. A figura 13B demonstra que AS no período de 10 horas diminui a produção de nitrito causado pelo SS em células endoteliais (CT: 100±9%, SS: 503±20%, AS: 69±10%, AS+SS: 134±21%).

5.10. Receptor AT1 e NADPH oxidase modulam a redução de produção de óxido nítrico em resposta ao *shear stress* causado pela elevada concentração de sódio em células endoteliais

Candesartan e DPI foram capazes de prevenir a redução de produção de óxido nítrico em resposta ao *SS* na presença do AS (SS: 503±20%, AS+SS:134±21%, SS+Candesartan: 477±19%, SS+DPI: 498±19% - figura 13B). Entretanto, Alopurinol com SS não preveniu a ação da AS na produção de nitrito (CT: 100±9%, SS: 503±20%, AS: 69±10%, AS+SS:134±21%, SS+ Alopurinol: 137±10%).

a)



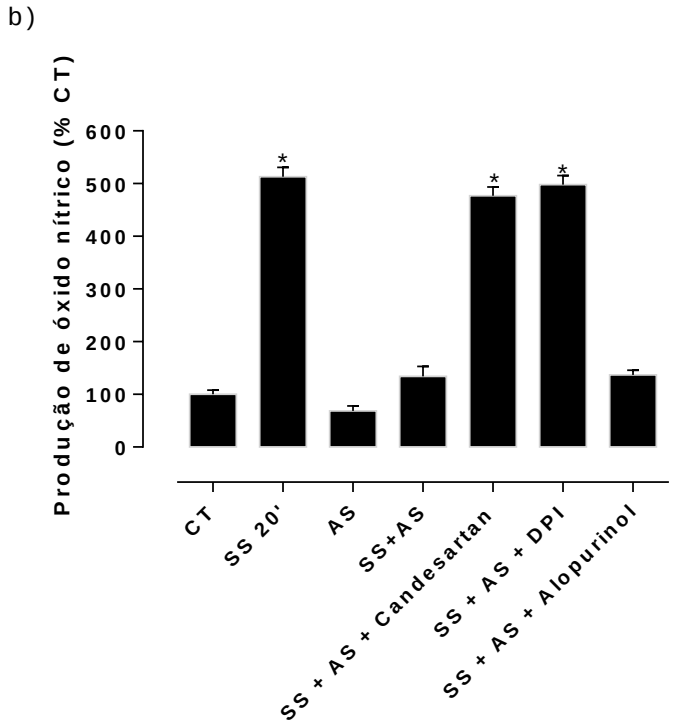


Figura 13: Elevada concentração de sódio leva a um prejuízo na produção de óxido nítrico induzido pelo *shear stress* enquanto Candesartan e DPI preveniram essa resposta. A) SS foi realizado por 20 minutos e produção de nitrito foi mensurada em meio de cultura. B) Inibidores foram incubados 30 minutos antes do AS. AS, meio com elevada concentração de sódio (160mM); CT, Controle (140mM) Candesartan (1µM), DPI (100nM) e Alopurinol (100µM). Dados são representados como média ± EPM. *p<0.05 vs. Controle (n=5).

6. DISCUSSÃO:

Nosso estudo demonstrou pela primeira vez que AS diminui a migração de células endoteliais através da via do receptor AT1 e NADPH oxidase provavelmente pela redução na expressão de moléculas de adesão, além de afetar a funcionalidade da célula endotelial pela baixa resposta ao *SS* devido à redução na produção de NO. Assim, AS interfere ou prejudica o funcionamento celular independente dos fatores hemodinâmicos. O prejuízo no processo de migração da célula endotelial implica na dificuldade em reconstruir a monocamada endotelial e restaurar a integridade da parede vascular após uma injúria (Cahill *et al*., 2016).

Diferentes condições patológicas podem estar associadas à injúria vascular e dano celular, dentre essas, a hipertensão arterial. Condições relacionadas a AS têm sido associadas com remodelamento vascular patológico e aumento de morbidade cardiovascular, além disso, os efeitos deletérios, incluindo disfunção endotelial, insuficiência cardíaca e doenças renais (Ferreira *et al*., 2010; Drenjancevic-Peric *et al*., 2011). Estudos prévios mostraram que a alta concentração de sódio em cultura celular pode levar a senescência celular, diminuição da proliferação celular e afetar a integridade de células endoteliais por causar rigidez celular (Dmitrieva *et al*., 2007; Oberleithner *et al*., 2011; Gu *et al*., 1998). Assim, nossos resultados mostrados corroboram com esses estudos visto que AS *in vitro* é capaz de interferir ou prejudicar o funcionamento celular independente dos fatores hemodinâmicos. Além disso, nós provamos que o AS não causou a morte de células endoteliais, consequentemente, o AS afeta a migração de células endoteliais, entretanto não promove morte celular nesta concentração.

