

Dieta hipossódica aumenta a biodisponibilidade de NO e a produção de prostanóides vasoconstrictores da COX-2 em ratos espontaneamente hipertensos

Teresa Cristina Francischetto Travaglia

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas
Fisiologia Cardiovascular

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, Fevereiro de 2016.

**Dieta hipossódica aumenta a biodisponibilidade de NO
e a produção de prostanóides vasoconstritores da
COX-2 em ratos espontaneamente hipertensos**

Teresa Cristina Francischetto Travaglia

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Ivanita Stefanon

Co-orientadora: Dr^a. Paula Frizera Vassallo

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, Fevereiro de 2016.

**Dieta hipossódica aumenta a biodisponibilidade de NO
e a produção de prostanóides vasoconstritores da
COX-2 em ratos espontaneamente hipertensos**

Teresa Cristina Francischetto Travaglia

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 02 de fevereiro de 2016 por:

Prof^a. Dr^a Ivanita Stefanon – Orientadora, UFES

Dr^a Paula Frizera Vassallo – Co-orientadora, UFES

Prof^a. Dr^a Maria Del Carmen Bisi Molina - UFES

Prof.Dr Fausto Edmundo Lima Pereira - UVV

Prof^a. Dr^a Nazaré Souza Bissoli - UFES

Dr^a Maylla Ronacher Simões - UFES

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, Fevereiro de 2016.

Travaglia, Teresa 1982

Dieta hipossódica aumenta a biodisponibilidade de NO e a produção de prostanóides vasoconstrictores da COX-2 em ratos espontaneamente hipertensos. [Vitória] 2016.

124p., 29,7 cm (UFES, D. SC., Ciências Fisiológicas, 2016)

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a Ivanita Stefanon

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Paula Frizera Vassallo

1. Dieta hipossódica; 2. Hipertensão; 3. Endotélio; 4. Reatividade vascular; 5. COX-2; 6. Espécies Reativas de Oxigênio; 7. Sistema renina angiotensina.

Aos que eu mais amo, àqueles a quem eu devo tudo o que eu sou e tudo o que eu acredito. Meus pais, Anselmo e Orlete, minha irmã Maria Luisa, meu esposo Rafael e minha amada filha Helena.

“Nada é para sempre, dizemos, mas há momentos que parecem ficar suspensos, pairando sobre o fluir inexorável do tempo.”

José Saramago

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por clarear meu o caminho principalmente nos momentos mais difíceis, por me dar forças para chegar até aqui e por todas as pessoas iluminadas que colocou e coloca na minha vida a cada dia.

A minha família, a minha base!!! Ao meu pai Anselmo, minha mãe Orlete e minha irmã Maria Luisa que são minha referência de vida. Sem vocês ao meu lado diariamente, certamente não teria chegado até aqui. Obrigada por abdicarem do tempo de vocês em função das minhas necessidades. Amo vocês!

Ao Rafael, meu grande companheiro, por estar sempre ao meu lado. Obrigada pelo amor e paciência em todos os momentos. A minha linda e amada filha Helena, que chegou às nossas vidas no meio dessa difícil caminhada, mas que me serviu de motivação e incentivo diante das dificuldades.

Agradeço em especial a Prof^a Dr^a Ivanita pela oportunidade de realização do doutorado. Obrigada pela orientação, sabedoria e dedicação imprescindíveis para realização deste trabalho. Agradeço pela paciência ao longo dessa jornada e por todas as vezes que soube entender as minhas dificuldades e limitações.

A Dr^a Paula Frizera, obrigada pela co-orientação, pelo apoio e por todo carinho. Muito obrigada por sempre me acolher nos momentos mais difíceis e me direcionar sempre com boas ideias. Você foi fundamental para conclusão desse estudo!

Ao Prof^o Dalton, querido chefe, obrigada por sempre me acolher nos momentos de dúvidas e por toda sua disponibilidade nas discussões dos meus resultados e nas revisões do artigo.

Aos professores do nosso laboratório: Prof^a. Dr^a. Alessandra e Prof^o. Dr^o. Leonardo, obrigada por todo apoio, ensinamentos e opiniões. Vocês foram fundamentais para o meu crescimento.

A banca, meus agradecimentos, por aceitar realizar a avaliação deste trabalho.

Aos amigos e colegas de laboratório: Aurélia, Bruna, Edna, Fabiana Siman, Fabiana Simões, Jonaína, Lorena, Mayla, Mirian, Paula, Priscila, Rogério, Thaís e aos demais colegas que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

Meus agradecimentos especiais a Lorena e Rogério que diretamente me ajudaram na realização dos experimentos e na compreensão dos resultados. Obrigada por toda disponibilidade em todos os momentos que procurei a ajuda de vocês.

Às colegas Rebeca e Ludimila que "dividiram" comigo os animais usados durante os experimentos, nunca medindo esforços para conciliar meus horários com o de vocês, garantindo sempre o aproveitamento de todos os animais. Muito obrigada pela parceria.

A todos os demais professores do PPGCF / UFES, pela contribuição em minha formação.

A todos os funcionários do PPGCF / UFES, pelos serviços prestados.

A CAPES, CNPq e à FAPES/FUNCITEC, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
1.1 SÓDIO E A POPULAÇÃO.....	25
1.1.1 Ingestão de sódio.....	25
1.1.2 O consumo de sódio e o sistema cardiovascular.....	27
1.2 TÔNUS VASCULAR E SUA REGULAÇÃO.....	32
1.2.1 Endotélio vascular.....	33
1.2.2 Óxido Nítrico	35
1.2.3 Ciclooxygenase-2.....	37
1.2.4 Espécies Reativas de Oxigênio.....	39
1.2.5 Sistema Renina-Angiotensina	45
2 JUSTIFICATIVA.....	48
3 OBJETIVOS.....	49
3.1 OBJETIVO GERAL.....	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	50
4.1.1 Modelo Experimental.....	50
4.1.2 Avaliação da pressão arterial sistólica.....	51
4.2 REATIVIDADE VASCULAR.....	51
4.2.1 Avaliação da função vascular da artéria mesentérica.....	51
<i>4.2.1.1 Avaliação da integridade do músculo liso vascular.....</i>	<i>54</i>
<i>4.2.1.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio.....</i>	<i>54</i>
4.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS – REATIVIDADE VASCULAR	55
4.3.1 Efeitos dieta hipossódica por 28 semanas sobre a resposta constritora à fenilefrina e dilatadora a acetilcolina em artérias mesentérica de ratos SHR.....	55
4.3.2 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos nos efeitos da dieta hipossódica por 28 semanas sobre a resposta à fenilefrina.....	56
<i>4.3.2.1 Participação do óxido nítrico, dos prostanóides, das espécies reativas de oxigênio e do sistema renina aniotensina aldosterona na resposta contrátil a fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos que receberam dieta normossódica ou hipossódica.....</i>	<i>57</i>

4.4 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE WESTERN BLOT....	58
4.5 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
5 RESULTADOS.....	62
5.1 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA.....	62
5.2 EFEITOS DA DIETA HIPOSSÓDICA SOBRE A FUNÇÃO VASCULAR DE ARTERIA MESENTÉRICA DE RESISTENCIA DE RATOS SHR.....	63
5.2.1 Efeitos da dieta hipossódica sobre a resposta contrátil ao cloreto de potássio (KCL 120 mmol/l) em artérias mesentéricas de ratos SHR.....	63
5.2.2 Efeitos da dieta hipossódica sobre o relaxamento dependente do endotélio em artérias mesentéricas de ratos SHR.....	63
5.2.3 Efeitos da dieta hipossódica sobre a resposta contrátil a fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos SHR.....	65
5.2.4 Efeitos da dieta hipossódica sobre a participação do óxido nítrico na resposta vasoconstritora à fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos SHR.....	66
<i>5.2.4.1 Expressão protéica da isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS) e da isoforma induzível da sintase do óxido nítrico (iNOS).....</i>	<i>68</i>
5.2.5 Efeitos da dieta hipossódica sobre a participação dos prostanóides derivados da via da ciclooxygenase (COX) na resposta contrátil a fenilefrina.....	69
<i>5.2.5.1 Expressão proteica da isoforma constitutiva da ciclooxygenase (COX- 2).....</i>	<i>73</i>
5.2.6 Efeitos da dieta hipossódica sobre a participação de espécies reativas do oxigênio na resposta contrátil a fenilefrina.....	73
5.2.7 Efeitos da dieta hipossódica sobre a participação do sistema renina angiotensina aldosterona na resposta contrátil a fenilefrina.....	77
<i>5.2.7.1 Expressão protéica do receptor de angiotensina AT1.....</i>	<i>79</i>
6. DISCUSSÃO.....	81
6.1 PRINCIPAIS RESULTADOS DO PRESENTE ESTUDO.....	81
6.2 SAL E PRESSÃO ARTERIAL: SUA RELAÇÃO COM O RISCO PARA DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	82

6.3 EFEITO DA DIETA HIPOSSÓDICA POR 28 DIAS SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE MESENTÉRICAS DE SHR.....	83
6.4 EFEITO DA DIETA HIPOSSÓDICA POR 28 DIAS SOBRE A MODULAÇÃO ENDOTELIAL NOS ANÉIS ISOLADOS DE MESENTÉRICAS DE SHR.....	83
6.5 O PAPEL DOS PROSTANÓIDES DERIVADOS DA CICLOOXIGENASE (COX) NO EFEITO DO SÓDIO SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RATOS SHR.....	85
6.6 O PAPEL DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NO EFEITO DO SÓDIO SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RATOS SHR.....	87
6.7 O PAPEL DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA NO EFEITO DO SÓDIO SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RATOS SHR.....	89
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
8 REFERÊNCIAS.....	92
ANEXO I:.....	117

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Pressão Arterial Sistólica (PAS) avaliada por pletismografia de cauda durante o protocolo experimental.....61
- Tabela 2:** Resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) induzidas pela acetilcolina em artérias mesentéricas de ratos dos grupos com dieta normossódica e hipossódica.....64
- Tabela 3:** Valores de resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) obtidos através das curvas concentração resposta a fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos dos grupos com dieta normossódica e hipossódica.....66
- Tabela 4:** Valores de resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) obtidos através das curvas concentração resposta a fenilefrina na presença de L-NAME em artérias mesentéricas de ratos dos grupos com dieta normossódica e hipossódica.....68
- Tabela 5:** Valores de resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) obtidos através das curvas concentração resposta a fenilefrina na presença de indometacina (INDO) em artérias mesentéricas de ratos dos grupos com dieta normossódica e hipossódica.....71
- Tabela 6:** Valores de resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) obtidos através das curvas concentração resposta a fenilefrina na presença de NS 398 em artérias mesentéricas de ratos dos grupos com dieta normossódica e hipossódica.....72
- Tabela 7:** Valores de resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) obtidos através das curvas concentração resposta a fenilefrina na presença de apocinina (APO) em artérias mesentéricas de ratos dos grupos com dieta normossódica e hipossódica.....75

Tabela 8: Valores de resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) obtidos através das curvas concentração resposta a fenilefrina na presença de catalase e tiron em artérias mesentéricas de ratos dos grupos com dieta normossódica e hipossódica.....77

Tabela 9: Valores de resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) obtidos através das curvas concentração resposta a fenilefrina na presença de enalapril e losartan em artérias mesentéricas de ratos dos grupos com dieta normossódica e hipossódica.....79

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fatores relaxantes e contráteis derivados do endotélio. 20-HETE, o ácido 20- hidroxieicosatetraenóico; KCa, canais para potássio ativados por cálcio; COX, ciclooxigenase; LOX, lipooxigenase; EC, células endoteliais; EDCFs, fatores vasoconstritores derivados do endotélio; EDRFs, fatores vasodilatadores derivados do endotélio; EETs, ácidos epoxieicosatrienoicos; NOS, óxido nítrico; H₂O₂, o peróxido de hidrogénio; NOX, NAD(P)H-oxidase; P450-2C 2J ou 4A, o citocromo P450; PGI₂, prostaciclina; PGs, prostaglandinas; ROS, espécies reativas de oxigênio; SOD, superóxido-dismutase; ET-1, endotelina; VSMC, célula do músculo liso vascular; XO, xantina oxidase; H₂S, sulfeto de hidrogênio. (Fonte: Félétou e Vanhoutte, 2009).....33

Figura 2: Via de produção do óxido nítrico (NO) pela enzima eNOS. Esta via pode ser ativada após a estimulação de receptores das células endoteliais em cuja via de sinalização ocorra o aumento da concentração intracelular do Ca²⁺. Dentre os agonistas pode-se citar a acetilcolina (ACh), substância P (SP), bradiginina (BK), e adenosina trifosfato (ATP). Após a liberação pelas células endoteliais, este mediador exerce sua ação nas células musculares lisas, através da produção dos segundo mensageiro, GMPc, ou ainda através da hiperpolarização (modificado de Rattmann, 2009).....36

Figura 3: Fontes celulares de geração do estresse oxidativo vascular e algumas estratégias de intervenções farmacológicas. (1) NADPH- oxidase (2) xantina oxidase (3) óxido nítrico sintase desacoplada. Juntas promovem a produção de espécies reativas de oxigênio. (Modificado de Weseler & Bast, 2010).....41

Figura 4: Fotografia do leito mesentérico mostrando as artérias com suas ramificações.....52

Figura 5: Esquema representativo do miógrafo de arame onde foram realizados os experimentos de reatividade vascular.....53

Figura 6: Esquema geral representativo de protocolo experimental realizado para avaliar a reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência de ratos. *ACh*=acetilcolina (adaptado de Wiggers, 2008)54

Figura 7: Esquema representativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE (A) e/ou à *ACh* (B) (adaptado de Batista, 2014)56

Figura 8: Curva concentração-resposta à acetilcolina (*ACh*) para a avaliação do relaxamento dependente do endotélio em segmentos de artérias mesentéricas de ratos dos grupos com dieta normossódica e hipossódica. Os resultados (Média ± EPM) estão expressos como porcentagem da pré-contracção à fenilefrina. ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ vs normossódica. O número de animais usados está indicado entre parênteses.....64

Figura 9: Resposta contrátil induzida pela fenilefrina em segmentos de artérias mesentérica de ratos SHR dos grupos normossódico e hipossódico. Os resultados (Média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contracção induzida por 120 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses.....65

Figura 10: Efeito do L-NAME (100 µM), inibidor da sintase do óxido nítrico, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em segmentos de artérias mesentérica de ratos dos grupos de dieta normossódica (A) e hipossódica (B). Diferença percentual da área abaixo da curva nos dois grupos experimentais (C). Os resultados (Média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contracção induzida por 120 mM de KCl. ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni* e teste *t* de Student para comparação de médias. * $p < 0,05$ vs normossódica. O número de animais usados está indicado entre parênteses.....67

Figura 11: Análise densitométrica da expressão protéica da isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS) (A) e da isoforma induzível da sintase do óxido nítrico (iNOS) (B) em artéria mesentérica de ratos dos grupos normossódica e hipossódica. Na parte superior da figura estão demonstradas as bandas representativas da expressão da eNOS, iNOS e da α -actina. Os resultados (média \pm EPM) estão expressos como relação entre a densidade das bandas da eNOS, iNOS e da α -actina. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste-*t* não pareado. * $p < 0,05$ vs hipossódica.69

Figura 12: Efeitos da indometacina (10 μ M), inibidor inespecífico da via do ácido araquidônico e ciclooxigenase, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em segmentos de artérias mesentéricas de ratos dos grupos de dieta normossódica (A) e hipossódica (B). Diferença percentual de área abaixo da curva nos dois grupos experimentais (C). Os resultados (Média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni* e teste *t* de Student para comparação de médias. * $p < 0,05$ vs normossódico). O número de animais usados está indicado entre parênteses.....70

Figura 13: Efeitos do inibidor da COX-2, o NS 398 (1 μ M), sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina (FE) em segmentos de artérias mesentéricas de ratos dos grupos de dieta normossódica (A) e hipossódica (B). Os resultados (Média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni* e teste *t* de Student para comparação de médias. * $p < 0,05$ vs normossódica. O número de animais usados está indicado entre parênteses.....72

Figura 14: Análise densitométrica da expressão protéica da isoforma induzível da ciclooxigenase (COX-2) em artéria mesentérica de ratos dos grupos normossódica e hipossódica. Na parte superior da figura estão demonstradas as bandas representativas da expressão da COX-2 e da α -actina. Os resultados (média \pm EPM) estão expressos como relação entre a densidade

das bandas da COX- 2 e da α -actina. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste-*t* não pareado. * $p < 0,05$ vs normossódica.....73

Figura 15: Efeitos do inibidor da NADPH oxidase, a apocinina (10 μ M) sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina (FE) em segmentos de artérias mesentéricas de ratos dos grupos de dieta normossódica (A) e hipossódica (B). Diferença percentual de área abaixo da curva nos dois grupos experimentais (C). Os resultados (Média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni* e teste *t* de Student para comparação de médias. * $p < 0,05$ vs normossódica. O número de animais usados está indicado entre parênteses.....74

Figura 16: Efeitos de um “varredor” não enzimático de ânion superóxido, o tiron (1 mM) e de um eliminador de peróxido de hidrogênio, a catalase (1000 U/ml) sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina (FE) em segmentos de artérias mesentéricas de ratos dos grupos de dieta normossódica (A) e hipossódica (B). Os resultados (Média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni*. $p > 0,05$. O número de animais usados está indicado entre parênteses.....76

Figura 17: Efeitos do inibidor da enzima conversora da angiotensina, enalapril (10 μ M) e do antagonista dos receptores AT1, losartan (10 μ M) sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina (FE) em segmentos de artérias mesentéricas de ratos dos grupos de dieta normossódica (A) e hipossódica (B). Os resultados (Média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni*. O número de animais usados está indicado entre parênteses. $p > 0,05$78

Figura 18: Análise densitométrica da expressão protéica do receptor de angiotensina AT1 em artéria mesentérica de ratos dos grupos normossódica e

hipossódica. Na parte superior da figura estão demonstradas as bandas representativas da expressão do receptor AT1 e da α -actina. Os resultados (média \pm EPM) estão expressos como relação entre a densidade das bandas do receptor AT1 e da α -actina. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste-*t* não pareado. $p > 0,05$80

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

20-HETE: ácido 20- hidroxieicosatetraenóico

AA: ácido araquidônico

ACh: acetilcolina

AHA: *American Heart Association*

ang I: angiotensina I

ang II: angiotensina II

AT1: angiotensina tipo 1

ATP: adenosina trifosfato

BH4: tetrahidrobiopterina

BK: bradicinina

CDC: Centros para Controle e Prevenção de Doenças

CEUA-UFES: Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da
Universidade Federal do Espírito Santo

CMLV: célula do músculo liso vascular

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX: ciclooxigenase

COX-1: ciclooxigenase-1

COX-2: ciclooxigenase-2

DASH: *Dietary Approaches to Stop Hypertension*

dAUC: diferença da área abaixo da curva

DCNT: Doenças Crônicas não Transmissíveis

DCV: doença cardiovascular

EC: células endoteliais;

ECA: enzima conversora de angiotensina

ECSOD: SOD extracelular

EDCF: fator vasoconstritor derivados do endotélio

EDHF: fator hiperpolarizante derivado do endotélio

EDRF: fator relaxante derivado do endotélio

EETs: ácidos epoxieicosatrienoicos

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

EPM: erro padrão da media

ERO: espécies reativas de oxigênio

ET-1: endotelina

FE: fenilefrina

GCs: guanilato ciclase solúvel

GMPc: monofosfato cíclico de guanosina

GPx: glutathione peroxidase

GTP: trifosfato de guanosina

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

H₂S: sulfeto de hidrogênio.

HAS Hipertensão Arterial Sistêmica

HOCl: ácido hipocloroso

INDO: indometacina

IOM: Instituto de Medicina

KCa: canais para potássio ativados por cálcio

KCl: cloreto de potássio

L-NAME: N-nitro-L-arginina metil éster

LOX: lipooxigenase

NADPH oxidases

nNOS: óxido nítrico sintase neuronal

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintase

O₂^{•-}: ânion superóxido

OH⁻: radical hidroxila

OMS: Organização Mundial de Saúde

ONOO⁻: peróxido de nitrito

PA: pressão arterial

PAS: pressão arterial sistólica

PD2: prostaglandina D2

pD2: sensibilidade

PGE2: prostaglandina E2

PGF2 α : prostaglandina F2 α

PGH2: prostaglandina H2

PGI2: prostaciclina I2

PKG: proteína quinase G

PLA2: fosfolipase A2

R_{máx}: resposta máxima

SHR: ratos espontaneamente hipertensos

SOD: superoxidodesmutase

SRA: sistema renina-angiotensina

TOHP: *Trials of Hypertension Prevention*

TXA2: tromboxano A2

UFES: Universidade Federal do Espírito Santo

VSMC: célula do músculo liso vascular

XO: xantina oxidase

RESUMO

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: A restrição de sal é recomendada no tratamento da hipertensão para reduzir a pressão arterial, mas a implicação sobre os fatores de risco cardiovasculares ainda é uma questão em debate. A capacidade que a dieta com restrição de sódio tem para reduzir a incidência de mortalidade cardiovascular na hipertensão ainda não é clara. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de um longo período de dieta com restrição de sal sobre a reatividade de artérias mesentéricas de ratos espontaneamente hipertensos (SHR). **MATERIAL E MÉTODOS:** Ratos machos SHR receberam dieta normossódica (0,3% NaCl) ou hipossódica (0,03% NaCl) durante 28 semanas. Foi isolado o terceiro ramo da artéria mesentérica para análise da influência dos mediadores da reatividade vascular: óxido nítrico (NO), ciclooxigenase-2 (COX-2), espécies reativas de oxigênio (ERO) e sistema renina-angiotensina (SRA). **RESULTADOS:** Após 7 meses de dieta, o grupo SHR que recebeu dieta hipossódica apresentou redução na pressão arterial sistólica (PAS) quando comparado ao que recebeu dieta normossódica (dieta hipossódica: 169 ± 4 mmHg, normossódica: $203 \pm 4,7$ mmHg; $P < 0,05$). A redução na ingestão de sal não alterou a vasoconstrição induzida pela fenilefrina, mas aumentou a vasodilatação induzida pela acetilcolina. A dieta hipossódica também aumentou os efeitos da inibição da sintase de NO com L-NAME (100 mM) sob a resposta induzida pela fenilefrina e a expressão vascular da iNOS. O inibidor da ciclooxigenase, indometacina (10 μ M) e o inibidor da COX-2, NS 398 (1 μ M) reduziram a reatividade vascular à fenilefrina no grupo de dieta hipossódica concomitante a um aumento na expressão da proteína COX-2. Não houve participação das espécies reativas de oxigênio na reatividade vascular modulada pela dieta hipossódica, quando avaliadas através do uso de bloqueadores de EROs, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, nem com o uso dos bloqueadores de receptores da ACE e do receptor para AT1, enalapril (10 μ M) e losartan (10 μ M). A expressão da proteína do receptor AT1 também foi semelhante nos dois grupos. **CONCLUSÕES:** Estes resultados sugerem que a dieta hipossódica modula a reatividade mesentérica, provavelmente, pelo aumento da biodisponibilidade de

NO e da produção de prostanóides vasoconstritores através da via da COX-2 em ratos espontaneamente hipertensos. As EROs e o sistema renina-angiotensina local não estão envolvidos nessa resposta vascular.

Palavras-chave: dieta hipossódica; hipertensão arterial; endotélio vascular; reatividade vascular; óxido nítrico; COX-2; espécies reativas de oxigênio; sistema renina-angiotensina.

