EFEITO DO ALTO SÓDIO NO FENÓTIPO MIGRATÓRIO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES DE AORTA DE RATOS

Bruna Ferro Brun

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

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

Vitória, agosto de 2017

EFEITO DO ALTO SÓDIO NO FENÓTIPO MIGRATÓRIO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES DE AORTA DE RATOS

Bruna Ferro Brun

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.

_____

Drª. Carmem Luiza Sartório - UFES.

_____

Profª. Drª. Luciene Cristina Gastalho Campos - UESC

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

Vitória, agosto de 2017

Brun, Bruna Ferro 1992.

Efeito do alto sódio no fenótipo migratório de células musculares lisas vasculares de aorta de ratos [Vitória] 2017

88 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.

Orientadora: Dr. ª Paula Frizera Vassallo

1. Alto sódio. 2. Migração celular. 3. Célula Muscular Lisa Vascular. 4. Receptor AT1. 5. Ciclooxigenase-2. 6. Tromboxano.

"A persistência é o menor caminho do êxito".

Charles Chaplin

Á minha maior incentivadora, minha mãe.
Á você a minha eterna gratidão, amor e admiração.
Aquela que pelo simples fato de existir
é a minha maior motivação:
Minha amada filha, Gabriela.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo. Principalmente por cada ensinamento.

Á minha mãe, por todo amor, carinho e dedicação a mim durante todos esses anos. Sem você, nada disso seria possível. Você sempre acreditou nos meus sonhos, me incentivou e me apoiou, principalmente nos momentos mais difíceis. Te amo muito, mãe!

Á minha princesa, Gabriela. Você chegou para me ensinar muitas coisas, dentre elas o amor incondicional de uma mãe. Você é e sempre será a minha maior motivação. Te agradeço por entender meus momentos de ausência, por me alegrar com seus sorrisos e com todo seu amor e carinho. Te amo infinito!!!

Aos meus pais do coração, tio Erique e tia Rosi. Obrigada por todo amor, incentivo e apoio. Vocês são anjos de Deus nas nossas vidas, amo vocês.

Ao meu noivo, Tiago. Te agradeço pela paciência infinita, por fazer de tudo para me ver feliz, por tornar os momentos difíceis mais fáceis, pelo companheirismo, amizade e pelo amor.

Á minha querida orientadora, Paula. Obrigada por aceitar o desafio que seria me orientar. Muito obrigada pela confiança, pelo conhecimento compartilhado, pelos conselhos dados e pela disponibilidade, mesmo em momentos difíceis.

Ao Valério, meu Co-orientador. Obrigada por todo conhecimento compartilhado, pela total disponibilidade, pelos puxões de orelha e pelos preciosos conselhos dados.

Ás professoras Carmem e Luciene, por aceitarem o convite para avaliação deste trabalho.

Ás professoras Lívia e Ana Paula por me acolherem de forma tão carinhosa.

Aos Professores do LEMC, Dalton, Leonardo, Alessandra e Ivanita. Obrigada pelos ensinamentos e pela convivência.

Á Renata, minha amora. Você conhece cada parte dessa trajetória. Te agradeço por me acolher, por ser tão você, por cada dia que ficou ao meu lado nos intermináveis experimentos de migração. Por me motivar, por estar sempre disposta a me ouvir e aconselhar. Á Wena, sempre com muitas histórias para contar, alegrava meus dias de trabalho no laboratório. Estar com vocês era risada certa.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho, Felipe e Rebeca. Obrigada por todo suporte durante a realização deste projeto, vocês foram fundamentais para conclusão deste trabalho.

Ao Marquinhos, pela amizade, pelas brincadeiras e conhecimentos compartilhados.

Ao Vitão e a Randri, obrigada pela companhia, pelos cafés, pelas conversas, principalmente durante os intermináveis experimentos de WB, a amizade de vocês foi fundamental durante este processo.

Aos alunos do *team* Vassallo e Barauna, pelas contribuições nas reuniões científicas.

Aos alunos do LEMC e do PPGCF, Marito, Thiago, Gilson, Camila, Emily, Elis, Paula, Eduardo e Cléo. Vocês são pessoas incríveis.

Aos funcionários da UFES, que ao desempenharem suas funções tornaram algumas tarefas mais fáceis.

A todos que de alguma formar me incentivaram e me ajudaram durante esse tempo.

Ás agências de fomento, CAPES, FAPES e CNPq.

RESUMO

INTRODUÇÃO: No sistema cardiovascular, a migração de células musculares lisas vasculares (CMLVs) é fundamental em processos como, angiogênese, vasculogênese, e como resposta a injúrias participando do processo de remodelamento vascular. O aumento da concentração de sódio (AS) tem sido associado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, independente do aumento da pressão arterial. Entretanto, pouco ainda se sabe sobre os efeitos do AS sobre a migração de CMLVs e os possíveis mecanismos envolvidos. **OBJETIVO:** Testar a hipótese de que o aumento da concentração de sódio pode induzir modificações no fenótipo migratório de células musculares lisas vasculares e avaliar os possíveis mecanismos moleculares que possam estar envolvidos neste processo. **METODOLOGIA:** Células musculares lisas vasculares primárias, obtidas pelo método de explante, foram utilizadas neste estudo. A migração celular foi avaliada pelo método de *Wound-Healing* nas condições: Alto Sódio (AS, NaCl:160mM) e Controle (CT, NaCl:140mM) e foram utilizados os fármacos: Candesartan, Enalapril, Tiron, Angiotensina II, NS398, Apocinina, SQ29548, U46619, CAY10441 e U0126 (N= 5 a 7). A viabilidade celular foi avaliada pela marcação com Anexina V e PI. A expressão gênica de ciclooxigenase 2 (COX-2) foi analisada pelo RT-PCR. A expressão proteica de ERK 1/2 fosforilada foi avaliada através da técnica de Western Blot. **RESULTADOS**: A pré-exposição ao AS reduziu a migração de CMLVs (CT: 100 ± 14% / AS: 58 ± 11%), sem alterar a viabilidade celular. O bloqueio do receptor AT1, com Candesartan, preveniu a ação do AS sobre a migração celular (*AS + Candesartan: 101 ± 10%), bem como o bloqueio da ECA pelo Enalapril (*AS + Enalapril: 97 ± 5%). O bloqueio de COX-2, com NS398, também preveniu a redução de migração celular pelo AS (*AS + NS398: 96 ± 7%) O bloqueio de ERK1/2, com U0126 também reverteu a ação do AS (*AS + U0126: 99 ± 5%), bem como o bloqueio do receptor de tromboxano com SQ29548 (*AS + SQ29548: 94 ± 10%). AS aumentou a expressão gênica da ciclooxigenase 2 (COX-2) e a fosforilação de ERK1/2 em CMLVs, sendo que o bloqueio do receptor AT1 foi capaz de normalizar a expressão de COX-2 e prevenir o aumento da fosforilação de ERK 1/2. Finalmente, o inibidor da quinase MEK 1/2 preveniu o aumento da expressão gênica de COX-2. **CONCLUSÃO:** O estudo demonstrou que o AS reduz a migração de células musculares lisas

vasculares, através do aumento da expressão de COX-2 via receptor AT1 através da fosforilação de ERK 1/2. Além disso, o aumento de COX-2 pelo AS parece modular a redução de migração de CMLVs pelo aumento de tromboxano.

Palavras Chaves: 1. Alto sódio. 2. Migração celular. 3. Célula Muscular Lisa Vascular. 4. Receptor AT1. 5. Ciclooxigenase-2. 6. Tromboxano.

ABSTRACT

INTRODUCTION: In the cardiovascular system, the migration of vascular smooth muscle cell migration (VSMC) is fundamental in processes such as angiogenesis, vasculogenesis, and in response to injuries in the process of vascular remodeling. High sodium (HS) has been associated with the development of cardiovascular diseases, regardless the increase in blood pressure. However, little is known about their effects in migration of VSMCs and the possible mechanisms involved. **OBJECTIVE:** To test the hypothesis that high sodium concentration can induce phenotypic changes in VSMCs and to evaluate the molecular mechanisms that may be involved in this process. **METHODS:** Primary vascular smooth muscle cells were obtained by the explant method. Cellular migration was evaluated by the Wound-Healing method under the conditions: High Sodium (AS, NaCl: 160 mM) and Control (CT, NaCl: 140 mM) and the following drugs were used: Candesartan, Enalapril, Tiron, Angiotensin II, NS398, Apocinin, SQ29548, U46619, CAY10441 and U0126 (N = 5 to 7). Cell viability was assessed by Annexin V and PI labeling. The gene expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) was analyzed by RT-PCR. Protein expression of phosphorylated ERK 1/2 was assessed by the Western Blot. **RESULTS:** Pre-exposure of CMLVs to HS reduced migration (CT: 100 ± 14% / HS: 58 ± 11%), without modifying cellular viability. Blocking of the AT1 receptor with Candesartan prevented the action of HS in cell migration (* HS + Candesartan: 101 ± 10%), as well as the blockade of ACE by Enalapril (* HS + Enalapril: 97 ± 5%). Blockade of COX-2 with NS398 also prevented the action of HS (* HS + NS398: 96 ± 7%). Blocking of ERK 1/2 with U0126 also reversed the action of HS (* HS + U0126: 99 ± 5%), as well as the thromboxane receptor blockade with SQ29548 (* HS + SQ29548: 94 ± 10%). HS increased the gene expression of COX-2 and ERK1 / 2 phosphorylation. AT1 receptor blockade normalized COX-2 gene expression and prevented the increase of ERK 1/2 phosphorylation. Inhibitor of the MEK 1/2 prevented the increase of COX-2 gene expression. **CONCLUSION:** The study demonstrated that HS reduces the migration of vascular smooth muscle cells by increasing COX-2 expression via the AT1 receptor through ERK 1/2 phosphorylation. In addition, the increase of COX-2 by HS seems to modulate the reduction of migration of VSMCs by the increase of thromboxane.

Key words:1. High sodium.2. Cell migration.3. Vascular smooth muscle cell. 4. AT1 receptor. 5. Cyclooxygenase-2. 6. Thromboxane

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Porcentagem

AA - ácido araquidônico

AC - adenilato ciclase

AMPc - adenosina monofosfato cíclico

Ang II - Angiotensina II

AS - Alto Sódio

AT1 - Receptor de Angiotensina tipo 1

AT2 - Receptor de Angiotensina tipo 2

Cl^- - Cloreto

CMLVs - Células Musculares Lisas Vasculares

COX-1 - Ciclooxigenase 1

COX-2- Ciclooxigenase 2

CT - Controle

DCV - Doença Cardiovascular

DP - Receptor de prostaglandina D2

eNOS - óxido nítrico-sintase endotelial

EP1 - receptor de prostaglandina E2

EP4 - receptor de prostaglandina E2

EROS - Espécies Reativas de Oxigênio

FP - Receptor de prostaglandina F2α,

g - Força Gravitacional

g – Grama

h - Horas

HAS - Hipertensão Arterial Sistêmica

IL1β – Interleucina 1 beta

IL6 - Interleucina 6

iNOS - óxido nítrico-sintase induzida

IP - Receptor de Prostaciclina

M - Molar

MAPK - proteínas quinases ativadas por mitógenos;

mg – Miligrama

mM - Milimolar

Na^+ - Sódio

NaCl - Cloreto de Sódio

NHE - Trocador Sódio Hidrogênio

nm – Nanômetro

NO - óxido nítrico

PA - Pressão Arterial

PDGF - crescimento derivado de plaquetas;

PGD2 - prostaglandina D2

PGE2 - prostaglandina E2

PGF2α - prostaglandina F2α,

PGI2 - prostaglandina I2

PLA2 - fosfolipase A2

PLC - fosfolipase C.

RT - PCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real;

SFB - Soro Fetal Bovino

SRA - Sistema Renina Angiotensina

TNFα - Fator de Necrose Tumoral alfa

TP - Receptor de Tromboxano

TXA2 - Tromboxano A2

VEGF - Fator de crescimento derivado do endotélio

αSMA - alfa actina de músculo liso

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação das camadas que constituem as Artérias.

Figura 2: Visão clássica do Sistema Renina Angiotensina Aldoresterona e seus componentes.

Figura 3: Síntese de prostanóides.

Figura 4: Aparecimento de CMLVs a partir de fragmento de aorta.

Figura 5: Imunofluorescência para confirmação de CMLVs.

Figura 6: Esquema do Protocolo de Migração celular

Figura 7: Mortalidade Celular.

Figura 8: Viabilidade Celular: apoptose e necrose.

Figura 9: Migração Celular.

Figura 10: Migração Celular – Avaliação da Participação do aumento da osmolaridade e do íon Cloreto (Cl^-).

Figura 11: Migração com Candesartan (10^{-6}M)

Figura 12: Migração celular: Avaliação da participação de Ang II e ECA.

Figura 13: Migração celular: efeito das espécies reativas de oxigênio.

Figura 14: Migração com Inibidor específico da COX-2 NS398 ($10x10^{-6}$M).

Figura 15: Expressão gênica de Ciclooxigenase 2 após incubação com alto sódio e após bloqueio do receptor AT1.

Figura 16: Migração com Inibidor de ERK 1/2 U0126 (10^{-6}M).

Figura 17: Expressão proteica de ERK 1/2 fosforilada.

Figura 18: Expressão proteica de ERK 1/2 fosforilada com o bloqueio de AT1.

Figura 19: Expressão gênica de COX-2 com o bloqueio de ERK 1/2.

Figura 20: Migração com bloqueadores dos receptores de prostanóides.

Figura 21: Migração com U46619 (10^{-7}M).

Figura 22: Diagrama esquemático dos mecanismos através dos quais o alto sódio diminui a migração de células musculares lisas vasculares.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 20

1.1 O CONSUMO DE CLORETO DE SÓDIO E A POPULAÇÃO 20

1.2 SÓDIO E HIPERTENSÃO ARTERIAL 21

1.3 SÓDIO E DISFUNÇÃO VASCULAR 22

1.4 SÓDIO E CÉLULA MUSCULAR LISA 24

1.5 MIGRAÇÃO CELULAR 26

1.6 O SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA 27

1.7 CICLOOXIGENASE 2 E PROSTANÓIDES 30

2. OBJETIVOS 35

2.1 OBJETIVO GERAL 35

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 35

3. JUSTIFICATIVA 37

4. METODOLOGIA 39

4.1 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES 39

4.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA 41

4.3 FÁRMACOS E REAGENTES 42

4.4 MORTALIDADE CELULAR 42

4.5 APOPTOSE E NECROSE CELULAR 43

4.6 MIGRAÇÃO CELULAR 44

4.7 WESTERN BLOT 45

4.8 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR) 46

5. RESULTADOS 50

5.1 ALTO SÓDIO NÃO ALTERA A VIABILIDADE DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES.....50

5.2 ALTO SÓDIO REDUZ A MIGRAÇÃO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES 52

5.3 O AUMENTO DA OSMOLARIDADE E O DO ÍON CLORETO (CL-) NÃO ALTERAM A MIGRAÇÃO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES.54

5.4 O BLOQUEIO DO RECEPTOR AT1 E DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA RESTAURAM A REDUÇÃO DE MIGRAÇÃO EM CMLVs EXPOSTAS AO ALTO SÓDIO 55

5.5 O ESTRESSE OXIDATIVO NÃO PARTICIPA DA REDUÇÃO DE MIGRAÇÃO PROVOCADA PELO ALTO SÓDIO EM CMLVs.....57

5.6 O BLOQUEIO DE COX-2 NORMALIZA A MIGRAÇÃO DE CMLVs EXPOSTAS AO ALTO SÓDIO 59

5.7 O BLOQUEIO DA PROTEÍNA QUINASE ATIVADA POR MITÓGENO (MAPK) ERK 1/2 RESTAURA A REDUÇÃO DE MIGRAÇÃO EM CMLVs EXPOSTAS AO ALTO SÓDIO 61

5.8 ALTO SÓDIO AUMENTA A FOSFORILAÇÃO DE ERK 1/2 EM CMLVs...62

5.9 O BLOQUEIO DE ERK 1/2 NORMALIZA A EXPRESSÃO GÊNICA DE COX-2 EM CMLVs EXPOSTAS AO ALTO SÓDIO 64

5.10 O RECEPTOR TROMBOXANO (TP) PARTICIPA DA REDUÇÃO DE MIGRAÇÃO PROMOVIDA PELO ALTO SÓDIO EM CMLVs.....65

6. DISCUSSÃO.....69

7. CONCLUSÃO.....76

8. REFERÊNCIAS 78

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 O CONSUMO DE CLORETO DE SÓDIO E A POPULAÇÃO

O sódio é o principal eletrólito do fluido extracelular e tem papel fundamental em diversas funções do organismo, como na manutenção do volume e da osmolaridade. Aproximadamente 95% do conteúdo total de sódio corporal encontra-se no meio extracelular. Além disso, ele também contribui em algumas funções fisiológicas, tais como: manutenção do equilíbrio ácido-básico, contração muscular e transmissão nervosa (HOLBROOK et al., 1984).

A principal fonte de obtenção de sódio para o organismo é a alimentação, encontramos sódio naturalmente nos alimentos que consumimos. O sódio proveniente da alimentação é completamente absorvido pelo trato gastrintestinal e sua excreção é realizada pelo sistema renal, responsável pela manutenção do equilíbrio de sódio no organismo. Em condições normais, a concentração plasmática de sódio está entre 135 e 145mEq/L (WEBSTER; DUNFORD; NEAL, 2010).

Atualmente a principal fonte de sódio na alimentação é o cloreto de sódio, ou sal de cozinha, no qual o sódio constitui 40%, ou seja, em 5g de cloreto de sódio, temos 2g de sódio. Um determinante que influencia na quantidade de sódio consumida por uma população é o contexto cultural e seus hábitos alimentares (BROWN et al., 2009).

Apesar de ser um nutriente fisiologicamente essencial, o consumo de sódio médio da população, está acima do recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Atualmente, a OMS recomenda uma ingestão de 5 g de sal (NaCl) por dia, o equivalente a 2 g de sódio / dia (WHO), 2013), porém na maioria das populações, o consumo deste mineral encontra-se acima de 2,3 g/dia (HE; MACGREGOR, 2009; HOLBROOK et al., 1984).

No Brasil, em 2008 um estudo avaliou a quantidade diária de sódio disponível para consumo nos domicílios brasileiros. Foi demonstrado que o consumo médio de sódio por pessoa é de 4,5 g, excedendo em mais de duas vezes o consumo máximo recomendado de 2 g/dia (SARNO et al., 2009).

Em Vitória/ES, um estudo realizado em 2003 por Molina e colaboradores, demonstrou que o consumo de sal diário, estimado a partir da excreção urinária de 12 horas, entre os participantes do estudo foi elevado, cerca de 12,6 ± 5,8 g. Demonstrando novamente um consumo maior do que o preconizado (BISI MOLINA et al., 2003)

1.2 SÓDIO E HIPERTENSÃO ARTERIAL

A homeostase de sódio plasmático influencia o sistema cardiovascular de indivíduos normotensos e hipertensos e é um grande fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (BEIL; SCHMIEDER, 1995).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA). Considera-se HAS, valores de PA ≥ 140 / 90 mmHg (NOBRE et al., 2010) A longo prazo este aumento de PA, por muitas vezes, está associado a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo, como coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos, bem como alterações metabólicas, e consequentemente, aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais (WHO, 2013).

No Brasil e no mundo, a HAS tornou-se um dos principais problemas de saúde pública, devido à alta taxa de incidência da doença na população. De acordo com a OMS, as doenças cardiovasculares são responsáveis por cerca de 17 milhões de mortes no mundo anualmente, sendo que desses 17 milhões a HAS é responsável por 9,4 milhões de óbitos em todo o mundo (WHO, 2013). No Brasil, a prevalência média da HAS na população urbana adulta em 2009 foi de 32,5%, como consequência estes números produzem um impacto direto nas taxas de mortalidade, morbidade e incapacidade (NOBRE et al., 2010)

O consumo excessivo de sódio tem sido associado com vários efeitos prejudiciais à saúde, evidências na literatura demonstram uma relação entre o alto consumo de sal e doenças cardiovasculares (STRAZZULLO et al., 2009). Além do aumento da PA, estudos demonstram que o aumento da concentração de sódio no organismo promove, hipertrofia cardíaca, prejuízo do relaxamento ventricular,

disfunção endotelial e injúria renal, predispondo assim, ao aparecimento das doenças cardiovasculares (DOS SANTOS et al., 2006; YU et al., 1998; ZHU; HUANG; LOMBARD, 2007).

Estudos epidemiológicos vêm demonstrando a relação entre a alta ingestão de sódio e o aumento da pressão arterial. O INTERSALT, estudo realizado em 1988 em 52 países, revelou a associação entre o consumo médio de sódio e a PA média, através da avaliação da excreção urinária de sódio em 24 horas. Além disso, tal estudo também observou associação positiva entre o consumo de sódio e o aumento da pressão com a idade (COOPERATIVE, 1988; MOHAN; CAMPBELL, 2009).