Diversos mecanismos celulares podem estar envolvidos na migração diminuída de células endoteliais quando incubados com AS, em nosso estudo, a

primeira via avaliada foi a do sistema renina angiotensina devido ao seu já descrito envolvimento com o sódio, através do bloqueio do receptor AT1 pelo seu antagonista, o Candesartan. O bloqueio do receptor AT1 foi capaz de prevenir a redução da migração causada pelo AS de células endoteliais. Nossos resultados mostraram que ao bloquearmos o receptor AT1 a migração de células endoteliais foi normalizada corroborando com Desideri em que mostrou que angiotensina II reduziu a migração de células endoteliais e na presença do Candesartan, demonstrou efeito contrário, normalizando a migração de HUVECs quando expostas a doses crescentes de angiotensina II (Desideri, 2003).

Entretanto, diferentes vias intracelulares podem ser ativadas pelo receptor AT1 dentre elas: 1) o aumento da ativação da via da Janus quinase que é capaz de aumentar a expressão de proteína tirosina quinase e promover a diminuição da expressão de NF-k beta resultando a inflamação e proliferação celular, 2) a via da Rho/ROCK, que é capaz de promover a vasoconstrição, hipertrofia de células musculares lisas e inflamação em resposta a ativação desse receptor, 3) a beta-arrestina que pode funcionar como uma proteína ancorada para moléculas de sinalização intracelular, 4) outra via de sinalização que o receptor AT1 pode estar associado é a atividade da tirosina quinase aumentada, podendo levar ao aumento da expressão de MAP quinase (Proteína-quinases ativadas por mitógenos) o que irá aumentar os fatores de transcrição gênicos e proporcionará o crescimento e proliferação celular e por fim, 5) destaca-se a ação desse receptor na capacidade de ativar a via da NADPH oxidase que proporciona a formação do O_2^- que pode proporcionar o estresse oxidativo (Barauna, VG et al., 2009). Estudos tem mostrado que a elevada concentração de sódio está associada com o estresse oxidativo e esse tem sido implicado na patogenia da disfunção endotelial relacionada à

hipertensão que envolve a redução da resposta vasodilatadora devido a menor produção e biodisponibilidade do NO e o aumento das espécies reativas de oxigênio (Dharmashankar *et al*., 2010; Kizhakekuttu *et al*., 2010). Visto que existe essa associação entre o alto sódio e o estresse oxidativo e que um dos nossos objetivos era associar com o fenótipo migratório, optamos por seguir a via do estresse oxidativo relacionada ao receptor AT1.

Inicialmente, a implicação das EROs na migração de células endoteliais deste trabalho foi confirmada pelo varredor de EROs**,** Tiron, que preveniu completamente a redução da migração celular causada pelo AS. O estresse oxidativo tem sido implicado em lesão celular, necrose e apoptose através do efeito direto oxidante em lipídios, proteínas e DNA (Elahi *et al*., 2009) enquanto a administração de antioxidantes poderiam ter um efeito protetor contra essa condição (Fanelli *et al*., 2011). Em adição, Lamari e colaboradores mostraram que a produção de espécies reativas de oxigênio pode profundamente diminuir a migração de células endoteliais através da diminuição da expressão de importantes moléculas de adesão, como integrina alfa 5 e alfa V, além de modificar as interações célula-célula através da ruptura do complexo caderina/catenina, prejudicando a adesão celular e consequentemente, o funcionamento celular (Lamari *et al*., 2007; Elahi *et al*., 2009). Nossos dados sugerem o envolvimento das EROs na migração reduzida de células endoteliais através do AS, desta forma o próximo passo foi procurar descrever por qual via.

Em particular, componentes do SRA estão associados com o estresse oxidativo, uma vez que a ativação do receptor AT1 pode levar a produção de espécies reativas de oxigênio principalmente através da ativação da NADPH oxidase e assim a produção de O_2^- (Sungkawom *et al*., 2011; Virdis *et al*., 2011; Fazeli *et*

al., 2012). Assim, para a continuidade do estudo, a próxima etapa foi avaliar se a via da NADPH oxidase estaria envolvida no efeito da AS na migração de células endoteliais, desta forma foi utilizado o DPI, (bloqueador da NADPH oxidase e xantina oxidase). O DPI preveniu a redução da migração de células endoteliais causada pelo AS. Entretanto, DPI pode inibir tanto NADPH oxidase quanto Xantina Oxidase. Para esclarecer esse efeito, nós usamos o Alopurinol, inibidor específico da Xantina Oxidase. Esse inibidor não preveniu a redução de migração de células endoteliais quando incubadas com AS, assim nossos resultados fortemente sugerem que a migração celular reduzida é via receptor AT1 e NADPH oxidase.