ABSTRACT

Background and purpose: Salt restriction is recommended for hypertension treatment to reduce blood pressure, but its cardiovascular risk factor implication is still a matter of discussion. The ability of dietary sodium restriction to reduce the incidence of cardiovascular mortality and vascular function in spontaneously hypertensive rats (SHR) is still unclear. The aim of this study was to observe the effect of a long period of salt restriction on the vascular reactivity properties of mesenteric arteries of SHRs. **Experimental approach:** Male SHR received standard salt diet (0,3 % NaCl) or low salt (0,03 % NaCl) for 28 weeks. Isolated mesenteric artery segments were used to analyze nitric oxide (NO), cyclooxygenase-2 (COX-2) and renin-angiotensin system influence on vascular reactivity. **Key results:** SHRs at low salt diet had a lower systolic blood pressure (SBP) than rats receiving standard salt diet (low salt: 169 ± 4 mmHg, standard salt: $203 \pm 4,7$ mmHg; $P < 0.05$). Low salt intake did not change the phenylephrine-induced vasoconstriction but increase acetylcholine-induced vasodilatation. It also increased the effects of NO synthase inhibition with L-NAME (100 mM) on phenylephrine responses and iNOS expression was increased in low salt group. The cyclooxygenase inhibitor, indomethacin (10 μ M) and the COX-2 inhibitor NS 398 (1 μ M) reduced the reactivity to phenylephrine in low salt treated group and COX-2 protein expression was increased in low salt. The effects of apocynin (10 μ M); the superoxide anion scavenger, tiron (1 mM); the hydrogen peroxide scavenger, catalase (1000 U·mL⁻¹); and the ACE and AT₁ receptor blockers, enalapril (10 μ M) and losartan (10 μ M) on vascular reactivity were not different between the two groups. The level of AT₁ protein expression was similar in all groups. **Conclusions:** These findings suggest that low salt diet modulates mesenteric vasoreactivity response probably by increased NO bioavailability and vasoconstrictor prostanoid production through the COX-2 pathway, respectively in spontaneously hypertensive rats. ROS and the local renin-angiotensin system are not involved in the vascular response.

Keywords: Low salt diet; hypertension; endothelium; vascular reactivity; nitric oxide; COX-2; reactive oxygen species; renin-angiotensin system.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O SÓDIO E A POPULAÇÃO

O sódio, normalmente encontrado em alimentos na forma de cloreto de sódio, é um componente essencial da dieta. Por ser o principal cátion do meio extracelular, a concentração de sódio é determinante na regulação da pressão osmótica e na manutenção da homeostasia. Variações na concentração plasmática de sódio podem ter efeitos importantes sobre o volume de líquido intersticial e plasmático, equilíbrio ácido-base, manutenção da atividade elétrica celular, além da capacidade de resposta do sistema cardiovascular para os agentes pressóricos endógenos circulantes (Franco e Oparil, 2006).

O sal, constituído por cloreto de sódio, é um dos principais alimentos aditivo, e é importante para a conservação dos alimentos, bem como para o aprimoramento do gosto. Assim, 1 g de sódio está contido em 2,5 g de sal. Um mmol de sódio equivale a 23 mg de sódio (Mohan e Campbell, 2009).

1.1.1 Ingestão de sódio

Em indivíduos saudáveis, praticamente todo sódio ingerido é absorvido, e sua excreção urinária é o principal mecanismo de manutenção de seu equilíbrio no organismo (Holbrook et al, 1984). As populações humanas são capazes de viver em condições extremas de consumo de sódio, por exemplo, como os índios ianomâmis do Brasil que consomem apenas cerca de 0,46 g / dia de sódio até o consumo de mais de 13,8 g/dia que ocorre no norte da Japão (Institute of medicine, 2004).

A capacidade de sobreviver a concentrações extremamente baixas de ingestão de sódio reflete a capacidade dos humanos em conservar sódio, reduzindo a sua perda na urina e suor. Sob condições de adaptação máxima e sem suar, a

mínima quantidade de sódio necessária para repor as perdas é estimado em não mais do que 0,18 g/dia. Por outro lado, rins humanos podem excretar muito rapidamente grandes cargas de sal, permitindo à adaptação a ingestão aguda ou crônica de sal sem grandes alterações na pressão arterial ou homeostase (Institute of medicine, 2004).

São observadas diferenças importantes quando se compara países desenvolvidos e em desenvolvimento em relação à procedência do sódio. Nos países desenvolvidos, acredita-se que a maior parte do sódio consumido provenha de alimentos processados. Em contrapartida, nos países em desenvolvimento, a maior parte do consumo de sódio seja proveniente do sal de cozinha adicionado no preparo dos alimentos e de condimentos à base de sal (Anderson et al, 2010).

A ingestão de sódio recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é de no máximo 2 g de sódio/dia, o equivalente a 5 g de sal/dia (WHO, 2003; WHO, 2012). Na maioria das populações, a ingestão de sódio encontra-se acima de 2,3 g/dia (Holbrook et al, 1984; He e MacGregor, 2009). Nas sociedades mais industrializadas o consumo médio pode chegar a 3,5 g de sódio/dia (Franco e Oparil, 2006). Esses valores representam um consumo de sódio bem acima das necessidades fisiológicas mínimas, que é estimado em apenas 0,20-0,50 g/dia. (Holbrook et al, 1984; He e MacGregor, 2009).

Em 2003, Bisi Molina et al realizaram um estudo de base populacional na cidade de Vitória-ES que estimou que esta população ingeria mais do que o dobro de sal recomendado pela OMS. Os valores médios de consumo diário de sal em Vitória-ES eram da ordem de 12,5g em adultos, o que equivale a aproximadamente 5 g de sódio/dia. Na mesma época, a Associação Americana do Coração (*AHA-American Heart Association*) recomendava um consumo de sal inferior a 6 g/dia (ou seja, não mais do que 2,3 g de sódio/dia) para a população em geral e para indivíduos hipertensos, diabéticos, negros, doentes renais crônicos e adultos com mais de 50 anos deveria ser de até 1,5 g/dia de sódio, ou seja, 4 g de sal/dia (Bisi Molina et al, 2003; Pearson et al, 2002; Kotchen, 2013).

Porém, como nos EUA, os Centros para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) apresentaram resultados mostrando que quase 70% da população americana estava incluída em grupos para os quais era recomendada uma ingestão máxima de 1,5 g de sódio por dia, conseqüentemente a partir de 2010, a AHA, passou a recomendar uma ingestão de sódio inferior a 1,5 g/dia para toda a população americana (Whelton et al, 2012).

Estudos populacionais e de intervenção mostraram que uma redução do alto consumo de sal nas populações em geral contribuíam para redução na morbimortalidade geral e para a morbi-mortalidade cardiovascular de modo específico. Assim, vários países passaram a adotar metas de consumo médio de sal na população em geral e não só apenas para uma população específica.

Nas recomendações da OMS, a meta é reduzir a ingestão de sódio para < 2 g/dia até 2025, ou seja, um pouco mais de 5 g de sal/dia por pessoa (Kotchen, 2013). Em 2011, o Ministério da Saúde do Brasil lançou o “Plano de Redução do Sódio em Alimentos Processados” como parte integrante das Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNT).

1.1.2 O consumo de sódio e o sistema cardiovascular

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA). Atualmente, o critério diagnóstico de hipertensão em adultos é a aferição de uma pressão sistólica de repouso igual ou maior do que 140 mmHg e/ou a diastólica acima de 90 mmHg (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010; Nascimento et al, 2013).

A HAS é um dos principais fatores de risco para doença cardiovascular e devido a sua alta incidência, torna-se um dos principais problemas de saúde pública no Brasil e no mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde

(OMS), a HAS é responsável por mais de 7 milhões de óbitos em todo o mundo, sendo que a sua prevalência na população urbana adulta brasileira em 2009 variou entre 22,3 - 43,9%, produzindo um impacto direto nas taxas de mortalidade, morbidade e incapacidade (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010).

O consumo excessivo de sal se associa com vários efeitos prejudiciais a saúde, com diversas evidências na literatura demonstrando a relação entre o alto consumo de sal e doenças cardiovasculares (Strazzullo et al, 2009; WHO, 2007). Estudos mostram que o aumento do teor de sódio no organismo promove elevação da pressão arterial, hipertrofia cardíaca, prejuízo do relaxamento ventricular, disfunção endotelial e injúria renal, predispondo assim, ao aparecimento das doenças cardiovasculares (Yu et al, 1998; Franco e Oparil, 2006; dos Santos et al, 2006).

O *Intersalt* (primeiras publicações em 1988) e o *Dietary Approaches to Stop Hypertension* (DASH) em 2001, foram dois grandes estudos populacionais que contribuíram muito para o entendimento do efeito da dieta sobre a pressão arterial. O *Intersalt* incluiu 10.079 indivíduos selecionados de diferentes comunidades de áreas industrializadas e não industrializadas, com diferentes teores de sódio na alimentação usual e observou-se uma relação direta entre a ingestão de sódio e o valor médio da pressão arterial em cada população, sendo estimado que valores acima de 6 g/dia na ingestão de sal por mais de 30 anos conduziria a um aumento da pressão arterial sistólica de 9 mmHg. O DASH, um estudo de intervenção, testou os efeitos de diferentes padrões alimentares sobre a pressão arterial em 412 participantes. Foi avaliado três níveis de ingestão de sódio (4, 6 e 8 g/dia) em duas dietas diferentes: a dieta americana usual e a dieta DASH (rica em frutas, verduras e grãos, incluindo derivados desnatados do leite, peixe, legumes, aves e carnes magras, com conteúdo reduzido de doces e bebidas). A conclusão desse estudo foi que, além de se perceber uma redução da pressão arterial com a redução da ingestão de sal em todos os participantes, os benefícios para a saúde em longo prazo dependiam da capacidade das pessoas mudarem a dieta e aumentarem

a disponibilidade de alimentos com menor teor de sódio (Sacks et al, 2001; Olmos e Benseñor, 2001).

Em uma simulação computacional, Bibbins-Doming et al (2010) estimaram os efeitos benéficos de uma redução do sódio na dieta de até 1,2 g/dia em diversos desfechos sociais e de saúde da população americana, tais como, uma redução de 66 a 120 mil eventos coronarianos, redução de 99 mil casos de infarto do miocárdio, redução de até 92 mil mortes e uma economia de até 24 bilhões /ano nos gastos com saúde.

Já foi evidenciado também através de estudos clínicos e experimentais que o consumo excessivo de sal promove danos cardiovasculares que vão além da elevação da PA (Tuomilehto et al, 2001), com lesão direta no coração, vasos e rins (Varagic et al, 2006; Mercier et al, 2007; Endemann et al, 2004).

Dieta rica em sódio tem sido associada com a disfunção vascular, caracterizada pelo aumento da resistência vascular periférica (Nishida et al, 1998; Solofa et al, 2002), assim como a produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (Lenda e Boegehold, 2002) e diminuição da óxido nítrico sintase (NOS) (Ni e Vaziri, 2001). Além disso, o aumento do consumo de sódio comprometeu o relaxamento dependente do endotélio em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Kagota et al, 2001).

Analisando aos efeitos do consumo excessivo de sal sobre a função renal, Matavelli et al (2007) demonstraram que ratos SHR submetidos a sobrecargas crescentes de sal (4, 6 e 8% na dieta) durante 2 meses, desenvolvem disfunção renal precoce e grave com elevados graus de proteinúria e albuminúria, refletindo em uma exacerbação da doença hipertensiva promovida pela alta ingestão de sal.

Assim, por se conhecer os efeitos maléficos da alta ingestão de sódio, sobre o sistema cardiovascular e controle pressórico, pacientes com doenças cardiovasculares, especialmente os hipertensos, adotam uma dieta com restrição excessiva de sódio. Porém, a indicação de uma dieta com redução na concentração de sódio, para toda a população é um assunto ainda controverso

e tem sido objeto de intensa discussão na literatura atual, já que ainda existem dúvidas se tal medida traria apenas benefícios.

Dois grandes estudos de intervenção *Trials of Hypertension Prevention* (TOHP) - TOHP I (1,9 g de sódio / dia) e TOHP II (2,5 g de sódio/dia) (Cook et al, 2007) evidenciaram que a redução de sal a longo prazo leva a uma menor pressão arterial em indivíduos normotensos e hipertensos, além de uma redução na mortalidade por doença cardiovascular. Em contrapartida, outros importantes estudos não observaram efeitos benéficos da dieta de baixo sódio em pacientes com insuficiência cardíaca. A dieta de baixo sal apresentou efeitos renais e neuro-hormonais prejudiciais, aumento da concentração plasmática de renina, aldosterona, adrenalina, noradrenalina, colesterol e triglicerídeos (Paterna et al, 2008, Rogacz, et al, 1990; Graudal et al, 2012), além de aumento no tempo de hospitalização e da mortalidade para causas cardiovasculares (Paterna et al, 2008; Klein et al, 2005).

Em 2011, Stolarz-Skrzypek et al realizaram um estudo populacional, prospectivo, envolvendo 3681 participantes sem doença cardiovascular (DCV) e evidenciaram que os indivíduos que tiveram um menor consumo de sódio apresentaram maior taxa de mortalidade e de eventos cardiovasculares. Nesse estudo, mesmo sendo observado que a elevação da pressão arterial sistólica estava associada a um maior consumo de sódio, ao contrário do que se esperava, não houve um aumento do risco de eventos cardiovasculares.

A revista *American Journal of Hypertension* publicou em 2013 artigos de defensores e críticos das atuais recomendações da OMS e AHA sobre a ingestão máxima diária de sódio com o objetivo de alertar sobre a conclusão do relatório do Instituto de Medicina (IOM) de que ...“os resultados de estudos de saúde são inconsistentes em qualidade e insuficientes em quantidade, para determinar se a ingestão de sódio abaixo de 2.300 mg/dia pode aumentar ou diminuir o risco de doença cardíaca, acidente vascular cerebral, ou todas as causas de mortalidade na população geral dos EUA”... (Kotchen, 2013). Estudiosos alegam que apesar da restrição de sódio reduzir a pressão arterial de hipertensos, não existe uma informação conclusiva disponível para mostrar

que essa redução é benéfica ou prejudicial em termos de resultados relevantes para o paciente (Matyas et al, 2011). Com isso, as evidências para a redução da morbidade e mortalidade das doenças cardiovasculares como resultado da redução da ingestão de sódio permanecem controversas.

Mesmo entendendo que as políticas de restrição de sal para a população geral devam prosseguir, principalmente devido ao consumo excessivo de sal em quase todo o mundo, a recomendação de uma forma generalizada do uso de dietas de baixo sódio para quaisquer pacientes deveria ser visto com certa cautela (Alderman et al, 1995). De acordo com a American Society of Clinical Nutrition as dietas de restrição salina para sub-grupos específicos de pacientes mereceriam estudos mais aprofundados (Bernstein e Willet, 2010)

Apesar de vários estudos descreverem seu efeito anti-hipertensivo, as dietas de restrição salina para sub-grupos específicos de pacientes pode aumentar o risco de eventos cardiovasculares (Paterna et al, 2008; Klein et al, 2005; Stolarz-Skrzypek et al, 2011). Entretanto, os mecanismos pelos quais a redução do sódio no organismo promove alterações cardiovasculares ainda não estão esclarecidos. Assim, estudar o impacto da redução no consumo de sal em modelos experimentais de hipertensão arterial pode fornecer informações de relevância para o entendimento da fisiopatologia e mecanismos moleculares envolvidos nessa dieta.

Alguns modelos experimentais de indução de hipertensão arterial envolvem mecanismos que contribuem para o melhor entendimento da hipertensão arterial no homem. O SHR (*spontaneously hypertensive rats*), que é um modelo de hipertensão espontânea, desenvolvido por Okamoto e Aoki (1963) destaca-se dentre os modelos de animais que desenvolvem hipertensão de origem genética. Ele é considerado um excelente modelo da HA essencial do homem pela similaridade da sua fisiopatogenia com a hipertensão primária no homem (Trippodo e Frohlich, 1981).

1.2 TÔNUS VASCULAR E SUA REGULAÇÃO

A disfunção endotelial vascular está associada com a hipertensão arterial, que é um importante fator de risco para doenças cardiovasculares na população em geral. Uma disfunção no 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; Widlansky et al, 2003; Jablonski et al, 2013; Dickinson et al, 2009; Seals et al, 2011).

As alterações decorrentes da disfunção endotelial nos processos hipertensivos são multifatoriais e em muitos casos, parecem depender do tipo de hipertensão desenvolvida, de sua duração e do leito vascular estudado. Há controvérsias na literatura em relação ao relaxamento vascular dependente do endotélio na hipertensão arterial, podendo estar diminuído, inalterado ou até mesmo aumentado (Lee et al, 1987; Angus e Cocks, 1989; Panza et al, 1990; Mantelli et al, 1995; Taddei et al, 1997; Briones et al, 1999).

O papel da ingestão de sódio nas doenças cardiovasculares, em particular hipertensão e na disfunção endotelial vascular, tem sido uma questão de debate. Assim, para melhor compreender os efeitos da restrição do sódio sobre os vasos sanguíneos, é necessária uma breve revisão sobre os componentes vasculares e a regulação do tônus vascular.

O tônus do músculo liso vascular é um fator determinante de resistência vascular. Da mesma forma, a resistência vascular periférica é importante na regulação da pressão sanguínea e na distribuição do fluxo sanguíneo entre e dentro dos tecidos e órgãos do corpo. A regulação da atividade contrátil das células do músculo liso vascular (CMLVs) é dependente de uma complexa interação entre estímulos vasodilatadores e vasoconstritores oriundos de hormônios, neurotransmissores, fatores derivados do endotélio e pressão

sanguínea (Jackson, 2000; Blaustein e Hamlyn, 2010), sendo o seu estado contrátil determinante para o diâmetro do lúmen arterial, o que irá afetar o fluxo e a pressão sanguínea (Mulvany e Halpern, 1977).

Para desencadear a contração, as células musculares lisas vasculares requerem um aumento na concentração de Ca^{+2} citoplasmático. Este aumento pode resultar tanto do influxo do Ca^{+2} através de canais específicos da membrana citoplasmática, quanto de liberação dos estoques intracelulares, como o retículo sarcoplasmático, aumentando a oferta do Ca^{+2} à maquinaria contrátil (Lincoln et al, 2001).

Fatores derivados do endotélio vascular, hormônios, neurotransmissores e agentes farmacológicos possuem capacidade regulatória sobre a atividade contrátil das células do músculo liso vascular e, portanto, sobre o tônus vascular, fator determinante da resistência vascular periférica, e, conseqüentemente, da pressão arterial.

1.2.1 Endotélio vascular

O endotélio é constituído por uma camada de tecido pavimentoso localizado entre o sangue o músculo liso vascular, servindo como uma barreira semipermeável, regulando o fluxo de nutrientes e substâncias. Além disso, o endotélio é fundamental no controle do tônus vascular por liberar vários fatores que modulam a contratilidade e o relaxamento do músculo liso vascular (Triggle et al, 2003; Kolluru et al, 2010).

Os principais fatores vasodilatadores produzidos pelo endotélio são: o óxido nítrico, o fator hiperpolarizante derivado do endotélio e a prostaciclina. Dentre os principais fatores contráteis estão: as prostaglandinas, os tromboxanos, a endotelina I, a angiotensina II e as espécies reativas do oxigênio (EROS) (Félétou e Vanhoutte, 2006). A Figura I elucida os fatores relaxantes e contráteis derivados do endotélio. O equilíbrio na produção desses mediadores é importante para regulação do tônus vascular.

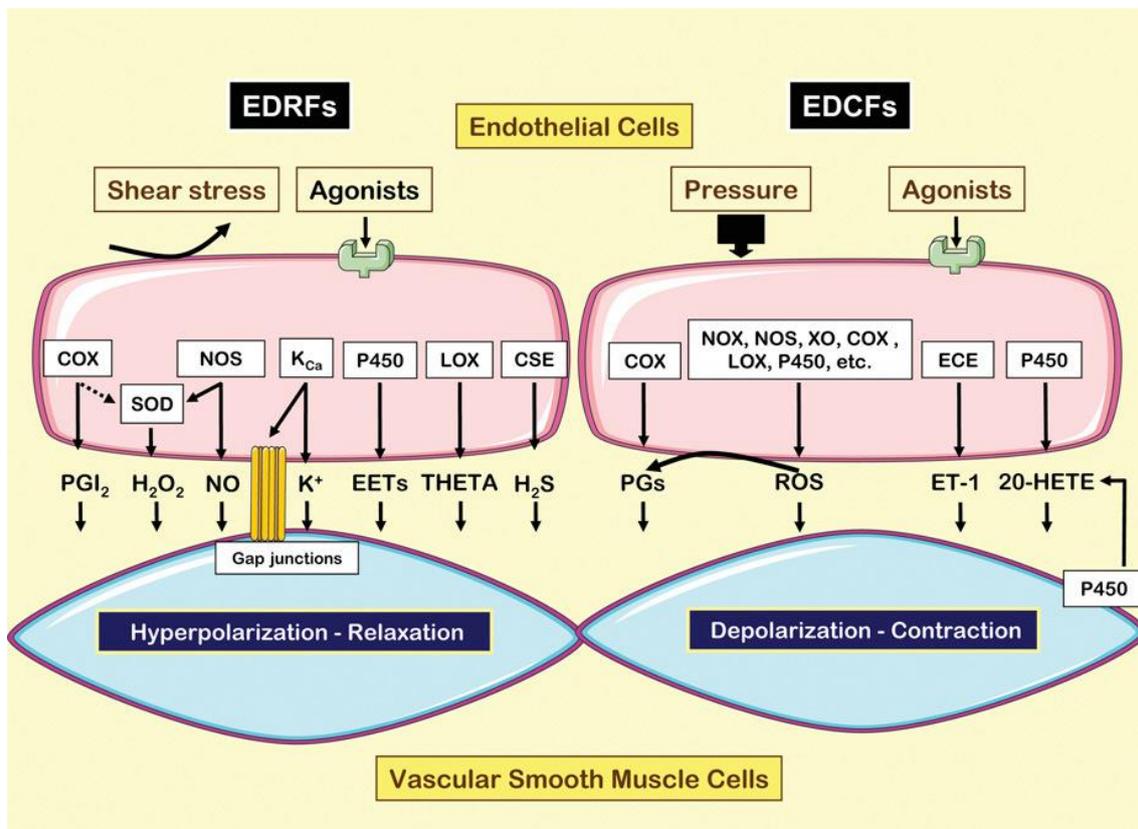


Figura 1: Fatores relaxantes e contráteis derivados do endotélio. 20-HETE, o ácido 20- hidroxieicosatetraenóico; K_{Ca}, canais para potássio ativados por cálcio; COX, ciclooxigenase; LOX, lipooxigenase; EC, células endoteliais; EDCFs, fatores vasoconstritores derivados do endotélio; EDRFs, fatores vasodilatadores derivados do endotélio; EETs, ácidos epoxieicosatrienoicos; NOS, óxido nítrico; H₂O₂, o peróxido de hidrogênio; NOX, NAD(P)H-oxidase; P450-2C 2J ou 4A, o citocromo P450; PGI₂, prostaciclina; PGs, prostaglandinas; ROS, espécies reativas de oxigênio; SOD, superóxido-dismutase; ET-1, endotelina; VSMC, célula do músculo liso vascular; XO, xantina oxidase; H₂S, sulfeto de hidrogênio. (Fonte: Félétou e Vanhoutte, 2009).

Assim, para entender a ação da dieta hipossódica no sistema cardiovascular, em especial na regulação do tônus do músculo liso vascular através da liberação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras vamos discutir sobre algumas vias que participam do controle do tônus vascular.

1.2.2 Óxido Nítrico

Furchgott e Zawadzki, em 1980, foram os primeiros a relatar a descoberta do Fator Relaxante Derivado do Endotélio (EDRF), ao demonstrarem a capacidade das células endoteliais de liberar um potente vasodilatador (Furchgott e Zawadzki, 1980; Moncada et al, 1991). Após especulações sobre qual molécula/substância seria, de fato, este fator vasodilatador, descobriu-se que o EDRF era o radical livre biatômico óxido nítrico (NO) (Palmer et al, 1987; Angus e Cocks, 1989; Moncada et al, 1991; Marin e Rodriguez- Martinez, 1997).

O NO é um radical livre inorgânico altamente reativo, em estado gasoso, o que o permite difundir facilmente pelas membranas celulares promovendo vasodilatação. Sua síntese resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios da L-arginina que é convertido em L-citrulina, reação que é catalisada pela óxido nítrico sintase (NOS). Em condições fisiológicas o relaxamento ocorre pela estimulação de receptores (da acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato, substância P, serotonina e outros) na membrana das células endoteliais ou por vários estímulos físicos e químicos, como estiramento vascular produzido por aumento da pressão arterial, estresse de cisalhamento (*shear stress*), levando a ativação da NOS e consequente produção de NO (Fèlètou e Vanhoutte, 2009, Marín e Rodriguez-Martínez, 1997; Moncada et al, 1991).