Estudos clínicos demonstram que o diagnóstico, o tratamento e o controle da HAS, são fundamentais para a redução dos eventos cardiovasculares. Falta de diagnóstico e tratamento da hipertensão é uma preocupação particular para os países em desenvolvimento. A prevenção da hipertensão e o tratamento são altamente atrativos devido à relação custo benefício (MOHAN; CAMPBELL, 2009).

1.3 SÓDIO E DISFUNÇÃO VASCULAR

A disfunção do endotélio vascular pode preceder o aparecimento de sintomas clínicos das doenças cardiovasculares e levar a danos em órgãos, como lesão renal, acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio (BONETTI et al., 2003; DICKINSON et al., 2009; JABLONSKI et al., 2013; SEALS et al., 2011; WIDLANSKY et al., 2003). Uma dieta rica em sódio, pode levar à disfunção vascular, caracterizada pelo aumento da resistência vascular periférica (NISHIDA et al., 1998; SOFOLA et al., 2002), bem como aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (LENDA; BOEGEHOLD, 2002).

No contexto da disfunção vascular, a queda na produção de óxido nítrico (NO) também tem sido associada ao aumento do consumo de sódio. Um estudo realizado por Vaziri e colaboradores, avaliou os efeitos da dieta hipersódica sobre a produção de NO, para tanto, ratos Sprague-Dawley foram submetidos a uma dieta hipersódica (8% NaCl), em dois tempos diferentes: 2 dias e 3 semanas de exposição a dieta. O grupo que consumiu a dieta por 2 dias, apresentou redução significativa da expressão

de iNOS e eNOS no córtex renal e na aorta. Já o grupo que consumiu a dieta por 3 semanas, apresentou diminuição da iNOS no rim, na aorta, no coração e no cérebro. Além disso, neste grupo, também foi observada a diminuição da eNOS no córtex renal e na aorta. Sugerindo uma relação entre o consumo, bem como o tempo de consumo, de uma dieta hipersódica e a produção de óxido nítrico (NI; VAZIRI, 2001).

Outro estudo também demonstrou uma relação entre a exposição a uma dieta hipersódica e a redução de NO. Leda e colaboradores, demonstraram que o tratamento de animais normotensos por 5 semanas com uma dieta hipersódica (7% NaCl), promoveu aumento do estresse oxidativo através do aumento da atividade da NADPH oxidase e Xantina oxidase, resultando na diminuição do relaxamento mediado pelo endotélio por diminuir a biodisponibilidade de NO (LENDA; BOEGEHOLD, 2002).

Em humanos, também foram avaliados os efeitos de uma dieta hipersódica sobre a função vascular independente da PA. Para tanto, 14 indivíduos saudáveis, com idade entre 22 e 46 anos foram recrutados e submetidos a um histórico médico completo. Não foram aceitos participantes com histórico de doenças cardiovasculares e HAS, diabetes mellitus e insuficiência renal. Os participantes obesos (IMC>30 kg / m^2) e tabagistas também foram excluídos. Os participantes tiveram a dieta controlada durante 7 dias e foram randomizados em dois grupos: Dieta hipossódica (20 mM/ sódio/dia) e hipersódica (300 / 350 mM sódio/dia). Os resultados deste estudo demonstraram que não houve alteração da PA em ambos os grupos. Porém no grupo exposto a dieta hipersódica, foi observado prejuízo no relaxamento mediado pelo endotélio vascular, através da medida da dilatação mediada por fluxo da artéria braquial no último dia de cada dieta (DUPONT et al., 2013).

Ainda no contexto endotelial, a sobrecarga de sódio em cultura de células endoteliais promoveu o enrijecimento celular (OBERLEITHNER et al., 2011). Nesse estudo, a exposição ao aumento da concentração do sódio no meio de cultura (CT: 135 mM; AS: 150mM), em células endoteliais, alterou as propriedades mecânicas do endotélio vascular, prejudicando seu funcionamento.

1.4 SÓDIO E CÉLULA MUSCULAR LISA

As células musculares lisas vasculares (CMLVs), compõem estruturalmente a parede vascular, localizam-se na camada média do vaso, que é composta basicamente por CMLVs e elastina (Figura 1). Além de serem um componente estrutural fundamental, as CMLVs são responsáveis por realizar a regulação do tônus vascular, manutenção da pressão intravascular e regulação da perfusão tecidual (OWENS, 1995). Em relação a outros tipos celulares, as CMLVs são células altamente especializadas e diferenciadas, podendo desempenhar várias funções. CMLVs podem alternar seu fenótipo em resposta a estímulos extracelulares, normalmente se encontram em um fenótipo contrátil no vaso sanguíneo, mas podem passar para o fenótipo sintético, desempenhando várias funções como proliferação, migração, e síntese de matriz extracelular (WANG et al., 2015).

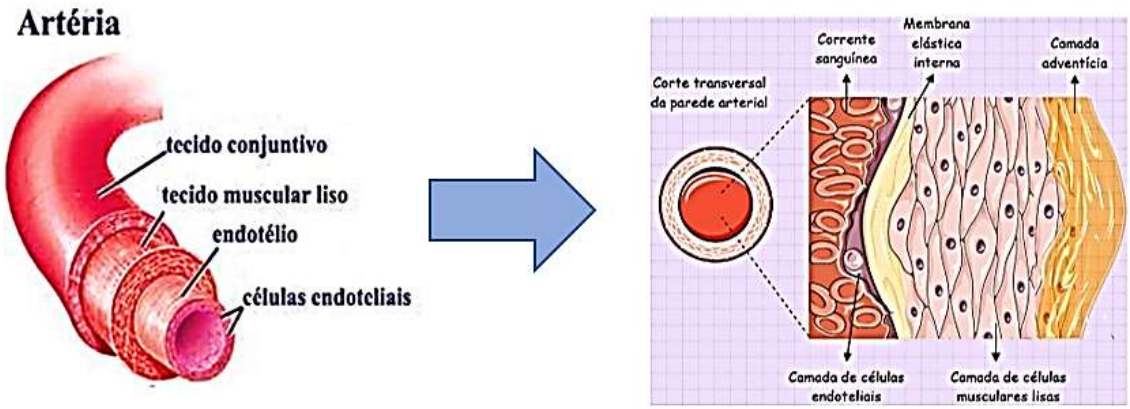

Figura 1: Representação das camadas que constituem as artérias: tecido conjuntivo, muscular liso e endotelial. Fonte: Guyton, 2012.

A plasticidade de CMLVs pode ser observada durante o desenvolvimento vascular quando CMLVs desempenham um papel fundamental na formação do vaso sanguíneo. Este processo é caracterizado pelos altos índices de proliferação,

migração e produção de componentes da matriz extracelular, tais como colágeno, elastina, e proteoglicanos, que constituem uma grande parte da parede do vaso sanguíneo. Esse processo ocorre ao mesmo tempo em que CMLVs adquirem uma capacidade contrátil (OWENS; KUMAR; WAMHOFF, 2004)

Processos patológicos, como aterosclerose e hipertensão arterial, envolvem alterações fenotípicas de CMLVs. Em resposta a lesão vascular, essas células são capazes de modificar, de forma expressiva, a sua taxa de proliferação celular, bem como a migração, desempenhando um papel importante durante a resposta a lesão e reparo do vaso sanguíneo (GOMEZ; OWENS, 2012).

Em resposta ao aumento da concentração do sódio no meio de cultura as CMLVs desenvolveram hipertrofia, bem como um aumento da síntese proteica e diminuição da proliferação celular, pela ação direta do sódio sobre as células, independente da alteração de osmolaridade no meio de cultura celular (GU et al., 1998). Por outro lado, Wu e colaboradores observaram que o aumento da concentração de sódio (180 mM) levou ao aumentou da proliferação de CMLVs, através da ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), através do aumento da fosforilação de ERK1/2 e JNK, culminando no aumento de proliferação (WU et al., 2016).

Liu e colaboradores demonstraram que uma pequena alteração na concentração de sódio (137,5 mM para 140 mM) não alterou a proliferação de CMLVs, porém o sódio tornou as células mais sensíveis a angiotensina II (Ang II), levando a um aumento de proliferação. Um possível mecanismo molecular discutido seria que a Ang II através do receptor AT1, ativaria a via intracelular da ERK1/2 modulando a expressão do trocador sódio-hidrogênio e aumentando o pH intracelular, com consequente aumento da proliferação de CMLVs na presença de sódio e Ang II (LIU et al., 2014).

Outros estudos demonstraram que o a exposição a elevada concentração de sódio leva ao envelhecimento celular *in vitro,* em cultura de células *HeLa* e *MEF*s. O mesmo estudo também demonstrou que a exposição do *C. elegans* á uma elevada concentração de sódio também foi capaz de promover o mesmo efeito *in vivo* (DMITRIEVA et al., 2007). Além disso, cultura de células mIMCD3, expostas a concentrações crescentes de sódio (450, 500 e 550 mosmol) apresentaram danos no DNA com perda da capacidade de reparação ao dano (ZHANG et al., 2004).

Apesar de existirem estudos que tentam esclarecer o mecanismo pelos quais ocorrem as alterações fenotípicas celulares induzidas pelo alto teor de sódio em cultura celular, os achados encontrados são contraditórios. Além disso, até o momento, nenhum estudo avaliou os efeitos do alto sódio sobre o fenótipo migratório de CMLVs.

1.5 MIGRAÇÃO CELULAR

Migração e proliferação celular compõe processos importantes envolvidos tanto em fenômenos fisiológicos como fisiopatológicos. Dentre eles, a angiogênese e vasculogênese são importantes para o desenvolvimento e integridade dos vasos sanguíneos. Embora as células endoteliais sejam conhecidas por iniciar estes processos, é necessário que haja o recrutamento das CMLVs, sendo elas responsáveis por revestir a camada endotelial e compor a camada média dos vasos. Durante o processo de revestimento, as CMLVs apresentam alta taxa de proliferação e migração, porém ao finalizar este processo, elas se diferenciam, retomando as características contráteis (CARMELIET, 2000; JAIN, 2003).

In vivo ou *in vitro*, a migração celular começa através da estimulação de receptores que estão localizados na superfície celular. O sinal recebido, através do receptor, é traduzido e desencadeará uma série de eventos celulares coordenados, como remodelamento da estrutura do citoesqueleto celular. A resposta inicial da célula a um estímulo promotor de migração, é a polimerização da actina, provocando a protrusão da borda dianteira da célula em direção ao estímulo quimiotático ou ao longo da matriz extracelular. Posteriormente, ocorre a contração da borda posterior da célula concomitante ao remodelamento do citoesqueleto celular e desprendimento da borda posterior, ocorrendo então a propulsão da célula em direção ao estímulo (RIDLEY et al., 2003).

Algumas substâncias são conhecidas por promover a migração de CMLVs, como: Ang II, PDGF, VEGF, TNFα, IL-6, IL-1β, prostanóides entre outros. Após a ativação do receptor, a transdução intracelular do sinal recebido, pode ser realizada através da ativação de MAPK, descrita na literatura por desempenhar um papel importante na regulação da expressão gênica e síntese proteicaprotéica. O caminho

de sinalização se inicia pela fosforilação sequencial de proteínas quinases citoplasmáticas: MAP3K, MAP2K e, finalmente, MAPK (MAP quinase). Três proteínas principais compõe a família das MAPK, são elas: ERK1/2, p38 e JNK (GERTHOFFER, 2007).

No sistema cardiovascular, a migração de CMLVs contribui para a reparação do vaso sanguíneo após a lesão vascular, podendo ser provocada por diversos estímulos, tais como: hipertensão, tabagismo, diabetes ou dislipidemia. Após a lesão, o subendotélio é exposto às plaquetas circulantes que secretam fatores de crescimento e citocinas, responsáveis por estimular a proliferação e a migração de CMLVs, levando a formação da neoíntima (LIBBY; WARNER; FRIEDMAN, 1988; ROSS et al., 1974). Apesar de existirem várias vias de sinalização que podem modular a migração celular, como por exemplo os fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGFs), que são capazes de ativar a migração de forma imediata, a ativação por sinais mecânicos e canais iônicos também são necessários para a liberação de citocinas e reorganização do citoesqueleto (MA et al., 2003; SCHWAB, 2001)

1.6 O SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

Descrito há mais de 80 anos, o sistema renina angiotensina (SRA) é conhecido pelo seu papel fundamental na regulação da homeostase de sódio extracelular, além de desenvolver um papel importante na regulação do tônus vascular e manutenção da PA (PAGE; HELMER, 1940). Classicamente, o SRA circulante é entendido como um sistema endócrino cujo o principal componente é um octapeptídeo, a Ang II, sendo esta responsável pelos principais efeitos do SRA (NGUYEN DINH CAT; TOUYZ, 2011). Classicamente, o SRA se inicia através da clivagem do angiotensinogênio de origem hepática, pela enzima renina, dando origem a um peptídeo de 10 aminoácidos, a angiotensina I (Ang I). Em seguida, a Ang I é clivada em Ang II, pela enzima conversora de angiotensina (ECA), presente principalmente no tecido pulmonar (Figura 2). Fisiologicamente, no SRA circulante, a renina, é quem inicia as reações em cascata, sendo secretada em situações de queda da PA ou de diminuição da concentração de sódio que sensibilizam as células justa glomerulares a secretarem

renina. A Ang II promove a elevação da pressão arterial, através da vasoconstrição arteriolar e por retenção de sódio e água por meio do aumento da reabsorção tubular. Esta última, ocorre de forma direta e indiretamente pela indução da secreção, pelas glândulas suprarrenais, de aldosterona, que é um hormônio retentor de sódio por excelência (WEBER, 2001).

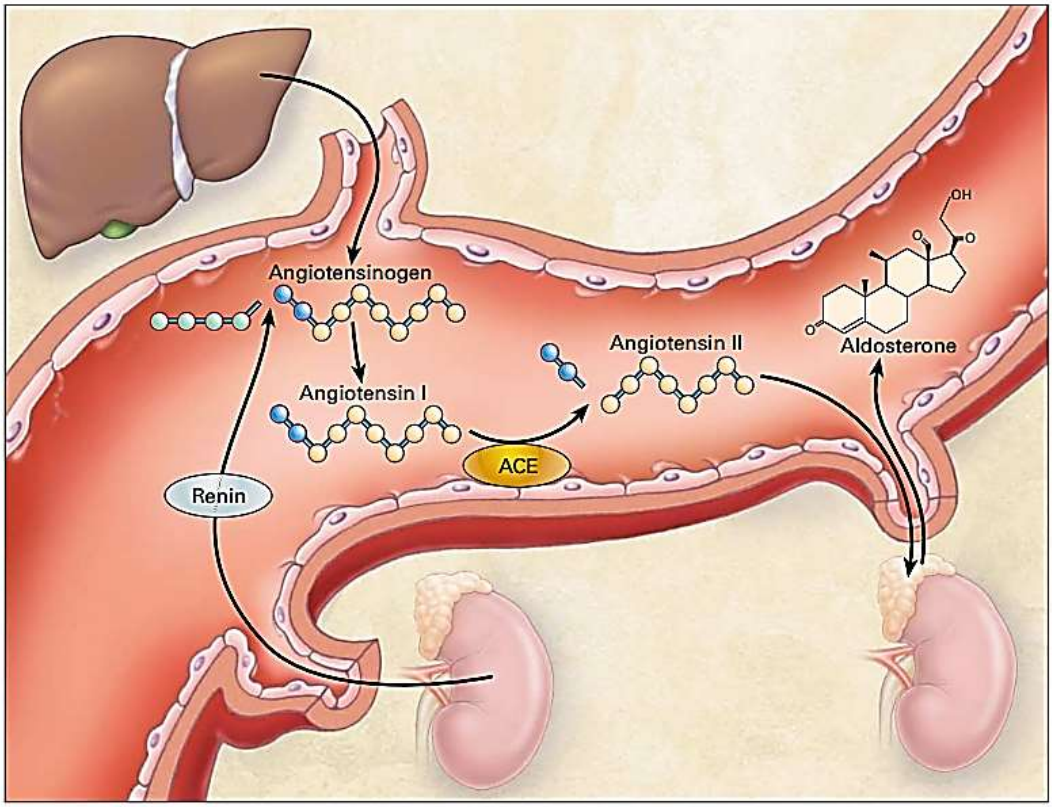

Figura 2. Visão clássica do Sistema Renina Angiotensina Aldoresterona e seus componentes. **Fonte:** WEBER, 2001.

Para desenvolver seus efeitos em órgãos alvos, Ang II se liga em seus receptores alvos, dos quais dois tipos principais são bem descritos: AT1 e AT2. Ambos são receptores transmembrânicos acoplados a proteína G. Localizam-se predominantemente nos rins, coração, CMLVs, adrenais, útero, ovários e cérebro (CAREY; SIRAGY, 2003). Ang II ao se ligar ao receptor AT1, promove seus efeitos mais conhecidos: vasoconstrição, aumento de proliferação e migração celular.

Entretanto, os receptores AT2 quando estimulados, promovem efeitos antagônicos (UNGER, 2002).

Além do SRA circulante, atualmente, já está descrito a existência de um SRA tecidual ou local. A existência de um SRA local se dá pelo reconhecimento de tecidos com capacidade local de formação e atuação de Ang II (CAREY; SIRAGY, 2003). Acredita-se que podemos encontrar, até o momento, todos os componentes de SRA, em alguns órgãos como: coração (DANSER et al., 1999), cérebro (MORIMOTO; SIGMUND, 2002), vasos sanguíneos (BADER et al., 2001), tecido adiposo (ENGELI; NEGREL; SHARMA, 2000), pâncreas (SERNIA, 2001), placenta (NIELSEN; SCHAUSER; POULSEN, 2000), rins (BADER et al., 2001) e, recentemente, foi demonstrado que todos os componentes do SRA também estão presentes em CMLVs (DE MELLO, 2017).

Apesar dos efeitos conhecidos de Ang II nos tecidos alvos, o conceito de um SRA local ou tecidual trouxe novos conceitos acerca das ações deste sistema, uma vez que, o SRA tecidual desempenha funções independentes as dos SRA circulante (PAUL; POYAN MEHR; KREUTZ, 2006). Além disso, tem sido observado que a contribuição mais significativa do SRA tecidual tem sido a nível celular, desempenhando efeitos autócrinos, parácrinos e intrácrinos (DE MELLO, 2017; KUMAR et al., 2012).

Em CMLVs, a Ang II, através do receptor AT1, é capaz de promover: proliferação, migração, hipertrofia, inflamação, reorganização de citoesqueleto e aumento do estresse oxidativo através da ativação de NADPH oxidase levando ao aumento do ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. Além disso, Ang II pode regular a produção de prostanóides e a expressão da COX-2 em CMLVs. Os prostanóides além de controlarem o tônus vascular, desempenham funções importantes em nível celular, atuando na agregação plaquetária, proliferação, migração e hipertrofia celular, todos relacionados a processos como angiogênese, aterogênese e remodelamento vascular (GRIENDLING et al., 1994b; HU et al., 2002; HUGHES, 2000; MEHTA; GRIENDLING, 2007a; XI et al., 1999).

Imediatamente após Ang II se ligar ao seu receptor, cascatas de eventos intracelulares acontecem, como a ativação de MAPK. Essas proteínas são responsáveis por converter estímulos extracelulares em respostas celulares. Uma das proteínas que constitui a família das MAPKs é a ERK1/2, que quando ativada,

encontra-se fosforilada e atua como segundo mensageiro regulando várias funções celulares (CHANG; KARIN, 2001; RAMAN; CHEN; COBB, 2007).

1.7 CICLOOXIGENASE 2 E PROSTANÓIDES

Os prostanóides são derivados do ácido araquidônico (AA) e atuam no leito vascular promovendo tanto vasodilatação como vasoconstrição. A produção destes prostanóides depende da disponibilidade de AA e da atividade das ciclooxigenases e sintases das prostaglandinas (ALVAREZ et al., 2007a).

A síntese dos prostanóides se inicia quando o AA, um fosfolipídio constituinte de membrana celular, sofre a ação da fosfolipase A_2 (PLA_2) e é liberado. Após sua liberação, o AA disponível será oxidado pela ação das ciclooxigenase (COX). Após a oxidação, o AA é convertido em prostaglandina H_2 (PGH_2), precursor imediato de muitos prostanóides (Figura 3). Após a sua formação, PGH_2, irá sofrer ação de várias sintases específicas, que irão formar prostaglandina E2 (PGE_2), prostaciclina (PGI_2), prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), prostaglandina D2 (PGD_2) ou Tromboxano A_2 (TXA_2) (BOS et al., 2004). Os prostanóides formados, irão se ligar aos seus receptores específicos acoplados a proteína G. Existem oito tipos de receptores, IP, EP2/EP4 e DP, respectivamente, que quando ativados promovem vasodilatação. Já os receptores, EP1, EP3, FP e TP, promovem vasoconstrição quando ativados pelos respectivos agonistas.