Além disso, nós encontramos que a atividade da NADPH oxidase estava aumentada em células endoteliais incubadas com o AS e sugerimos que exista a participação da NADPH oxidase nos efeitos sobre a migração celular observados neste estudo. Além dos dados mencionados acima, o ensaio do DHE demonstrou que a incubação com o AS significantemente aumentou a produção de O_2^- nas células endoteliais, observado pelo aumento da marcação destas células em vermelho, sendo esse aumento da produção de O_2^- abolido completamente pela presença do Candesartan e DPI. A alta atividade da NADPH oxidase aumenta a produção de O_2^-, uma vez que é a principal produtora dessa espécie reativa de oxigênio (Fazeli *et al*., 2012).

No presente estudo, nós mostramos que o AS reduziu a expressão gênica de Integrina Alfa 5, Beta 3, Beta1, VE-caderina e PECAM, sugerindo que AS afeta a expressão de moléculas de adesão que pode explicar o prejuízo na migração de células endoteliais. Migração celular e adesão celular são processos que requerem uma adequada expressão de moléculas de adesão, pois, integrinas, VE-caderina e PECAM, são capazes de controlar a migração celular, regular as vias de

sinalização intracelular que controlam a organização do citoesqueleto e crescimento celular (Huttenlocher *et al*., 2011; Campbell *et al*., 2011; Giannotta *et al*., 2013; Lertkiatmongkol *et al*., 2016). Para confirmar se a redução das moléculas de adesão foi modulada pelo receptor AT1 e/ou estresse oxidativo pela NADPH oxidase, nós primeiramente bloqueamos o receptor AT1 e encontramos que apenas a expressão de PECAM foi restaurada. Como nosso objetivo é a migração celular que é um processo importante tanto para crescimento celular, reparo de uma injúria e angiogênese, estabelecemos a molécula PECAM como foco, pois essa molécula de adesão é necessária para a ação migratória celular, visto que é capaz de controlar a interação célula-célula e sua baixa expressão pode prejudicar essa interação e comprometer a integridade celular, pois, se a célula não estiver fortemente ligada à outra, a capacidade migratória celular pode ser afetada (Lertkiatmongkol *et al*., 2016). Cao e colaboradores mostraram que a alta expressão de PECAM melhora a motilidade de células endoteliais (Cao *et al*., 2002). Nesse estudo, quando a expressão de PECAM é bloqueada, existiu uma redução na migração de células endoteliais e também mostrou que a expressão de PECAM está envolvida no processo de angiogênese, com isso, essa molécula de adesão tem funções importantes no processo de migração celular. Outros estudos mostraram a importância da molécula PECAM para a migração, dentre eles, Schimmenti mostrou que a expressão de PECAM pode modular a migração celular e principalmente essa proteína está envolvida na regulação da migração de células endoteliais e pode assim ser muito importante no desenvolvimento vascular, reparação após injúria e angiogênese (Schimmenti *et al*., 1992). Além disso, Sheibani e colaboradores mostraram que anticorpo para PECAM bloqueia a migração de células endoteliais (Sheibani *et al*., 1997), e angiogênese in vivo (DeLisser *et al.,* 1997). Em adição,

Kodon mostrou que camundongos deficientes para PECAM exibiram defeitos no processo de angiogênese (Kodon *et al*., 2007).

DPI foi responsável por restaurar a expressão gênica de moléculas de adesão como integrinas, VE-Caderina e PECAM, sugerindo que as expressões das moléculas de adesão parecem ser moduladas principalmente pela NADPH oxidase. Já tem sido descrito que o O_2^- pode afetar a migração de células endoteliais e adesão celular, pois essa espécie reativa de oxigênio pode modificar as interações célula-célula, dificultando o processo migratório e adesão (Lamari *et al*., 2007). Mesmo se postulássemos que provavelmente AS reduziu a migração de células endoteliais pela ativação do receptor AT1 seguido pelo aumento da NADPH oxidase levando a produção de O_2^- que afeta a expressão de moléculas de adesão, os achados demonstram que o receptor AT1 parece modular apenas a expressão de PECAM, enquanto NADPH oxidase modula integrinas, VE-caderina e PECAM. Como já dito, PECAM é uma molécula de adesão muito importante para a migração celular e visto que em nossos resultados tanto o uso do Candesartan quanto o uso do DPI normalizaram a expressão gênica de PECAM, decidimos estabelecer a via das moléculas de adesão e não focamos em outras vias ativadas pelo receptor AT1 que possam também modular a migração celular, como a via da Rho/ROCK (Higuchi *et al*., 2007) ou outras moléculas que regulam a matriz celular, migração e relacionadas com o processo de angiogênese. Desta forma, provavelmente existem outros mecanismos que estão ativando a NADPH oxidase e modulando moléculas de adesão pelo AS e que não são dependentes apenas do receptor AT1.