Existem três isoformas da sintase do óxido nítrico: duas constitutivas, presentes em células endoteliais (óxido nítrico sintase endotelial, eNOS) ou em células neuronais (óxido nítrico sintase neuronal, nNOS); e outra isoforma que não se apresenta de forma constitutiva, mas que pode ser induzida por estímulos imunológicos, que levam ao aumento de cálcio intracelular e ativação da expressão em macrófagos, células endoteliais, cardiomiócitos, dentre outros tipos celulares (óxido nítrico sintase indutível, iNOS) (Förstermann e Sessa, 2012).

O óxido nítrico, produzido pelas células endoteliais, promove vasodilatação difundindo-se rapidamente para as células musculares lisas onde ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs). Quando ativada, esta enzima promove a formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) a partir do trifosfato de guanosina (GTP). O aumento da concentração de GMPc leva à ativação da proteína quinase G (PKG) que fosforila diversas proteínas, reduzindo a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio e, assim, promovendo o relaxamento da musculatura lisa vascular (Moncada et al, 1991; Cannon, 1998) (Figura 2).

O óxido nítrico constitui um dos fatores mais importantes na regulação do tônus vascular (Moncada et al, 1991; Marín e Rodríguez Martínez, 1997), com reconhecida capacidade vasodilatadora. Estudos corroboram a teoria de que em SHR a síntese de NO está normal ou até mesmo elevada, embora sua degradação esteja potencializada devido ao aumento na produção de radicais livres (Nava et al, 1995; Briones et al, 1999 e 2002).

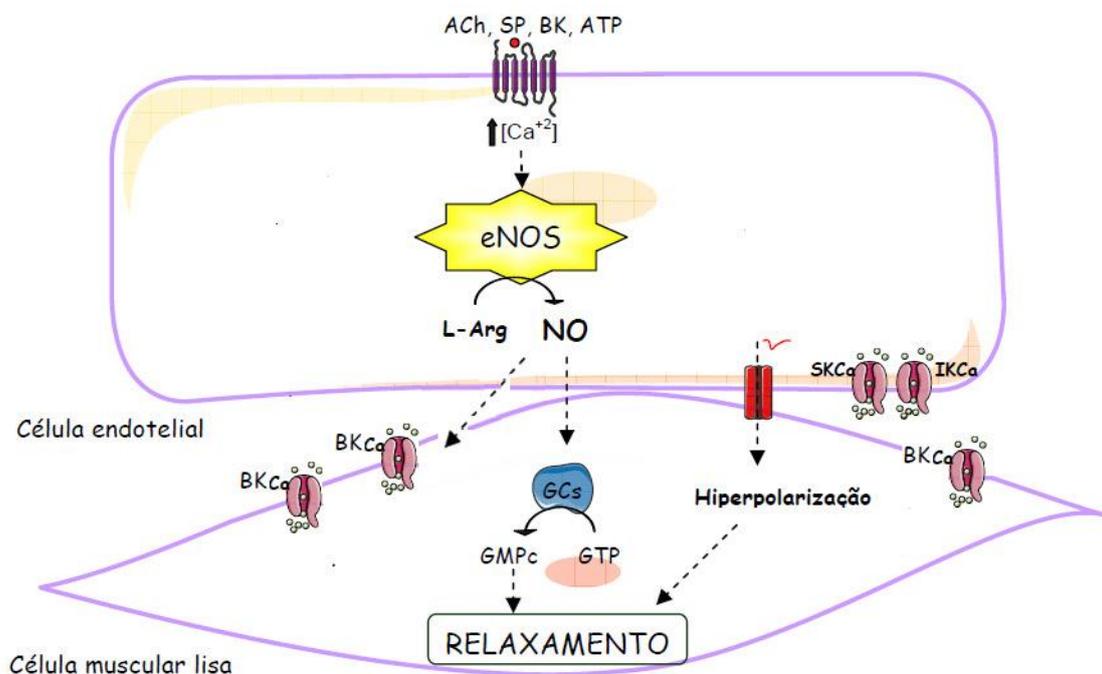


Figura 2: Via de produção do óxido nítrico (NO) pela enzima eNOS. Esta via pode ser ativada após a estimulação de receptores das células endoteliais em cuja via de

sinalização ocorra o aumento da concentração intracelular do Ca^{2+} . Dentre os agonistas pode-se citar a acetilcolina (ACh), substância P (SP), bradicinina (BK), e adenosina trifosfato (ATP). Após a liberação pelas células endoteliais, este mediador exerce sua ação nas células musculares lisas, através da produção do segundo mensageiro, GMPc, ou ainda através da hiperpolarização (modificado de Rattmann, 2009).

Já está bem estabelecido na literatura que a sobrecarga de sal pode alterar a biodisponibilidade de NO (Zhu, 2004 e 2007, Nurkiewicz e Boegehold, 2007, Ni e Vaziri, 2001, Kagota et al, 2002, Matrougui et al, 1998). Entretanto em condições de baixo sódio, os achados ainda não são concretos (Jablonski et al, 2013)

1.2.3 Ciclooxygenase-2 (COX-2)

Com a descoberta em 1980 do EDRF, acreditava-se que o endotélio era responsável apenas pela produção de fatores relaxantes. Porém posteriormente, observou-se que o endotélio vascular também produzia fatores vasoconstritores, além dos vasodilatadores (De Mey e Vanhoutte, 1982). A descoberta dos fatores vasoconstritores derivados do endotélio se deu principalmente pela inibição da contração vascular induzida por diversos inibidores da ciclooxygenase (Miller e Vanhoutte, 1985). Hoje se sabe que os fatores constritores derivados do endotélio (EDCF) são prostanóides derivados do ácido araquidônico (AA) e podem atuar sobre o leito vascular promovendo tanto a vasoconstrição como a vasodilatação e, por este motivo, estão diretamente relacionados ao controle do tônus e da reatividade vascular em condições fisiológicas e patológicas. A produção destes prostanóides depende da disponibilidade de ácido araquidônico, da atividade das ciclooxygenases e sintases das prostaglandinas (Davidge, 2001; Adeagbo et al, 2005; Alvarez et al, 2005 e 2007).

Os prostanóides mais comuns são prostaciclina I₂ (PGI₂), prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina D₂ (PD₂), prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) e o tromboxano A₂ (TXA₂). Esses prostanóides são derivados do ácido araquidônico (AA), sendo este um constituinte dos fosfolipídios de membrana, que é liberado por

ação da fosfolipase A2 (PLA2). Após sua liberação o AA será oxidado pela ciclooxigenase (COX), enzima chave na síntese de prostanóides, e convertido a prostaglandina H2 (PGH2), precursor imediato de muitos prostanóides (Bos, et al, 2004).

Há duas isoformas principais da ciclooxigenase, denominadas ciclooxigenase-1 (COX -1) e 2 (COX-2) que realizam a síntese das prostaglandinas (PG) e do tromboxano A2 (TXA2). A COX-1, considerada a isoforma constitutiva, é expressa em muitos tecidos e sintetiza pequenas quantidades de PGs e tem como principal função a manutenção das funções fisiológicas (Smith et al, 1996). A COX-2 é a isoforma induzida por estímulos pró-inflamatórios, citocinas, fatores mitogênicos e endotoxinas e tem a expressão relacionada principalmente com processos inflamatórios (Wu, 1995, Antman et al, 2005).

As isoformas da COX convertem o ácido araquidônico em prostaglandina H2 e esta por ação de sintases específicas é convertida em prostaglandina E2 (PGE2), prostaglandina I2 (PGI2), prostaglandina F2 α (PGF2 α), prostaglandina D2 (PGD2) ou TXA2 (Mardini e FitzGerald, 2001). Mais recentemente foi descrita a COX-3 (Chandrasekharan et al, 2002), cuja função está relacionada à síntese de prostanóides que medeiam a febre e a dor (Schwab et al, 2003).

Os prostanóides, após serem sintetizados, vão se unir a receptores acoplados a proteínas G. Existem oito diferentes tipos de receptores para os prostanóides da COX: EP₁, EP₂, EP₃, EP₄, IP, FP, DP e TP. Após a união com os respectivos receptores os prostanóides vão exercer seus efeitos sobre o leito vascular. Os receptores EP₂, EP₄, IP e DP quando ativados pelos prostanóides estimulam a adenilato ciclase, promovem aumento do AMPc e relaxamento do músculo liso vascular. Os receptores EP₁, EP₃, FP e TP quando ativados promovem a contração do músculo liso vascular por distintos mecanismos. Os receptores EP₁, FP e TP promovem vasoconstrição pelo aumento dos níveis de Ca²⁺ intracelular, enquanto os receptores EP₃ inibem a adenilato ciclase, reduzem os níveis de AMPc e promovem a vasoconstrição (Wright et al, 2001).

Em condições fisiológicas existe um equilíbrio entre a formação de prostanóides vasodilatadores e vasoconstritores derivados da COX, contribuindo para manutenção do tônus vascular. Contudo, em algumas doenças vasculares a produção de prostanóides constritores encontra-se aumentada (Vanhoutte et al, 2005). Em determinados modelos de hipertensão se tem observado um aumento na síntese de fatores endoteliais contráteis derivados de COX (Vanhoutte, 1995; Taddei et al, 1997; Davidge, 2001), os quais poderiam ser responsáveis pelo prejuízo no relaxamento (Dohi et al, 1996; Zhou et al, 1999), assim como o incremento da vasoconstrição induzida por agonistas (Taddei e Vanhoutte, 1993). Além da participação da COX na manutenção das condições fisiológicas, atualmente é bem conhecida a implicação dos prostanóides derivados desta via no processo patológico de várias doenças que cursam com inflamação, como as cardiovasculares e renais (Vane et al, 1994; Schonbeck et al, 1999; Wu, 1995). Em modelos experimentais de hipertensão foi notada maior expressão da COX-2 e maior participação dos prostanóides contráteis derivados desta via na resposta vascular a fenilefrina (Alvarez et al, 2005).

Apesar de já se conhecer a participação da COX no controle do tônus e da reatividade vascular em condições fisiológicas e patológicas, poucas são as publicações que relacionaram o efeito da dieta de restrição de sódio na participação de prostanóides derivados da COX-2. Estudos observaram aumento da COX-2 no córtex renal, particularmente nas células da mácula densa (Yang et al, 1998; Pöschke et al, 2012).

1.2.4 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

O termo estresse oxidativo define-se como a condição que envolve um aumento na produção das espécies reativas do oxigênio, onde há uma incapacidade das enzimas antioxidantes de controlarem essa produção, ocasionando também um desequilíbrio na biodisponibilidade do sistema enzimático (Paravicini e Touyz, 2008). O aumento do estresse oxidativo é evidenciado em várias doenças do sistema cardiovascular, sendo caracterizado

por aumento de espécies reativas de oxigênio ou por uma redução das defesas antioxidantes (Suzuki et al, 1995; Hamilton et al, 2001; Wu et al, 2001; Lassègue et al, 2012).

Todos os tipos de células podem produzir EROs, que são moléculas derivadas do metabolismo do oxigênio, eletricamente instáveis e potencialmente reativas com moléculas biológicas capazes de causar oxidação, sendo as de maior relevância: ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH\cdot$). Com importante fonte celular geradora de radicais livres pode-se citar a mitocôndria, que além de ser fonte geradora de energia (ATP), pelo processo de fosforilação oxidativa é também a principal geradora de espécies reativas de oxigênio em condições fisiológicas e patológicas, pela adição de um elétron a molécula de oxigênio (Lee e Wei, 2007). Outras importantes fontes de EROs são a xantina oxidase, mieloperoxidases, ciclooxigenases, lipooxigenases, NOS na falta de substrato ou cofatores, isoenzimas da citocromo P450 e as enzimas da família das NADPH oxidases (Mueller et al, 2005; Bedard e Krause, 2007; Koh et al, 2009). Weseler e Bast (2010), por meio de uma revisão bibliográfica, propuseram as fontes celulares de geração do estresse oxidativo, conforme demonstra a figura 3.

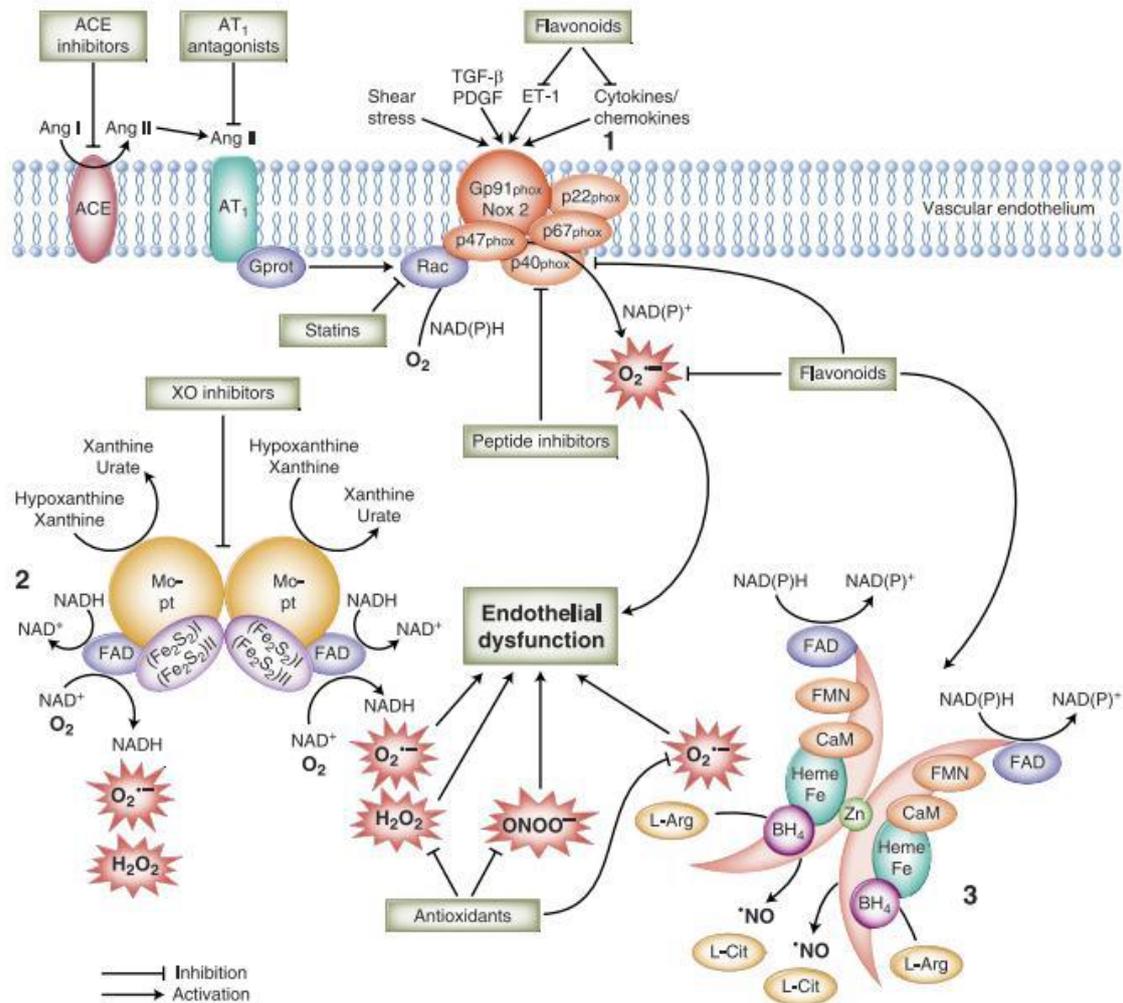


Figura 3: Fontes celulares de geração do estresse oxidativo vascular e algumas estratégias de intervenções farmacológicas. (1) NADPH- oxidase (2) xantina oxidase (3) óxido nítrico sintase desacoplada. Juntas promovem a produção de espécies reativas de oxigênio (*Modificado de Weseler & Bast , 2010*).

As células vasculares produzem EROs em condições normais, sendo estas espécies encontradas em baixos níveis no interior da célula e são constantemente geradas e destruídas por sistemas endógenos e estímulos ambientais. O adequado equilíbrio entre a geração e a inativação das EROs é necessário para que estas espécies modulem a função vascular, através da ativação de vias de sinalização intracelulares que provocam a proliferação celular, remodelamento vascular, desenvolvimento de processo inflamatório e alteração no tônus vascular (Szasz et al, 2007; Weseler & Bast, 2010; Zinkevich & Gutterman, 2011).

No sistema vascular, o ânion superóxido assume destacada relevância entre as EROs, sendo formado pela redução univalente do oxigênio que é mediada por enzimas como a NADPH oxidase e xantinas oxidases e também a partir da NOS desacoplada (Weseler e Bast, 2010; Förstermann & Sessa, 2012). Após sua formação, o ânion superóxido, além de exercer seus efeitos em diferentes vasos sanguíneos e órgãos, pode dar origem a outras EROs. O ânion superóxido reage com o óxido nítrico, inativando-o e originando o peróxido de nitrito (ONOO-) e por ação da enzima antioxidante superoxidodesmutase (SOD), o ânion superóxido é dismutado em peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o qual pode ser convertido em água por ação da glutathiona peroxidase (GPx) ou da catalase.

O H₂O₂ regula vias de sinalização que levam a contração e ao crescimento do músculo liso vascular, migração e inflamação. O H₂O₂ também pode ser metabolizado pela mieloperoxidase e formar o ácido hipocloroso (HOCl) ou também reagir com metais de transição e dar origem ao radical hidroxila (OH⁻) (Griedling et al, 2000; Szocs et al, 2002). Dentre as EROs, o O₂^{•-}, o peroxinitrito e o radical hidroxila são as mais instáveis e reativas enquanto o peróxido de hidrogênio é a mais estável (Taniyama e Griendling, 2003). A catalase, importante antioxidante intracelular, é mais efetiva quando o estresse oxidativo está em altos níveis e participa da reação que transforma o H₂O₂ em H₂O e O₂ (Cai, 2005; Sindhu et al, 2005; Gongora et al, 2006).

Dentre as enzimas oxidantes, a NADPH oxidase é a mais importante fonte geradora de ânion superóxido, sendo constituída por diferentes subunidades: gp91phox (mais conhecida como NOX, subunidade catalítica), p22phox, p47phox, p67phox, p40phox e rac2 (proteína G de baixo peso molecular) (Griendling et al, 2000). A p22phox é a subunidade essencial para o adequado funcionamento da NADPH oxidase, principalmente na formação de O₂^{•-} nas células. Subunidades homólogas da gp91phox foram descritas, e estas fazem parte da família da NOX (vem de "Nonphagocytic NADPH oxidase"), composta pela NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2 que são expressas em vários tecidos e estão ligadas a funções biológicas relacionadas com a defesa e o crescimento celular (McIntyre et al, 1999; Lassègue e Clempus,

2003; Geiszt, 2006; Drummond et al, 2011). As diversas isoformas, que geralmente se definem pela subunidade catalítica que possui, diferenciam-se pela regulação e localização específica, além das EROs que produzem. Assim, NOX-1, NOX-2 e NOX-5 geram ânion superóxido e NOX-4, DUOX-1 e DUOX-2 geram H₂O₂ (Drummond et al, 2011).

Os principais componentes do complexo enzimático NADPH oxidase, NOX1 e NOX4, são altamente expressos nas células vasculares e o aumento da expressão de diferentes NOXs, incluindo a NOX1 e NOX4, tem sido implicada em várias doenças cardiovasculares, tais como aterosclerose, hipertensão, diabetes, isquemia/reperfusão, restenose ou aneurismas da aorta abdominal. Assim, EROs derivados de NOX contribuem para o stress oxidativo, inflamação vascular, disfunção endotelial e remodelação vascular observado nestas patologias cardiovasculares (Dikalova et al, 2005; Drummond et al, 2011; Lassègue et al, 2012; Montezano e Touyz, 2014).

Muito embora o organismo possa gerar grandes quantidades de EROs, em contrapartida são sintetizadas substâncias antioxidantes que inativam as EROs, levando, assim, ao equilíbrio desse sistema. Desse modo, o estresse oxidativo seria um desarranjo deste equilíbrio, na qual substâncias pró-oxidantes se sobrepõem à capacidade antioxidante do organismo. Além disso, as EROs ativam metaloproteinases e possibilitam uma inclinação do balanço endotelial para a produção de fatores vasoconstritores, os quais possuem papel fundamental na patogênese de enfermidades vasculares (Griendling e Fitzgerald, 2003). Um mecanismo notório que influencia as doenças cardiovasculares é a reação do ânion superóxido com o óxido nítrico, o que leva à diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico e, portanto, aos efeitos vasodilatadores e antiinflamatórios do óxido nítrico; além da formação de peroxinitrito, que contribui para o estresse oxidativo. Além disso, o ânion superóxido também contribui para o processo inflamatório, participando do aumento da expressão de COX-2, presente na hipertensão arterial (Martínez-Revelles et al, 2013; Alvarez et al, 2007; Martín et al, 2012).

Outro aspecto que deve ser levado em consideração são os diferentes tipos de mecanismos intracelulares e extracelulares associados a atividades enzimáticas que irão se contrapor a ação das EROs e do estresse oxidativo, compondo assim o sistema antioxidante. Nos vasos está o principal sistema antioxidante composto pelas três isoformas da SOD, a catalase e a glutathione peroxidase. As diferentes isoformas da SOD catalizam a reação que transforma o ânion superóxido em H₂O₂ e O₂, sendo a SOD extracelular (ECSOD) a isoforma mais encontrada nos vasos. A glutathione peroxidase, que é importante em baixos níveis de estresse oxidativo, transforma o H₂O₂ em H₂O. Enquanto a catalase, importante antioxidante intracelular, é mais efetivo quando o estresse oxidativo está em altos níveis e participa da reação que transforma o H₂O₂ em H₂O e O₂ (Cai, 2005; Sindhu et al, 2005; Gongora et al, 2006).

Situações onde ocorre aumento da produção de EROs, redução da atividade do sistema antioxidante e aumento do estresse oxidativo estão associadas ao desenvolvimento de enfermidades como o câncer, artrites, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (Griendling e Fitzgerald, 2003; Navas-Acien et al, 2005; Prozialeck et al, 2006; Valko et al, 2006).

É sabido que as dietas ricas em sal levam a um aumento da geração de EROs na parede microvascular e, conseqüentemente, deprimem a regulação dependente do endotélio dos vasos (Lenda, 2002). Esse prejuízo na dilatação dependente do endotélio ocorre através da redução da biodisponibilidade do óxido nítrico [NO] como resultado do estresse oxidativo (Zhu et al, 2004; Nurkiewicz et al, 2007). Isto pode ser mediado através da oxidação e redução da biodisponibilidade da tetrahidrobiopterina [BH₄] (Nurkiewicz et al, 2010), que é um co-fator essencial para a produção de NO pela óxido nítrico sintase endotelial [eNOS] (Zhu et al, 2004; Nurkiewicz et al, 2010). Sem BH₄ adequada, eNOS é "desacoplada", produzindo mais ânion superóxido e menos NO (Landmesser et al, 2003). Já na dieta com restrição de sódio, ao contrário do que ocorre nas dietas ricas em sal, observou-se um aumento dos níveis de NO e redução do estresse oxidativo (Jablonski et al, 2013). É possível que a restrição de sódio na dieta "reacople" a eNOS, aumentando a produção de NO

e esse aumento dos níveis de NO pode ocorrer por um aumento da biodisponibilidade da BH4 (Landmesser et al, 2003).

1.2.5 Sistema Renina-Angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) faz parte de um complexo sistema hormonal e exerce importante papel na regulação da pressão sanguínea e na homeostase dos fluídos corporais, sendo esse sistema circulante e também local presente em diferentes tecidos como: cérebro, rins, córtex da adrenal, coração e vasos sanguíneos (Dzau, 1989; Danser e Schalekamp, 1996; Bader et al, 2001). O sistema renina-angiotensina desempenha papel vital no controle da função dos sistemas cardiovascular e renal, pois a angiotensina II, principal peptídeo efetor deste sistema, participa do controle do tônus vascular e da manutenção dos níveis de pressão arterial. Adicionalmente, é conhecido que o SRA local ou tecidual refere-se a um sistema peptidérgico com características de uma glândula endócrina (Paul et al, 2006).