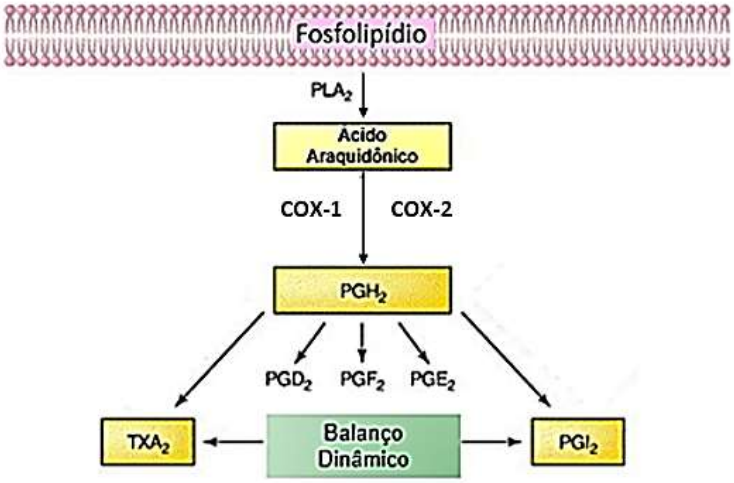

Figura 3: Síntese de prostanóides. PLA_2: fosfolipase A_2; COX-1: ciclooxigenase 1; COX-2: ciclooxigenase 2; PGH_2: Prostaglandina H_2; PGD_2: prostaglandina D_2; PGF_2: prostaglandina F_2; PGE_2: prostaglandina E_2; PGI_2: prostaciclina; TXA_2: Tromboxano A_2. Fonte: Elaborada pela autora.

Há duas isoformas principais da COX, denominadas ciclooxigenase-1 (COX-1) e 2 (COX-2) que realizam a síntese das prostaglandinas (PG) e do TXA_2. A COX-1, considerada a isoforma constitutiva, é expressa em muitos tecidos e sintetiza pequenas quantidades de PGs tendo como principal função a manutenção das funções fisiológicas (SMITH; GARAVITO; DEWITT, 1996). A COX-2 é a isoforma induzida, sua expressão é estimulada por citocinas, fatores mitogênicos e endotoxinas, e sua expressão relaciona-se principalmente com processos inflamatórios (ANTMAN; DEMETS; LOSCALZO, 2005).

O aumento da expressão de COX-2 tem sido relacionado a hipertensão. Alvarez e colaboradores demonstraram que ratos espontaneamente hipertensos (SHR) apresentam maior expressão de COX-2 (ALVAREZ et al., 2005). Além disso, o aumento da expressão de COX-2 tem sido associado ao aumento da rigidez dos vasos, aumento da deposição de matriz extracelular, aumento da reatividade vascular, disfunção endotelial e inflamação vascular (ALVAREZ et al., 2005, 2007; AVENDAÑO et al., 2016; MARTÍNEZ-REVELLES et al., 2013).

Um estudo recente evidenciou, em modelo animal de HAS pela infusão de Ang II, um aumento da expressão de COX-2 associado a produção de prostanóides (TXA_2 e PGE_2), com disfunção vascular caracterizado pelo aumento da resposta vasoconstritora, diminuição do relaxamento em artérias isoladas e estresse oxidativo.

Curiosamente, o tratamento prévio destes animais com inibidor específico da COX-2 (NS398) preveniu estes efeitos (MARTÍNEZ-REVELLES et al., 2013).

TXA_2 e PGI_2 são PGs descritas por exercerem efeitos importantes no sistema cardiovascular. O tromboxano, conhecido pelo seu efeito vasoconstritor mais potente que o da Ang II, desempenha um papel crítico sobre a agregação plaquetária e hemostasia, sendo contrabalançado pela prostaciclina, que é um vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária igualmente poderoso (MILLER, 2006).

No nível celular, a PGI_2 através do seu receptor (IP), mantém a integridade da barreira endotelial, inibe a apoptose e diminui a expressão de moléculas de adesão, culminando na diminuição da infiltração plaquetária (MAZZONE et al., 2002). Além disso, em CMLVs, a prostaciclina através do seu receptor (IP) desempenha um efeito vasoprotetor e inibe a proliferação, migração, hipertrofia, a deposição de matriz extracelular, impedindo consequentemente a formação de neoíntima (MAJED; KHALIL, 2012).

O TXA_2 tem sido relacionado a patogênese de uma variedade de doenças cardiovasculares, incluindo doença cardíaca isquêmica (NERI SERNERI et al., 1981), aterosclerose (MEHTA et al., 1988), hipertensão (FRANCOIS et al., 2004) e acidente vascular cerebral (AVC) (CHAMORRO, 2009).

Os receptores de tromboxano (TP) são expressos em vários tipos de células e tecidos, como o coração, macrófagos, endotélio e CMLVs (SPARKS et al., 2013). Estudos tem sugerido a participação dos receptores TP na patogênese da hipertensão, especialmente naquela associada à ativação do SRA (FRANCOIS et al., 2004). Estudos demonstraram que antagonistas de TP foram capazes de atenuar o desenvolvimento de hipertensão associada à infusão crônica de Ang II e camundongos deficientes de TP são resistentes ao desenvolvimento de hipertensão provocada por Ang II (FRANCOIS et al., 2004)

Acerca das modulações celulares, TXA_2 através dos seus receptores (TP), promove alterações celulares opostas aos efeitos observados através da ação de PGI_2. Em CMLVs, é capaz de alterar seu fenótipo de contrátil para secretório (GLEIM et al., 2009). Além disso, estudos demonstram que o uso de análogos do receptor de TXA2 promovem aumento de proliferação e migração de CMLVs. O TXA_2 foi descrito por induzir a angiogênese em células endoteliais (DANIEL et al., 1999), porém de

forma contraditória outros estudos já observaram que o TXA_2 em cultura de células endoteliais é capaz de promover efeitos antiangiogênicos (SMYTH, 2010). Diante disso, os efeitos celulares acerca da produção de prostanóides e da ativação de seus receptores ainda não está completamente elucidado.

Diversos estudos clínicos e experimentais evidenciam que o excessivo consumo de sódio promove danos cardiovasculares que vão além da elevação da PA (TUOMILEHTO et al., 2001). Estudos demonstraram que os danos promovidos pelo alto consumo de sódio podem estar associados ao SRA, principalmente pela ativação do receptor AT1 (VARAGIC et al., 2008). Além disso, outros estudos também demonstraram uma relação entre o alto consumo de sódio e a ativação de processos inflamatórios, como o aumento da expressão de COX-2 e produção de prostanoides (HE et al., 2014). Apesar dos efeitos sistêmicos conhecidos acerca do alto consumo de sódio, pouco ainda se sabe sobre seus efeitos celulares, principalmente na migração celular. Portanto, o presente estudo buscou investigar se o aumento da concentração de sódio é capaz de promover alterações no fenótipo migratório de CMLVs e elucidar os possíveis mecanismos envolvidos. Para tanto, investigamos a participação do SRA, da COX-2 e dos receptores de prostanoides.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Testar a hipótese de que o aumento da concentração de sódio pode induzir modificações no fenótipo migratório de CMLVs e avaliar os possíveis mecanismos moleculares que possam estar envolvidos neste processo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a mortalidade das CMLVs após exposição ao alto sódio;
- Avaliar a apoptose e necrose das CMLVs após exposição ao alto sódio;
- Avaliar o fenótipo migratório de CMLVs expostas ao alto sódio;
- Avaliar a participação do receptor AT1 e da ECA na migração de CMLVs expostas ao alto sódio;
- Avaliar as vias moduladas através do receptor AT1: Ativação da NAPH oxidase e COX-2;
- Avaliar a participação da COX-2 na migração de CMLVs expostas ao alto sódio;
- Avaliar alterações na fosforilação de ERK1/2, e se esta alteração está relacionada ao receptor AT1 em CMLVs expostas ao alto sódio;
- Avaliar a participação do receptor AT1 e da ERK1/2 na modulação da expressão gênica de COX-2 em CMLVs;
- Avaliar a participação dos receptores de PGI_2 e TXA_2 na migração de CMLVs expostas ao alto sódio.

Justificativa

3. JUSTIFICATIVA

O consumo abusivo de sódio, tem sido associado não somente ao aumento da pressão arterial, mas também ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (STRAZZULLO et al., 2009). Dentre os efeitos acerca do aumento da concentração de sódio, estão a hipertrofia cardíaca, prejuízo do relaxamento ventricular, disfunção endotelial e injúria renal (DOS SANTOS et al., 2006; LI et al., 2012; YU et al., 1998) . Apesar das evidências acerca dos efeitos do alto sódio no organismo, pouco ainda se sabe sobre os seus efeitos no nível celular. Sendo assim, estudos utilizando células isoladas, são importantes para que se entenda os efeitos do sódio no nível celular e para elucidar possíveis mecanismos moleculares envolvidos. Apesar de alguns estudos já terem avaliado os efeitos do alto sódio em cultura celular, até o momento, nenhum estudo avaliou os efeitos do alto sódio sobre a migração de CMLVs.

Metodologia

4. METODOLOGIA

Para realização deste estudo, foram utilizados ratos Wistar, machos, com 12 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo. Todos os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 h, com livre acesso a água e ração em gaiolas apropriadas, com no máximo 4 animais por gaiola. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos do Colegiado Brasileiro de Experimentação Animal e previamente aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo sob o número 049/2014.

4.1 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES

As células foram obtidas através da técnica de explante da aorta torácica (CAMPOS et al., 2009). Após o animal ser anestesiado com Uretana (1,5 g/kg) por via intraperitoneal, a aorta foi retirada do animal e colocada em placa de Petri contendo solução tampão fosfato-salino e antibióticos (PBS + Penicilina 100U/ml e estreptomicina 100 U/ml), onde foi realizada a retirada do tecido conjuntivo e a artéria foi levada para o fluxo laminar em tubo falcon com a mesma solução.

A partir desse momento, todos os procedimentos foram realizados cuidadosamente dentro de uma capela de fluxo laminar. A aorta foi aberta longitudinalmente com o auxílio de uma tesoura cirúrgica. Através de força mecânica realizada no lúmen do vaso com uma pinça cirúrgica, foi feita a retirada da camada de células endoteliais do vaso. Em seguida a artéria foi cortada em fragmentos de aproximadamente 2 mm x 2 mm e estes foram então colocados em uma placa de cultura de 6 poços, pré-tratadas com gelatina (3%), com a camada muscular em contato com a placa.

Os fragmentos foram mantidos em meio de cultura DMEM high glucose suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), Penicilina 100U/ml e estreptomicina 100 U/ml, em estufa umidificada a 37ºC e 5% de CO_2. O meio de cultura foi trocado a cada 72 horas.

Passados cerca de sete a dez dias, foi comprovada a aparição de CMLVs procedentes dos explantes teciduais, através da visualização direta em microscópio de células que se aderiram ao fundo da placa (Figura 4). Quando as células atingiram confluência aproximada de 80 %, cerca de 15 dias após a extração, as CMLVs foram tripsinizadas. Para isso, as células foram lavadas 2x com PBS sem cálcio (Ca^{2+}) e sem magnésio (Mg^{2+}), após a lavagem, foi adicionado tripsina-EDTA a 0,05 % durante 3 min. na incubadora a 37ºC, com o objetivo de facilitar a suspensão das células do fundo das placas. Em seguida, a tripsina foi neutralizada com meio de cultura DMEM high, 10 % SFB, Penicilina 100U/ml e estreptomicina 100 U/ml, as células foram semeadas em garrafas de 75 cm^2 e mantidas em estufa umidificada a 37ºC e 5% de CO2. Para manter o crescimento exponencial, após atingirem 100% de confluência, as células eram tripsinizadas e 30% das células eram devolvidas para a garrafa. Cada tripsinização / repique, foi realizada com uma frequência média entre 4 e 7 dias.

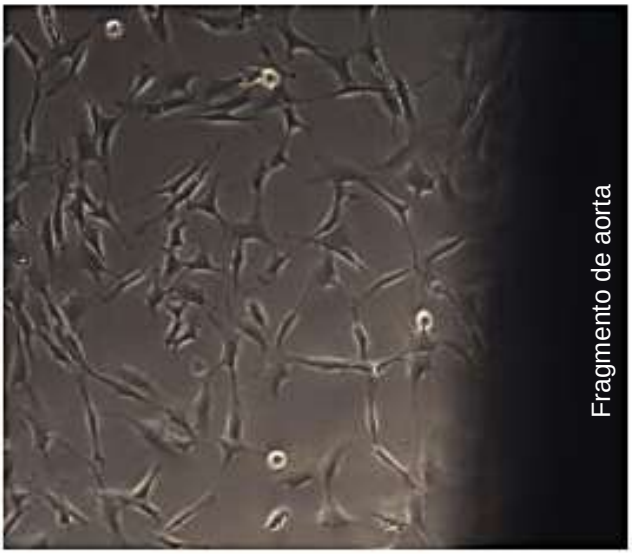

Figura 4: Aparecimento de CMLVs a partir de fragmento de aorta. Cerca de 7 dias após a extração.

Para realização dos protocolos experimentais, foram utilizadas células sempre entre a terceira e sexta passagem. Com o objetivo de equalizar as células na mesma fase do ciclo celular, antes de realizarmos os estímulos, as células foram submetidas ao *starving* (jejum), processo pelo qual é realizada a redução para 0,5% de SFB do meio de cultura. Para realização dos experimentos, foram utilizados concentrações moleculares de sódio de 140 mM (Controle) e 160 mM (alto sódio). A condição de alto

sódio, foi conseguida através da adição de Cloreto de Sódio (NaCl) ao meio de cultura o suficiente para que a concentração atingisse 160 mM. Como o aumento da concentração do sódio foi realizado através da adição de NaCl (1M), porém, ao realizarmos essa alteração, sabemos que alteramos a pressão osmótica bem como a concentração de cloreto no meio, utilizamos *Mannitol* (1M) como controle osmótico e cloreto de colina (1M) para avaliar a participação do Cl^-. Todos os reagentes foram comprados da *Sigma Aldrich* (St. Louis, Missouri, EUA).

4.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para confirmar a eficiência da realização do nosso método de extração de CMLVs, realizamos a marcação por imunofluorescência da proteína de citoesqueleto α- actina de músculo liso. Para tanto, as células foram plaqueadas em placa de 24 poços ($4x10^4$ célula por poço) e após atingir confluência de 60% o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas 3x com PBS. As células foram fixadas com solução de paraformaldeído 4% em temperatura ambiente por 30 minutos. Após a fixação as células foram lavadas novamente por 3x com PBS. As células então foram permeabilizadas com solução de Triton T-X100 0,15% por 15 minutos e novamente foram lavadas 3x com PBS. Para que não houvesse ligações inespecíficas foi realizado o bloqueio com solução de BSA 4% em PBS por uma hora, seguido da incubação com anticorpo primário alfa actina de músculo liso (Anti-actin, α-smooth muscle antibody, mouse monoclonal (A5228), Sigma *Aldrich*, proporção de 1:10000) por 12 horas em geladeira. Após a incubação, foi realizada a lavagem novamente em PBS por 3x e incubado com anticorpo secundário Alexa flúor (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), (proporção de 1:500) durante 45 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz. Novamente as células foram lavadas 3x com PBS e após, incubadas com o marcador nuclear intercalante de DNA (DAPI 20ug/mL, Invitrogen, Carlsbad, California, EUA). Finalmente, foram lavadas por 3x com solução de PBS. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência e foram utilizados os seguintes comprimentos de onda: Alexa flúor: 488 nm e DAPI: 345nm (Figura 5).

A) B)

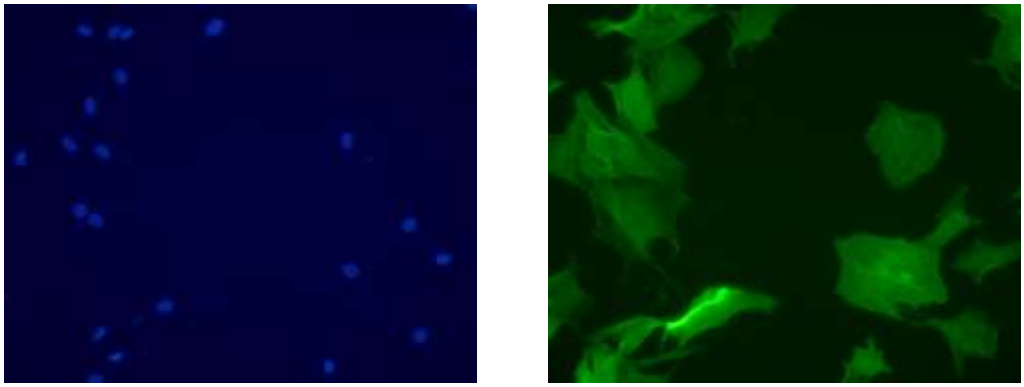

Figura 5: Imunofluorescência para confirmação de CMLVs. A) DAPI e B) α- actina.

4.3 FÁRMACOS E REAGENTES

Candersartan (10^{-6}M), antagonista do receptor AT1; Enalapril (5 x 10^{-5}M) inibidor da ECA; Angiotensina II (10^{-7}M) agonista do receptor AT1; Tiron (100x10^{-6}M) varredor de espécies reativas de oxigênio e Apocinina (30x10^{-6}M) inibidor da NADPH oxidase foram adquiridos através da *Sigma Aldrich* (St. Louis, Missouri, EUA). NS398 (10^{-5}M) inibidor específico da COX-2; SQ29548 (10^{-5}M) antagonista do receptor de tromboxano; U46619 (2 x 10^{-7}M) agonista do receptor de tromboxano e CAY10441 (10^{-5}M) antagonista do receptor de prostaciclina foram adquiridos através da *Cayman Chemicals* (Ann Arbor, Michigan, EUA). U0126 (10^{-6}M) inibidor de quinase extracelular induzida por mitógeno (MEK), foi adquirido através da empresa *Cell Signaling Technology* (Danvers, Massachusetts, EUA). Todos os inibidores, antagonistas e agonistas foram adicionados ao meio de cultura 60 minutos antes do estímulo com o sódio.

4.4 MORTALIDADE CELULAR

Foi utilizado a coloração com Azul de Tripan *(Trypan Blue,* Sigma) para determinar o número de células em necrose *vs.* células viáveis. O método baseia-se

no princípio de que as células vivas possuem membranas celulares intactas, que não são permeáveis ao Azul de Tripan, enquanto que as células mortas perdem a integridade de membrana e desta forma se tornam permeáveis e marcam em azul pelo corante.

Células na terceira passagem foram plaqueadas em placa de 24 poços, 5 x 10^4 células por poço, cerca de 60% de confluência. Após atingirem 100% de confluência as células foram expostas ao alto sódio por 24, 48 e 72 horas. Ao final de cada tempo de incubação, as células foram tripsinizadas e misturadas com o corante, em proporção de 1 para 1 e quantificadas em câmara de *Neubauer*. As células que apresentaram coloração azul foram consideradas como não viáveis.

4.5 APOPTOSE E NECROSE CELULAR

A detecção de apoptose e necrose foi realizada por marcação celular com Anexina VFITC/Iodeto de Propídio e analisada por citometria de fluxo. A anexina V-FITC se liga a fosfatidilserina, uma proteína que é externalizada na membrana das células que estão iniciando o processo apoptótico, e o iodeto de propídeo se liga ao DNA das células em necrose, uma vez que o Iodeto só é capaz de penetrar em células que não possuem a membrana celular íntegra. Para tanto, foi utilizado o kit BD Annexin V: FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, San Diego, CA). Células em quarta passagem foram plaqueadas em placas de 6 poços, 50x10^4 células por poço. Ao atingirem 100% confluência, as células foram submetidas ao *starving* em meio de cultura contendo 0.5% de SFB por 24 horas. Após o *starving*, as células foram expostas ao sódio durante 24 horas. Após a exposição, as células foram tripsinizadas, centrifugadas à 153*g* por 5 minutos e lavadas 2x com PBS. Em seguida, as células foram ressuspendidas em tampão de ensaio (Binding Buffer 1x) na concentração de 1x10^6 células/mL. Foi realizada uma etapa adicional de centrifugação à 153 *g* durante 10 minutos. Por fim, o pellet de células foi ressuspendido em 500uL de tampão de ensaio. Imediatamente após, as células foram marcadas com 2uL de Anexina V-FITC e PI durante 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Foram adquiridos10.000 eventos em citômetro de fluxo FACS Canto (BD Biosciences, San Jose, CA). Os dados foram analisados no software Cell Quest.

4.6 MIGRAÇÃO CELULAR

Células em quarta passagem foram utilizadas para o protocolo de migração celular, realizado pelo método de *Wound-Healin*g. O método consiste em realizar uma ferida/risco na camada celular. As células tendem a migrar para o espaço aberto artificialmente, o índice de migração é a diferença entre a área inicial e a área final (DU NOÜY, 1916; LIANG; PARK; GUAN, 2007).