Em nossos resultados foi mostrado que o AS diminuiu a produção de NO quando células endoteliais foram submetidas ao SS, sugerindo que, essas células quando expostas ao AS, não estariam respondendo a esse estímulo hemodinâmico,

provavelmente devido à redução inicial da expressão gênica de moléculas de adesão. SS está associado com a produção de NO, uma vez que esse promove aumento de transcrição da eNOS (Cecchi *et al*., 2011; Kumar *et al*., 2010). Lertkiatmongkol abordou em seu estudo sobre as moléculas de adesão ter um papel crucial para que SS possa ser realizado adequadamente, visto que esse efeito hemodinâmico é capaz de proporcionar mudanças na forma e orientação das células endoteliais, como consequência, a reorganização da adesão celular, ou seja, a interação célula-célula e célula-matriz devem ser realizadas de forma adequada para manter a monocamada endotelial (Lertkiatmongkol *et al*., 2016). Além disso, SS está associado com a regulação da síntese e liberação de moléculas de adesão e de aumentar a sinalização de NO que exerce efeitos importantes na função da célula endotelial, pois, NO é um importante vasodilatador que modula o tônus vascular e consequentemente uma migração celular eficiente (Murohara *et al*., 2000; Lamalice *et al*., 2007; Ando *et al*., 2011).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Nosso estudo demonstrou pela primeira vez que AS reduz a migração de células endoteliais e esse efeito parece estar envolvido com a ativação do receptor AT1 e estresse oxidativo pelo aumento da produção de O_2^- e da atividade da NADPH oxidase. Ao mesmo tempo, AS diminuiu de forma significativa a expressão gênica de moléculas de adesão, cuja expressão encontra-se modulada pela NADPH oxidase e parcialmente pelo receptor AT1. Além disso, o AS reduziu a produção de NO pelas células endoteliais em resposta ao SS, demonstrando que esta condição de AS afeta também a função endotelial relacionado ao controle fino do tônus vascular, pois o NO é um importante vasodilatador. Esses efeitos podem estar associados com ao prejuízo observado no fenótipo migratório de células endoteliais incubados com AS. Assim, nós acreditamos que AS afeta a migração de células endoteliais e seus efeitos deletérios independente dos fatores hemodinâmicos podem estar associados também à fisiopatologia de doenças cardiovasculares.

8. ANEXO:

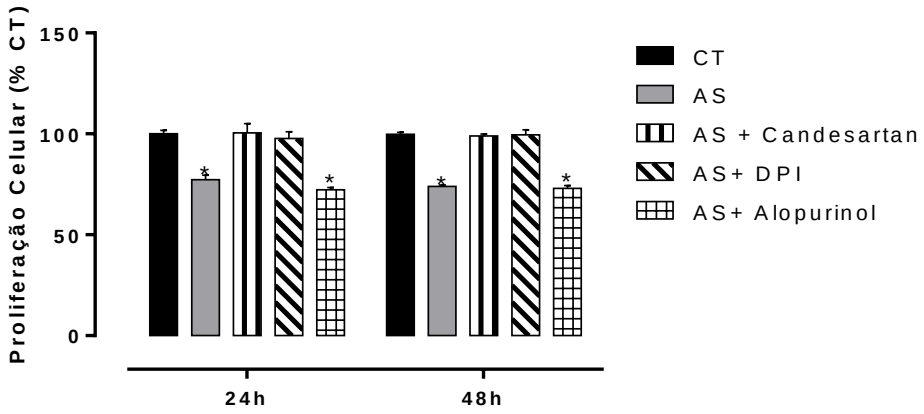
Metodologia Proliferação Celular:

A proliferação celular foi avaliada pelo método MTS seguindo as instruções do fabricante (Promega). Brevemente, foram plaqueadas $1x10^4$ CE por well em uma placa de meio de cultura de 96 poços. As CE foram incubadas com o AS (160mM) no período de 24 e 48h. Ao final de cada período foram adicionados 10uL a cada poço do corante de MTS e feito análise no espectrofotômetro sendo a leitura em 540nm.