O substrato do sistema renina-angiotensina é uma a-glicoproteína chamada angiotensinogênio que é liberada pelo fígado na circulação e por ação da renina, secretada pelas células justaglomerulares dos rins, é clivado em um decapeptídeo chamado angiotensina I. Este decapeptídeo por sua vez sofre a ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), que é expressa principalmente nas células endoteliais do pulmão, e é transformado em um octapeptídeo chamado angiotensina II. A angiotensina II pode atuar diretamente sobre receptores específicos localizados nas células do músculo liso vascular ou de modo indireto, através da liberação de aldosterona pela estimulação da adrenal (Quinn e Williams, 1988; Hackenthal et al, 1990; Deschepper, 1994; Hall, 2003; Persson et al, 2004). Foi identificada posteriormente outra enzima participante deste sistema, uma carboxipeptidase, denominada enzima conversora da angiotensina II (ECA II) que cliva tanto a angiotensina I como a angiotensina II em um metabólito chamado angiotensina 1-7 que tem propriedades vasodilatadoras. Tanto a ECA I como a ECA II são importantes no controle dos níveis de angiotensina II (Crackower, et al, 2002;

Danilczyk e Penninger, 2006). Porém outras peptidases também podem degradar a angiotensina II em angiotensina III e angiotensina 3-8 (Carey e Siragy, 2003).

A angiotensina II atua em dois tipos de receptores específicos, os da angiotensina tipo 1 (AT1) que são amplamente distribuídos por todos os órgãos e nos angiotensina tipo 2 (AT2). A ação da angiotensina II sobre os receptores AT1 são as que caracterizam seus efeitos mais conhecidos, de vasoconstrição e aumento da proliferação e do crescimento celular. No entanto os receptores da angiotensina tipo 2 (AT2) quando estimulados antagonizam os efeitos dos receptores AT1 e exercem efeito anti-proliferativo e anti-apoptótico. Os receptores AT2 são importantes na regulação do crescimento, na diferenciação e na regeneração do tecido nervoso, mas após o nascimento ocorre redução da sua expressão, expressão esta que pode ser induzida em algumas condições patológicas, como nas doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão, hipertrofia cardíaca, insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio e remodelação ventricular. (Griedling et al, 1996; Steckelings et al, 2005).

A atuação da angiotensina II no receptor AT1 ocorre por vias mediadas por proteínas G, tirosinas-quinases e por receptores não-tirosina-quinases. A angiotensina II além de alterar a reatividade vascular exerce importante ação pró-inflamatória na parede vascular através da produção de espécies reativas de oxigênio, citocinas inflamatórias e moléculas de adesão (Ohnaka et al, 2000; Schiffrin, 2005; Pauletto e Rattazzi, 2006; Alvarez et al, 2007; Savoia e Schiffrin, 2007; Beltrán et al, 2009) que participam das respostas inflamatórias presentes nas doenças vasculares. A angiotensina II também estimula a liberação de prostaglandinas em células do músculo liso, e também em outros tipos celulares, através da ativação da fosfolipase A2 (Freeman et al, 1998).

Autores descreveram que este peptídeo pode levar à migração e à proliferação de CMLVs, estimulando o processo inflamatório nestas células (Bomfim et al, 2011). Além disso, a angiotensina II pode regular a produção de prostanóides e a expressão da COX-2 em células do músculo liso vascular (Ohnaka et al, 2000; Hu et al, 2002, Alvarez et al, 2007; Pérez-Girón et al, 2014) e em

fibroblastos adventiciais através da ativação dos receptores AT1 (Beltrán et al, 2009). Sabe-se que a angiotensina II ativa a NADPH oxidase, levando ao aumento do ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, exercendo relevante efeito sobre o leito vascular através da indução do estresse oxidativo (Cai et al, 2003; Suzuki et al, 2005).

Assim, alterações no sistema renina-angiotensina estão associadas ao desenvolvimento de doenças como aterosclerose, hipertensão arterial e insuficiência renal e cardíaca (Rajagopalan et al, 1996; Griending et al, 2000; Ohtsu et al, 2005), contribuindo para as características inflamatórias do processo patológico, sobretudo, através da angiotensina II.

Sabe-se que alterações no sistema renina-angiotensina pode estar relacionada com a ingestão de sódio, principalmente durante a sobrecarga de sal. Estudos mostram que os componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona estão ativamente envolvidos tanto no remodelamento cardíaco como vascular induzida por uma dieta rica em sódio (Drenjančević-Perić et al, 2011; Tikellis et al, 2012; Zeng et al, 2004, dos Santos et al, 2006). Suematsu et al (2010) mostraram que a dieta de baixo sódio induziu a ativação do sistema renina-angiotensina, com um aumento da angiotensina II no plasma.

2. JUSTIFICATIVA

A relação entre o consumo excessivo de sal e o aumento da pressão sanguínea já é conhecida, o que leva a crença de que uma dieta de baixo sódio irá reduzir o risco de eventos cardiovasculares associados à hipertensão. No entanto, a redução da pressão arterial através do baixo consumo de sódio só tem relevância se refletir em uma redução da mortalidade geral e da morbimortalidade associada aos eventos cardiovasculares.

Apesar de já ser bem descrito o efeito hipotensor de dietas com restrição em sódio (Elliott et al, 1996, Denton et al, 1995, He et al, 2010; Lewington et al, 2002), existem controvérsias com relação aos efeitos desta restrição. Isso se deve a estudos recentes que concluíram que a restrição de sal em longo prazo, apesar de reduzir a pressão arterial, não alterou a mortalidade e aumentou o risco de eventos cardíacos (Stolarz-Skrzypek et al, 2011). Assim, o efeito de dietas restritivas em sódio sobre a função cardiovascular não está devidamente elucidado.

Em relação aos benefícios de uma dieta restrita em sal em outros órgãos, Berger et al (2015) demonstraram que a dieta de baixo sal atenua a progressão da hipertensão em SHR, impedindo a proteinúria com aumento na expressão de cubilina e está associada a uma modulação de RAS local do rim, sendo assim observado uma relação entre a baixa ingestão de sal e proteção renal na hipertensão. Porém, ainda não se sabe se a restrição na ingestão de sódio é capaz de reverter a disfunção endotelial vascular. Os mecanismos fisiológicos pelos quais uma dieta de baixo sódio poderia melhorar a função endotelial vascular em humanos e animais ainda não estão esclarecidos.

Assim, uma vez que os efeitos na reatividade vascular de uma dieta com baixo sal continuam mal compreendidos e a disfunção vascular é um fator importante relacionado a hipertensão e a doença cardiovascular, o objetivo do presente estudo foi determinar os efeitos de um longo período de restrição de sal na dieta sobre a função vascular de artéria mesentérica de ratos SHR.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se a ingestão crônica de uma dieta de baixo sódio altera a função vascular de artéria mesentérica de resistência de animais SHR, e determinar o papel do óxido nítrico, da ciclooxigenase-2, do estresse oxidativo e do sistema renina angiotensina nas alterações vasculares induzidas pela restrição de sódio.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da ingestão crônica de uma dieta hipossódica sobre a pressão arterial sistólica em animais espontaneamente hipertensos;
- Analisar se a ingestão crônica de uma dieta hipossódica promove alteração na reatividade vascular à fenilefrina;
- Verificar se ingestão crônica de uma dieta hipossódica altera o relaxamento vascular dependente do endotélio;
- Estudar participação do óxido nítrico na reatividade vascular à fenilefrina após a ingestão crônica de uma dieta hipossódica;
- Investigar se a ingestão crônica de uma dieta hipossódica altera a participação dos prostanóides derivados da via da COX, das espécies reativas de oxigênio e do sistema renina aniotensina na resposta vasoconstrictora induzida pela fenilefrina;
- Investigar se a ingestão crônica de uma dieta hipossódica modifica a expressão proteica da eNOS, INOS, COX-2 e AT1.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados ratos SHR (ratos espontaneamente hipertensos), machos, fornecidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. O uso e cuidado desses animais experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1991). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-UFES 053/2012).

4.1.1 Modelo Experimental

Os ratos foram divididos aleatoriamente em dois grupos e alimentados com uma dieta que diferem apenas em seu conteúdo de NaCl a partir do momento do desmame com quatro semanas de idade, durante 28 semanas. Todos os outros componentes da ração foram mantidos constantes. A dieta com sal padrão (normossódica) continha 0,3% de NaCl. A dieta com baixo sal (hipossódica) foi preparada através da redução somente no teor de sal da dieta normossódica por 10 vezes (0,03% de NaCl) para imitar um consumo de sal altamente restritivo, como atualmente é recomendado para pacientes com doença cardiovascular. As duas dietas foram obtidos a partir da PragSoluções® (São Paulo-SP, Brasil). Durante este estudo, todos os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro com duração de 12h cada, em ambiente com temperatura controlada (25°C) e tiveram livre acesso à água e ração.

4.1.2 Avaliação da pressão arterial sistólica

Para avaliar o efeito da dieta hipossódica sobre os valores pressóricos dos ratos, a pressão arterial sistólica (PAS) dos animais dos grupos dieta normossódica e hipossódica foi verificada no desmame, entre 3 e 7 meses de idade. A medida da PAS não invasiva foi realizada no animal acordado pelo método de pletismografia de cauda (IITC Inc., Califórnia, EUA).

Antes de fazer a primeira medida da PAS os animais foram submetidos a um período de três dias de adaptação para que os mesmos não ficassem estressados durante o procedimento. No dia da medida da PAS os animais eram colocados em um cilindro de acrílico (holter), a cauda era conectada ao sensor de pressão do manguito (cuff) que por sua vez estava conectado ao amplificador e este ao computador para obtenção dos dados pressóricos. Os cilindros com os ratos foram colocados em uma estufa a 37 °C, por um período de 10 a 15 minutos, a fim de promover dilatação da artéria caudal, possibilitando melhor aferição da PAS. Em seguida, um manguito de pressão com um sensor de pulso era conectado à cauda desses animais. Foram realizadas dez medidas em cada animal, das quais foi obtida a média aritmética da PAS de cada animal.

4.2 REATIVIDADE VASCULAR

4.2.1 Avaliação da função vascular da artéria mesentérica

A análise da reatividade das artérias mesentéricas de ratos foi realizada de acordo com método descrito por Mulvany & Halpern (1977). Após 28 semanas de acompanhamento, os ratos foram anestesiados com cetamina (70 mg.kg⁻¹, ip, Agener - União Brasil) e xilazina (10 mg.kg⁻¹, ip, Bayer, a Brasil). As artérias mesentéricas foram cuidadosamente dissecadas, e o tecido conjuntivo foi removido. Este era mantido em solução de Krebs Henseleit (em mM: NaCl 115; NaHCO₃ 25; KCl 4,7; MgSO₄.7H₂O 1,2; CaCl₂.2H₂O 2,5; KH₂PO₄ 1,2;

glicose 11,1 e Na₂EDTA 0,01) aerada com mistura carbogênica contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂ a 4°C e pH 7.4 durante o procedimento de dissecação. O terceiro ramo da artéria mesentérica foi isolado com o auxílio de um microscópio de dissecação e segmentos de, aproximadamente, 2 mm de longitude foram cortados e mantidos a 4°C. Após preencher as câmaras do miógrafo para vasos de resistência (Danish Myo Tech, Modelo 410A e 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca) com Krebs Henseleit, dois fios de tungstênio (40 µm de diâmetro) foram inseridos no lúmen das artérias para medida de força isométrica. Um dos fios estava acoplado a um transdutor de força isométrica e o outro fio conectado a um micromanipulador que permitia o estiramento das artérias. Esse miógrafo estava conectado a um sistema para aquisição de dados (Powerlab/800 ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Austrália) e a um computador (PC Pentium) (Figura VIII).



Figura 4: Fotografia do leito mesentérico mostrando as artérias com suas ramificações.

Após período de 30 minutos de estabilização em solução de Krebs Henseleit gaseificada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂, pH 7,4, 37° C), as artérias foram estiradas a uma tensão de repouso considerada ótima em relação ao seu diâmetro interno. Para isso, em cada segmento arterial a relação tensão: diâmetro interno foi calculado e então foi determinada a circunferência interna correspondente a uma pressão transmural de 100 mmHg

para um vaso relaxado in situ (L100). Para a realização dos experimentos, as artérias foram mantidas com uma circunferência interna L1, calculada como $L1 = 0,90 \times L100$, circunferência na qual o desenvolvimento de força é máximo (Mulvany & Halpern, 1977).

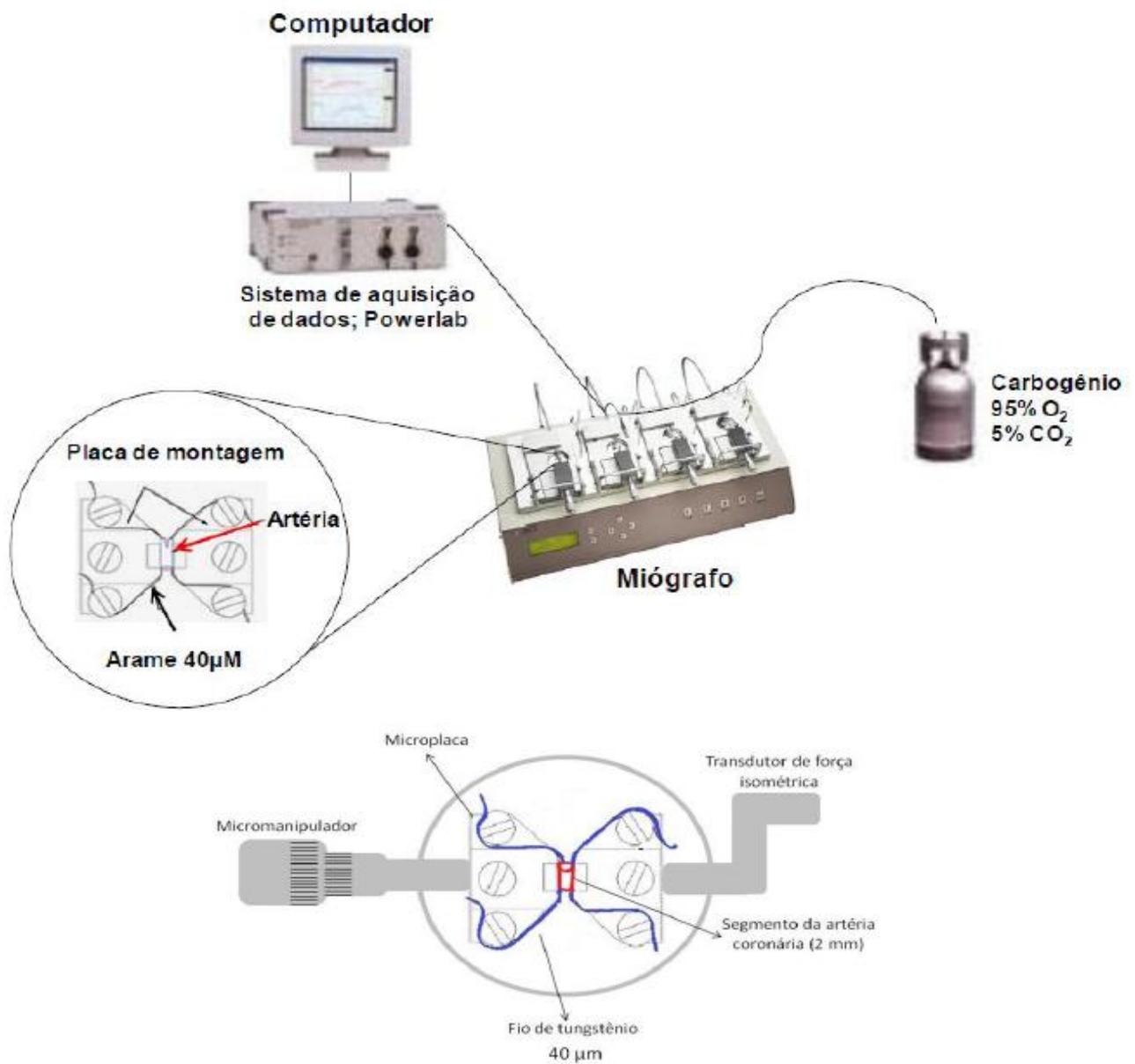


Figura 5: Esquema representativo do miógrafo de arame onde foram realizados os experimentos de reatividade vascular.

4.2.1.1 Avaliação da integridade do músculo liso vascular.

Após estabilização em sua tensão de estiramento ideal, os segmentos de artérias mesentéricas foram expostos a uma solução com concentração alta de potássio (120 mM, a composição é similar ao Krebs Henseleit, no entanto o NaCl foi substituído por KCl em concentração equimolar) para avaliar a capacidade contrátil dos segmentos (Figura 6). A solução foi novamente trocada para solução de Krebs- Henseleit normal e após retorno à sua tensão basal, determinou-se a presença de endotélio.

4.2.1.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio.

Para comprovar a integridade endotelial, as artérias foram pré-contraídas com uma concentração de fenilefrina (FE) suficiente para produzir 50% da contração produzida pela solução de Krebs-Henseleit com KCl 120 mM, e então o relaxamento vascular foi obtido por exposição a 10 μ M de ACh, como se observa na Figura 6. Somente foram utilizadas nesse estudo as artérias com relaxamento superior a 80% da contração induzida pela FE.

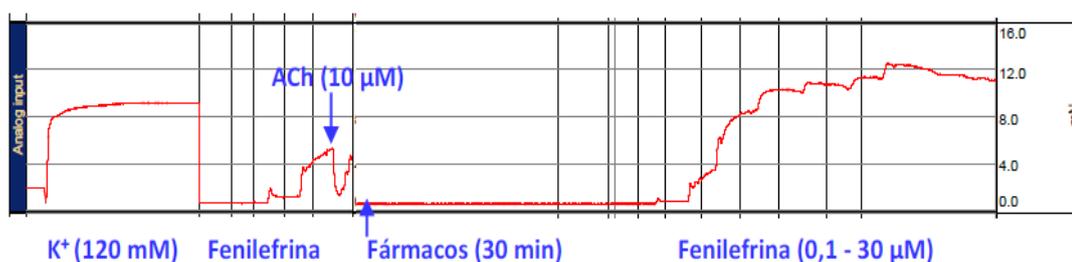


Figura 6: Esquema geral representativo de protocolo experimental realizado para avaliar a reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência de ratos. ACh=acetilcolina (adaptado de Wiggers, 2008).

4.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS – REATIVIDADE VASCULAR

4.3.1 Efeitos dieta hipossódica por 28 semanas sobre a resposta constritora à fenilefrina e dilatadora a acetilcolina em artérias mesentérica de ratos SHR.

Após o teste de integridade endotelial as artérias permaneceram 30 minutos para se estabilizarem e então, para investigar o efeito da dieta hipossódica sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina, agonista alfa-adrenérgico, foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina, na concentração de 0,1 nM a 0,3 mM, de maneira cumulativa nos dois grupos estudados totalizando 14 distintas concentrações (Figura 7A). O efeito frente a esta concentração crescente de fenilefrina foi normalizado em função da resposta contrátil máxima induzida pelo KCl (120 mM), que foi considerada 100% da resposta contrátil.

Para estudar o efeito da dieta sobre a resposta vasodilatadora dependente do endotélio, foram realizadas curvas concentração-resposta à acetilcolina (0,01 nM a 0,3 mM). Para tal, os anéis de mesentérica com endotélio foram pré-contraídos com fenilefrina 1 μ M. Uma vez obtido o platô, foram realizadas as curvas concentração-resposta, cumulativas à acetilcolina (Figura 7B). O efeito vasodilatador frente à acetilcolina foi calculado como percentual de relaxamento considerando o platô de contração à fenilefrina, sendo este platô considerado 100% da contração.

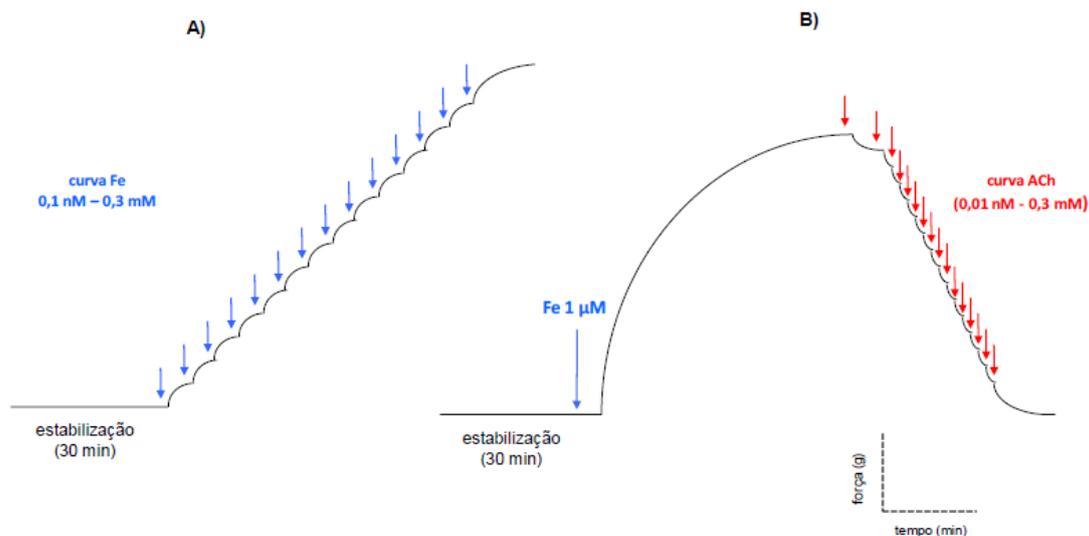


Figura 7: Esquema representativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE (A) e/ou à ACh (B) (adaptado de Batista, 2014).

4.3.2 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos nos efeitos da dieta hipossódica por 28 semanas sobre a resposta à fenilefrina.

Todos os protocolos de reatividade vascular, a partir deste momento, foram realizados da mesma forma. Com a finalidade de avaliar a via pela qual a dieta hipossódica modificava a reatividade vascular, alguns fármacos foram utilizados. Após o teste do endotélio e dos 30 minutos de estabilização da preparação, o fármaco a ser estudado era incubado por trinta minutos, e, logo após, realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (Figura 7A).

4.3.2.1 Participação do óxido nítrico, dos prostanóides, das espécies reativas de oxigênio e do sistema renina aniotensina aldosterona na resposta contrátil a fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos que receberam dieta normossódica ou hipossódica.

Para avaliar se a dieta hipossódica altera a participação do óxido nítrico na resposta contrátil à fenilefrina, os anéis de mesentérica foram incubados com um inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 μ M).

A participação dos prostanóides derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina foi avaliada através da incubação dos anéis isolados de mesentéricas com indometacina (10 μ M), um inibidor inespecífico da ciclooxigenase e com NS 398 (1 μ M), inibidor específico da ciclooxigenase-2 (COX-2).

Para verificar se a dieta hipossódica altera a participação das espécies reativas de oxigênio sobre a resposta contrátil à fenilefrina, uma vez que a produção de espécies reativas altera a reatividade vascular, foram utilizados: a apocinina (Apo, 10 μ M), um inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase, o tiron (ácido disulfônico 4,5-dihidroxi-1,3-benzeno - 1mM), um “varredor” não-enzimático de ânion superóxido e a catalase (1000 U / ml), um eliminador de peróxido de hidrogênio.

Ainda, a fim de investigar a participação do sistema renina-angiotensina local na resposta contrátil a fenilefrina foram realizadas curvas concentração-resposta a fenilefrina na presença de Losartan (10 μ M), bloqueador dos receptores angiotensinoginérgicos AT1 e Enalapril (10 μ M), inibidor da enzima conversora da angiotensina ECA.

4.4 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE WESTERN BLOT.

A técnica de Western Blot foi utilizada para determinar a influência da dieta hipossódica sobre a expressão proteica das isoformas iNOS, eNOS e COX-2 e da isoforma do receptor AT1. Para isto, todo o mesentério a partir do primeiro ramo da mesentérica superior foi utilizado como amostra para esta análise. Estes foram congelados com nitrogênio líquido e mantidos a -80°C até o momento em que foram utilizados.