Para tanto, foram plaqueadas 50 x 10^4 células/poço em placa de 6 poços. Após atingir 100% de confluência, as células foram submetidas ao *starving*. Com o objetivo de observar em qual tempo de exposição ao sódio as alterações no padrão migratório seriam mais evidentes, CMLVs foram expostas sódio de duas formas: 1- Aguda, onde o sódio era adicionado após o *starving* exatamente no momento que se iniciava o protocolo de migração, logo após realizar o risco na placa e mantido durante todo o experimento de migração, totalizando 10 horas de exposição; 2- Pré-exposição: onde a concentração de sódio foi alterada junto a adição na placa do meio de *starving* e também foi mantido durante todo o experimento de migração, totalizando 34 horas de exposição (24 horas de *starving* + 10 horas relacionada ao tempo inteiro do protocolo de migração). A avaliação da migração foi realizada a cada duas horas, em ambas as condições, pois, queríamos observar as possíveis alterações precocemente. Para avaliar as possíveis vias moleculares envolvidas, utilizamos os fármacos acima citados.

No início do protocolo o meio de cultura foi aspirado e então foi realizado um risco com uma ponteira de 10 ul na placa (Figura 6), retirando as células de uma extremidade à outra. Foi realizado lavagem de cada poço 3x com PBS, para retirada das células em suspensão que poderiam interferir na análise. Em seguida foi adicionado meio de cultura celular, de acordo com o protocolo (controle, alto sódio, bloqueadores/inibidores + sódio). Foi realizado o registro de 3 imagens por poço a cada duas horas sempre do mesmo ponto, durante um período de 10 horas após o início do protocolo, para que fosse possível visualizar a partir de qual horário houve alteração do padrão migratório de CMLVs. A captura das imagens foi realizada através de uma câmera (BEL Eurekam) acoplada ao microscópio com o auxílio da objetiva de 10 x. A área de migração celular foi analisada através do programa Imagem J

(domínio público) através da demarcação da área inicial e das demais áreas de acordo com o tempo de estímulo. Para avaliar a área migrada, utilizamos a diferença entre a área inicial e a área referente ao tempo de estímulo.

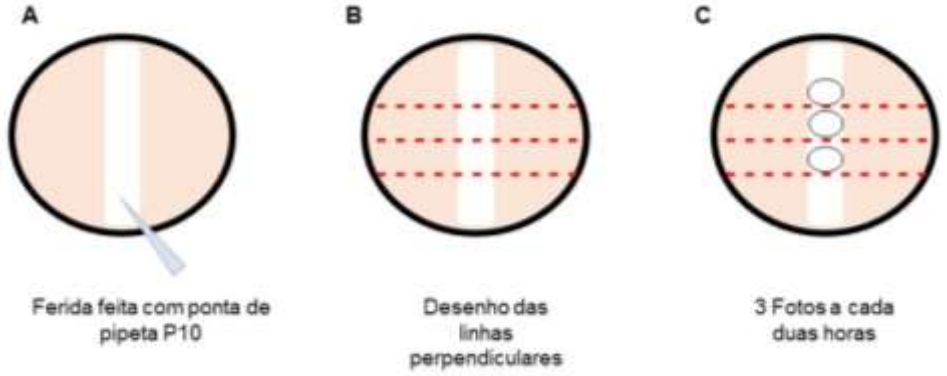

Figura 6: Esquema do Protocolo de Migração celular – *Wound-Healing.*

4.7 WESTERN BLOT

A técnica de Western Blot foi utilizada para determinar a expressão proteicaprotéica de ERK1/2 fosforilada. Para tanto, as células foram lisadas com Ripa Buffer (Sigma) acrescidos de inibidores de proteases e fosfatases (Sigma) na proporção de 1% e 10% respectivamente, conforme orientação do fabricante. As amostras foram centrifugadas a 10.000 *g*, a 4ºC por 10 minutos. A quantificação das proteínas totais do sobrenadante foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

O extrato de proteína foi separado em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), que permite a separação de proteínas de acordo com o peso molecular. As amostras foram previamente diluídas em tampão Laemmli e aquecidas em banho maria 95 ºC para desnaturação proteica até sua estrutura primária. Em seguida, foram carregadas em gel de entrada com concentração de 5% (1 M Tris pH:6,8, acrilamida 30%, SDS 10%, APS 10% e Temed). Após o carregamento, o sistema montado (PowerPacTM HC, BioRad CA, EUA) foi submetido a uma corrente elétrica constante de 100V por 2 horas, onde correram o gel de separação eletroforética com concentração de 12% (1,5 M Tris pH: 8.8, acrilamida 30%, SDS

10%, APS 10% e Temed) previamente imersos em tampão de corrida eletroforética (25mM de Tris HCl, 190mM de glicina e 0.1% de SDS).

Após a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de PVDF através do sistema "sanduíche" contendo o gel, a membrana e o papel Whatman embebido com solução de transferência (Tris-25 mM, Glicina-190 mM, Metanol-20%). O sistema (Trans-Blot SD Cell BioRad, EUA) foi submetido a uma corrente constante de 100 V por 1 hora a uma temperatura de aproximadamente 4ºC. A transferência foi confirmada pela presença da coloração das bandas do marcador de peso molecular na membrana (Kaleidoscope Prestained Standards, Bio-rad Laboratories).

Para evitar ligações inespecíficas, foi realizado o bloqueio da membrana com 5% BSA (Sigma) em TBS-T (Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 a 0,1%, pH 7,6) após a transferência por um período de 1 hora sob agitação constante. Em seguida, a membrana foi lavada com TBS-T e a incubação das membranas com os anticorpos primários de interesse foi realizada overnight, a 4 ºC com os anticorpos primários de interesse: pERK1/2 (proporção de1:1000; Cell Signaling) e alfa actina (proporção de 1:10.000; Sigma). Passado o período de incubação, as membranas foram lavadas com TBS-T e posteriormente foram incubadas durante 1 hora sob agitação, à temperatura ambiente, com anticorpo secundário conjugado a peroxidase. Foi realizado a incubação com reagente para imuno-detecção por meio de luminescência, ECL (GE Healthcare, Little Chalfont, RU). A visualização das bandas foi realizada em fotodocumentador ChemiDoc XRS+ (Biorad, Hercules, California, EUA) e a captura das imagens por software Bio-rad Image Lab 5.2.1(Biorad, Hercules, California, EUA). A análise foi realizada através do programa Imagem J (domínio público).

4.8 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR)

A técnica de reação de cadeia da polimerase em tempo real, foi utilizada para avaliar a expressão gênica do RNA mensageiro da COX-2. Após atingirem 100% de confluência as células foram submetidas ao *starving* por 24 horas. Após o *starving,* as células foram expostas ao sódio por 4, 6 e 24 horas em meio de cultura com 0,5% SFB. A extração de RNA total das amostras, foi realizada utilizando Trizol (Invitrogen,

Carlsbad, California, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Utilizamos o primer (5'- GATGACGAGCGACTGTTCCA-3' e 5´- TGGTAACCGCTCAGGTGTTG-3´) para identificação de COX-2. A expressão de ciclofilina A (5'- TGGCAAGCATGTTGGGTCTTTGGGAG-3' e 5- GGTGATCTTCTTGCTGGTCTGCCATTC-3') foi utilizado como normalizador.

A concentração de RNA total foi quantificada usando o NanoDrop (NanoDrop Technologies, EUA). Além disso, verificamos a pureza e a integridade do RNA em gel de agarose 1%, marcado com Nacy-520 (*Sigma-Aldrich*, EUA). O gel foi imerso em tampão TAE 1X e a eletroforese realizada a 100 Volts por aproximadamente 20 minutos. As bandas foram observadas em um transluminador UV. A síntese de cDNA foi realizada utilizando 2 µg de RNA total. Para obtenção da primeira fita de cDNA, as amostras foram incubadas com 0,5 µg/mL de oligo dT12-18 a 65ºC por 5 min. A transcrição reversa das amostras foi realizada em volume total de 20 µL contendo 3U de RNAsin (Promega, Madison, USA), 10 mM de dNTPs, 0.1 M de DTT, 1X tampão de enzima, e 2.5U de SuperScript Reverse Transcriptase II (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA). Após incubação por 1 hora a 42 ºC, a temperatura foi elevada a 95 ºC por 5 minutos e as amostras foram rapidamente colocadas em gelo para desnaturação de híbridos RNA-cDNA formados.

A quantificação da expressão gênica de COX-2 foi realizada pelo sistema de detecção do produto específico amplificado no equipamento 7500 Real Time PCR System (Biosystem, CA, EUA) realizada com o kit SYBRgreen PCR Master Mix (Biosystem, CA, EUA). Inicialmente, foi realizada a curva de concentração para o primer da COX-2. 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 (COX-2) referência ciclofilina). Os níveis de expressão gênica de COX-2 foram obtidos pelo $2^{-\Delta\Delta CT}$ (ΔΔCt é o valor ΔCt subtraído do ΔCt da amostra).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados por média ± erro padrão da média (e.p.m.). O nível de significância foi estabelecido em $p<0,05$. A comparação entre os grupos foi

feita através do teste T de *Student* ou por análise de variância (ANOVA) uma e duas vias com medidas repetidas ou completamente randomizada, dependendo da ocasião e do número de situações ou grupos e vias a comparar. Quando identificadas diferenças significantes, foi aplicado o teste *post-hoc* de Bonferroni para localizar as diferenças. Toda a análise e construção gráfica foi realizada por meio do software *GraphPad Prism 6.0*

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 ALTO SÓDIO NÃO ALTERA A VIABILIDADE DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES

Realizamos a coloração das células com azul de Tripan (*Trypan Blue*), para avaliar se a concentração de sódio de 160mM causaria morte celular. Como demonstrado na Figura 7, não houve mortalidade celular quando as células musculares lisas foram expostas ao alto sódio (AS), por 24, 48 e 72 horas (CT, 100±0,4%; AS, 100±0,6%).

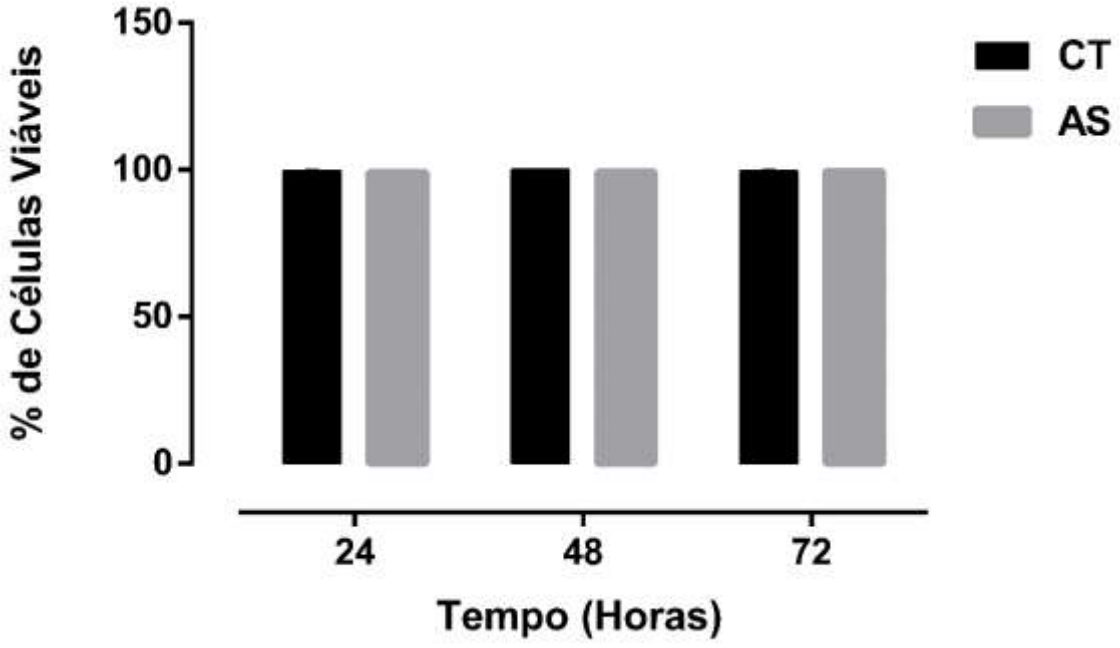

Figura 7: Mortalidade Celular. Contagem de células marcadas com azul de Tripan em hemocitômetro.Não houve mortalidade celular no grupo exposto ao alto sódio. ANOVA 2 vias, n= 4.

Apesar de não observarmos mortalidade celular em células expostas ao AS, decidimos realizar uma avaliação mais específica acerca da viabilidade dessas células. Para tanto, realizamos a marcação das células com Anexina V e Iodeto de propídio, uma técnica muito utilizada para detecção de apoptose e necrose celular. Células em apoptose, externalizam a proteína de membrana fosfatidilserina, possibilitando a ligação de Anexina V à fosfatidilserina. Já as células em necrose, por não terem a membrana celular íntegra, são permeáveis ao iodeto de propídeo, que se ligar ao DNA celular. A exposição ao alto sódio por 24 horas não alterou a viabilidade celular (Figura 8A, CT, 88.9±0.7; AS, 88.8±0.5), não desencadeou apoptose precoce (Figura 8B, CT, 4.38±0.3; AS, 4.23±0.3), apoptose tardia (Figura 8C, CT, 4.73±0.5; AS, 5.15±0.3) e não promoveu necrose nas CMLVs (Figura 8D, CT, 1.90±0.2; AS, 1.77±0.2).

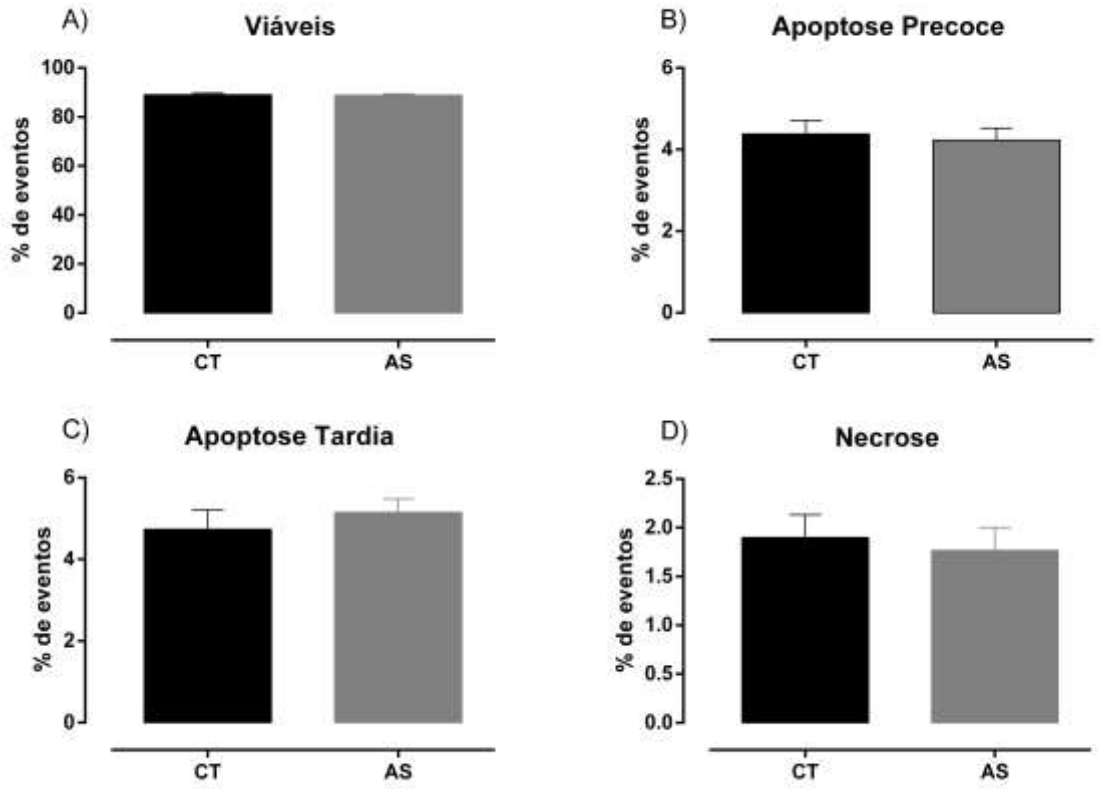

Figura 8: Viabilidade Celular: apoptose e necrose. A) Células Viáveis; B) Células em apoptose precoce; C) Células em apoptose Tardia; D) Células em necrose. Não foi observado apoptose ou necrose em CMLVs incubadas com alto sódio por 24 horas. Teste T,n=5.

5.2 ALTO SÓDIO REDUZ A MIGRAÇÃO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES

Nosso próximo passo, foi realizar a avaliação da migração celular, uma característica fenotípica da célula muscular lisa. Para tanto, utilizamos o método de *Would-Healing,* no qual avaliamos a migração com incubação aguda ao alto sódio e também com pré-incubação por 24 horas ao alto sódio. Com o objetivo de visualizar de forma precoce alterações na migração, inicialmente, a migração celular foi analisada a cada duas horas, durante 10 horas. Na figura 9A, que mostra a migração de CMLVs após a incubação aguda, ou seja, quando a concentração de sódio foi alterada no início do protocolo experimental, observamos que nos tempos de 8 e 10 horas após o início do experimento houve uma redução de migração celular de 30% (CT, 100±32%; AS, 70±19%). Entretanto, a pré-incubação ao alto sódio, ou seja,

quando a concentração de sódio foi alterada junto ao *starving*, foi capaz de promover uma redução maior, em torno de 40%, podendo ser observada já no tempo de 6 horas após o início do experimento, se mantendo nos tempos de 8 e 10 horas (CT, 100±14%; AS, 58±11%) (Figura 9B).

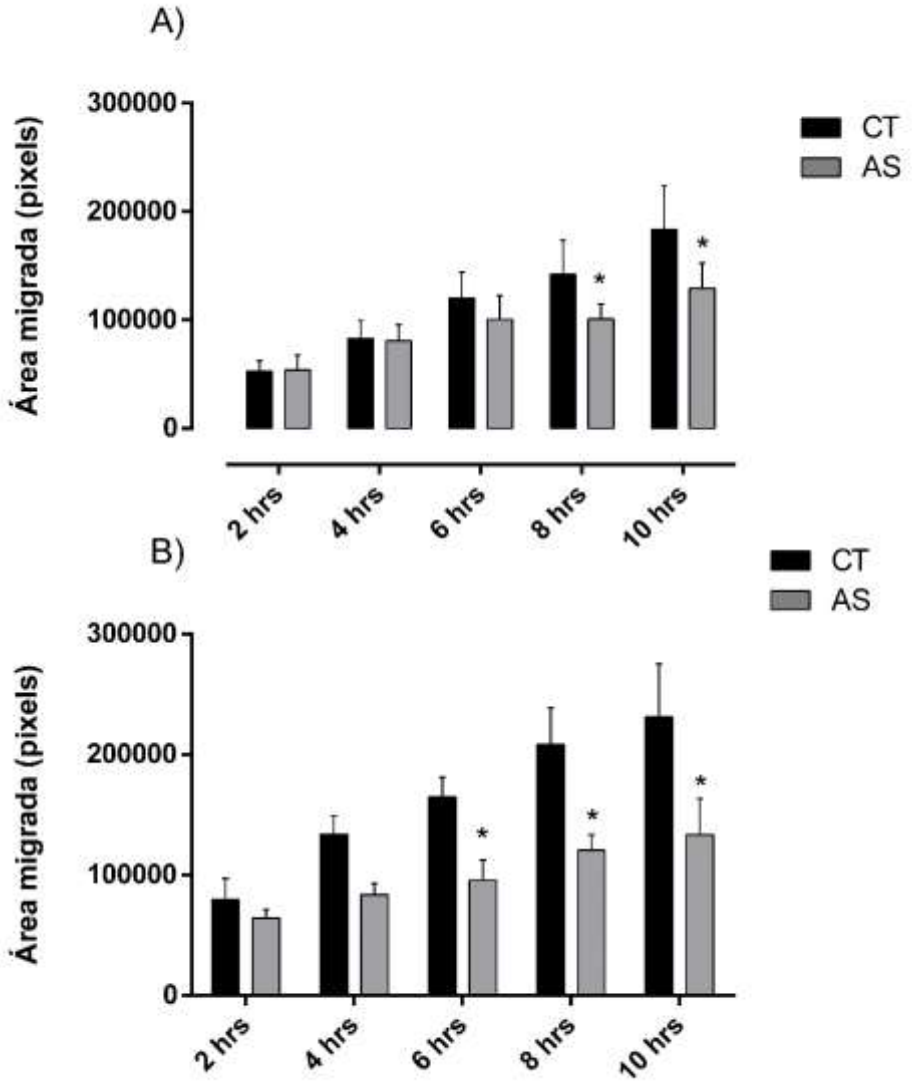

Figura 9: Migração Celular. **A) Exposição Aguda ao Alto sódio.** A exposição aguda ao alto sódio foi capaz de reduzir de forma significativa a migração de CMLVs em relação ao Controle a partir de 8 horas do início da exposição. **B) Migração Celular com pré-incubação de 24 horas.** O alto sódio foi capaz de reduzir de forma significativa a migração de CMLVs em relação ao Controle a partir de 6 horas do início do experimento. ANOVA 2 vias medidas repetidas, *p<0,05, n= 5.