Resultado da Proliferação:

Em adição aos nossos experimentos, nós investigamos o efeito do AS no fenótipo de proliferação celular por meio do ensaio de MTS. O anexo 1 mostra que o AS diminuiu a proliferação de células endoteliais tanto no período de 24h (CT: 100±2%, AS: 77±2%) quanto de 48h (CT: 100±1%, AS: 74±1%), sugerindo que o aumento da concentração extracelular de sódio, afeta a proliferação de CE. A partir destes dados, foram realizados os mesmos bloqueios do fenótipo migratório. Com isso, o antagonista do receptor AT1 e DPI foram capazes de normalizarem a proliferação celular em ambos os tempos 24h (CT: 100±2%, AS: 77±2%, AS+ Candesartan: 101±5%, AS + DPI: 98±3%); 48h (CT: 100±1%, AS: 74±1%, AS + Candesartan: 99±1%, AS+ DPI: 99±3%), entretanto ao realizar o bloqueio específico da Xantina Oxidase por meio do Alopurinol, esse inibidor foi incapaz de prevenir a redução da proliferação causada pelo AS nos tempos de 24h (CT: 100±2%, AS: 77±2% e AS+ Alopurinol: 72±1%) e 48h (CT: 100±1%, AS: 74±1% e AS+ Alopurinol: 73± 1%). Esses dados sugerem que a via da AT1- NADPH oxidase parece ser responsável também pela redução da proliferação de células endoteliais causado pelo alto sódio. Ambos os fenótipos são descritos como componentes importantes no processo de

remodelamento vascular e também na angiogênese em reposta ao um processo de injúria. Desta forma o AS parece afetar mais de um fenótipo relacionado à resposta celular a um processo de injúria.



Anexo 1: Candesartan e DPI preveniram a redução da proliferação de células endoteliais induzidas pelo AS: Antagonista do receptor AT1, Candesartan (1µM); DPI (100nM) e Alopurinol (100µM). Inibidores foram incubados 30 minutos antes do AS. AS, meio com elevada concentração de sódio (160mM); CT, Controle (140mM). Dados são representados como média ± EPM. *p<0.05 vs. Controle (n=5).

9. REFERÊNCIAS:

ABADIR, P M et al. Subcellular characteristics of functional intracellular renin–angiotensin systems. **Peptides** 38 (2012) 437–445.

AHN, J et al. Cardiac structural and functional responses to salt loading in SHR. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2004;287:H767–72.

ALBUQUERQUE, M L; FLOZAK, A S. Wound closure in sheared endothelial cells is enhanced by modulation of vascular endothelial-cadherin expression and localization. **Exp Biol Med (Maywood).** . 2002. 227:1006–1016.

AMMANN, K R et al. Collective cell migration of smooth muscle and endothelial cells: impact of injury. **Journal of Biological Engineering**. (2015) 9:19

ANDO, J et al. Effects of Shear Stress and Stretch on Endothelial Function. **Antioxidants & Redox Signaling** Volume 00, Number 0, 2011

BARAUNA, V G. ECA e receptor AT1 participam da mecanotransdução de sinais hemodinâmicos independentes da angiotensina II. 2009. 167 f. Tese Doutorado em Ciências. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BASSANEZE, V et al. Shear stress induces nitric oxide-mediated vascular endothelial growth factor production in human adipose tissue mesenchymal stem cells. **Stem Cells Dev**. 2010 Mar;19(3):371-8. doi: 10.1089/scd.2009.0195.

BATISTA, P R et al. Toll-Like Receptor 4 Upregulation by Angiotensin II Contributes to Hypertension and Vascular Dysfunction through Reactive Oxygen Species Production. **Plos One**. August 2015, Volume 9.

BELL, L; MADRI J A. Influence of the angiotensin system on endothelial and smooth muscle cell migration. **Am J Pathol.** 1990;137:7–12.

BELL, L; LUTHRINGER D L; MADRI J A; WARREN S L. Autocrine angiotensin system regulation of bovine aortic endothelial cell migration and plasminogen activator involves modulation of proto-oncogene pp60c-src expression. **J Clin Invest.** 1992;89:315–320.

BENIGNI, A et al. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging**. EMBO Molecular Medicine**. 2010

BERGER, R C M et al. Renal Effects and Underlying Molecular Mechanisms of Long-Term Salt Content Diets in Spontaneously Hypertensive Rats. **Plos One**. Oct 2015.

BORGES, J C M. Características estruturais e funcionais das células endoteliais. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás. 2012.

BRAGULAT, E et al. Endothelial Dysfunction in Salt-Sensitive Essential Hypertension. **Hypertension**. 2001.

BROWE, D M. Angiotensin II (AT1) Receptors and NADPH Oxidase Regulate Cl Current Elicited by B1 Integrin Stretch in Rabbit Ventricular Myocytes. **The Journal of General Physiology**. (2004)

CAHILL, P A et al. Vascular endothelium e Gatekeeper of vessel health. **Atherosclerosis.** 248 (2016) 97e109

CAMPBELL, D J. Clinical relevance of local renin angiotensin systems. **Frontiers in Endocrinology.** July 2014 doi: 10.3389/fendo.2014.00113.

CAMPVELL, I D et al. Integrin structure, activation, and interactions. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2011;

CAO, G; O'BRIEN, C D et al. Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. **Am J Physiol Cell Physiol.** 2002 May;282(5):C1181-90.