A extração de proteínas foi procedida com a homogeneização das amostras, em temperatura de 4°C , com tampão de homogeneização contendo: Tris - HCl (10 mM, pH 7,4); NaVO_3 (1 mM); SDS, 1%; DTT (0,5 mM); EDTA (5 mM , pH 8); PMSF (1 mM); NaF (10 mM); Inibidor de protease.

A homogeneização foi realizada em baixa temperatura, onde, durante todo o procedimento, o homogeneizador de vidro era mantido em um recipiente com gelo. Após a homogeneização do tecido, essa mistura foi acondicionada em microtubos e centrifugada (Eppendorf-Neitheir-Hinz, Gmb 22331, Alemanha) a 6000 rpm durante 12 minutos, a 4°C . O sobrenadante foi recolhido e o precipitado descartado. Em seguida, foi realizada a quantificação proteica pelo método Lowry (Peterson, 1977). Em seguida foram aliqüotados os volumes para uma carga de 50 μg de proteína, sendo este volume de amostra misturado, em partes iguais, com tampão de homogeneização.

Alíquotas do homogeneizado foram diluídas em solução de Laemmli (Uréia 0,5 mM; SDS 0,17 mM; DTT 39 μM ; Tris-HCl 0,01 M pH=8 e Azul de bromofenol 0,5 %). Para analisar a expressão proteica da eNOS, iNOS, COX-2, AT1 e α -actina, as amostras foram carregadas em gel SDS-poliacrilamida 10% (acrilamida 40%, Tris HCl 1,5 M (pH = 8,8), SDS 10%, persulfato amônico (APS) 10% e Temed), juntamente com um marcador de peso molecular de amplo espectro (6 a 180 kDa), previamente imersos em uma cuba contendo solução tampão de eletroforese (Tris-HCl 25mM, glicina 190 mM, SDS 0.1 %), que é um eletrólito com alta capacidade de tamponamento, sendo submetidas à eletroforese aplicando corrente constante de 80 V (PowerPacTM HC, BioRad,

Singapura) durante aproximadamente 2 horas, fazendo com que as amostras (proteínas) passassem pelo gel.

Uma vez separadas, as proteínas foram transferidas para uma membranas de difluoreto de polivinilo ou de nitrocelulose (*Immun-Blot PVDF Membrane for Western Blotting 0,2 μ m, BioRad Laboratories, EUA/ Amersham, GE Healthcare, UK, respectivamente*) previamente ativadas com metanol/água. Para isso, o gel, a membrana e papel Whatman (*GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Suécia*) foram colocados em um sistema “sanduíche”. O método realizado foi o de transferência líquida na qual o sanduíche era montado em suporte Holder Cassete e acoplado à uma cuba (Trans-Blot SD Cell Bio-Rad, USA) contendo uma solução de tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0,1% e Metanol 20%) mantido à 8° C com uma corrente de 60 V por 2 horas. Uma vez transferidas às proteínas, as membranas foram deixadas durante uma hora a temperatura ambiente em agitação contínua com uma solução de bloqueio para evitar ligações inespecíficas do anticorpo. Esta solução de bloqueio continha 5 % de leite desnatado em pó ou 5 % de BSA, dissolvida em solução de lavagem das membranas: 10 mM de Tris-HCl a pH = 7,5; 100 mM de NaCl; e 0,1 % Tween-20 (TBS-T).

Em seguida, também sob agitação constante, as membranas foram incubadas por toda a noite a 4° C com os anticorpos primários para eNOS (1:250, Transduction Laboratories KY), iNOS (1:250, Transductions Laboratories KY), COX-2 (1:200; Cayman Chemical; Ann Arbor, MI, USA e AT1 (1:500, Santa Cruz, Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

Uma vez finalizada a incubação com os anticorpos primários, foram feitas três lavagens sucessivas de dez minutos cada, com uma solução TBS-T, para eliminar os restos do anticorpo primário que não se uniram. À continuidade, as membranas foram incubadas durante uma hora, a temperatura ambiente e agitação contínua, com o correspondente anticorpo secundário. ImunoglobulinaIgG anti-coelho conjugado com peroxidase (1:2000; Bio-Rad, USA and 1:5000; Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) ou IgG anti-

camundongo conjugado com peroxidase (1:5000; StressGen Bioreagent Corp., Victoria, Canada).

Após a incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos para remoção do anticorpo secundário com a solução TBS-T e por mais 30 minutos com a solução TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5) (as soluções foram trocadas a cada 5 minutos no TBS-T e a cada 10 minutos no TBS). Os imunocomplexos foram detectados por meio da exposição da membrana, durante 5 min a um sistema de detecção por quimioluminescência (ECL Plus, AmershamTM, GE Healthcare, UK). As membranas, então, foram expostas a autorradiografia para revelação (*Medical Film, Konica Minolta Medical Imaging, Wayne, EUA / Hyperfilm, AmershamTM, UK*). A análise densitométrica foi utilizada para quantificar as bandas das proteínas e, para isso, os filmes com as bandas proteicas foram escaneados. O programa ImageJ foi utilizado para quantificação da área e da densidade das bandas.

4.5 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Os valores de “n” representam o número de animais ou unidades experimentais utilizadas em cada protocolo experimental.

A resposta vasoconstritora induzida pela fenilefrina foi normalizada em função da resposta máxima de contração induzida por 120 mM de KCl, que foi considerada como 100% da resposta contrátil do músculo. A partir deste valor, as respostas contráteis à fenilefrina foram normalizadas. Os resultados das respostas de relaxamento induzido pela acetilcolina estão expressos como porcentagem de relaxamento relacionada à contração previamente obtida utilizando a fenilefrina. Para cada curva concentração-resposta a fenilefrina e a acetilcolina foram calculados os valores de sensibilidade (pD_2) e resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$). Para isso, foi realizada uma análise de regressão não linear,

obtida através da análise das curvas concentração-resposta a esses agonistas, utilizando o GraphPad Prism Software (San Diego, CA, U.S.A.).

Com a finalidade de comparar a magnitude de efeito dos fármacos sobre a resposta contrátil à fenilefrina e à acetilcolina em artérias dos diferentes grupos estudados, alguns resultados estão expressos como diferença da área abaixo da curva (dAUC) de concentração-resposta à fenilefrina em situação controle (sem fármacos) e experimental (com inibidores). A AUC foi calculada para cada curva concentração-resposta e a diferença está expressa como porcentagem da diferença da AUC (%dAUC) da curva controle correspondente (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, EUA).

A análise estatística dos resultados foi realizada quando indicado teste t, pareado e/ ou não pareado para comparação de médias, ou análise de variância (ANOVA), duas vias, medidas completamente randomizada. Em caso de significância foi adotado o post-hoc de Tukey (seguido de ANOVA 1 via) ou Bonferroni (seguido de ANOVA 2 vias) para comparação das médias individuais (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, EUA).

Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$.

Os resultados da expressão proteica da eNOS, iNOS, COX-2 e AT1 estão expressos como a relação entre a densidade ótica para eNOS, iNOS, COX-2 ou AT1 em relação à α -actina.

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA.

O efeito da dieta com restrição de sal por 28 semanas sobre a pressão arterial foi avaliada no desmame, aos 3 meses e aos 7 meses em ambos os grupos. No desmame, a PAS foi similar entre os grupos de animais SHR e aumentou significativamente nos dois grupos durante o período de 28 semanas de acompanhamento. Ao final das 28 semanas, os ratos que receberam dieta com restrição de sal apresentaram uma pressão arterial sistólica (PAS) significativamente menor do que o grupo que recebeu dieta normossódica (hipossódica: 169 ± 4 mmHg, $n = 14$, normossódica: $203 \pm 4,7$ mmHg, $n = 13$; $p < 0,05$) (Tabela 1). A dieta com restrição de sal foi capaz de atenuar a elevação de pressão arterial nos animais SHR.

Tabela 1. Pressão Arterial Sistólica (PAS) avaliada por pletismografia de cauda durante o protocolo experimental.

	PAS (mmHg)		
	Desmame	3 meses	7 meses
Normossódica	$131 \pm 5,6$	188 ± 6	$203 \pm 4,7$
Hipossódica	-	$161 \pm 12^*$	$169 \pm 4^*$

Valores apresentados como média \pm EPM. Normossódica: grupo dieta padrão ($n = 13$). Hipossódica: grupo dieta baixo sal ($n = 14$). PAS: pressão arterial sistólica * $p < 0.05$ vs. Normossódica.

5.2 EFEITOS DA DIETA HIPOSSÓDICA SOBRE A FUNÇÃO VASCULAR DE ARTERIA MESENTÉRICA DE RESISTENCIA DE RATOS SHR

5.2.1 Efeitos da dieta hipossódica sobre a resposta contrátil ao cloreto de potássio (KCl 120 mmol/l) em artérias mesentéricas de ratos SHR.

Com a finalidade de verificar a capacidade contrátil das artérias utilizadas, todos os segmentos arteriais, após procedimento de normalização, eram expostos a solução rica em KCl (120 mmol/L). A contração máxima arterial, estimulada por alta concentração de KCl de cada artéria é um importante dado, já que todas as contrações aos fármacos são expressos como porcentagem da contração máxima induzida pelo KCl.

Adicionalmente, diferenças na contração ao KCl nos grupos experimentais podem ser um indicativo de lesão/alteração do músculo liso vascular. No entanto, a dieta hipossódica durante 28 semanas não alterou a resposta ao KCl, ou seja, a dieta não prejudicou a capacidade contrátil do músculo liso vascular, já que a resposta máxima das artérias do grupo com dieta normossódica foi semelhante à resposta máxima das artérias do grupo com dieta hipossódica (normossódica: $4,41 \pm 0,43$ g vs hipossódica: $4,20 \pm 0,45$ g, (n=13), $p>0,05$).

5.2.2 Efeitos da dieta hipossódica sobre o relaxamento dependente do endotélio em artérias mesentéricas de ratos SHR

Para avaliar se a dieta hipossódica por 28 semanas foi capaz de alterar o relaxamento dependente do endotélio, foi realizada curva concentração-resposta a acetilcolina (1nmol/L - 10 μ mol/L). A acetilcolina promoveu relaxamento das artérias mesentéricas de maneira concentração dependente nos dois grupos. Porém, a dieta com restrição de sal aumentou o relaxamento dependente do endotélio induzido por acetilcolina, quando comparado com ratos que receberam dieta normossódica. (Figura 8 e Tabela 2).

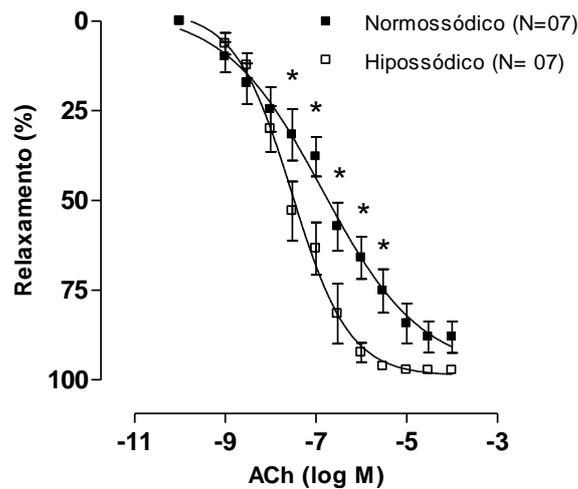


Figura 8: Curva concentração-resposta à acetilcolina (ACh) para a avaliação do relaxamento dependente do endotélio em segmentos de artérias mesentéricas de ratos dos grupos com dieta normossódica e hipossódica. Os resultados (Média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da pré-contracção à fenilefrina. ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ vs normossódica. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

Tabela 2: Valores de resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) induzidas pela acetilcolina em artérias mesentéricas de ratos dos grupos com dieta normossódica e hipossódica. A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré contração com à fenilefrina.

	R _{max} (%)	pD ₂
Normossódica	97,56 \pm 9.03	6,85 \pm 0,24
Hipossódica	98,84 \pm 2.73	7,53 \pm 0,10*

Valores expressos em média \pm EPM. Teste *t* não-pareado * $p < 0,05$ vs normossódica

5.2.3 Efeitos da dieta hipossódica sobre a resposta contrátil a fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos SHR

A administração de fenilefrina aumentou de maneira concentração-dependente o tônus basal dos segmentos de artérias mesentéricas de ratos que receberam dieta normossódica e hipossódica. No entanto, quando comparada as duas dietas, não houve alterações nas respostas vasoconstritoras induzidas por fenilefrina (Figura 9 e Tabela 3). Este resultado sugere que, apesar do aumento de vasodilatação apresentado no resultado anterior, pode haver outra via compensatória vasoconstritora que mantém a resposta à fenilefrina na dieta hipossódica igual ao grupo controle. Assim, para verificar a influência dos fatores endoteliais na resposta à fenilefrina, investigamos algumas vias de agentes vasoativos derivados do endotélio.

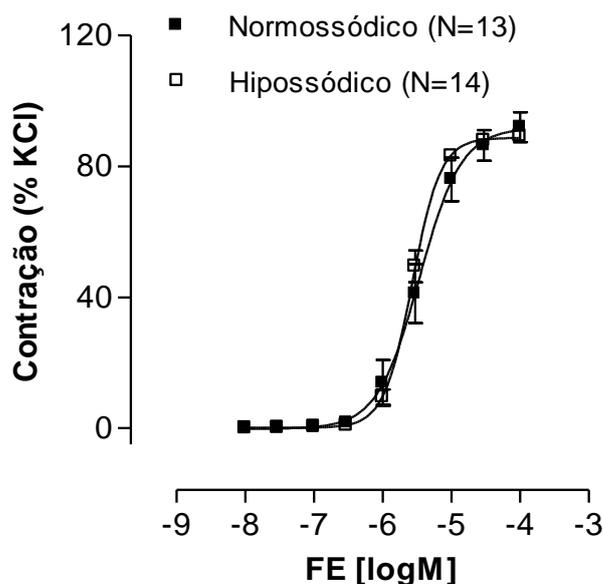


Figura 9: Resposta contrátil induzida pela fenilefrina em segmentos de artérias mesentérica de ratos SHR dos grupos normossódico e hipossódico. Os resultados (Média ± EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. O número de animais usados está indicado entre parênteses

Tabela 3: Valores de resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) obtidos através das curvas concentração resposta a fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos dos grupos com dieta normossódica e hipossódica.

	R _{max} (%)	pD ₂
Normossódica	94,49 ± 4,15	5,49 ± 0,06
Hipossódica	88,75 ± 1,37	5,56 ± 0,02

Valores expressos em média ± EPM. Teste *t* não-pareado *p*>0,05

5.2.4 Efeitos da dieta hipossódica sobre a participação do óxido nítrico na resposta vasoconstritora à fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos SHR

Para analisar o papel do óxido nítrico na resposta vasoconstritora à fenilefrina, segmentos arteriais com endotélio intacto foram pré-incubados com o L-NAME (100 µM), um inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase. O L-NAME provocou o deslocamento nas curvas de concentração-resposta à fenilefrina nas artérias mesentéricas em ambos os grupos experimentais (Figura 10 A-B, Tabela 4). Entretanto, ao comparar a magnitude deste efeito por meio da %dAUC, observou-se que nos ratos que receberam dieta hipossódica, a modulação dependente do NO na resposta contrátil à fenilefrina está aumentada (Figura C e Tabela 4). Este resultado sugere que a biodisponibilidade do NO pode estar aumentada em consequência da dieta com restrição de sal e ser ele o responsável pelo aumento da vasodilatação.

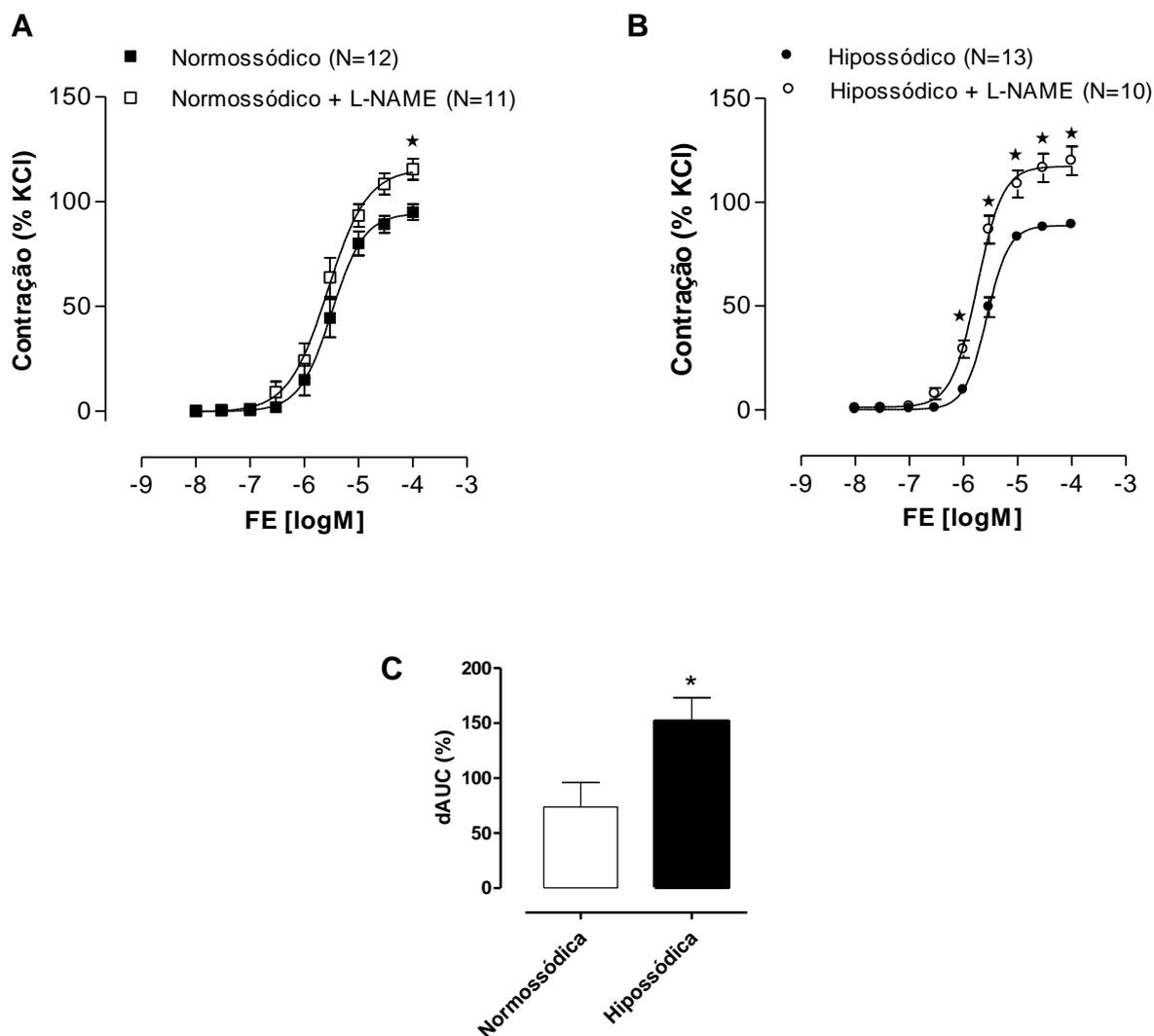


Figura 10: Efeito do L-NAME (100 μ M), inibidor da sintase do óxido nítrico, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em segmentos de artérias mesentérica de ratos dos grupos de dieta normossódica (A) e hipossódica (B). Diferença percentual da área abaixo da curva nos dois grupos experimentais (C). Os resultados (Média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni* e teste *t* de Student para comparação de médias. * $p < 0,05$ vs normossódica. O número de animais usados está indicado entre parênteses

Tabela 4: Valores de resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) obtidos através das curvas concentração resposta a fenilefrina na presença de L-NAME em artérias mesentéricas de ratos dos grupos com dieta normossódica e hipossódica.

	R _{máx} (%)	pD ₂
Normossódica	94,49 ± 4,15	5,49 ± 0,06
Normossódica + L-NAME	115,60 ± 5,20*	5,56 ± 0,07
Hipossódica	88,75 ± 1,37	5,56 ± 0,02
Hipossódica + L-NAME	117,30 ± 3,13 [#]	5,74 ± 0,04 [#]

Valores expressos em média ± EPM. Teste *t* não-pareado.*p<0,05; R_{máx}: normossódica vs normossódica + L-NAME [#]p<0,05 ; R_{máx} e pD₂: hipossódica vs hipossódica + L-NAME

5.2.4.1 Expressão protéica da isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS) e da isoforma induzível da sintase do óxido nítrico (iNOS)

A expressão da eNOS e iNOS foram avaliadas com intuito de verificar se o aumento da participação do NO na reatividade vascular após uma dieta hipossódica também era acompanhada de alterações nas expressões dessas enzimas. A expressão da eNOS e iNOS em condições basais (segmentos de artérias retirados logo após o animal ser sacrificado) foram detectadas através da técnica de Western Blot em segmentos de mesentéricas de ratos dos grupos com dieta normossódica e hipossódica. Foi observado que nestas artérias a dieta hipossódica por 28 semanas não provocou alteração na expressão protéica da eNOS, porém a expressão proteica da iNOS encontrou-se elevada nos segmentos mesentéricos de ratos do grupo com dieta hipossódica (Figura 11 A-B).

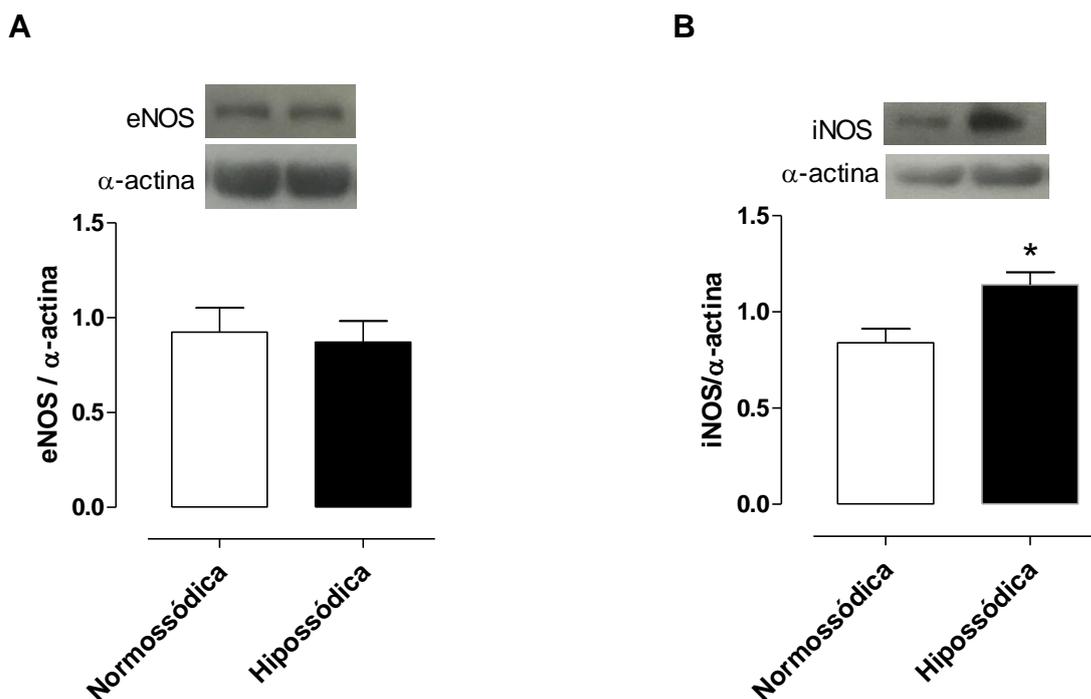


Figura 11: Análise densitométrica da expressão protéica da isoforma endotelial da sintase do óxido nítrico (eNOS) (A) e da isoforma induzível da sintase do óxido nítrico (iNOS) (B) em artéria mesentérica de ratos dos grupos normossódica e hipossódica. Na parte superior da figura estão demonstradas as bandas representativas da expressão da eNOS, iNOS e da α -actina. Os resultados (média \pm EPM) estão expressos como relação entre a densidade das bandas da eNOS, iNOS e da α -actina. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste-*t* não pareado. * $p < 0,05$ vs hipossódica.