Nós observamos que a alta concentração de sódio no meio de cultura foi capaz de reduzir a migração de células musculares lisas em ambos as formas de incubação,

sendo mais evidente quando realizada a pré-incubação ao sódio. Desta forma, optamos por esta condição para prosseguir o projeto e estudar as possíveis vias que poderiam estar envolvidas nesta redução da migração em células na condição de pré-incubação ao alto sódio.

5.3 O AUMENTO DA OSMOLARIDADE E O DO ÍON CLORETO (CL-) NÃO ALTERAM A MIGRAÇÃO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES

O aumento da concentração do sódio no meio de cultura celular, é realizado através da adição de NaCl (1M) até a concentração desejada. Porém, ao realizarmos essa alteração, aumentamos a pressão osmótica bem como a concentração de cloreto do meio. Para excluir a participação do aumento da pressão osmótica, utilizamos *Mannitol* (1M) como controle osmótico, um composto quimicamente inerte e não tóxico. A quantidade de manitol adicionada ao meio de cultura foi igual a quantidade de NaCl adicionada ao meio. A osmolaridade do meio não foi medida. Para avaliar a participação do cloreto, utilizamos o cloreto de colina (1M) na concentração para atingir a quantidade de Cl^- equivalente ao do NaCl a 160 mM. Neste experimento foi avaliado o efeito do aumento da osmolaridade *per se* na migração de CMLVs. Como observado na figura 10, o aumento da osmolaridade ou do íon cloreto isoladamente não alteraram a migração de CMLVs. Este resultado demonstra que a alteração fenotípica observada na migração foi promovida pelo sódio.

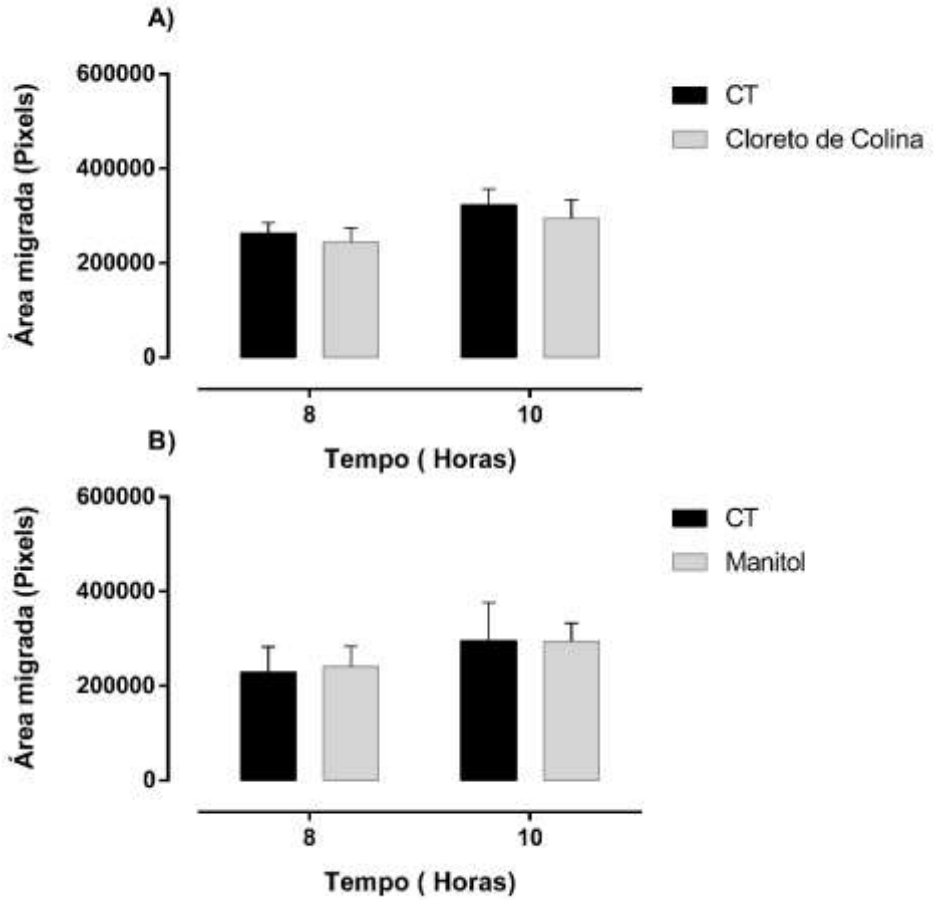

Figura 10: Avaliação da Participação do aumento da osmolaridade e do íon Cloreto (Cl^-) na migração celular. **A) Cloreto de Colina.** O uso de cloreto de colina não alterou a migração de CMLVs. **B) Manitol.** O aumento da osmolaridade por Manitol, não alterou a migração de CMLVs. ANOVA 2 vias medidas repetidas, n= 5.

5.4 O BLOQUEIO DO RECEPTOR AT1 E DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA RESTAURAM A REDUÇÃO DE MIGRAÇÃO EM CMLVs EXPOSTAS AO ALTO SÓDIO

Após comprovarmos a participação do sódio na redução de migração, nós avaliamos as possíveis vias que poderiam estar envolvidas. Nós avaliamos a participação do receptor AT1, através do uso de seu bloqueador, Candesartan (10^{-6}M). Como podemos observar na Figura 11, o uso do Candesartan preveniu a redução da migração em células expostas ao alto sódio (CT, 100±6%; AS, 70±11%; AS + Candesartan, 101±10%). Este resultado sugere que existe a participação do sistema renina angiotensina, no processo de redução da migração causada pelo alto sódio.

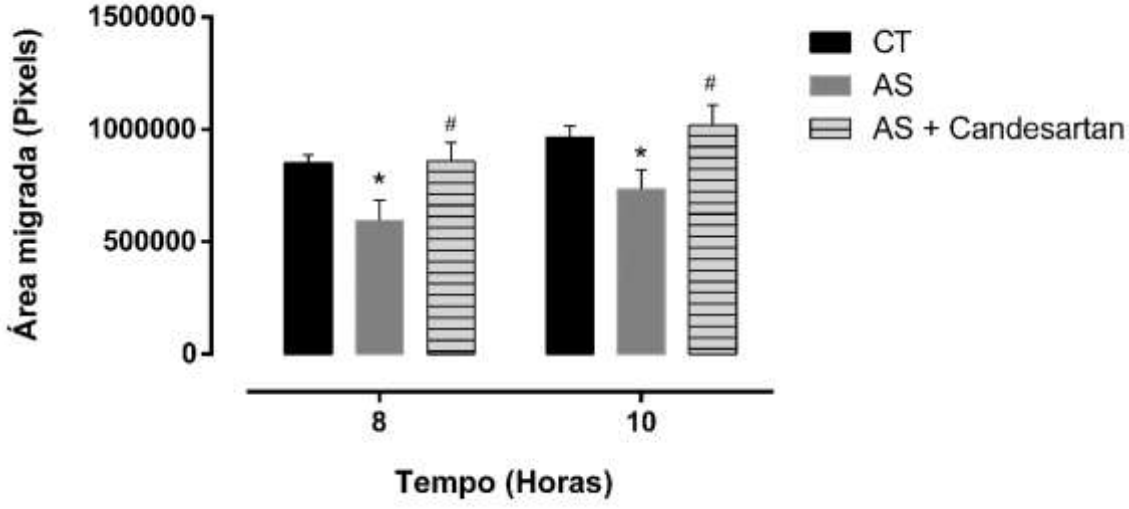

Figura 11: Bloqueio do receptor AT1 com Candesartan (10^{-6}M) na migração.O bloqueio do receptor AT1 foi eficaz em recuperar a diminuição de migração induzida pelo alto sódio em relação ao controle. ANOVA 2 vias medidas repetidas. *#p<0,05, * comparado com o Controle; # Comparado com a condição – AS. n= 5.

Sabemos que o agonista do receptor AT1 é a Angiotensina II, sendo assim, realizamos a avaliação do efeito direto de Ang II sobre a migração de CMLVs. Observamos que a incubação com Ang II também foi capaz de reduzir a migração, tendo um efeito semelhante ao provocado pelo AS (CT, 100±5%; AS, 78±6%; Ang II,72±6%) (Figura 12-A). Estes dados corroboram para a hipótese de ocorre a ativação do receptor AT1 pela condição de alto sódio para que o ocorra a redução de migração celular.

Para que Ang II seja formada, é necessário que a Ang I seja clivada em Ang II pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA). Desta forma, utilizamos Enalapril para avaliar a participação da ECA. Enalapril foi eficaz em prevenir a redução de migração de CMLVs expostas ao alto sódio (CT, 100±5%; AS, 78±6%; AS + Enalapril,97±5%) (Figura 12-B).

Estes resultados demonstram a redução da migração de CMLVs pelo AS é mediada pelo receptor AT1 e que o bloqueio da ECA também foi capaz de normalizar a migração. Além disso, a incubação das células com Ang II, igualmente foi capaz de reduzir a migração de CMLVs, corroborando ao efeito provocado pela exposição das células ao AS.

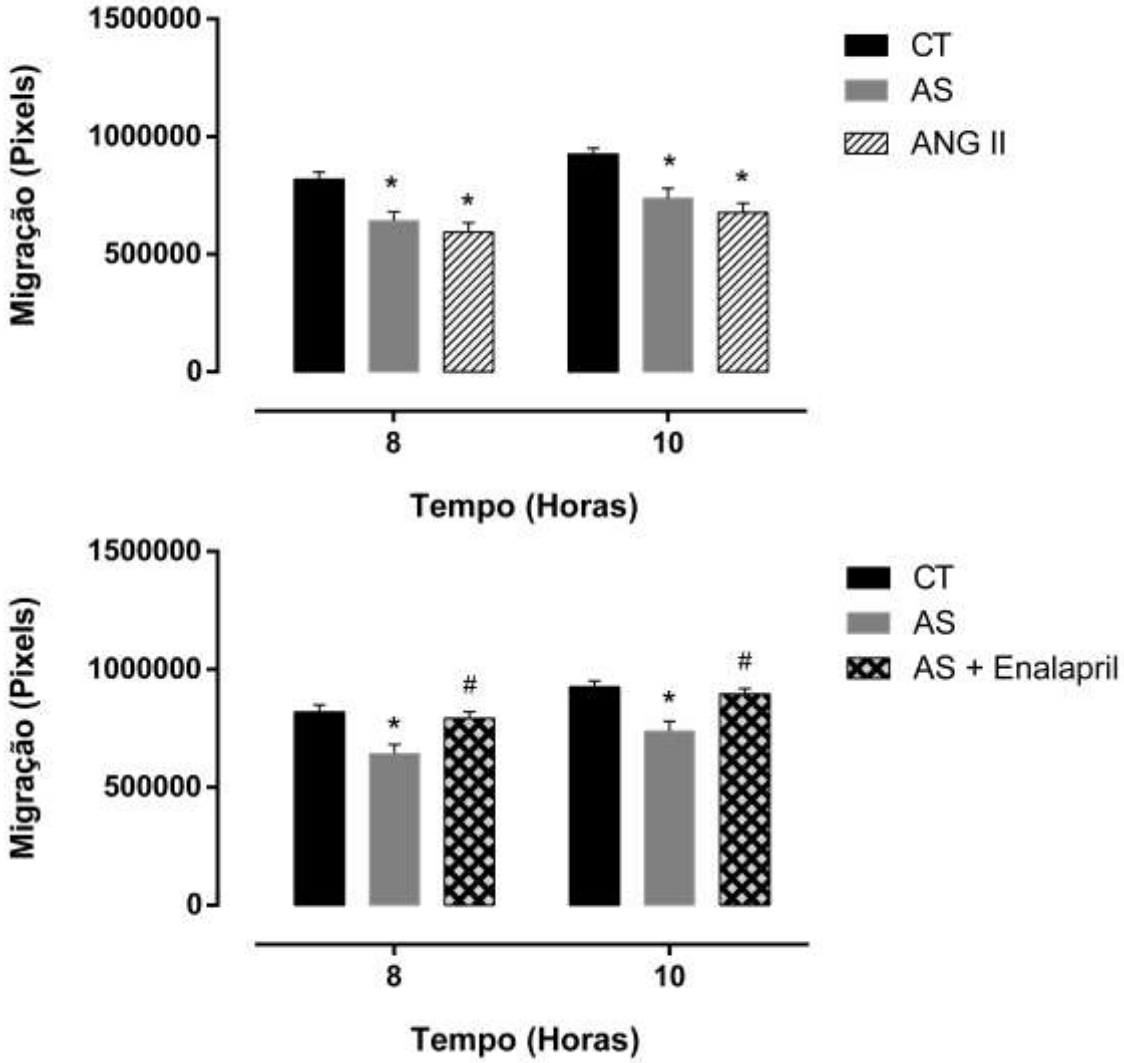

Figura 12: Migração celular: Avaliação da participação de Ang II e ECA. A) Angiotensina II (10^{-7} M): a incubação com Ang II, reduziu a migração de CMLVs. **B) Enalapril (5×10^{-5} M):** o inibidor da ECA normalizou a migração de CMLVs expostas ao AS. ANOVA 2 vias medidas repetidas. $^{*\#}p<0,05$, * comparado com o Controle; # Comparado com a condição – AS. n= 5.

5.5 O ESTRESSE OXIDATIVO NÃO PARTICIPA DA REDUÇÃO DE MIGRAÇÃO PROVOCADA PELO ALTO SÓDIO EM CMLVs

Após comprovarmos que a ativação do receptor AT1 está envolvida na redução de migração, decidimos avaliar as possíveis vias que podem estar sendo moduladas através deste receptor. Sabemos que a ativação do receptor AT1 é capaz de ativar

diretamente a NADPH oxidase, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Um desbalanço das EROs, pode modular as funções celulares de CMLVs (BROWN; GRIENDLING, 2015).

Nós avaliamos a participação das EROs de duas formas, através da pré-incubação com Tiron (100 x 10^{-6}M), antioxidante tipo varredor de EROs e através da pré-incubação com Apocinina, inibidor da NADPH oxidase. Porém, como demonstrado na Figura 13, o uso de Tiron (CT, 100±23%; AS, 74±20%; AS + Tiron, 72±18%) bem como o de Apocinina (CT, 100±28%; AS, 71± 25%; AS + Apocinina, 60±19%) não foi capaz de reverter a redução de migração das células expostas ao alto sódio. Estes resultados demonstram que a redução de migração das células expostas ao AS, não ocorre pelo aumento de produção de espécies reativas de oxigênio.

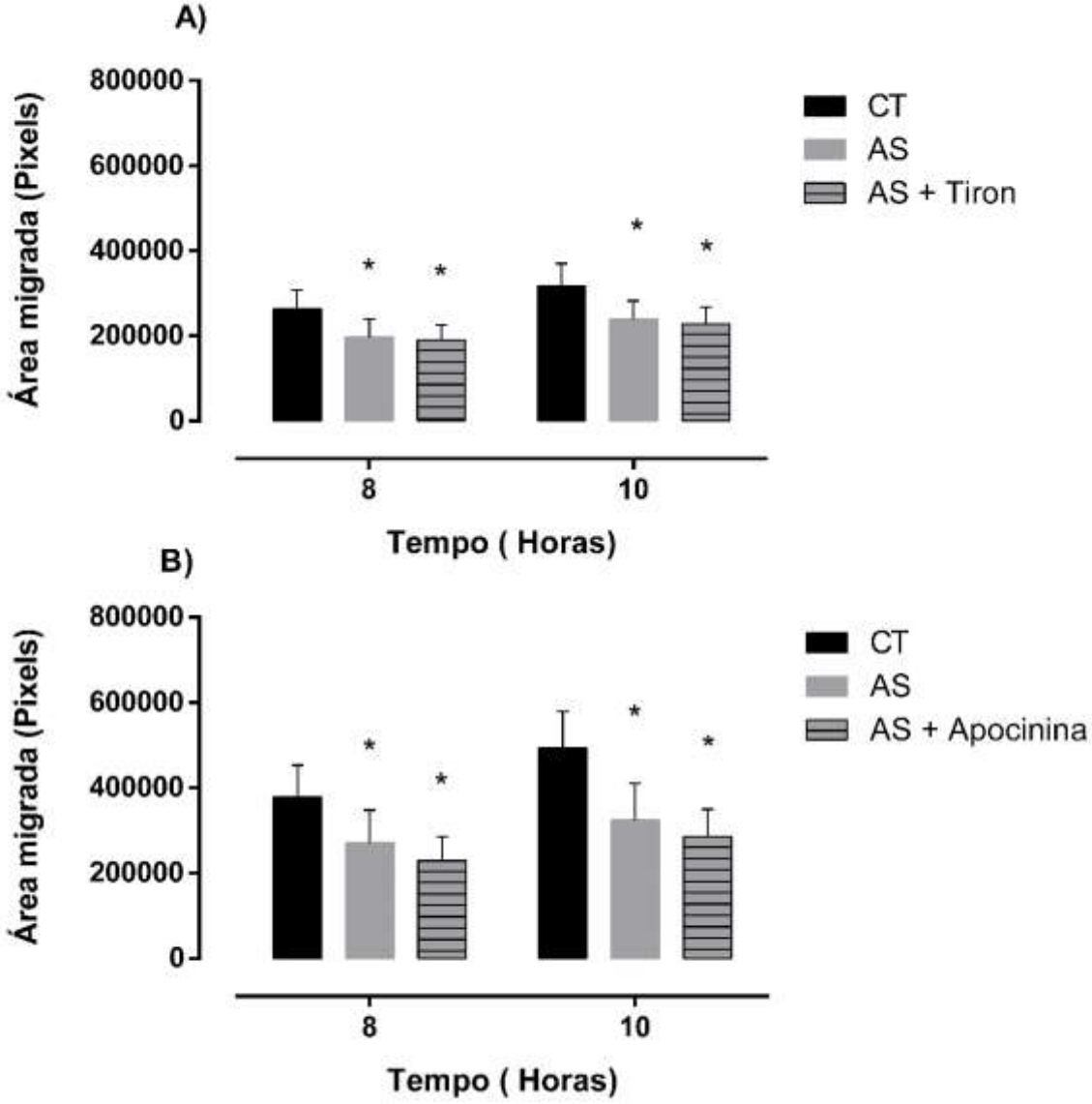

Figura 13: Migração celular: efeito das espécies reativas de oxigênio. A) Migração com varredor de EROS Tiron (100 x 10^{-6}M). Tiron, antioxidante tipo varredor, não foi eficaz em reverter a redução de migração induzida pelo alto sódio. **B) Migração com inibidor da NADPH Oxidase Apocinina (30 x 10^{-6}M).**Apocinina, inibidor da NADPH oxidase, não foi eficaz em reverter a redução de migração. ANOVA 2 vias medidas repetidas. *p<0,05, * comparado com o Controle, n= 6.

5.6 O BLOQUEIO DE COX-2 NORMALIZA A MIGRAÇÃO DE CMLVs EXPOSTAS AO ALTO SÓDIO

Além de modular o estresse oxidativo e a atividade da NADPH oxidase, o receptor AT1 pode modular outras vias, como a via inflamatória, através da estimulação da expressão de COX-2. Uma enzima fundamental na síntese de

prostanóides (HU et al., 2002). Para tal, nós avaliamos a participação da COX-2 através do uso do seu inibidor específico, NS398. Podemos observar na Figura 14, que o uso deste inibidor preveniu a redução de migração induzida pelo alto sódio (CT, 100±6%; AS, 70±11%; AS + NS398, 96±7%).