CARVALHO, M H C et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Rev Bras Hipertens.** 8: 76-88, 2001.

CASWELL, P; NORMAN J. Endocytic transport of integrins during cell migration and invasion.**Trends Cell Biol**. 2008; 18:257-63.

CECCHI, E et al. Role of hemodynamic shear stress in cardiovascular disease. **Atherosclerosis** 214 (2011) 249–256.

CHAN, S H H et al. Brain stem oxidative stress and its associated signaling in the regulation of sympathetic vasomotor tone. **J Appl Physiol.** 113: 1921–1928, 2012.

CHANDEL, N S; SCHUMACKER, P T. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. **J Appl Physiol**. 88:1880–1889, 2000.

CORDAILLAT, M; RUGATE, C et al. Cardiorenal abnormalities associated with high sodium intake: correction by spironolactone in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 2005; 289:R1137–43.

DEANFIELD, J E et al. Endothelial Function and Dysfunction. **Circulation** 2007.

DEL CARMEM BISI MOLINA, M et al. Hipertensão arterial e consumo de sal em população urbana. **Revista de Saúde Pública**. 2003, 743-750.

DESIDERI, G et al. Angiotensin II Inhibits Endothelial Cell Motility Through an AT1-Dependent Oxidant-Sensitive Decrement of Nitric Oxide Availability. **Arterioscler Thromb Vasc** Biol. 2003.

DHARMASHANKAR, K ei al. Vascular Endothelial Function and Hypertension: Insights and Directions. **Curr Hypertens Rep**. 2010 December ; 12(6): 448–455. doi:10.1007/s11906-010-0150-2

DMITRIEVA, N et al. High NaCl promotes cellular senescence. **J Cell cycle**. 2007 v6, p 3108-13.

DRENJANCEVIC-PERIC, I; KUNERT, M et al. High-salt diet and hyper- tension: focus on the renin-angiotensin system. **Kidney Blood Press Res** 2011;34:1–11.

DUSSE, L M S et al. Nitric oxide revision. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 39, n. 4, 2003.

ELAHI, M M et al. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** 2:5, 259-269; November/December 2009.

ENDEMANN, D et al. Endothelial Dysfunction. **J Am Soc Nephrol** 15: 2004.

FAN, W H; PECH, M and KARNOVSKY, M J. Connective tissue growth factor (CTGF) stimulates vascular smooth muscle cell growth and migration in vitro. **Eur J Cell Biol** 2000;79:915–23.

FANELLI, C et al. Linking oxidative stress, the renin-angiotensin system and hypertension. **Hypertension.** 2011;57:373-374.

FAZELI, G; STOPPER, H et al. Angiotensin II induces DNA damage via AT1 receptor and NADPH oxidase isoform Nox4. **Mutagenesis** vol. 27 no. 6 pp. 673–681, 2012 Advance Access publication 27 July 2012.

FERREIRA, D N; KATAYAMA, I A et al. Salt-induced cardiac hypertrophy and interstitial fibrosis are due to a blood pressure-independent mechanism in Wistar rats. **J Nutr** 2010;140:1742–51.

FURIERI, L B et al. Endothelial dysfunction of rat coronary arteries after exposure to low concentrations of mercury is dependent on reactive oxygen species. **British Journal of Pharmacoly**. 2010: DOI:10.1111/j.1476-5381. 2010.01203.

GANDHI, N S et al. Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1) and Its Interactions with Glycosaminoglycans: . Molecular Modeling Studies. **Biochemistry,** Vol. 47, No. 17, 2008.

GIANNOTTA, M et al. VE-Cadherin and Endothelial Adherens Junctions: Active Guardians of Vascular Integrity. **Developmental Cell** 26, September 16, 2013

GRIENDLING, K K; SORESCU, D; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circ Res.** 86: 494–501, 2000.

GU, J W; ANAND, V et al. Sodium Induces Hypertrophy of Cultured Myocardial Myoblasts and Vascular Smooth Muscle Cells. **Hypertension**. 1998;31:1083-1087.

HA, S K et al. Dietary Salt Intake and Hypertension. **Electrolyte Blood Press** 12:7-18, 2014

HIGUCHI, S et al. Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. **Clinical Science** (2007) 112, 417–428.

HUTTENLOCHER, A; HORWITZ, A R. Integrins in cell migration. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 2011 Sep 1;3(9):a005074. DOI: 10.1101/cshperspect.a005074.

KLEINBONGARD, P et al. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. **Free Radical Biology & Medicine** 2003;35(7):790–796. [PubMed: 14583343].

KARNIK, S S et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIX. Angiotensin Receptors: Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli. **Pharmacol Rev**. 2015; 67:754–819.