5.2.5 Efeitos da dieta hipossódica sobre a participação dos prostanóides derivados da via da ciclooxygenase (COX) na resposta contrátil a fenilefrina

Para investigar se a dieta com restrição de sal altera a participação dos prostanóides derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxygenase na resposta contrátil à fenilefrina em segmentos de artérias mesentéricas, incubamos essas artérias com o inibidor não seletivo da COX, a indometacina (10 μ M).

A indometacina promoveu redução da resposta contrátil à fenilefrina em artérias mesentéricas de ambos os grupos (Figura 12 A-B, Tabela 5), mas o

efeito foi maior no grupo que recebeu dieta hipossódica, como podemos observar pela diferença da área abaixo da curva (Figura 12C e Tabela 5). Estes resultados sugerem uma influência maior de prostanóides na resposta vasoconstritora induzida pela fenilefrina no grupo com dieta hipossódica.

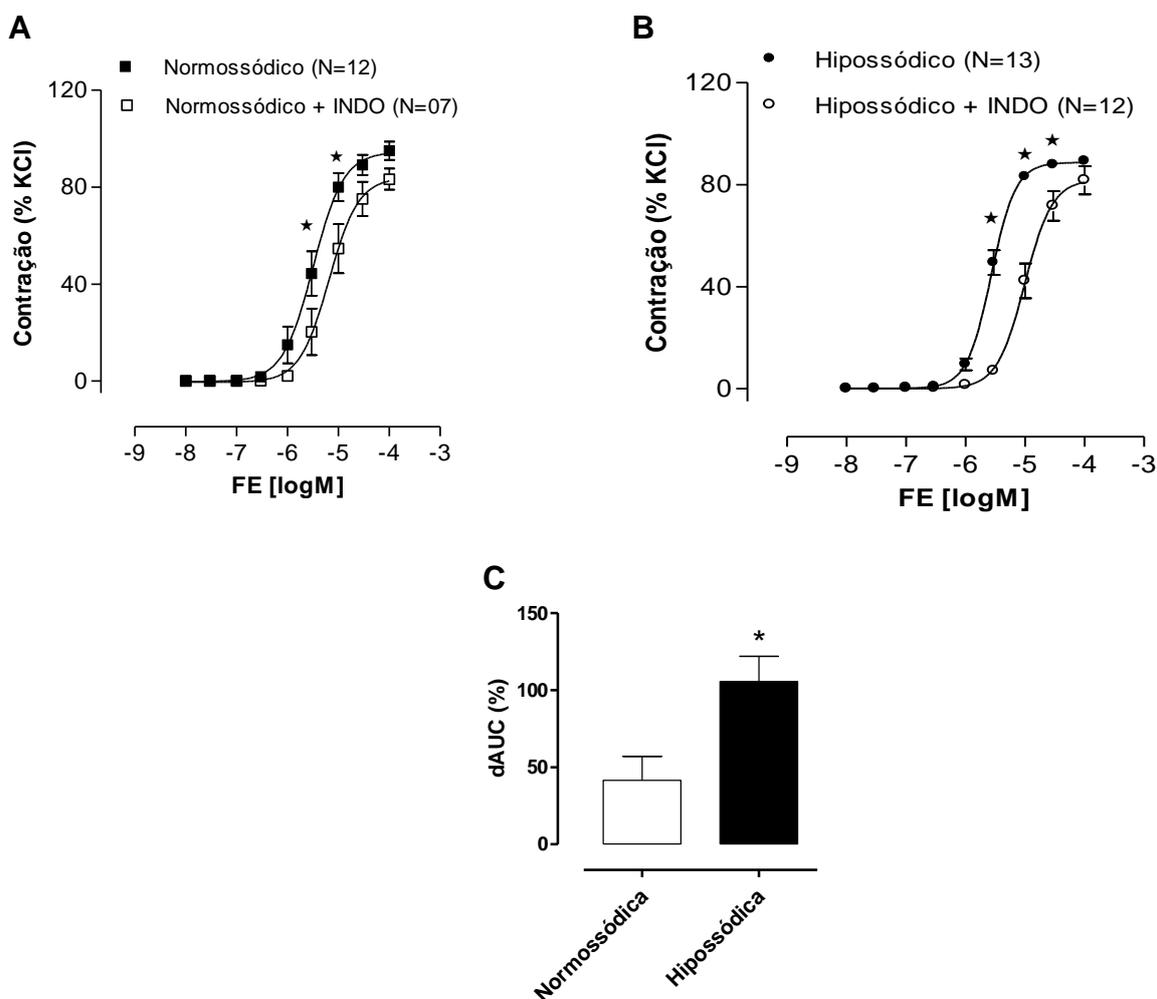


Figura 12: Efeitos da indometacina (10 μ M), inibidor inespecífico da via do ácido araquidônico e ciclooxigenase, sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em segmentos de artérias mesentéricas de ratos dos grupos de dieta normossódica (A) e hipossódica (B). Diferença percentual de área abaixo da curva nos dois grupos experimentais (C). Os resultados (Média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni* e teste *t* de Student para comparação de médias. * $p < 0,05$ vs normossódico). O número de animais usados está indicado entre parênteses.

Tabela 5: Valores de resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) obtidos através das curvas concentração resposta a fenilefrina na presença de indometacina (INDO) em artérias mesentéricas de ratos dos grupos com dieta normossódica e hipossódica.

	R _{max} (%)	pD ₂
Normossódica	94,49 ± 4,15	5,49 ± 0,06
Normossódica + INDO	83,94 ± 5,66	5,18 ± 0,08*
Hipossódica	88,75 ± 1,37	5,56 ± 0,02
Hipossódica + INDO	82,07 ± 3,84	5,00 ± 0,04 [#]

Valores expressos em média ± EPM. Teste *t* não-pareado.*p<0,05; pD₂: dieta normossódica vs normossódica + INDO [#]p<0,05 ; pD₂: dieta hipossódica vs hipossódica + INDO

Diante desse resultado, fomos investigar se esta resposta poderia ser associada à participação da COX-2, por meio da incubação dos anéis de mesentéricas com o inibidor de COX-2, o NS 398 (1 uM). A presença deste fármaco reduziu a resposta contrátil à fenilefrina nos segmentos de artéria mesentérica dos ratos do grupo de dieta hipossódica (Figura 13B, Tabela 6) sem promover alteração nos anéis do grupo de dieta normossódica (Figura 13A, Tabela 6). Estes resultados sugerem que a maior influência de prostanoídes sobre a resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina, no grupo com dieta hipossódica, é dependente da via da COX-2.

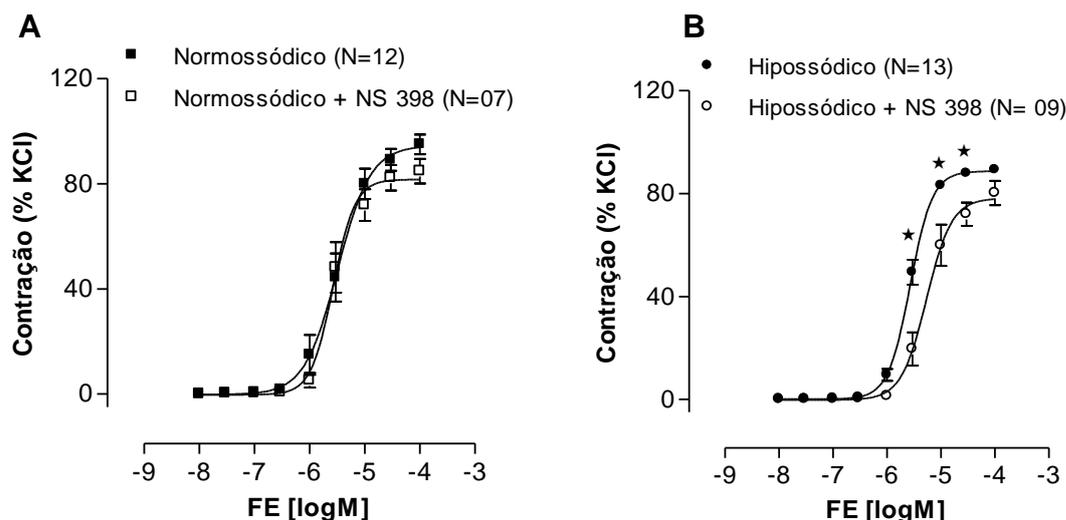


Figura 13: Efeitos do inibidor da COX-2, o NS 398 (1 μ M), sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina (FE) em segmentos de artérias mesentéricas de ratos dos grupos de dieta normossódica (A) e hipossódica (B). Os resultados (Média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni* e teste *t* de Student para comparação de médias. * $p < 0,05$ vs normossódica. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

Tabela 6: Valores de resposta máxima (R_{\max}) e sensibilidade (pD_2) obtidos através das curvas concentração resposta a fenilefrina na presença de NS 398 em artérias mesentéricas de ratos dos grupos com dieta normossódica e hipossódica.

	$R_{\max}(\%)$	pD_2
Normossódica	$94,49 \pm 4,15$	$5,49 \pm 0,06$
Normossódica + NS398	$81,67 \pm 2,98^*$	$5,57 \pm 0,05$
Hipossódica	$88,75 \pm 1,37$	$5,56 \pm 0,02$
Hipossódica + NS398	$78,21 \pm 3,47^\#$	$5,26 \pm 0,05^\#$

Valores expressos em média \pm EPM. Teste *t* não-pareado. * $p < 0,05$; R_{\max} : normossódica vs normossódica + NS 398 $^\#p < 0,05$; R_{\max} e pD_2 : hipossódica vs hipossódica + NS 398

5.2.5.1 Expressão proteica da isoforma constitutiva da ciclooxigenase (COX-2)

Os resultados funcionais evidenciam envolvimento de prostanóides vasoconstritores nos efeitos da dieta hipossódica sobre a reatividade vascular à fenilefrina em artérias mesentéricas. Baseando neste resultado, foi avaliada a expressão protéica da isoforma da COX-2 através da técnica de Western Blot no leito mesentérico. Como vemos na Figura 14 a expressão proteica desta isoforma encontra-se elevada nos segmentos mesentéricos de ratos do grupo com dieta hipossódica.

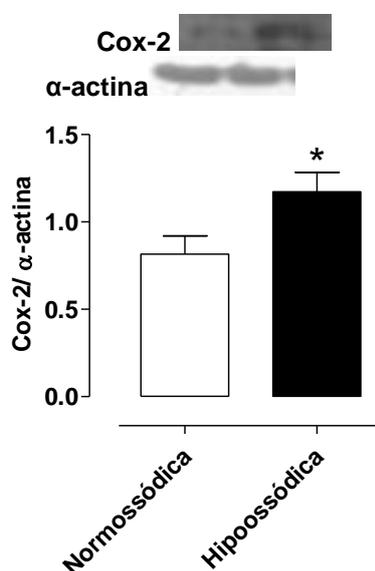


Figura 14: Análise densitométrica da expressão protéica da isoforma induzível da ciclooxigenase (COX-2) em artéria mesentérica de ratos dos grupos normossódica e hipossódica. Na parte superior da figura estão demonstradas as bandas representativas da expressão da COX-2 e da α -actina. Os resultados (média \pm EPM) estão expressos como relação entre a densidade das bandas da COX-2 e da α -actina. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste-*t* não pareado, * $p < 0,05$ vs normossódica.

5.2.6 Efeitos da dieta hipossódica sobre a participação de espécies reativas do oxigênio na resposta contrátil a fenilefrina

Para elucidar a maneira pela qual a dieta hipossódica modifica a resposta vasomotora foi necessário entender a participação das espécies reativas de

oxigênio nesse modelo experimental. Para isso, as artérias mesentéricas foram incubadas com apocinina (10 μM), inibidor específico da NADPH oxidase (enzima que sintetiza $\text{O}_2^{\bullet-}$). A apocinina reduziu, de maneira similar, a resposta contrátil à fenilefrina em ambos os grupos (Figura 15 A-B-C, Tabela 7).

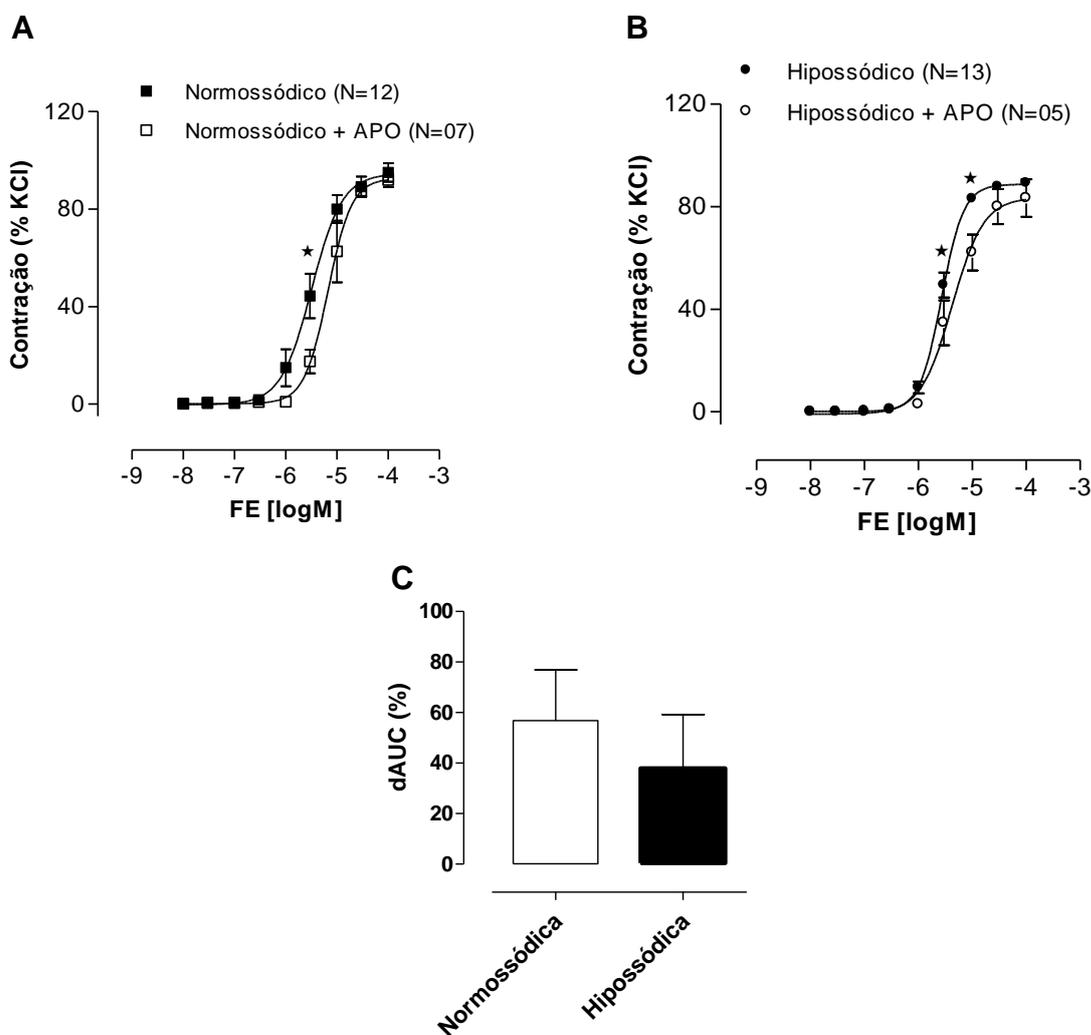


Figura 15: Efeitos do inibidor da NADPH oxidase, a apocinina (10 μM) sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina (FE) em segmentos de artérias mesentéricas de ratos dos grupos de dieta normossódica (A) e hipossódica (B). Diferença percentual de área abaixo da curva nos dois grupos experimentais (C). Os resultados (Média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni* e teste *t* de Student para comparação de médias. * $p < 0,05$ vs normossódica. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

Tabela 7: Valores de resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) obtidos através das curvas concentração resposta a fenilefrina na presença de apocinina (APO) em artérias mesentéricas de ratos dos grupos com dieta normossódica e hipossódica.

	R _{max} (%)	pD ₂
Normossódica	94,49 ± 4,15	5,49 ± 0,06
Normossódica + APO	92,56 ± 4,12	5,17 ± 0,05*
Hipossódica	88,75 ± 1,37	5,56 ± 0,02
Hipossódica + APO	83,54 ± 4,62	5,29 ± 0,09 [#]

Valores expressos em média ± EPM. Teste *t* não-pareado.*p<0,05; pD₂: normossódica vs normossódica + APO [#]p<0,05; pD₂: hipossódica vs hipossódica + APO.

Além da apocinina, os anéis também foram incubados com um eliminador de peróxido de hidrogênio, a catalase (1000 U/ml) e um “varredor” não enzimático de ânion superóxido, o tiron (1 mM) (Figura 16A e 16B, Tabela 8). Também não houve diferenças entre os grupos sobre a modulação do estresse oxidativo vascular de resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina em ratos que receberam dieta hipossódica. Estes resultados sugerem que as espécies reativas de oxigênio não estão envolvidas na resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina neste modelo.

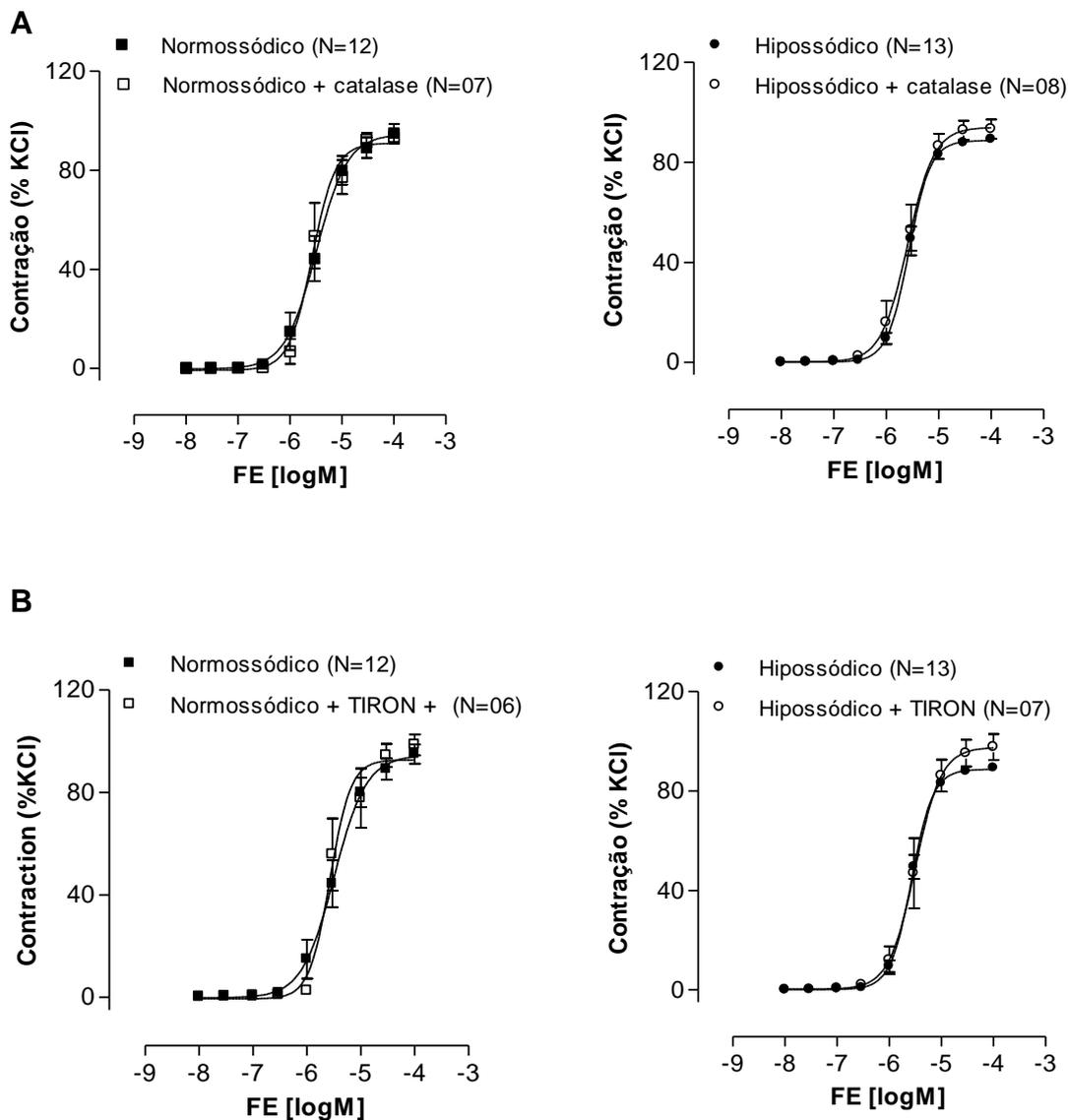


Figura 16: Efeitos de um eliminador de peróxido de hidrogênio, a catalase (1000 U/ml) (A) e de um “varredor” não enzimático de ânion superóxido, o tiron (1 mM) (B) sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina (FE) em segmentos de artérias mesentéricas de ratos dos grupos de dieta normossódica e hipossódica. Os resultados (Média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni*. $p > 0,05$. O número de animais usados está indicado entre parênteses.

Tabela 8: Valores de resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) obtidos através das curvas concentração resposta a fenilefrina na presença de catalase e tiron em artérias mesentéricas de ratos dos grupos com dieta normossódica e hipossódica.

	R _{max} (%)	pD ₂
Normossódica	94,49 ± 4,15	5,49 ± 0,06
Normossódica + catalase	90,96 ± 3,80	5,56 ± 0,05
Normossódica + tiron	92,72 ± 4,3	5,57±0,05
Hipossódica	88,75 ± 1,37	5,56 ± 0,02
Hipossódica + catalase	94,02 ± 3,63	5,59 ± 0,05
Hipossódica + tiron	97,59 ± 4,59	5,50 ± 0,06

Valores expressos em média ± EPM. Teste *t* não-pareado. $p > 0,05$

5.2.7 Efeitos da dieta hipossódica sobre a participação do sistema renina angiotensina na resposta contrátil a fenilefrina

Para investigar a participação do sistema renina-angiotensina na resposta contrátil à fenilefrina em artérias mesentéricas de ratos que receberam dieta hipossódica, realizamos experimentos de reatividade vascular na presença do inibidor da enzima conversora da angiotensina, enalapril (10 μ M) e do antagonista dos receptores AT₁, losartan (10 μ M). Como mostrado na Figura 17A e B, e na tabela 9, os dois bloqueadores não reduziram a resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina em mesentérica de ratos com dieta hipossódica. Esse resultado sugere que dieta com restrição de sal não afetou a modulação do sistema renina-angiotensina local na resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina neste modelo.