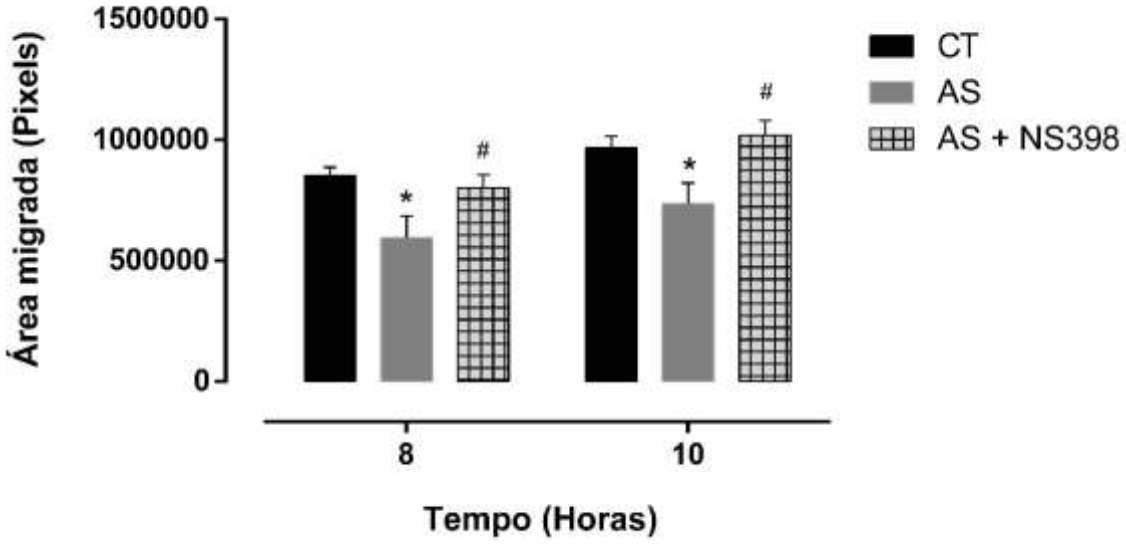

Figura 14: Migração com Inibidor específico da COX-2 NS398 ($10x10^{-6}$M). O bloqueio de Ciclooxigenase-2 foi eficaz em recuperar a diminuição de migração induzido pelo alto sódio em relação ao controle. ANOVA 2 vias medidas repetidas. *# p<0,05, *comparado com o Controle. # comparado com a condição – AS. n=5.

5.7 ALTO SÓDIO AUMENTA A EXPRESSÃO GÊNICA DE CICLOOXIGENASE 2

Após observarmos a participação do receptor AT1 e da COX-2 na redução de migração de CMLVs expostas ao alto sódio, decidimos avaliar a expressão gênica de COX-2 em células expostas ao AS. Foi realizada a exposição ao alto sódio por 4, 6 e 24 horas, com ou sem incubação do bloqueador do receptor AT1, Candesartan. Como demonstrado na Figura 15, o alto sódio é capaz de aumentar de forma significativa a expressão gênica de COX-2, de modo tempo-dependente, a partir de 6 horas de exposição ao AS. O bloqueio do receptor AT1 normalizou a expressão de COX-2. Nossos resultados demonstram que há uma modulação do receptor AT1 na expressão gênica de COX-2.

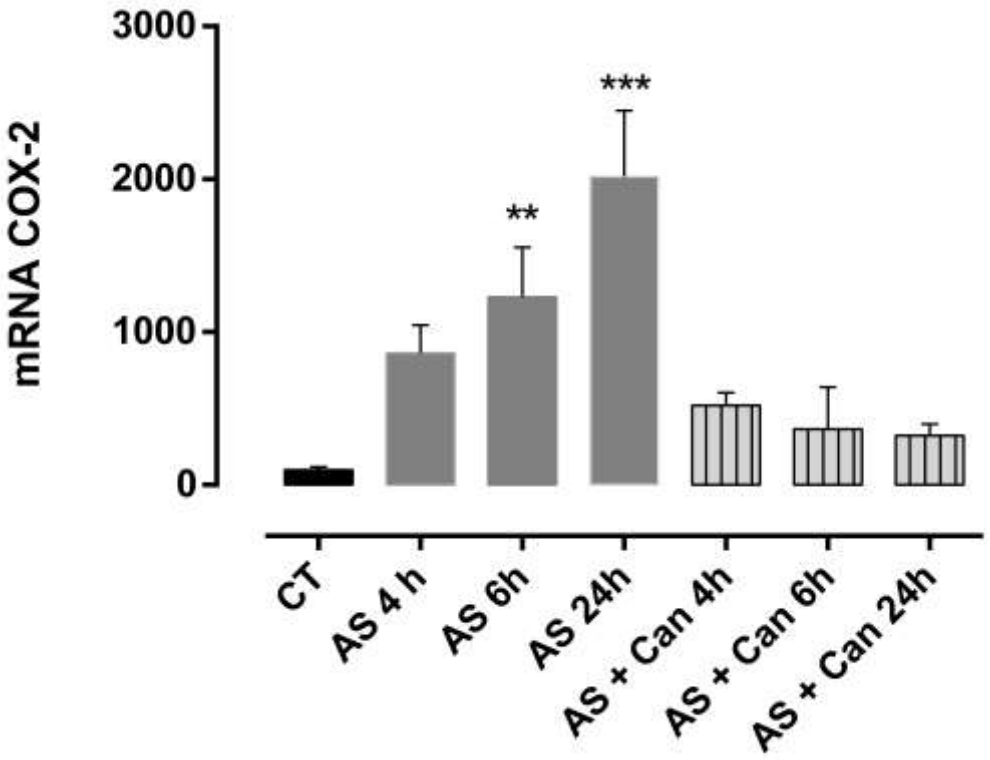

Figura 15: Expressão gênica de Ciclooxigenase 2 após incubação com alto sódio e após bloqueio do receptor AT1. O alto sódio aumentou a expressão gênica de COX-2 e o bloqueio do receptor AT1 com Candesartan normalizou este aumento. ANOVA 1 via. *p<0,05 comparado com o Controle. n=5.

5.7 O BLOQUEIO DA PROTEÍNA QUINASE ATIVADA POR MITÓGENO (MAPK) ERK 1/2 RESTAURA A REDUÇÃO DE MIGRAÇÃO EM CMLVs EXPOSTAS AO ALTO SÓDIO

Em CMLVs exposta ao AS, o bloqueio do receptor AT1 além de normalizar a migração, também normalizou a expressão gênica de COX-2. Diante disso, resolvemos analisar uma possível via de sinalização entre o receptor AT1 e a COX-2. Para tanto, realizamos o bloqueio de ERK1/2, uma importante proteína membro da família das MAPK, conhecida por participar de várias respostas celulares, atuando como segundo mensageiro intracelular. O receptor AT1 quando ativado, pode ativar a ERK 1/2, além de outras MAPK. Na Figura 16, podemos observar que o bloqueio de ERK1/2, através do seu inibidor U0126, normalizou a redução de migração em CMLVs expostas ao AS (CT, 100±6%; AS, 78±6%; AS + U0126, 99±5%).

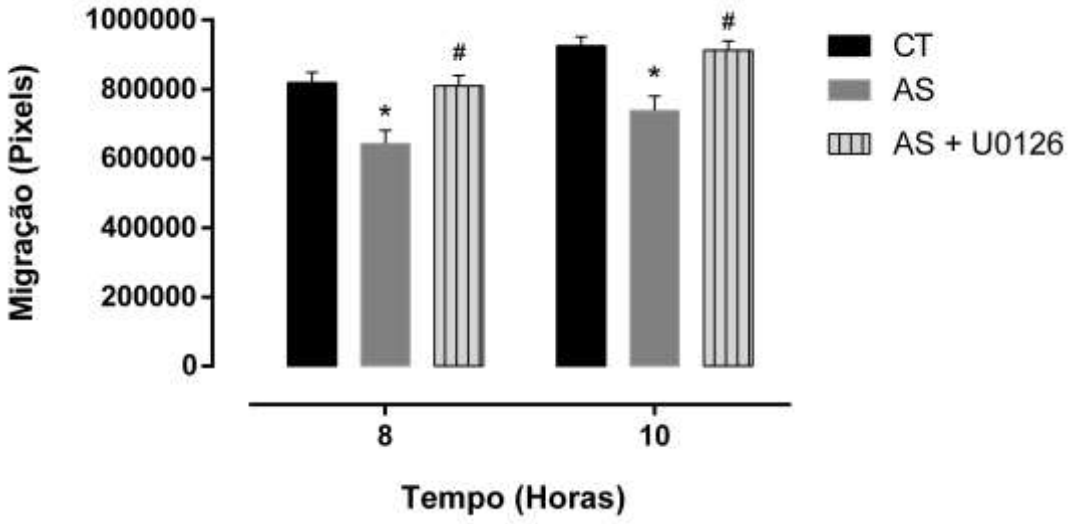

Figura 16: Migração com inibidor de ERK 1/2 U0126 (10^{-6}M). O bloqueio de ERK 1/2 foi eficaz em normalizar a diminuição de migração induzida pelo alto sódio em relação ao controle. ANOVA 2 vias medidas repetidas. *# p<0,05, *comparado com o Controle. # comparado com a condição – AS. n=5.

5.8 ALTO SÓDIO AUMENTA A FOSFORILAÇÃO DE ERK 1/2 EM CMLVs

Após comprovarmos que ERK 1/2 está envolvida na redução da migração, nós avaliamos através da técnica de Western Blot se a exposição das células ao AS foi capaz de aumentar a fosforilação de ERK1/2, sua forma ativa. Na Figura 17, podemos observar que houve um aumento de ERK1/2 fosforilada em células expostas ao AS a partir de 10 minutos de exposição ao AS. Aos 60 minutos de exposição ao AS a fosforilação diminuiu, não sendo mais estatisticamente significante.

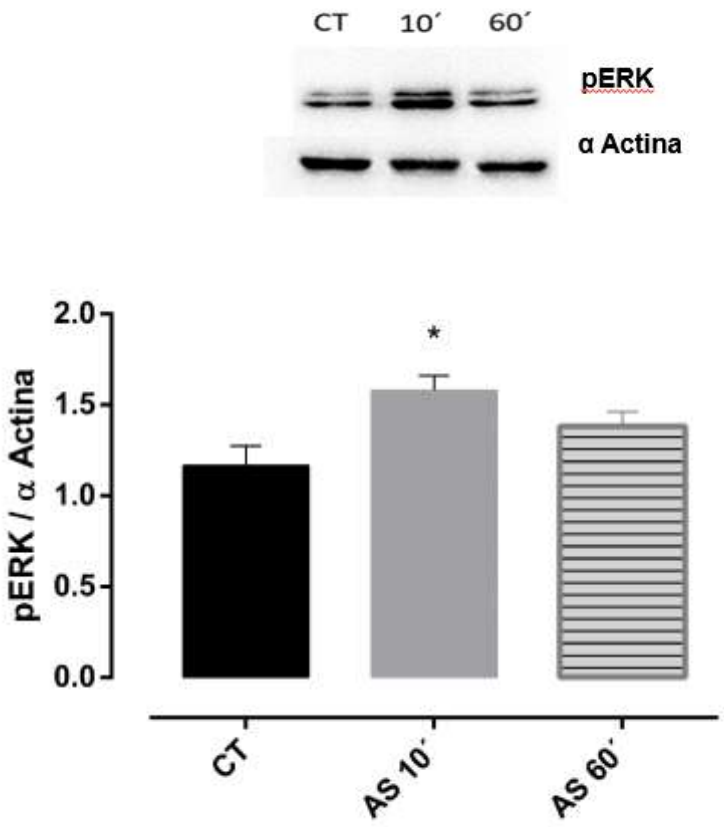

Figura 17: Expressão proteica de ERK 1/2 fosforilada. O alto sódio foi capaz de aumentar a fosforilação de ERK 1/2 no tempo de 10 minutos de exposição. ANOVA 1 via. *p<0,05, *comparado com o Controle. n=5.

Para avaliar se o receptor AT1 modula o aumento da fosforilação de ERK 1/2 no grupo alto sódio, realizamos o bloqueio do receptor com Candesartan. Como demonstrado na Figura 18, Candesartan normalizou a fosforilação de ERK 1/2.

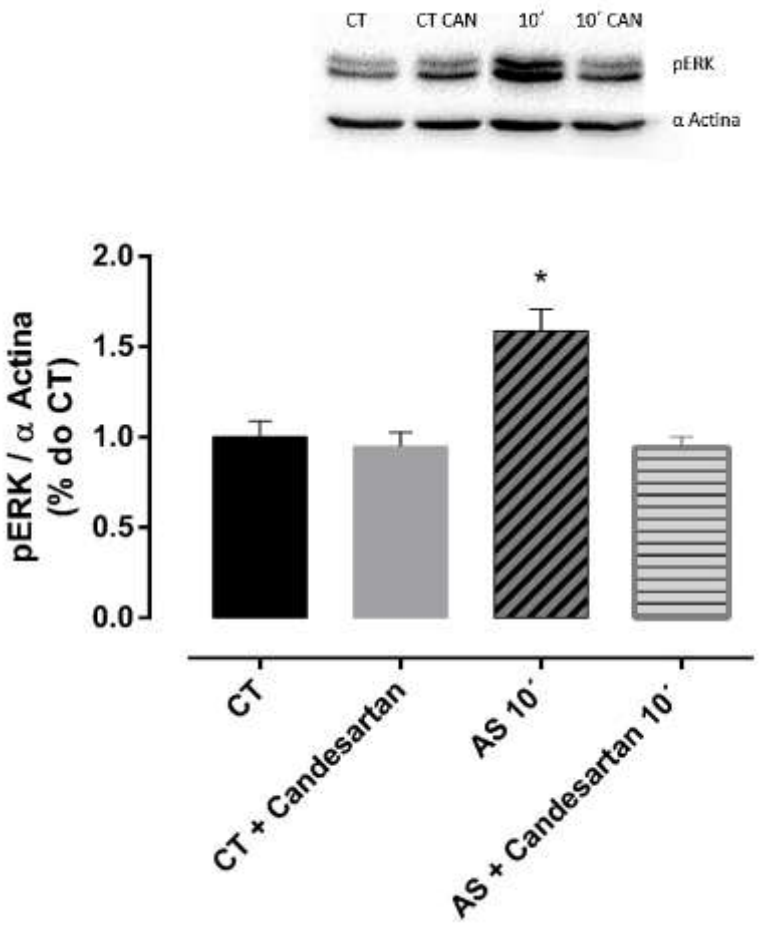

Figura 18: Expressão proteica de ERK 1/2 fosforilada com o bloqueio de AT1. O alto sódio foi capaz de aumentar a fosforilação de ERK 1/2 no tempo de 10 minutos de exposição e o uso de Candesartan normalizou a fosforilação de ERK 1/2. ANOVA 1 via. *p<0,05 comparado com o Controle. n=5.

5.9 O BLOQUEIO DE ERK 1/2 NORMALIZA A EXPRESSÃO GÊNICA DE COX-2 EM CMLVs EXPOSTAS AO ALTO SÓDIO

Após comprovarmos que ERK 1/2 está mais fosforilada em células expostas ao AS via receptor AT1, estando envolvida na redução da migração, nós avaliamos se o bloqueio de ERK1/2, seria capaz de normalizar a expressão gênica de COX-2 através da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real. O bloqueio de ERK 1/2 com U0126 reverteu o aumento da expressão gênica promovido pelo AS (Figura 19). Os dados apresentados até o momento demonstram a participação do receptor AT1 na redução da migração bem como aumento da expressão gênica de COX-2 através de fosforilação de ERK1/2.

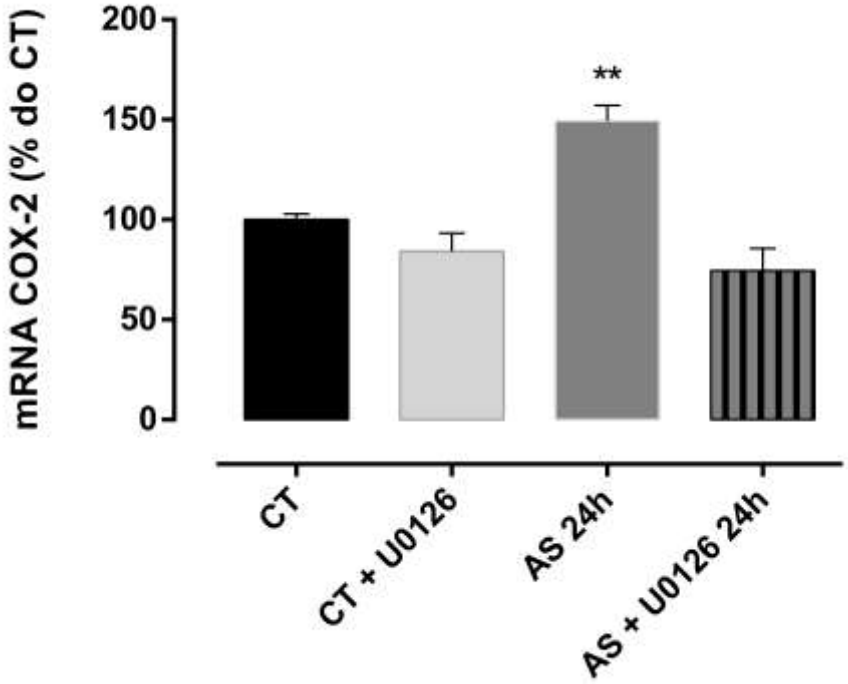

Figura 19: Expressão gênica de COX-2 com o bloqueio de ERK 1/2. O alto sódio aumentou a expressão gênica de COX-2 após 24 horas de exposição. O bloqueio de ERK 1/2 normalizou a expressão gênica de COX-2. ANOVA 1 via. **p<0,01, *comparado com o Controle. n=5.

5.10 O RECEPTOR TROMBOXANO (TP) PARTICIPA DA REDUÇÃO DE MIGRAÇÃO PROMOVIDA PELO ALTO SÓDIO EM CMLVs

Para avaliar a via *downstream* da COX-2, realizamos migrações com os bloqueadores dos receptores de Prostaciclina (IP) e Tromboxano (TP). O bloqueio do receptor IP, não alterou a redução de migração observadas em CMLVs expostas ao AS (CT, 100±6%; AS, 70±11%; AS + CAY10441, 71±5%) (Figura 20-A). Porém o bloqueio do receptor TP reverteu a redução da migração em células expostas ao AS (CT, 100±6%; AS, 70±11%; AS + SQ29548, 94±10%) (Figura 20-B).

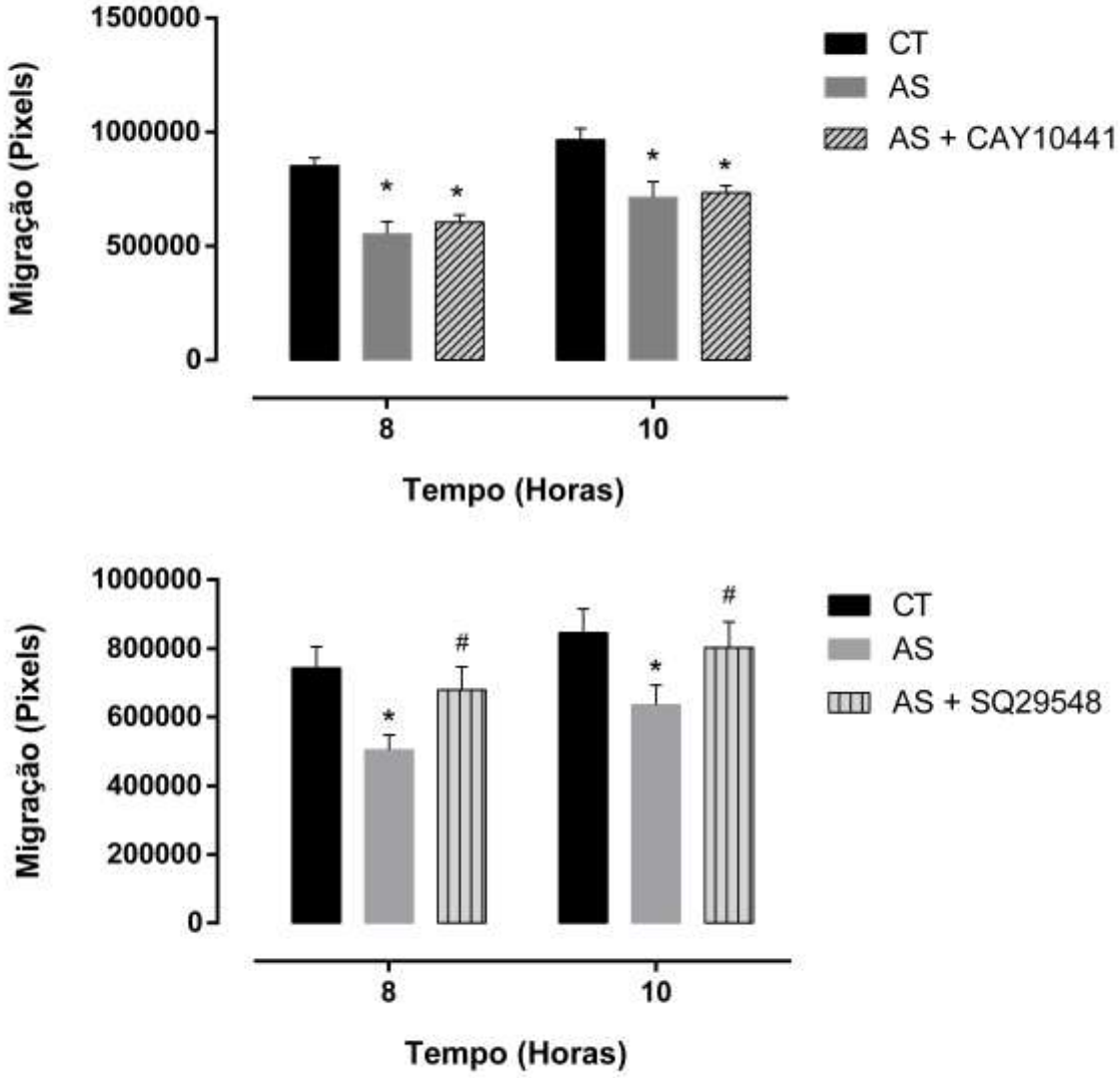

Figura 20: Migração com bloqueadores dos receptores de prostanóides. A) Migração com bloqueador do receptor de prostaciclina (IP). CAY10441, antagonista do receptor de prostaciclina (IP) não reverteu a redução provocada pelo alto sódio. **B) Migração com bloqueador do receptor de tromboxano (TP).** SQ295489, antagonista do receptor de tromboxano, normalizou a migração de células expostas ao AS. ANOVA 2 vias medidas repetidas. *#p<0,05, *comparado com o Controle. # comparado com a condição – AS. n=6.