KIZHAKEKUTTU, T J, WIDLANSKY, M E. Natural antioxidants and hypertension: promise and challenges. **Cardiovasc Ther** 2010;28:e20–e32.

KOBORI, H et al. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. **Pharmacol rev**. 2007; 59 (3): 251-287.

KRAFTS, K P. Tissue Repair. **Organogenesis** 6:4, 225-233; October/November/December 2010; © 2010 Landes Bioscience.

KUMAR, S et al. Shear stress stimulates nitric oxide signaling in pulmonary arterial endothelial cells via a reduction in catalase activity: role of protein kinase C delta. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. 2010 January; 298(1): L105–L116.

KUROSAKA, M et al. Reduced angiogenesis and delay in wound healing in angiotensin II type 1a receptor-deficient mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. 2009 627-634.

LAMALICE, L; LE BOEUF, F; HUOT J. Endothelial cell migration during angiogenesis. **Circ Res.** 2007 Mar 30;100(6):782-94.

LAMARI, F; BRAUT-BOUCHER, F; PONGNIMITPRASERT, N; BERNARD, M; FOGLIETTI, M J; DERAPPE, C; AUBERY, M. Cell adhesion and integrin expression are modulated by oxidative stress in EA.hy 926 cells. **Free Radic Res**. 2007 Jul;41(7):812-22.

LAUER, T et al. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. **Proc Natl Acad Sci** USA 2001;98(22):12814–12819. [PubMed: 11606734.

LERTKIATMONGKOL, P et al. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). **Curr Opin Hematol** 2016, 23:253–259

LI, S et al. Mechanotransduction in Endothelial Cell Migration. **Journal of Cellular Biochemistry** 96:1110–1126 (2005).

LIMA, N K; LIMA, F B et al. Effect of lifelong high- or low-salt intake on blood pressure, left ventricular mass and plasma insulin in Wistar rats. **Am J Med Sci.** 2006;331:309–14.

MA H et al. Oxidative DNA damage and its repair in rat spleen following subchronic exposure to aniline. **ToxicolApplPharmacol**. 2008: 233:247-253

MACHADO, R C. Efeitos da administração a longo prazo de dietas com diferentes teores de sódio sobre a função renal de ratos espontaneamente hipertensos. Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas. Vitória, Espírito Santo, 2015.

MANRIQUE, C; LASTRA, G; GARDNER, M. The renin angiotensin aldosterone system in hypertension: roles of insulin resistance and oxidative stress. **Med. Clin. North Am**. (2009) 93, 569– 582.

MELLO, W C et al. Angiotensin II and the Heart On the Intracrine Renin-Angiotensin System. Review Article. **Hypertension.** 2000;35:1183-1188.)

MICHAELIS, U R. Mechanisms of endothelial cell migration. **Cellular and Molecular Life Sciences**. (2014) 71:4131-4148.

MIURA S et al. Angiotensin II type 1 receptor blockers: Class effects vs. Molecular effects. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2011 March ; 12(1): 1–7. doi:10.1177/1470320310370852.

MORIGI, M et al. Fluid Shear Stress Modulates Surface Expression of Adhesion Molecules by Endothelial Cells**. Blood,** Vol 85, No 7 (April I), 1995: pp 1696-170.

MUROHARA, T; WITZENBICHLER, B et al. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2000 May;19(5):1156-61.

NICKENIG, G et al. Salt Induces Vascular AT1 Receptor Overexpression In Vitro and In Vivo. **Hypertension.** 1998;31:1272-1277.

NORIA, S et al. Transient and Steady-State Effects of Shear Stress on Endothelial Cell Adherens Junctions**. Circulation Research.** 2000, 85:504-514.

OBERLEITHNER, H et al. Plasma sodium stiffens vascular endothelium and reduces nitric oxide release. **PNAS**. October 9, 2007, vol. 104 no. 41. 16283.

OBERLEITHNER, H et al. Salt overload damages the glycocalyx sodium barrier of vascular endothelium. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 462, n. 4, p. 519–528, 2011.

PAAR, M et al. Endothelial sodium channels trigger endothelial salt sensitivity with aging. **Hypertension.** 2015;64:391-396.

PAUL, M; POYAN, M E H R A; KREUTZ, R: Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiol Rev.** 2006 Jul;86(3):747-803.

RAHIMI, Z et al. A systematic review of the role of renin angiotensin aldosterone system genes in diabetes mellitus, diabetic retinopathy and diabetic neuropathy. **J Res Med Sci.** 2014 Nov; 19(11): 1090–1098.

RAMACHANDRAN, A et al. Mitochondria, nitric oxide, and cardiovascular dysfunction. **Free Rad Biol Med** 2002;33(11):1465-34.