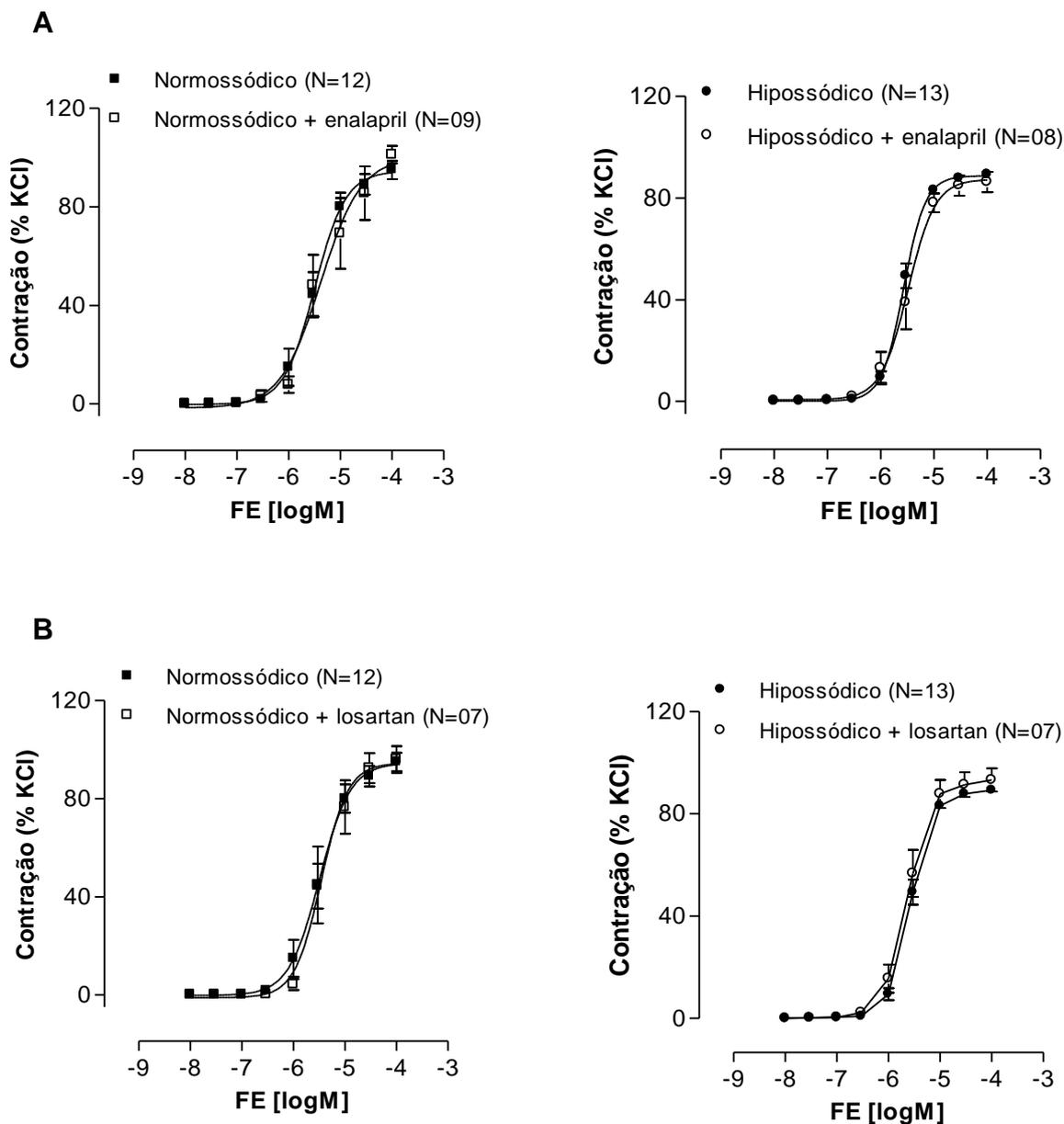


Figura 17: Efeitos do inibidor da enzima conversora da angiotensina, enalapril (10 μ M) (A) e do antagonista dos receptores AT₁, losartan (10 μ M) (B) sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina (FE) em segmentos de artérias mesentéricas de ratos dos grupos de dieta normossódica e hipossódica. Os resultados (Média \pm EPM) estão expressos como porcentagem da contração induzida por 120 mM de KCl. ANOVA duas vias seguida de *post hoc* de *Bonferroni*. O número de animais usados está indicado entre parênteses. $p > 0,05$.

Tabela 9: Valores de resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) obtidos através das curvas concentração resposta a fenilefrina na presença de enalapril e losartan em artérias mesentéricas de ratos dos grupos com dieta normossódica e hipossódica.

	R _{max} (%)	pD ₂
Normossódica	94,49 ± 4,15	5,49 ± 0,06
Normossódica + enalapril	100,0 ± 9,18	5,38 ± 0,13
Normossódica + losartan	94,50 ± 5,63	5,45 ± 0,08
Hipossódica	88,75 ± 1,37	5,56 ± 0,02
Hipossódica + enalapril	87,37 ± 3,68	5,48 ± 0,06
Hipossódica + losartan	92,97 ± 3,06	5,62 ± 0,05

Valores expressos em média ± EPM. Teste *t* não-pareado. $p > 0,05$

5.2.6.1 Expressão protéica do receptor de angiotensina AT1

Através da técnica de Western Blot a expressão protéica dos receptores AT1 foi detectada nos segmentos de mesentérica dos animais de ambos os grupos experimentais. A expressão protéica foi semelhante nas artérias mesentéricas dos ratos dos grupos normossódico e hipossódico (Figura 18), corroborando com os achados funcionais.

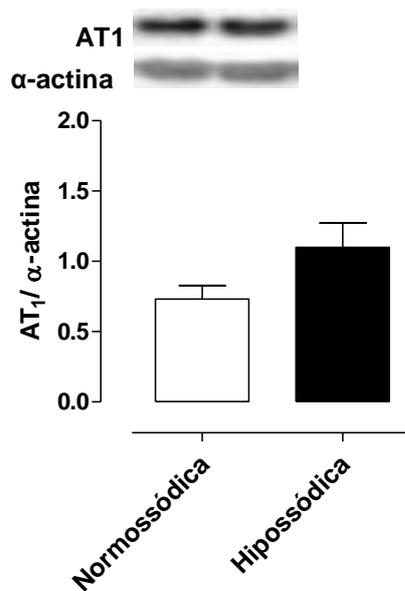


Figura 18: Análise densitométrica da expressão protéica do receptor de angiotensina AT1 em artéria mesentérica de ratos dos grupos normossódica e hipossódica. Na parte superior da figura estão demonstradas as bandas representativas da expressão do receptor AT1 e da α -actina. Os resultados (média \pm EPM) estão expressos como relação entre a densidade das bandas do receptor AT1 e da α -actina. O número de animais usados está indicado entre parênteses. Para análise comparativa foi usado o Teste-*t* não pareado. $p > 0,05$.

6. DISCUSSÃO

6.1 PRINCIPAIS RESULTADOS DO PRESENTE ESTUDO

A redução da ingestão de sódio para prevenir as doenças cardiovasculares é uma recomendação da Organização Mundial da Saúde. No entanto, existem evidências experimentais e clínicas de que, assim como tem sido observado com a alta ingestão de sódio, a restrição na ingestão de sódio também aumenta o risco de doenças cardiovasculares. A associação entre baixo sódio e doenças cardiovasculares pode se explicar através de alguns mecanismos, como por exemplo, disfunção endotelial e estresse oxidativo (Suematsu et al, 2010), superativação simpática (Campese et al, 1982), ativação do sistema renina angiotensina aldosterona (Westendorp et al, 2004, Tikellis et al, 2012 e Mori et al, 2009), resistência à insulina, aumento dos níveis de triacilglicerol (Ruivo et al, 2006), e aumento da aterogênese (Tikellis et al, 2012 e Raz Pauster et al, 2014).

A prática médica ainda recomenda a ingestão de baixa concentração de sal no tratamento da hipertensão e da insuficiência cardíaca. No entanto, uma série de estudos clínicos ao longo dos últimos 20 anos põe em questão essa recomendação. Por exemplo, pacientes com uma dieta de baixo sal tiveram um aumento nos eventos coronarianos em comparação àqueles que ingeriram concentração de sal normal e os pacientes que em dieta com baixo sal normalizaram a sua ingestão tiveram uma redução de eventos cardíacos, mas não eventos vasculares periféricas ou cerebrais (Suematsu et al, 2010).

Considerando que a restrição de sódio na dieta ainda é uma abordagem padrão em pacientes diagnosticados hipertensos, o presente estudo investigou se mudanças no conteúdo de sódio da dieta afetam a função vascular em ratos SHR.

Para execução desse estudo, foi usada uma dieta de baixo sódio (10 vezes menor quando comparado à dieta padrão) para mimetizar uma severa redução na ingestão de sódio semelhante a de pacientes diagnosticados hipertensos.

Os resultados obtidos neste estudo mostram os efeitos de uma dieta com baixo sal por 28 semanas sobre a reatividade vascular em artérias mesentéricas de ratos SHR. A restrição de sal (0,03 % NaCl) foi capaz de reduzir a pressão arterial e aumentar a resposta vasodilatadora induzida pela ACh, sem alterar a resposta vasoconstrictora a fenilefrina. Estes resultados podem ser explicados pela maior biodisponibilidade de NO e aumento na produção de prostanóides, por meio da via da COX-2, sem o envolvimento da ROS e do SRA.

6.2 INGESTÃO DE SAL E O COMPORTAMENTO DA PRESSÃO ARTERIAL

A relação entre a baixa ingestão de sódio e a redução na pressão arterial já é bem estabelecida na literatura (Appel et al, 1997; Sachs et al, 2001; Intersalt, 1988; Strazzullo, 2009; He e MacGregor, 2009). Apesar das diferenças individuais de sensibilidade, mesmo modestas reduções na quantidade de sal são, em geral, eficientes em reduzir a PAS (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010). Desde a década de 80, os estudos mostram uma redução da pressão arterial com a baixa ingestão sal em animais hipertensos e evidenciam que a restrição de sódio durante a fase de desenvolvimento da hipertensão nos animais SHR possui marcante efeito sobre a PAS. Pimenta et al (2009) demonstraram que uma dieta contendo cerca de 1 g/dia de sódio promoveu rápida e importante redução de PA em hipertensos resistentes. Dickinson et al (2007) mostraram que uma redução de apenas 1.3 g/dia na ingestão de sódio traduziu em uma diminuição de 5 mmHg na PAS, em indivíduos entre 25 e 55 anos de idade.

Os resultados de nosso estudo corroboram tais achados que demonstraram que a administração de uma dieta com restrição de sal durante 28 semanas em ratos SHR foi capaz de atenuar o desenvolvimento da hipertensão durante o acompanhamento dos animais.

6.3 EFEITOS DA DIETA HIPOSSÓDICA POR 28 DIAS SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE SHR

Inicialmente, nosso estudo avaliou a resposta à fenilefrina em vasos de resistências de ratos SHR com dieta normossódica e hipossódica e nenhuma alteração na contração à fenilefrina foi observada entre os grupos. Esse resultado sugere que pode estar ocorrendo uma modulação na resposta vasoconstrictora e ao mesmo tempo vasodilatadora das artérias mesentéricas de ratos SHR.

Estudos sobre a reatividade vascular investigaram condições de uma dieta rica em sódio demonstrando um aumento na resposta vascular, caracterizada pelo aumento da resistência vascular periférica (Nishida et al, 1998; Sofola et al 2002; Lenda et al, 2002; Adegunloye et al, 1997). Sofola et. al (2002) demonstraram que ratos Sprague-Dawley que receberam dieta rica em sódio por 4 semanas apresentaram um aumento na vasoconstrição em resposta à noradrenalina em vasos mesentéricos. Lenda et al (2002) mostraram que a alta ingestão de sal na dieta por 5 semanas levou a um aumento da produção das espécies reativas de oxigênio, assim como Ni e Vaziri em 2001 demonstraram uma diminuição da produção da óxido nítrico sintase (NOS) nos ratos em dieta com alto teor de sal. Além disso, o aumento do consumo de sódio comprometeu o relaxamento dependente do endotélio em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Kagota et al, 2001). No entanto, os efeitos da dieta com baixo teor de sódio em função do endotélio vascular e os mecanismos subjacentes permanecem desconhecidos (Jablonski et al 2013; Lima et al, 2006).

6.4 EFEITOS DA DIETA HIPOSSÓDICA POR 28 DIAS SOBRE A MODULAÇÃO ENDOTELIAL NOS ANÉIS ISOLADOS DE MESENTÉRICAS DE SHR

A partir do resultado descrito acima, em que não houve uma alteração da reatividade à FE, foi investigado como o sódio alterava o relaxamento vascular

dependente do endotélio. Para isto, foi realizada a curva concentração-resposta a acetilcolina. Nosso estudo mostrou que houve um aumento do relaxamento vascular induzido pela acetilcolina no grupo com restrição de sódio. Com esse achado, pode-se supor que a dieta hipossódica aumenta a liberação de um fator vasodilatador dependente do endotélio.

Neste sentido, o estudo visou investigar algumas vias que possivelmente poderiam esclarecer a ação vascular do sódio artérias mesentéricas de ratos SHR

Sabendo-se que dentre os fatores vasoativos derivados do endotélio, o NO é o principal fator relaxante que modula as respostas contráteis vasculares a diferentes agonistas (Chatterjee et al, 2008), procuramos avaliar se a dieta hipossódica aumentaria os efeitos vasodilatadores do endotélio através do aumento da biodisponibilidade de NO. Para isso foi realizada uma curva concentração resposta à fenilefrina na presença de L-NAME, um inibidor inespecífico da sintase do NO.

Neste estudo, o L-NAME potencializou a resposta vasoconstrictora à fenilefrina em ambos os grupos experimentais, mas em maior proporção no grupo com dieta hipossódica, conforme demonstrada pela %dAUC. Estes resultados sugerem que a restrição de sódio aumenta a modulação endotelial na resposta contrátil à fenilefrina por aumentar a biodisponibilidade de NO.

Corroborando com os dados funcionais, os resultados do presente estudo obtidos pela técnica de Western Blot demonstraram que apesar da expressão da eNOS estar inalterada após a dieta hipossódica, houve um aumento da expressão da isoforma induzível de óxido nítrico (iNOS) nos animais que receberam dieta hipossódica quando comparados ao grupo com dieta normossódica. Esse resultado sugere que a dieta hipossódica aumentou a biodisponibilidade de NO, que pode ser explicado pelo aumento de expressão de iNOS.

Estudos prévios mostram que a iNOS está presente em uma variedade de tecidos, principalmente em resposta a mediadores endógenos da inflamação, hipóxia e estresse oxidativo (Chatterjee et al, 2008; Sun et al, 2010). Além disso, o aumento da atividade e da expressão da iNOS está bem descrita em doenças inflamatórias como, por exemplo, a hipertensão arterial (Briones et al, 2000; Alvarez et al, 2008; Sun et al, 2010).

Os mecanismos fisiológicos pelos quais a restrição de sódio na dieta pode melhorar a função endotelial vascular em humanos são desconhecidas. Os dados disponíveis de modelos de roedores sugerem que dietas com alto teor de sódio podem prejudicar a dilatação dependente do endotélio através da redução da biodisponibilidade de NO como resultado do estresse oxidativo (Zhu et al, 2004; Nurkiewicz et al, 2007). Outros estudos em roedores sugerem que a alta ingestão de sódio também pode reduzir a expressão de eNOS (Ni et al, 2001) e suprimir a atividade da superóxido dismutase (SOD), uma importante enzima antioxidante (Lenda e Boegehold, 2002). Esse efeito de redução do relaxamento mediada pelo NO na condição de sobrecarga de sal também foram demonstrados em anéis isolados da aorta (Zhu et al, 2004) e artéria mesentérica de ratos normotensos (Zhu et al, 2007), além de em SHR com relação às artérias coronárias (Kagota et al, 2002; Matrougui et al, 1998).

Alterações na via do NO com dietas de restrição de sódio têm sido pouco descritas em estudos experimentais. Em um estudo com humanos, Jablonski et al (2013) demonstraram que a redução de sódio na dieta melhora a resistência vascular através de um aumento na dilatação dependente do endotélio, por aumento da biodisponibilidade de NO.

Enfim, apesar de ter sido observado esse aumento da vasodilatação no nosso estudo, não observamos redução na resposta vasoconstritora a fenilefrina pelo baixo sódio. Desta forma, pode haver uma via compensatória vasoconstritora adicional que modula a resposta à fenilefrina. Portanto, o próximo passo do estudo foi determinar as possíveis vias subjacentes de ambos os mecanismos.

6.5 O PAPEL DOS PROSTANÓIDES DERIVADOS DA CICLOOXIGENASE (COX) NO EFEITO DO SÓDIO SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RATOS SHR

Tem se observado um aumento na síntese de fatores endoteliais contráteis derivados de COX em determinados modelos de hipertensão (Vanhoutte, 1995; Taddei et al, 1997; Davidge, 2001), sendo esse aumento nos níveis dos fatores vasoconstritores associada com o desenvolvimento e a manutenção da disfunção vascular (Lüscher et al, 1986; dos Santos et al, 2003).

A expressão vascular de COX-2 está normalmente associada com processos inflamatórios em muitas condições, tais como aterosclerose e hipertensão (Antman et al, 2005; Alvarez et al, 2005; Adeagbo et al, 2005). Existem evidências substanciais de que a COX-2 desempenha um papel fundamental no controle local do tônus vascular (Yang et al, 1998). Em modelos experimentais de hipertensão foi notada maior expressão da COX-2 e maior participação dos prostanóides contráteis derivados desta via na resposta vascular a fenilefrina (Alvarez et al, 2005).

Sabendo-se disso, analisamos o envolvimento de prostanóides nas respostas vasoconstritoras induzidas pela restrição de sódio, e observamos que a inibição não seletiva da COX via indometacina reduziu a reatividade à fenilefrina em artérias mesentéricas no grupo com dieta de baixo sal, sugerindo a participação desta via nas alterações vasculares observadas.

Sabendo-se que a COX-2 é a isoforma induzida por estímulos pró-inflamatórios, citocinas, fatores mitogênicos e endotoxinas e tem a expressão relacionada principalmente com processos inflamatórios (Wu, 1995, Antman et al., 2005), acreditamos que após uma dieta com restrição de sal os prostanóides que estariam envolvidos numa maior resposta contrátil a fenilefrina seriam os derivados da COX-2.

Para isso, foram realizadas curvas concentração-resposta a fenilefrina em segmentos de mesentérica incubados com inibidor específico da COX-2, o NS

398. Nesse experimento, observou-se que na presença do NS 398 ocorreu redução da resposta contrátil a fenilefrina somente no vaso dos animais do grupo com dieta hipossódica, indicando que os prostanóides que promovem maior resposta contrátil a fenilefrina nos animais do grupo que fizeram restrição ao sódio são derivados da via da COX-2.

Associado aos achados funcionais nossos resultados também demonstram um aumento da expressão de COX-2 em artérias mesentéricas de ratos que receberam dieta hipossódica, corroborando os dados funcionais.

Não foram encontradas publicações que relacionaram a dieta de restrição de sódio com maior participação de prostanóides derivados da COX-2 na resposta vascular a fenilefrina. Entretanto, Yang et al (1998) mostraram que uma dieta com baixo teor de sal levou a um aumento da COX-2 no córtex renal, particularmente nas células da mácula densa. Da mesma forma, outro estudo também demonstrou que a dieta com restrição de sal, levou a um aumento da expressão da COX-2 na mácula densa, resultando na síntese de prostaglandinas e a secreção de renina (Pöschke et al, 2012).

O que pode explicar os motivos pelos quais as respostas à fenilefrina foram semelhantes entre os grupos foram os achados de que conjuntamente ao aumento da biodisponibilidade de NO que explica a resposta vasodilatadora aumentada a acetilcolina na dieta hipossodica, ocorreu um aumento de COX-2, confirmado pela vasoconstrição aumentada a fenilefrina quando foi bloqueada esta via.

6.6 O PAPEL DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NO EFEITO DO SÓDIO SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RATOS SHR

Dando prosseguimento às análises, sabe-se que no sistema cardiovascular, as espécies reativas de oxigênio desempenham um papel crucial no controle da função endotelial e do tônus vascular, sendo que o aumento da produção de

espécies reativas de oxigênio é um dos principais fatores que leva à redução da biodisponibilidade do NO e, assim, aumenta a contração do músculo liso vascular.

Para elucidar a maneira pela qual as espécies reativas de oxigênio influenciam na resposta vascular à fenilefrina após a administração a longo prazo de uma dieta com restrição de sal, analisou-se a participação da NADPH oxidase, com um inibidor da mesma, apocinina. Também foi avaliada a participação do ânion superóxido na resposta vascular a fenilefrina através de um varredor de ânion superóxido, o tiron e a participação do H₂O₂, com a catalase, que é varredor do peróxido de hidrogênio. Como resultado, não foram observadas alterações a resposta contrátil à fenilefrina após a dieta hipossódica. Estes resultados sugerem que as ROS não estão envolvidas nessas respostas, no modelo estudado.

O principal fator que contribui para a redução de biodisponibilidade do NO é o aumento de EROs, em especial do anion superóxido, que ao interagir com NO forma peróxido de nitrito, consumindo o óxido nítrico e diminuindo assim a biodisponibilidade do mesmo e, como consequência, ocorre diminuição do relaxamento do músculo liso (Beckman e Koppenol, 1996).

Sabe-se que as dietas ricas em sal resultam em aumento da geração de EROs na parede microvascular e, conseqüentemente, deprimem a regulação dependente do endotélio dos vasos (Lenda e Boegehold, 2002). Esse prejuízo na dilatação dependente do endotélio ocorre através da redução da biodisponibilidade do óxido nítrico [NO] como resultado do estresse oxidativo (Zhu et al, 2004; Nurkiewicz et al, 2007).

Em contrapartida, Jablonski et al (2013) demonstraram que a dieta com restrição de sódio melhora a função endotelial nas artérias de condução (macrovascular) e nos vasos de resistência (microvascular) em homens e mulheres de meia-idade e idosos com PAS elevada, sendo observado um aumento dos níveis de NO e redução do estresse oxidativo, com um aumento

modesto, porém significativo na circulação de atividade da SOD na condição de baixo teor de sódio.

6.7 O PAPEL DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA NO EFEITO DO SÓDIO SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RATOS SHR

Conforme já descrito na literatura, a angiotensina II pode induzir a expressão de COX-2 (Álvarez et al, 2007; Beltran et al, 2009) e, além disso, aumentar a produção de espécies reativas do oxigênio (Wolf, 2000), reduzir a biodisponibilidade do NO e provocar disfunção endotelial (Doughan et al, 2008).

O papel da angiotensina na regulação dos volumes de plasma e, especialmente, a homeostasia do sódio é também já é bem conhecido. Sabe-se também que alterações no sistema renina-angiotensina podem estar relacionadas com a ingestão de sódio, estando esse sistema ativamente envolvidos no remodelamento cardíaco e vascular induzidos pela sobrecarga de sal (Drenjančević-Perić et al, 2011; Tikellis et al, 2012; Zeng et al, 2004, dos Santos et al, 2006). Estudos mostraram que a restrição da ingestão de sódio resultou em um aumento plasmático de renina, angiotensina II e aldosterona, com melhora na reabsorção de sódio (Luchner et al, 1996).

Neste trabalho no grupo de dieta de baixo sal o bloqueio dos receptores AT1 e ACE com losartan e enalapril, respectivamente, não afetou as respostas vasoconstritoras induzidas por fenilefrina de artéria mesentérica dos SHRs que receberam dieta pobre em sal. Além disso, a análise de Western blot demonstrou níveis semelhantes de expressão da proteína de AT1 nas artérias mesentéricas de ambos os grupos. Esta constatação sugere que a dieta com restrição de sal em SHR quando analisada após longo período de ingestão, não afetou a capacidade do sistema renina-angiotensina local para influenciar a resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina.

Dos Santos et al (2006) observaram que ratos jovens normotensos submetidos a uma dieta rica em sal apresentaram maior reatividade vascular no leito vascular caudal, o que foi atribuído ao aumento da atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Durante a restrição da ingestão de sódio, Suematsu et al (2010) demonstraram que cães adultos que receberam dieta com baixo sódio (0,05% NaCl) durante 2 semanas apresentaram um aumento da renina e da angiotensina I e II plasmáticos, evidenciando que a dieta com baixo sódio induz a ativação do sistema renina-angiotensina.

Analisando a participação do sistema renina angiotensina local de outros órgãos durante a restrição de sódio, Berger et al (2015) demonstraram que a restrição crônica do consumo de sal em ratos SHR foi capaz de atenuar a progressão para hipertensão e impedir a proteinúria com o aumento na expressão de cubilina, sendo assim associada a uma modulação de RAS local do rim, com uma relação entre a baixa ingestão de sal e proteção renal na hipertensão. Também foi observado que os níveis de expressão de Ang II e do receptor intra-renais para (pro) renina ((P) RR) no duto coletor interior medular renal do rato aumentaram na dietas com restrição de sal (Gonzalez et al, 2014). Hattori et al (2014) observaram que a expressão de genes do sistema renina-angiotensina-aldosterona cardíaco estavam aumentados em ratos obesos que receberam dieta normal, enquanto a restrição de sal regulou para baixo a expressão destes genes. Schmid et al (1997) observaram aumento da expressão gênica de AT1 nos rins, fígado e pulmão com uma dieta de baixo sódio (0.02 %) que retornou ao basal após 3 semanas de dieta, enquanto a dieta de 4% de sal não influenciou a expressão deste receptor. Portanto, os estudos ainda são controversos e demonstram uma modulação órgão específica que se apresenta de forma temporária e transiente.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que a ingestão de uma dieta com restrição de sal por 28 semanas foi capaz de modular as respostas vasodilatadoras e vasoconstritoras das artérias mesentéricas de ratos SHR. Esta resposta é endotélio-dependente e decorrente do aumento da biodisponibilidade de NO e ao mesmo tempo de um aumento dos prostanoídes vasoconstritores via COX-2.