Nós também avaliamos, de forma indireta, a participação do receptor de Tromboxano, através do uso do seu agonista U46619. Quando adicionamos o agonista ao meio de cultura, observamos uma redução de migração, sendo este um resultado semelhante ao observado em células expostas ao alto sódio (CT, 100±6%; AS, 78±6%; U46619, 80±6%) (Figura 21).

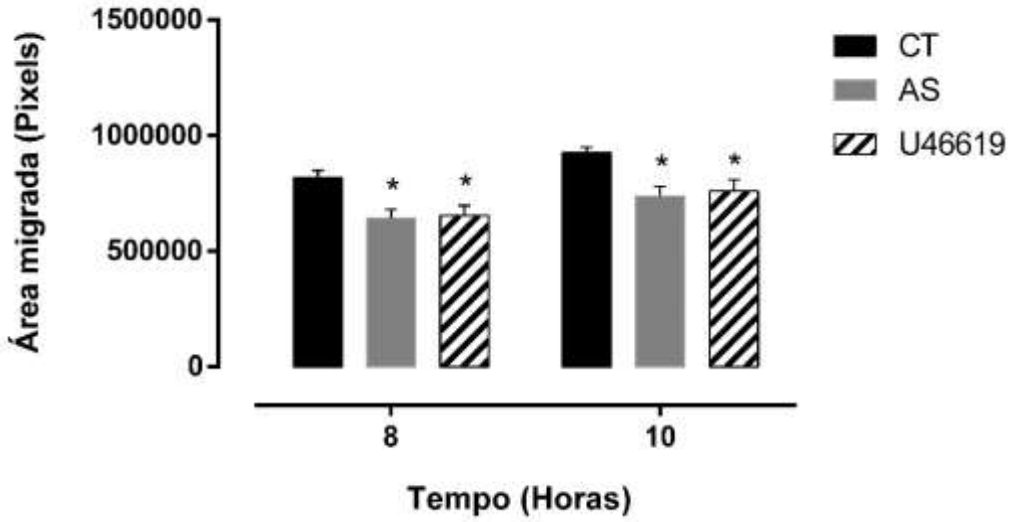

Figura 21: Migração com U46619 (10^{-7}M). O uso do agonista do receptor de tromboxano também reduziu a migração de CMLVs, tendo um efeito semelhante ao grupo alto sódio. ANOVA 2 vias medidas repetidas. *p<0,05 comparado com o Controle. n= 5.

Discussão

6. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que, a exposição ao AS reduziu a migração de CMLVs sem alterar a viabilidade celular. Ao estudarmos as vias de sinalização envolvidas observamos que o SRA local participa na redução da migração celular através da ativação do receptor AT1 e ECA. Além disto, demonstramos que o AS através do receptor AT1 levou a ativação da via inflamatória, pelo aumento da expressão de COX-2, propiciando a redução na migração celular. Foi observado também que a ativação do receptor AT1 desencadeou a fosforilação de ERK 1/2 que consequentemente foi responsável pelo aumento da expressão gênica da COX-2. Ao avaliarmos a via *downstream* da COX-2 evidenciamos que o bloqueio do receptor de tromboxano, e não o de prostaciclina, normalizou a migração de CMLVs expostas ao AS.

A migração celular é um processo fisiológico fundamental para a formação dos vasos sanguíneos, estando envolvida em processos como a vasculogênese e angiogênese, em ambos os processos há a participação de CMLVs (DORMANN; WEIJER, 2003). Além disso, a migração de CMLVs também pode estar envolvida em processos patológicos. No sistema cardiovascular, doenças como a HA, diabetes e dislipidemias podem provocar a lesão vascular. Nestes casos, a migração de CMLVs contribuem para o reparo do vaso sanguíneo pós injúria (WILLIS et al., 2004).

Apesar da importância do processo de migração celular, até o presente momento, nenhum estudo havia demonstrado os efeitos do alto sódio sobre a migração de CMLVs. No presente estudo foi observado que o aumento da concentração de sódio reduziu a migração de CMLVs. Müller e colaboradores, utilizando linhagem de macrófagos, observaram que uma elevada concentração de sódio, cerca de 195 mM, foi capaz de aumentar a migração e a quimiotaxia dos macrófagos (MÜLLER et al., 2013). Além disso, Amara e colaboradores evidenciaram um aumento da migração de células endoteliais após 24 horas de exposição ao AS (200 mM) (AMARA; ALOTAIBI; TIRIVEEDHI, 2016).

Alguns estudos, em CMLVs, demonstraram os efeitos do alto sódio sobre a proliferação destas células, mas não sobre a migração, porém com resultados contraditórios. Gu e colaboradores, demonstraram que CMLVs expostas a altas concentrações de sódio, 160 e 180 mM, apresentem redução de proliferação (GU et

al., 1998). Entretanto, Wu e colaboradores, demonstraram aumento de proliferação de CMLVs após a adição de sódio (180 mM) ao meio de cultura (WU et al., 2016).

Ao avaliamos as possíveis vias moleculares que poderiam estar envolvidas na redução de migração de CMLVs expostas ao AS observamos de forma intrigante que o bloqueio do receptor AT1, através do uso de seu antagonista Candesartan, normalizou a migração de CMLVs expostas ao AS. Também observamos que a pré-incubação com Enalapril, bloqueador da ECA, normalizou a migração das células expostas ao AS. Como o produto da ação da ECA é a Ang II, sendo a Ang II o agonista de AT1, avaliamos a participação da Ang II na migração sem alterar a concentração do sódio no meio. Observamos então que Ang II (10^{-7} M) também diminuiu a migração das CMLVs. A literatura mostra resultados contraditórios em relação ao efeito da Ang II sobre a migração. Alguns estudos demonstraram que a ativação do receptor AT1 leva a um aumento de migração em CMLVs (BLASCHKE et al., 2002; OHTSU et al., 2006; XI et al., 1999). Entretanto, Liu e colaboradores, constataram efeito dose dependente de Ang II (10^{-12} a 10^{-6}) sobre o fenótipo migratório de CMLVs. Foi demonstrado que nas doses de 10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8}M ocorreu um aumento significante de migração, entretanto, a incubação com doses maiores de 10^{-7} M e 10^{-6}M levou a uma redução da migração (LIU et al., 1997).

Resultados semelhantes foram observados em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), através do ensaio de *Boyden Chamber*, onde doses crescentes de Ang II, 10^{-9} M, 10^{-7} M e 10^{-6} M levaram a redução de migração de forma dose dependente, e o bloqueio do receptor AT1 normalizou a migração dessas células. Um possível mecanismo discutido foi o aumento de estresse oxidativo e diminuição da produção de óxido nítrico (DESIDERI, 2003).

Além disso, sabemos que CMLVs podem sintetizar todos os componentes do SRA. Conhecido como SRA tecidual ou local, este pode agir de forma distinta ao SRA sistêmico e uma vez ativado, o SRA local pode desempenhar um papel autócrino, parácrino e intrácrino (DE MELLO, 2017). Infelizmente, em nosso estudo não conseguimos dosar a Ang II e desta forma não podemos afirmar que um aumento de Ang II estaria ativando o receptor AT1. Entretanto, nossos resultados demonstram uma modulação do SRA local em CMLVs expostas ao AS via receptor AT1 e da ECA visto que o bloqueio de ambos foi capaz de normalizar a migração de CMLVs expostas ao AS.

A ativação do receptor AT1 pode estimular uma cascata de sinalização intracelular sendo que uma das possíveis vias a serem ativadas é a produção de EROs. São fontes produtoras de EROS: Xantina Oxidase, mitocôndria e NADPH oxidade, podendo esta ser diretamente estimulada pelo receptor AT1. A produção excessiva de EROS, pode alterar a migração, proliferação e levar a hipertrofia da CMLVs (TOUYZ; SCHIFFRIN, 2000). Diante do exposto, avaliamos a participação do estresse oxidativo através do uso de Tiron, um varredor de EROS e também pelo bloqueio da NADPH oxidase através do uso de Apocinina. Porém o uso destes fármacos não reverteu a redução na migração das CMLVs expostas ao AS. Apesar da literatura relatar uma relação entre o aumento do sódio e o estresse oxidativo, tanto em humanos (GREANEY et al., 2012), como em modelos animais (ZHU; HUANG; LOMBARD, 2007) e da ativação do receptor AT1 poder ativar diretamente a NADPH oxidase e aumentar a produção de EROS (GRIENDLING et al., 1994), estudos em cultura de CMLVs, com concentrações semelhantes àquelas utilizadas no presente estudo, tampouco demonstraram uma relação do alto sódio e estresse oxidativo (GU et al., 1998; WU et al., 2016)

Além de estimular diretamente a produção de EROS via NADPH oxidase, a ativação do receptor AT1 pode modular outras vias, como ativação de MAPK e ciclooxigenases. O receptor AT1 pode estimular diretamente a atividade de fosfolipase A2 (PLA2), sendo esta responsável pela biodisponibilidade celular de ácido araquidônico (AA), que uma vez liberado, será processado pelas ciclooxigenases. Além disso, estudos demonstram que o receptor AT1 modula diretamente a expressão de COX-2 (induzível) e não de COX-1 (constitutiva). A COX-2, desempenha um papel fundamental na produção de prostanóides vasodilatadores e vasoconstritores no vaso sanguíneo. Além disso, os prostanóides modulam processos celulares como hipertrofia, hiperplasia, migração e apoptose (OHNAKA et al., 2000).

Nós avaliamos a participação da COX-2 na redução de migração induzida pelo AS. O bloqueio da COX-2 através do seu bloqueador específico, NS398, foi capaz de normalizar a migração das células expostas ao AS e por RT-PCR observamos um aumento da expressão gênica de COX-2 em CMLVs a partir de 6 horas até o ponto avaliado de 24 horas após exposição ao AS. Uma vez que observamos a participação do receptor AT1, sabendo que o mesmo modula a expressão de COX-2, avaliamos a expressão gênica de COX-2 nesta condição. O bloqueio do receptor AT1 normalizou

a expressão de COX-2 a partir de 6 horas, sugerindo assim uma modulação direta deste receptor sobre a COX-2.

Estes achados corroboram com dados da literatura, onde vários autores demonstram a relação direta do receptor AT1 e da expressão/ participação da COX-2 (ALVAREZ et al., 2007b). Além disso, estudos *in vivo*, utilizando modelo animal, demonstram uma relação entre uma dieta de alto sódio e o aumento da expressão de COX-2 tanto no vaso sanguíneo como nos rins (MATROUGUI et al., 2001; YANG et al., 1998). Até o momento, nenhum estudo foi publicado demonstrando a relação entre o aumento da concentração do sódio no meio de cultura e aumento da expressão de COX-2. Porém alguns estudos em cultura de CMLVs, demonstram que o receptor AT1 consegue modular a expressão de COX-2 (HU et al., 2002; MORINELLI; WALKER; ULLIAN, 2008), o que corroboram com os nossos achados.

Apesar de nossos resultados terem mostrado uma relação entre AT1 e COX2, sabemos que existem proteínas intracelulares que participam dessa relação entre o receptor e a modulação gênica de outra proteína, sendo conhecido como segundo mensageiro. Uma família de proteínas, as MAPKs, são conhecidas na literatura por atuar mediando as respostas celulares pós-ativação de um receptor, como por exemplo o receptor AT1. Uma integrante das MAPKs é a ERK1/2, descrita extensivamente na literatura por mediar efeitos celulares como síntese proteica, hipertrofia, regulação de citoesqueleto e migração (KAWAI et al., 2017; MEHTA; GRIENDLING, 2007). Desta forma, ao avaliarmos uma possível via de sinalização celular entre o receptor AT1 e COX-2, através do bloqueio de ERK1/2 foi observada a normalização da migração de CMLVs expostas ao AS. Em seguida, constatamos o aumento significativo da forma ativa fosforilada de ERK 1/2, já com 10 minutos de exposição ao AS, com uma tendência a se manter fosforilada após 60 minutos de exposição ao AS. Adicionalmente, o bloqueio do receptor AT1 preveniu a fosforilação de ERK 1/2 em células expostas ao AS. Além disso, seguindo a sequência de via de sinalização, o bloqueio da ERK 1/2, não só normalizou a migração como normalizou a expressão gênica de COX-2.

A literatura já descreveu amplamente o papel fundamental de sinalização celular desempenhado pela família das MAPKs, especialmente por ERK 1/2, bem como a ativação dessas proteínas pelo receptor AT1 (HORIUCHI; IWANAMI; MOGI, 2012). Além disto, em CMLVs, a participação de ERK 1/2 modulando respostas

celulares foi relatada em um estudo onde o AS (aproximadamente 190 mM) aumentou a proliferação de CMLVs em cultura através da ativação das MAPKs, ERK 1/2 e JNK (WU et al., 2016).

Em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram, até o momento que, o AS reduz a migração de CMLVs via receptor AT1 levando ao aumento da expressão gênica de cicloocigenase 2. A via de sinalização intracelular entre o receptor AT1 e COX-2 se dá pela fosforilação de ERK1/2. Desta forma, sequencialmente foi avaliada a via *downstream* da COX-2.

Os prostanóides, são mediadores importantes na regulação das funções cardiovasculares. Em vasos sanguíneos saudáveis, a maioria dos prostanoides é formada pela isoforma constitutiva da ciclooxigenase (COX-1). No entanto, esses mediadores também podem ser sintetizados pela isoforma de ciclooxigenase induzível, COX-2, que em condições não patológicas normalmente não é expressa em células vasculares, mas pode ser induzida por alguns agentes e condições patológicas. Sendo assim, é descrito que a produção de prostanóide via COX-2 está envolvida também na modulação de respostas vasculares mediante situações patológicas (ADEAGBO et al., 2005; ALVAREZ et al., 2005a). Além disso, a ativação do receptor AT1 pelo seu ligante Ang II, é capaz de modular a expressão de COX-2 e modular a produção de prostanóides em CMLVs (HU et al., 2002; OHNAKA et al., 2000).

Dentre os produtos da ação da COX-2, vale destacar no vaso sanguíneo, especificamente em CMLVs, a Prostaciclina (PGI_2) e Tromboxano (TXA_2). Os efeitos vasodilatadores da PGI2 são opostos aos efeitos vasoconstritores deTXA_2 (WHEELER-JONES, 2008). Além disso, em CMLVs, a ligação de PGI_2 ao receptor de prostaciclina (IP) exerce efeitos protetores, inibindo a hipertrofia, migração, proliferação e formação de neoíntima (MILLER, 2006). Já o TXA_2 ao se ligar no receptor de tromboxano (TP), exerce em CMLVs efeitos antagônicos aos de PGI_2.

Diante do exposto, decidimos avaliar a via *downstream* da COX-2. Para tanto, realizamos o bloqueio dos receptores de PGI_2 (IP) e TXA_2 (TP), através dos seus antagonistas específicos. Curiosamente, observamos que somente o bloqueio do receptor de TXA_2 normalizou a migração de CMLVs expostas ao AS. Com o objetivo de provar a participação do receptor de TXA_2 de forma indireta, realizamos o experimento de migração na presença de seu agonista, U46619 (200 nM). Novamente

foi observada a redução de migração semelhante a provocada pelo AS, sugerindo assim a participação deste receptor. Infelizmente, um fator limitante deste trabalho foi a impossibilidade de dosar os níveis de TXA_2 no meio de cultura de CMLVs expostas ao AS.

Os efeitos por nós encontrados são opostos a maioria de dados descritos na literatura com relação a ação do TXA_2 sobre a migração celular. Como exemplo, Asthon e colaboradores demonstraram que em cultura primária de células endoteliais, o uso de dois miméticos de TXA_2, IBOP (100 nM) e U46619 (200 nM), foram capazes de reduzir a migração de células endoteliais pelo método de *Wound- Healing*. Além disso, ao avaliarem a formação de tubos, observaram que esta capacidade também estava reduzida em células endoteliais expostas ao TXA_2, por provável diminuição da comunicação célula-célula e célula matriz (ASHTON et al., 1999).

Por outro lado, Benndorf e colaboradores, avaliaram a participação do receptor de TXA_2 em células endoteliais em resposta a um estímulo angiogênico e migratório, o fator de crescimento derivado do endotélio, o VEGF. Os autores observaram que o mimético de TXA_2, U46619 (10^{-5} M) desempenhou um papel antagônico aos efeitos de VEGF, sendo capaz de inibir a migração e formação de tubos em células endoteliais induzidas pelo VEGF, bem como a angiogênese cardíaca induzida por VEGF *in vitro* e *in vivo* (BENNDORF et al., 2008). Além desses trabalhos acima citados, outros trabalhos demonstram os mesmos efeitos anti-angiogênicos do TXA_2 (ASHTON et al., 2004; GAO et al., 2000). Esses achados corroboram os aqui apresentados, uma vez que encontramos redução de migração e essa foi mediada pelo receptor de TXA_2.

Sumarizando os resultados apresentados demonstram pela primeira vez, que em cultura primária de CMLVs expostas ao AS ocorre a redução de migração via ativação do receptor AT1, com consequente aumento da expressão gênica de COX-2 através da fosforilação de ERK 1/2. Este aumento da expressão gênica de COX-2 parece levar ao aumento de TXA_2, visto que o bloqueio de seu receptor normalizou a redução de migração causada pelo AS.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que CMLVs expostas ao AS apresentam redução da migração, independente do aumento da osmolaridade ou do Cl^-. Esse efeito parece ser desencadeado pela ativação do receptor AT1 com consequente aumento da expressão gênica de COX-2 modulado pelo aumento da fosforilação de ERK 1/2. Devido a comprovação da participação da ECA sobre a redução da migração especulou-se um provável aumento de Ang II como responsável pela ativação de AT1. Além disso, o aumento de COX-2 pelo AS parece modular a redução de migração de CMLVs, através da ativação do receptor de tromboxano. Assim, os dados do presente trabalho levam a concluir que o AS afetaria a migração de CMLVs através de efeitos independentes dos fatores hemodinâmicos e modulação endotelial, podendo estes efeitos estarem associados à fisiopatologia de doenças cardiovasculares (Figura 22).

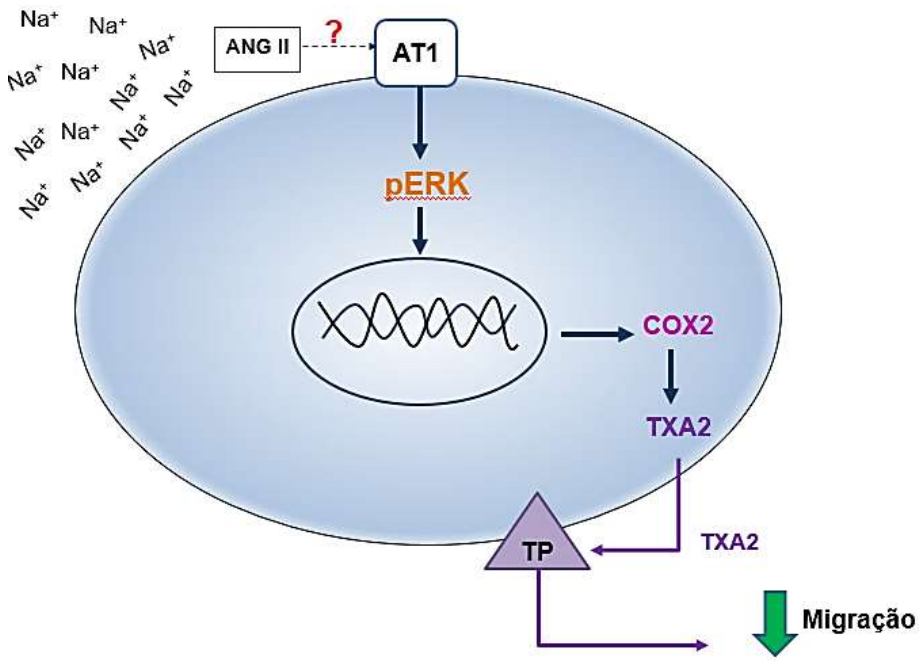

Figura 22: Diagrama esquemático dos mecanismos através dos quais o alto sódio diminui a migração de células musculares lisas vasculares. Na^+: sódio; ANG II: Angiotensina II; AT1: receptor AT1; pERK: ERK fosforilada; COX2: Ciclooxigenase 2; TXA2: tromboxano A_2; TP: receptor de tromboxano.