RIDLEY, A J; SCHWARTZ, M A; BURRIDGE, K et al. Cell migration: integrating signals from front to back. **Science** (New York, NY). 2003;302:1704–9.

RIZZONI, D. Endothelial dysfunction in hypertension: fact or fantasy?. **J Hypertens.** 2002;20:1479-81.

SAMO, F et al. Estimativa de consumo de sódio pela população brasileira. **Revista de Saúde Pública**. 2009, 43(2), 219-225.

SANDOO, A et al. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. **The Open Cardiovascular Medicine Journal,** 2011, 4, 302-312

SCHIEBER M et al. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. **Curr Biol**. 2014 May 19; 24(10): R453–R462. doi:10.1016/j.cub.2014.03.034.

SEDEEK, M; HEBERT, R L et al. Molecular mechanisms of hypertension: role of Nox family NADPH oxidases. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens***.,* 2009 18,122 127.

SINGH, K D et al. Angiotensin Receptors: Structure, Function, Signaling and Clinical Applications. **J Cell Signal**. 2016 June ; 1(2): . doi:10.4172/jcs.1000111.

SIMONE, S et al. Complement-dependent NADPH oxidase enzyme activation in renal ischemia/reperfusion injury**. Free Radical Biology and Medicine.** 74 2014.

SOUZA, H P; LAURINDO, F R M. Estresse oxidativo e ruptura da placa aterosclerótica. **Revista da sociedade de cardiologia do Estado de São Paulo**. São Paulo, v. 12, n. 4, p. 584-594, jul./ago. 2002.

SPARKS, M A et al. Classical Renin-Angiotensin System in Kidney Physiology. **Compr Physiol.** 2014 July ; 4(3): 1201–1228. doi:10.1002/cphy.c130040.

SUN, L et al. Endothelial dysfunction—An obstacle of therapeutic angiogenesis. **Ageing Research Reviews** 8 (2009) 306–313.

SUNGKAWOM, T et al. Oxidative stress increases angiotensin receptor type I responsiveness by increasing receptor degree of aggregation using image correlation spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes.** Volume 1808, issue 10, October 2011, Pages 2496–2

TEIXEIRA, B C et al. Marcadores inflamatórios, função endotelial e riscos cardiovasculares. **J Vasc Bras**. 2014 Abr.-Jun.; 13(2):108-115).

TITZE, J et al. Reduced osmotically inactive Na storage capacity and hypertension in the Dahl model. **American journal of physiology**. Renal physiology, v. 283, p. 134–141, 2002.

TONEY, G M et al. Central osmotic regulation of sympathetic nerve activity. **Acta physiologica Scandinavica**, v. 177, n. 1, p. 43–55, 2003.

TOUSOULIS, D et al. The role of nitric oxide on endothelial function. **Current Vascular Pharmacology.** 2012, 10, 4-18.

TUOMILEHTO, J; JOUSILAHTI, P et al. Urinary sodium excretion and cardiovascular mortality in Finland: a prospective study. **Lancet** 2001; 357: 848–851.

VANHOUTTE, P M; SHIMOKAWA, H; FELETOU, M; TANG, E H. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. **Acta Physiol (Oxf).** 2017, 219(1):22-96.

VESTWEBER, D. VECadherin: The Major Endothelial Adhesion Molecule Controlling Cellular Junctions and Blood Vessel Formation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** 2008.

VICENTE-MANZANARES, M; CHOI, C K; HORWITZ, A R. Integrins in cell migration--the actin connection. **J. Cell Sci**. 2009; 122:199-206.

VIGITEL Brasil 2014. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. [Internet]. Disponível em: http://portalsaude.saude.gov.br/images/ pdf/2015/abril/15/PPT-Vigitel-2014-.pdf. Acesso em 25/05/2017.

VIRDIS, A et al. Oxidative Stress andVascular Damage inHypertension: Role of Angiotensin II. **International Journal of Hypertension** 2011, Article ID 916310, 7 pages doi:10.4061/2011/916310.

VITA, J A. Endothelial Fuction. **Circulation**. 2011;124:e906e912.

WELCH, W J et al. AT1 receptor antagonist combats oxidative stress and restores nitric oxide signaling in the SHR. **Kidney International**, V.59 (2001), pp. 1257–1263.

WHO (World Health Organization). World Health Day 2013. **A Global Brief on Hypertensin**, 9.

WHO (World Health Organization). Guideline: Sodium intake for adults and chuldren. Geneva: World Health Organization; 2012.

ZOVICO, P V C et al. Effects of controlled doses of Oxyelite Pro on physical

performance in rats. **Nutrition & Metabolism.** (2016)

ZUNGU, I L et al. Phototherapy promotes cell migration in the presence of hydroxyurea. **Lasers in medical science**, v. 24, n. 2, p. 144–50, 2009.