Referências

8. REFERÊNCIAS

(WHO), W. H. . (2013). World Health Day 2013. **A global brief on hypertension**, p. 9, 2013.

ADEAGBO, A. S. O. et al. Cyclo-oxygenase-2, endothelium and aortic reactivity during deoxycorticosterone acetate salt-induced hypertension. **Journal of hypertension**, v. 23, n. 5, p. 1025–36, maio 2005.

ALVAREZ, Y. et al. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. **Journal of hypertension**, v. 23, n. 4, p. 767–777, 2005a.

ALVAREZ, Y. et al. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. **Journal of hypertension**, v. 23, n. 4, p. 767–77, abr. 2005b.

ALVAREZ, Y. et al. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 321, n. 1, p. 381–8, abr. 2007a.

ALVAREZ, Y. et al. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 321, n. 1, p. 381–8, abr. 2007b.

AMARA, S.; ALOTAIBI, D.; TIRIVEEDHI, V. NFAT5/STAT3 interaction mediates synergism of high salt with IL-17 towards induction of VEGF-A expression in breast cancer cells. **Oncology letters**, v. 12, n. 2, p. 933–943, ago. 2016.

ANTMAN, E. M.; DEMETS, D.; LOSCALZO, J. Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. **Circulation**, v. 112, n. 5, p. 759–70, 2 ago. 2005.

ASHTON, A. W. et al. Inhibition of endothelial cell migration, intercellular communication, and vascular tube formation by thromboxane A(2). **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 50, p. 35562–70, 10 dez. 1999.

ASHTON, A. W. et al. Thromboxane A2 receptor agonists antagonize the proangiogenic effects of fibroblast growth factor-2: role of receptor internalization,

thrombospondin-1, and alpha(v)beta3. **Circulation research**, v. 94, n. 6, p. 735–42, 2 abr. 2004.

AVENDAÑO, M. S. et al. Role of COX-2-derived PGE2 on vascular stiffness and function in hypertension. **British journal of pharmacology**, v. 173, n. 9, p. 1541–55, maio 2016.

BADER, M. et al. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 79, n. 2–3, p. 76–102, abr. 2001.

BEIL, A. H.; SCHMIEDER, R. E. Salt intake as a determinant of cardiac hypertrophy. **Blood pressure. Supplement**, v. 2, p. 30–4, jan. 1995.

BENNDORF, R. A. et al. Isoprostanes inhibit vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration, tube formation, and cardiac vessel sprouting in vitro, as well as angiogenesis in vivo via activation of the thromboxane A(2) receptor: a potential link between ox. **Circulation research**, v. 103, n. 9, p. 1037–46, 24 out. 2008.

BISI MOLINA, M. D. C. et al. [Hypertension and salt intake in an urban population]. **Revista de saude publica**, v. 37, n. 6, p. 743–50, dez. 2003.

BLASCHKE, F. et al. Angiotensin II-augmented migration of VSMCs towards PDGF-BB involves Pyk2 and ERK 1/2 activation. **Basic Research in Cardiology**, v. 97, n. 4, p. 334–342, 28 jul. 2002.

BONETTI, P. O.; LERMAN, L. O.; LERMAN, A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 23, n. 2, p. 168–75, 1 fev. 2003.

BOS, C. L. et al. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 36, n. 7, p. 1187–205, jul. 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–54, 7 maio 1976.

BROWN, D. I.; GRIENDLING, K. K. Regulation of Signal Transduction by Reactive Oxygen Species in the Cardiovascular System. **Circulation Research**, v. 116, n. 3, p. 531–549, 2015.

BROWN, I. J. et al. Salt intakes around the world: implications for public health. **International journal of epidemiology**, v. 38, n. 3, p. 791–813, jun. 2009.

CAMPOS, L. C. G. et al. Induction of CRP3/MLP expression during vein arterialization is dependent on stretch rather than shear stress. **Cardiovascular Research**, v. 83, n. 1, p. 140–147, 2009.

CAREY, R. M.; SIRAGY, H. M. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. **Endocrine reviews**, v. 24, n. 3, p. 261–71, jun. 2003.

CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nature medicine**, v. 6, n. 4, p. 389–95, abr. 2000.

CHAMORRO, A. TP receptor antagonism: a new concept in atherothrombosis and stroke prevention. **Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)**, v. 27 Suppl 3, n. SUPPL. 3, p. 20–7, 2009.

CHANG, L.; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. **Nature**, v. 410, n. 6824, p. 37–40, 1 mar. 2001.

COOPERATIVE, I. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. Intersalt Cooperative Research Group. **Bmj**, v. 297, n. 6644, p. 319–328, 1988.

DANIEL, T. O. et al. Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. **Cancer research**, v. 59, n. 18, p. 4574–7, 15 set. 1999.

DANSER, A. H. et al. Is there a local renin-angiotensin system in the heart? **Cardiovascular research**, v. 44, n. 2, p. 252–65, nov. 1999.

DE MELLO, W. C. Local Renin Angiotensin Aldosterone Systems and Cardiovascular Diseases. **The Medical clinics of North America**, v. 101, n. 1, p. 117–127, jan. 2017.

DESIDERI, G. Angiotensin II Inhibits Endothelial Cell Motility Through an AT1-Dependent Oxidant-Sensitive Decrement of Nitric Oxide Availability. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 7, p. 1218–1223, 2003.

DICKINSON, K. M.; KEOGH, J. B.; CLIFTON, P. M. Effects of a low-salt diet on

flow-mediated dilatation in humans. **The American journal of clinical nutrition**, v. 89, n. 2, p. 485–90, fev. 2009.

DMITRIEVA, N. I.; BURG, M. B. High NaCl promotes cellular senescence. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 6, n. 24, p. 3108–13, 15 dez. 2007.

DORMANN, D.; WEIJER, C. J. Chemotactic cell movement during development. **Current opinion in genetics & development**, v. 13, n. 4, p. 358–64, ago. 2003.

DOS SANTOS, L. et al. Effects of high sodium intake diet on the vascular reactivity to phenylephrine on rat isolated caudal and renal vascular beds: Endothelial modulation. **Life sciences**, v. 78, n. 19, p. 2272–9, 4 abr. 2006.

DU NOÜY, P. L. CICATRIZATION OF WOUNDS : II. MATHEMATICAL EXPRESSION OF THE CURVE REPRESENTING CICATRIZATION. **The Journal of experimental medicine**, v. 24, n. 5, p. 451–60, 1 nov. 1916.

DUPONT, J. J. et al. High dietary sodium intake impairs endothelium-dependent dilation in healthy salt-resistant humans. **Journal of Hypertension**, v. 31, n. 3, p. 530–536, mar. 2013.

ENGELI, S.; NEGREL, R.; SHARMA, A. M. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 35, n. 6, p. 1270–7, jun. 2000.

FRANCOIS, H. et al. Role for thromboxane receptors in angiotensin-II-induced hypertension. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 43, n. 2, p. 364–9, fev. 2004.

GAO, Y. et al. Reversal of angiogenesis in vitro, induction of apoptosis, and inhibition of AKT phosphorylation in endothelial cells by thromboxane A(2). **Circulation research**, v. 87, n. 9, p. 739–45, 27 out. 2000.

GERTHOFFER, W. T. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. **Circulation research**, v. 100, n. 5, p. 607–21, 16 mar. 2007.

GLEIM, S. et al. Prostacyclin receptor/thromboxane receptor interactions and cellular responses in human atherothrombotic disease. **Current atherosclerosis reports**, v. 11, n. 3, p. 227–35, maio 2009.

GOMEZ, D.; OWENS, G. K. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. **Cardiovascular research**, v. 95, n. 2, p. 156–64, 2012.

GREANEY, J. L. et al. Dietary sodium loading impairs microvascular function independent of blood pressure in humans: role of oxidative stress. **The Journal of Physiology**, v. 590, n. 21, p. 5519–5528, nov. 2012.

GRIENDLING, K. K. et al. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. **Circ Res**, v. 74, n. 6, p. 1141–1148, 1994a.

GRIENDLING, K. K. et al. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. **Circulation research**, v. 74, n. 6, p. 1141–8, 1 jun. 1994b.

GU, J. W. et al. Sodium induces hypertrophy of cultured myocardial myoblasts and vascular smooth muscle cells. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 31, n. 5, p. 1083–7, maio 1998.

HE, F. J.; MACGREGOR, G. A. A comprehensive review on salt and health and current experience of worldwide salt reduction programmes. **Journal of Human Hypertension**, v. 23, n. 6, p. 363–384, 2009.

HE, W. et al. Increased dietary sodium induces COX2 expression by activating NFκB in renal medullary interstitial cells. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 466, n. 2, p. 357–367, fev. 2014.

HOLBROOK, J. T. et al. Sodium and potassium intake and balance in adults consuming self-selected diets. **The American journal of clinical nutrition**, v. 40, n. 4, p. 786–93, out. 1984.

HORIUCHI, M.; IWANAMI, J.; MOGI, M. Regulation of angiotensin II receptors beyond the classical pathway. **Clinical Science**, v. 123, n. 4, p. 193–203, 1 ago. 2012.

HU, Z. et al. Angiotensin II increases expression of cyclooxygenase-2: implications for the function of vascular smooth muscle cells. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 303, n. 2, p. 563–73, nov. 2002.

HUGHES, A. D. AT 1-signalling in vascular smooth muscle. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 1, n. 2, p. 125–130, jun. 2000.

JABLONSKI, K. L. et al. Dietary sodium restriction reverses vascular endothelial dysfunction in middle-aged/older adults with moderately elevated systolic blood pressure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 61, n. 3, p. 335–43, 22

jan. 2013.

JAIN, R. K. Molecular regulation of vessel maturation. **Nature medicine**, v. 9, n. 6, p. 685–93, jun. 2003.

KAWAI, T. et al. AT1 receptor signaling pathways in the cardiovascular system. **Pharmacological research**, p. 1–10, 17 maio 2017.

KUMAR, R. et al. The intracrine renin–angiotensin system. **Clinical Science**, v. 123, n. 5, p. 273–284, 2012.

LENDA, D. M.; BOEGEHOLD, M. A. Effect of a High Salt Diet on Microvascular Antioxidant Enzymes. **Journal of Vascular Research**, v. 39, n. 1, p. 41–50, 13 fev. 2002.

LI, X.-Y. et al. High salt intake and stroke: meta-analysis of the epidemiologic evidence. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 18, n. 8, p. 691–701, ago. 2012.

LIANG, C.-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–33, 2007.

LIBBY, P.; WARNER, S. J.; FRIEDMAN, G. B. Interleukin 1: a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth-inhibitory prostanoids. **The Journal of clinical investigation**, v. 81, n. 2, p. 487–98, fev. 1988.

LIU, G. et al. Bimodal effects of angiotensin II on migration of human and rat smooth muscle cells. Direct stimulation and indirect inhibition via transforming growth factor-beta 1. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 17, n. 7, p. 1251–7, jul. 1997.

LIU, G. et al. High sodium augments angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation through the ERK 1/2-dependent pathway. **Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 37, n. 1, p. 13–8, jan. 2014.

MA, H. et al. Mechanisms of hepatocyte growth factor-mediated vascular smooth muscle cell migration. **Circulation research**, v. 93, n. 11, p. 1066–73, 28 nov. 2003.

MAJED, B. H.; KHALIL, R. A. Molecular mechanisms regulating the vascular prostacyclin pathways and their adaptation during pregnancy and in the newborn.

Pharmacological reviews, v. 64, n. 3, p. 540–82, 2012.

MARTÍNEZ-REVELLES, S. et al. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 1, p. 51–65, 1 jan. 2013.

MATROUGUI, K. et al. High NaCl intake decreases both flow-induced dilation and pressure-induced myogenic tone in resistance arteries from normotensive rats: involvement of cyclooxygenase-2. **Pharmacology and Toxicology**, v. 89, n. 4, p. 183–187, 2001.

MAZZONE, A. et al. Effects of iloprost on adhesion molecules and F1 + 2 in peripheral ischemia. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 32, n. 12, p. 882–888, dez. 2002.

MEHTA, J. L. et al. Increased prostacyclin and thromboxane A2 biosynthesis in atherosclerosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 12, p. 4511–5, jun. 1988.

MEHTA, P. K.; GRIENDLING, K. K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 292, n. 1, p. C82-97, jan. 2007a.

MEHTA, P. K.; GRIENDLING, K. K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 292, n. 1, p. C82-97, jan. 2007b.

MILLER, S. B. Prostaglandins in health and disease: an overview. **Seminars in arthritis and rheumatism**, v. 36, n. 1, p. 37–49, ago. 2006.

MOHAN, S.; CAMPBELL, N. R. C. Salt and high blood pressure. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 117, n. 1, p. 1–11, 2 jun. 2009.

MORIMOTO, S.; SIGMUND, C. D. Angiotensin mutant mice: a focus on the brain renin-angiotensin system. **Neuropeptides**, v. 36, n. 2–3, p. 194–200, 2002.

MORINELLI, T. A; WALKER, L. P.; ULLIAN, M. E. COX-2 expression stimulated by Angiotensin II depends upon AT1 receptor internalization in vascular smooth muscle cells. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1783, n. 6, p. 1048–54, jun. 2008.

MÜLLER, S. et al. Salt-dependent chemotaxis of macrophages. **PloS one**, v. 8,

n. 9, p. e73439, 2013.

NERI SERNERI, G. G. et al. Increased fibrinopeptide A formation and thromboxane A2 production in patients with ischemic heart disease: relationships to coronary pathoanatomy, risk factors, and clinical manifestations. **American heart journal**, v. 101, n. 2, p. 185–94, fev. 1981.

NGUYEN DINH CAT, A.; TOUYZ, R. M. A new look at the renin-angiotensin system--focusing on the vascular system. **Peptides**, v. 32, n. 10, p. 2141–50, out. 2011.

NI, Z.; VAZIRI, N. D. Effect of salt loading on nitric oxide synthase expression in normotensive rats. **American journal of hypertension**, v. 14, n. 2, p. 155–63, fev. 2001.

NIELSEN, A. H.; SCHAUSER, K. H.; POULSEN, K. Current topic: the uteroplacental renin-angiotensin system. **Placenta**, v. 21, n. 5–6, p. 468–77, 2000.

NISHIDA, Y. et al. Role of nitric oxide in vascular hyper-responsiveness to norepinephrine in hypertensive Dahl rats. **Journal of hypertension**, v. 16, n. 11, p. 1611–8, nov. 1998.

NOBRE, F. et al. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, n. 1, p. 1–51, 2010.

OBERLEITHNER, H. et al. Salt overload damages the glycocalyx sodium barrier of vascular endothelium. **Pflugers Archiv : European journal of physiology**, v. 462, n. 4, p. 519–28, out. 2011.

OHNAKA, K. et al. Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 35, n. 1 Pt 1, p. 68–75, jan. 2000.

OHTSU, H. et al. Angiotensin II signal transduction through small GTP-binding proteins: Mechanism and significance in vascular smooth muscle cells. **Hypertension**, v. 48, n. 4, p. 534–540, 2006.

OWENS, G. K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. **Physiological reviews**, v. 75, n. 3, p. 487–517, jul. 1995.

OWENS, G. K.; KUMAR, M. S.; WAMHOFF, B. R. Molecular regulation of

vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. **Physiological reviews**, v. 84, n. 3, p. 767–801, jul. 2004.

PAGE, I. H.; HELMER, O. M. A CRYSTALLINE PRESSOR SUBSTANCE (ANGIOTONIN) RESULTING FROM THE REACTION BETWEEN RENIN AND RENIN-ACTIVATOR. **The Journal of experimental medicine**, v. 71, n. 1, p. 29–42, 1 jan. 1940.

PAUL, M.; POYAN MEHR, A.; KREUTZ, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiological reviews**, v. 86, n. 3, p. 747–803, jul. 2006.

RAMAN, M.; CHEN, W.; COBB, M. H. Differential regulation and properties of MAPKs. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3100–3112, 2007.

RIDLEY, A. J. et al. Cell migration: integrating signals from front to back. **Science (New York, N.Y.)**, v. 302, n. 5651, p. 1704–9, 5 dez. 2003.

ROSS, R. et al. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 71, n. 4, p. 1207–10, abr. 1974.

SARNO, F. et al. Estimativa de consumo de sódio pela população brasileira, 2002-2003. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 2, p. 219–225, 2009.

SCHWAB, A. Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 280, n. 5, p. F739-47, maio 2001.

SEALS, D. R.; JABLONSKI, K. L.; DONATO, A. J. Aging and vascular endothelial function in humans. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 120, n. 9, p. 357–75, maio 2011.

SERNIA, C. A critical appraisal of the intrinsic pancreatic angiotensin-generating system. **JOP : Journal of the pancreas**, v. 2, n. 1, p. 50–5, jan. 2001.

SMITH, W. L.; GARAVITO, R. M.; DEWITT, D. L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 52, p. 33157–60, 27 dez. 1996.

SMYTH, E. M. Thromboxane and the thromboxane receptor in cardiovascular disease. **Clinical Lipidology**, v. 5, n. 2, p. 209–219, abr. 2010.

SOFOLA, O. A. et al. Change in endothelial function in mesenteric arteries of Sprague-Dawley rats fed a high salt diet. **The Journal of physiology**, v. 543, n. Pt 1, p. 255–60, 15 ago. 2002.

SPARKS, M. A. et al. Thromboxane receptors in smooth muscle promote hypertension, vascular remodeling, and sudden death. **Hypertension**, v. 61, n. 1, p. 166–173, 2013.

STRAZZULLO, P. et al. Salt intake, stroke, and cardiovascular disease: meta-analysis of prospective studies. **Bmj**, v. 339, p. b4567, 2009.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 4, p. 639–72, dez. 2000.

TUOMILEHTO, J. et al. Urinary sodium excretion and cardiovascular mortality in Finland: a prospective study. **Lancet (London, England)**, v. 357, n. 9259, p. 848–51, 17 mar. 2001.

UNGER, T. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. **The American journal of cardiology**, v. 89, n. 2A, p. 3A–9A; discussion 10A, 24 jan. 2002.

VARAGIC, J. et al. AT1 receptor antagonism attenuates target organ effects of salt excess in SHRs without affecting pressure. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 294, n. 2, p. H853-8, fev. 2008.

WANG, G. et al. Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells. **The Journal of physiology**, v. 593, n. 14, p. 3013–30, 15 jul. 2015.

WEBER, K. T. Aldosterone in Congestive Heart Failure. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 23, p. 1689–1697, 6 dez. 2001.

WEBSTER, J. L.; DUNFORD, E. K.; NEAL, B. C. A systematic survey of the sodium contents of processed foods. **The American journal of clinical nutrition**, v. 91, n. 2, p. 413–20, fev. 2010.

WHEELER-JONES, C. P. D. Regulation of endothelial prostacyclin synthesis by protease-activated receptors: mechanisms and significance. **Pharmacological reports : PR**, v. 60, n. 1, p. 109–18, 2008.

WIDLANSKY, M. E. et al. The clinical implications of endothelial dysfunction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 42, n. 7, p. 1149–60, 1 out. 2003.

WILLIS, A. I. et al. Vascular Smooth Muscle Cell Migration: Current Research and Clinical Implications. **Vascular and Endovascular Surgery**, v. 38, n. 1, p. 11–23, 2004.

WU, Y. et al. The activation of p38 MAPK limits the abnormal proliferation of vascular smooth muscle cells induced by high sodium concentrations. **International journal of molecular medicine**, v. 37, n. 1, p. 74–82, jan. 2016.

XI, X. P. et al. Central role of the MAPK pathway in ang II-mediated DNA synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 19, n. 1, p. 73–82, jan. 1999.

YANG, T. et al. Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. **The American journal of physiology**, v. 274, n. 3 Pt 2, p. F481-9, 2 mar. 1998.

YU, H. C. et al. Salt induces myocardial and renal fibrosis in normotensive and hypertensive rats. **Circulation**, v. 98, n. 23, p. 2621–2628, 1998.

ZHANG, Z. et al. High urea and NaCl carbonylate proteins in renal cells in culture and in vivo, and high urea causes 8-oxoguanine lesions in their DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 25, p. 9491–6, 22 jun. 2004.

ZHU, J.; HUANG, T.; LOMBARD, J. H. Effect of high-salt diet on vascular relaxation and oxidative stress in mesenteric resistance arteries. **Journal of vascular research**, v. 44, n. 5, p. 382–90, 2007.