A participação dos prostanoídes vasoconstritores derivados da via da COX 2 pode explicar por que a reatividade vascular à fenilefrina não está alterada, apesar do aumento da biodisponibilidade de NO. Acreditamos estar ocorrendo um equilíbrio na resposta vasoconstrictora e vasodilatadora, devido a participação dessas duas vias.

Os nossos resultados também mostram que uma dieta com restrição de sal não altera a participação do sistema renina-angiotensina local e a produção de espécies reativas de oxigênio, indicando que nenhuma dessas vias está envolvida na modulação do tônus vascular, quando estas vias foram avaliadas após 7 meses de dieta muito restritiva em sal.

Em suma, a partir dos resultados apresentados seria possível sugerir que além do aumento da vasodilatação devido aumento da biodisponibilidade de NO, existe a ativação de uma via inflamatória em vasos de mesentérica após a ingestão crônica de uma dieta com restrição de sal.

REFERENCIAS

Adeagbo AS, Zhang X, Patel D, Joshua IG, Wang Y, Sun X, Igbo IN, Oriowo MA. Cyclo-oxygenase-2, endothelium and aortic reactivity during deoxycorticosterone acetate salt-induced hypertension. *J Hypertens*. 2005 May;23(5):1025-36.

Adegunloye BJ, Sofola OA. Effect of dietary salt loading and high-calcium diet on vascular smooth muscle responses and endothelium function in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1997 Nov;24(11):814-8.

Alderman MH, Madhavan S, Cohen H, Sealey JE, Laragh JH. Low urinary sodium is associated with greater risk of myocardial infarction among treated hypertensive men. *Hypertension*. 1995 Jun;25(6):1144-52.

Alvarez Y, Briones AM, Balfagón G, Alonso MJ, Salaices M. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J Hypertens*. 2005 Apr;23(4):767-77.

Alvarez Y, Briones AM, Hernanz R, Pérez-Girón JV, Alonso MJ, Salaices M. Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. *Br J Pharmacol*. 2008 Mar;153(5):926-35.

Alvarez Y, Pérez-Girón JV, Hernanz R, Briones AM, García-Redondo A, Beltrán A, Alonso MJ, Salaices M. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007 Apr;321(1):381-8.

Anderson CA, Appel LJ, Okuda N, Brown IJ, Chan Q, Zhao L, Ueshima H, Kesteloot H, Miura K, Curb JD, Yoshita K, Elliott P, Yamamoto ME, Stamler J. Dietary sources of sodium in China, Japan, the United Kingdom, and the United States, women and men aged 40 to 59 years: the INTERMAP study. *J Am Diet Assoc.* 2010 May;110(5):736-45.

Angus JA, Cocks TM. Endothelium-derived relaxing factor. *Pharmacol Ther.* 1989; 41(1-2):303-52.

Antman EM, DeMets D, Loscalzo J. Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. *Circulation.* 2005 Aug 2;112(5):759-70.

Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, Vollmer WM, Svetkey LP, Sacks FM, Bray GA, Vogt TM, Cutler JA, Windhauser MM, Lin PH, Karanja N. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *N Engl J Med.* 1997 Apr 17;336(16):1117-24.

Bader M, Peters J, Baltatu O, Müller DN, Luft FC, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med (Berl).* 2001 Apr;79(2-3):76-102.

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996 Nov;271(5 Pt 1):C1424-37.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):245-313.

Beltrán AE, Briones AM, García-Redondo AB, Rodríguez C, Miguel M, Alvarez Y, Alonso MJ, Martínez-González J, Salaices M. p38 MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats. *J Hypertens.* 2009 Jan;27(1):142-54.

Berger RC, Vassallo PF, Crajinas Rde O, Oliveira ML, Martins FL, Nogueira BV, Motta-Santos D, Araújo IB, Forechi L, Girardi AC, Santos RA, Mill JG. Renal Effects and Underlying Molecular Mechanisms of Long-Term Salt Content Diets in Spontaneously Hypertensive Rats. *PLoS One*. 2015 Oct 23;10(10):e0141288.

Bernstein AM, Willett WC. Trends in 24-h urinary sodium excretion in the United States, 1957-2003: a systematic review. *Am J Clin Nutr*. 2010 Nov;92(5):1172-80.

Bibbins-Domingo K, Chertow GM, Coxson PG, Moran A, Lightwood JM, Pletcher MJ, Goldman L. Projected effect of dietary salt reductions on future cardiovascular disease *N Engl J Med*. 2010; 362(7): 590-599.

Bisi Molina Mdel C, Cunha Rde S, Herkenhoff LF, Mill JG. [Hypertension and salt intake in an urban population]. *Rev Saude Publica*. 2003 Dec;37(6):743-50.

Blaustein MP, Hamlyn JM. Signaling mechanisms that link salt retention to hypertension: endogenous ouabain, the Na(+) pump, the Na(+)/Ca(2+) exchanger and TRPC proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Dec;1802(12):1219-29.

Bomfim GF, Szasz T, Carvalho MHC, Webb RC. The Toll way to hypertension: role of the innate immune response. *Endocrinol Metab Syndr*. 2011; 2: 117.

Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 168-175.

Bos CL, Richel DJ, Ritsema, T, Peppelenbosch MP, Versteeg HH. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *International Journal of Biochemistry*. 2004; 36: 1187-1205.

Briones AM, Alonso MJ, Hernanz R, Miguel M, Salaices M. Alterations of the nitric oxide pathway in cerebral arteries from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002 Mar;39(3):378-88.

Briones AM, Alonso MJ, Marín J, Balfagón G, Salaices M. Influence of hypertension on nitric oxide synthase expression and vascular effects of lipopolysaccharide in rat mesenteric arteries. *Br J Pharmacol.* 2000 Sep;131(2):185-94.

Briones AM, Alonso MJ, Marín J, Salaices M. Role of iNOS in the vasodilator responses induced by L-arginine in the middle cerebral artery from normotensive and hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 1999 Jan;126(1):111-20.

Cai H, Griendling KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2003 Sep;24(9):471-8.

Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res.* 2005 Oct 1;68(1):26-36.

Campese VM, Romoff MS, Levitan D, Saglikes Y, Friedler RM, Massry SG. Abnormal relationship between sodium intake and sympathetic nervous system activity in salt-sensitive patients with essential hypertension. *Kidney Int.* 1982 Feb;21(2):371-8.

Cannon RO 3rd. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem.* 1998 Aug;44(8 Pt 2):1809-19.

Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev.* 2003 Jun;24(3):261-71.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct 15;99(21):13926-31.

Chatterjee A, Black SM, Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul Pharmacol*. 2008 Oct-Dec;49(4-6):134-40.

Cook NR, Cutler JA, Obarzanek E, Buring JE, Rexrode KM, Kumanyika SK, Appel LJ, Whelton PK. Long term effects of dietary sodium reduction on cardiovascular disease outcomes: observational follow-up of the trials of hypertension prevention (TOHP). *BMJ*. 2007 Apr 28;334(7599):885-8.

Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, Oliveira-dos-Santos AJ, da Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappell MC, Backx PH, Yagil Y, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*. 2002 Jun 20;417(6891):822-8.

Danilczyk U, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney. *Circ Res*. 2006 Mar 3;98(4):463-71.

Danser AH, Schalekamp MA. Is there an internal cardiac renin-angiotensin system? *Heart*. 1996 Nov;76(3 Suppl 3):28-32.

Davidge ST. Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res*. 2001 Oct 12;89(8):650-60.

De Mey JG, Vanhoutte PM. Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium. *Circ Res*. 1982 Oct;51(4):439-47.

Denton D, Weisinger R, Mundy NI, Wickings EJ, Dixson A, Moisson P, Pingard AM, Shade R, Carey D, Ardaillou R, et al. The effect of increased salt intake on blood pressure of chimpanzees. *Nat Med*. 1995 Oct;1(10):1009-16.

Deschepper CF. Angiotensinogen: hormonal regulation and relative importance in the generation of angiotensin II. *Kidney Int*. 1994 Dec;46(6):1561-3.

Dickinson BD, Havas S; Council on Science and Public Health, American Medical Association. Reducing the population burden of cardiovascular disease by reducing sodium intake: a report of the Council on Science and Public Health. *Arch Intern Med*. 2007 Jul 23;167(14):1460-8.

Dickinson KM, Keogh JB, Clifton PM. Effects of a low-salt diet on flow-mediated dilatation in humans. *Am J Clin Nutr*. 2009; 89: 485–90.

Dikalova A, Clempus R, Lassègue B, Cheng G, McCoy J, Dikalov S, San Martin A, Lyle A, Weber DS, Weiss D, Taylor WR, Schmidt HH, Owens GK, Lambeth JD, Griending KK. Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice. *Circulation* 2005; 112(17): 2668-76.

Dohi Y, Kojima M, Sato K. Endothelial modulation of contractile responses in arteries from hypertensive rats. *Hypertension*. 1996 Nov;28(5):732-7.

dos Santos L, Gonçalves MV, Vassallo DV, Oliveira EM, Rossoni LV. Effects of high sodium intake diet on the vascular reactivity to phenylephrine on rat isolated caudal and renal vascular beds: endothelial modulation. *Life Sci* 2006; 78: 2272-9.

dos Santos L, Xavier FE, Vassallo DV, Rossoni LV. Cyclooxygenase pathway is involved in the vascular reactivity and inhibition of the Na⁺, K⁺-

ATPase activity in the tail artery from L-NAME-treated rats. *Life Sci.* 2003 Dec 19;74(5):613-27.

Doughan AK, Harrison DG, Dikalov SI. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ Res.* 2008 Feb 29;102(4):488-96.

Drenjančević-Perić I, Jelaković B, Lombard JH, Kunert MP, Kibel A, Gros M. High-salt diet and hypertension: focus on the renin-angiotensin system. *Kidney Blood Press Res.* 2011; 34(1): 1-11.

Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10(6):453-71.

Dzau VJ. Multiple pathways of angiotensin production in the blood vessel wall: evidence, possibilities and hypotheses. *J Hypertens.* 1989 Dec;7(12):933-6.

Elliott P, Stamler J, Nichols R, Dyer AR, Stamler R, Kesteloot H, et al. Intersalt revisited: further analyses of 24 hour sodium excretion and blood pressure within and across populations. *BMJ.* 1996; 312(7041): 1249-53.

Endemann DH, Toyuz RM, Iglarez M, Savoia C, Schiffrin EL. Eplerenone prevents salt-induced vascular remodeling and cardiac fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2004; 43: 1252–1257.

Féletou M, Vanhoutte PM. EDHF: an update. *Clin Sci (Lond).* 2009 Jul 16;117(4):139-55.

Féletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Jun;26(6):1215-25.

Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012 Apr;33(7):829-37, 837a-837d.

Franco V, Oparil S. Salt sensitivity, a determinant of blood pressure, cardiovascular disease and survival. *J Am Coll Nutr.* 2006 Jun;25(3 Suppl):247S-255S.

Freeman EJ, Ruehr ML, Dorman RV. ANG II-induced translocation of cytosolic PLA2 to the nucleus in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1998 Jan;274(1 Pt 1):C282-8.

Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science.* 2001 Nov 30;294(5548):1871-5.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980 Nov 27;288(5789):373-6

Geiszt M. NADPH oxidases: new kids on the block. *Cardiovasc Res* 2006; 71: 289-299.

Gongora MC, Qin Z, Laude K, Kim HW, McCann L, Folz JR, Dikalov S, Fukai T, Harrison DG. Role of extracellular superoxide dismutase in hypertension. *Hypertension.* 2006 Sep;48(3):473-81.

Gonzalez AA, Womack JP, Liu L, Seth DM, Prieto MC. Angiotensin II Increases the Expression of (Pro) Renin Receptor During Low-Salt Conditions. *Am J Med Sci.* 2014; 348(5): 416-22.

Graudal NA, Hubeck-Graudal T, Jürgens G. Effects of low-sodium diet vs. high-sodium diet on blood pressure, renin, aldosterone, catecholamines, cholesterol, and triglyceride (Cochrane Review). *Am J Hypertens*. 2012 Jan;25(1):1-15.

Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation*. 2003 Oct 21;108(16):1912-6.

Griendling KK, Lassègue B, Alexander RW. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1996;36:281-306.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000 Mar 17;86(5):494-501.

Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev*. 1990 Oct;70(4):1067-116.

Hall JE. Historical perspective of the renin-angiotensin system. *Mol Biotechnol*. 2003 May;24(1):27-39.

Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyr M, Graham D, Dominiczak AF. Superoxide excess in hypertension and aging. A common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension* 2001; 37 [part 2]: 529-534.

Hattori T, Murase T, Takatsu M, Nagasawa K, Matsuura N, Watanabe S, et al. Dietary Salt Restriction Improves Cardiac and Adipose Tissue Pathology Independently of Obesity in a Rat Model of Metabolic Syndrome. *J Am Heart Assoc*. 2014; 3(6): e001312.

He FJ, MacGregor GA. A comprehensive review on salt and health and current experience of worldwide salt reduction programmes. *J Hum Hypertens*. 2009 Jun;23(6):363-84.

He FJ, MacGregor GA. Reducing population salt intake worldwide: from evidence to implementation. *Prog Cardiovasc Dis*. 2010; 52: 363-82.

Holbrook JT, Patterson KY, Bodner JE et al. Sodium and potassium intake and balance in adults consuming self-selected diets. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1984, 40(4):786–793.

Hu ZW, Kerb R, Shi XY, Wei-Lavery T, Hoffman BB. Angiotensin II increases expression of cyclooxygenase-2: implications for the function of vascular smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Nov;303(2):563-73.

Institute of Medicine. *Dietary Reference Intakes: Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate*. National Academies Press: Washington, DC, 2004.

Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. Intersalt Cooperative Research Group. *BMJ*. 1988 Jul 30;297(6644):319-28.

Jablonski KL, Racine ML, Geolfos CJ, Gates PE, Chonchol M, McQueen MB, et al. Dietary sodium restriction reverses vascular endothelial dysfunction in middle-aged/older adults with moderately elevated systolic blood pressure. *J Am Coll Cardiol*. 2013; 61(3): 335–343.

Jackson WF. Ion channels and vascular tone. *Hypertension*. 2000 Jan;35(1 Pt 2):173-8.

Kagota S, Tamashiro A, Yamaguchi Y, Nakamura K, Kunitomo M. High salt intake impairs vascular nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate system

in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 302(1): 344-51.

Kagota S, Tamashiro A, Yamaguchi Y, Sugiura R, Kuno T, Nakamura K, et al. Downregulation of vascular soluble guanylate cyclase induced by high salt intake in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2001; 134(4): 737-44.

Klein L, O'Connor CM, Leimberger JD, Gattis-Stough W, Piña IL, Felker GM, Adams KF Jr, Califf RM, Gheorghiade M; OPTIME-CHF Investigators. Lower serum sodium is associated with increased short-term mortality in hospitalized patients with worsening heart failure: results from the Outcomes of a Prospective Trial of Intravenous Milrinone for Exacerbations of Chronic Heart Failure (OPTIME-CHF) study. *Circulation.* 2005 May 17;111(19):2454-60.

Koh KK, Oh PC, Quon MJ. Does reversal of oxidative stress and inflammation provide vascular protection? *Cardiovasc Res.* 2009 Mar 1;81(4):649-59.

Kolluru GK, Siamwala JH, Chatterjee S. eNOS phosphorylation in health and disease. *Biochimie.* 2010 Sep; 92(9):1186-98.

Kotchen TA. The salt discourse in 2013. *Am J Hypertens.* 2013 Oct; 26(10):1177.

Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest.* 2003 Apr;111(8):1201-9.

Lassègue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol* 2003; 285: R277-R297.

Lassègue B, San Martín A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res*. 2012 May 11;110(10):1364-90.

Lee HC, Wei YH. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2007 May;232(5):592-606.

Lee TJ, Shirasaki Y, Nickols GA. Altered endothelial modulation of vascular tone in aging and hypertension. *Blood Vessels*. 1987;24(3):132-6.

Lenda DM, Boegehold MA. Effect of a high salt diet on microvascular antioxidant enzymes. *J Vasc Res*. 2002 Jan-Feb;39(1):41-50.

Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R; Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*. 2002 Dec 14;360(9349):1903-13.

Lima NK, Lima FB, dos Santos EA, Okamoto MM, Sumida DH, Hell NS, Furukawa LN, Heimann JC. Effect of lifelong high- or low-salt intake on blood pressure, left ventricular mass and plasma insulin in Wistar rats. *Am J Med Sci*. 2006 Jun;331(6):309-14.

Lincoln TM, Dey N, Sellak H. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol (1985)*. 2001 Sep;91(3):1421-30.

Luchner A, Stevens TL, Borgeson DD, Redfield MM, Bailey JE, Sandberg SM, Heublein DM, Burnett JC Jr. Angiotensin II in the evolution of experimental heart failure. *Hypertension*. 1996 Sep;28(3):472-7.

Lüscher TF, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1986 Apr;8(4):344-8.

Mantelli L, Amerini S, Ledda F. Roles of nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor in vasorelaxant effect of acetylcholine as influenced by aging and hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995 Apr;25(4):595-602.

Mardini IA, FitzGerald GA. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: a growing class of anti-inflammatory drugs. *Mol Interv*. 2001 Apr;1(1):30-8.

Marín J, Rodríguez-Martínez MA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther*. 1997 Aug;75(2):111-34.

Martín A, Pérez-Girón JV, Hernanz R, Palacios R, Briones AM, Fortuño A, Zalba G, Salaices M, Alonso MJ. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation reduces cyclooxygenase-2 expression in vascular smooth muscle cells from hypertensive rats by interfering with oxidative stress. *J Hypertens*. 2012 Feb;30(2):315-26.

Martínez-Revelles S, Avendaño MS, García-Redondo AB, Alvarez Y, Aguado A, Pérez-Girón JV, García-Redondo L, Esteban V, Redondo JM, Alonso MJ, Briones AM, Salaices M. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 2013 Jan 1;18(1):51-65.

Matavelli LC, Zhou X, Varagic J, Susic D, Frohlich ED. Salt loading produces severe renal hemodynamic dysfunction independent of arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Feb;292(2):H814-9.

Matrougui K, Schiavi P, Guez D, Henrion D. High sodium intake decreases pressure-induced (myogenic) tone and flow-induced dilation in resistance arteries from hypertensive rats. *Hypertension*. 1998 Jul;32(1):176-9.

Matyas E, Jeitler K, Horvath K, Semlitsch T, Hemkens LG, Pignitter N, Siebenhofer A. Benefit assessment of salt reduction in patients with hypertension: systematic overview. *J Hypertens*. 2011 May;29(5):821-8.

McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension*. 1999 Oct;34(4 Pt 1):539-45.

Mercier N, Labat C, Louis H, Cattan V, Benetos A, Safar ME, Lacolley P. Sodium, arterial stiffness, and cardiovascular mortality in hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 2007 Mar;20(3):319-25.

Miller VM, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to arachidonic acid are mediated by products of cyclooxygenase. *Am J Physiol*. 1985 Apr;248(4 Pt 2):H432-7.

Mohan S, Campbell NR. Salt and high blood pressure. *Clin Sci (Lond)*. 2009 Jun 2;117(1):1-11.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991 Jun;43(2):109-42.

Montezano AC, Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular Noxs, and hypertension: focus on translational and clinical research. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Jan 1;20(1):164-82.

Mori T, Kurumazuka D, Matsumoto C, Shirakawa H, Kimura S, Kitada K, Kobayashi K, Matsuda H, Hayashi T, Kitaura Y, Matsumura Y. Dietary salt

restriction activates mineralocorticoid receptor signaling in volume-overloaded heart failure. *Eur J Pharmacol.* 2009 Nov 25;623(1-3):84-8.

Mueller CF, Laude K, McNally JS, Harrison DG. ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Feb;25(2):274-8.

Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res.* 1977 Jul;41(1):19-26.

Nascimento LR, Molina Mdel C, Faria CP, Cunha Rde S, Mill JG. [Reproducibility of arterial pressure measured in the ELSA-Brasil with 24-hour pressure monitoring]. *Rev Saude Publica.* 2013 Jun;47 Suppl 2:113-21.

Nava E, Noll G, Lüscher TF. Increased activity of constitutive nitric oxide synthase in cardiac endothelium in spontaneous hypertension. *Circulation.* 1995 May 1;91(9):2310-3.

Navas-Acien A, Silbergeld EK, Sharrett R, Calderon-Aranda E, Selvin E, Guallar E. Metals in urine and peripheral arterial disease. *Environ Health Perspect.* 2005 Feb;113(2):164-9.

Ni Z, Vaziri ND. Effect of salt loading on nitric oxide synthase expression in normotensive rats. *Am J Hypertens.* 2001 Feb;14(2):155-63.

Nishida Y, Ding J, Zhou MS, Chen QH, Murakami H, Wu XZ, Kosaka H. Role of nitric oxide in vascular hyper-responsiveness to norepinephrine in hypertensive Dahl rats. *J Hypertens.* 1998 Nov;16(11):1611-8.

Nurkiewicz TR, Boegehold MA. High salt intake reduces endothelium-dependent dilation of mouse arterioles via superoxide anion generated from

nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007 Apr;292(4):R1550-6.

Nurkiewicz TR, Wu G, Li P, Boegehold MA. Decreased arteriolar tetrahydrobiopterin is linked to superoxide generation from nitric oxide synthase in mice fed high salt. *Microcirculation*. 2010 Feb;17(2):147-57.

Ohnaka K, Numaguchi K, Yamakawa T, Inagami T. Induction of cyclooxygenase-2 by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 2000 Jan;35(1 Pt 1):68-75.

Ohtsu H, Frank GD, Utsunomiya H, Eguchi S. Redox-dependent protein kinase regulation by angiotensin II: mechanistic insights and its pathophysiology. *Antioxid Redox Signal*. 2005 Sep-Oct;7(9-10):1315-26.

OKAMOTO K, AOKI K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963 Mar;27:282-93.

Olmos, RD, Benseñor IM. Dietas e hipertensão arterial: Intersalt e estudo DASH. *Rev Bras Hipertens*. 2001; 8(2): 221-4.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987 Jun 11-17;327(6122):524-6.

Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med*. 1990 Jul 5;323(1):22-7.

Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*. 2008 Feb;31 Suppl 2:S170-80.

Paterna S, Gaspare P, Fasullo S, Sarullo FM, Di Pasquale P. Normal-sodium diet compared with low-sodium diet in compensated congestive heart failure: is sodium an old enemy or a new friend? *Clin Sci (Lond)*. 2008 Feb;114(3):221-30.

Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*. 2006 Jul;86(3):747-803.

Pauletto P, Rattazzi M. Inflammation and hypertension: the search for a link. *Nephrol Dial Transplant*. 2006 Apr;21(4):850-3.

Pearson TA, Blair SN, Daniels SR, Eckel RH, Fair JM, Fortmann SP, Franklin BA, Goldstein LB, Greenland P, Grundy SM, Hong Y, Miller NH, Lauer RM, Ockene IS, Sacco RL, Sallis JF Jr, Smith SC Jr, Stone NJ, Taubert KA. AHA Guidelines for Primary Prevention of Cardiovascular Disease and Stroke: 2002 Update: Consensus Panel Guide to Comprehensive Risk Reduction for Adult Patients Without Coronary or Other Atherosclerotic Vascular Diseases. American Heart Association Science Advisory and Coordinating Committee. *Circulation*. 2002 Jul 16;106(3):388-91.

Pérez-Girón JV, Palacios R, Martín A, Hernanz R, Aguado A, Martínez-Revelles S, Barrús MT, Salaices M, Alonso MJ. Pioglitazone reduces angiotensin II-induced COX-2 expression through inhibition of ROS production and ET-1 transcription in vascular cells from spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014 Jun 1;306(11):H1582-93.

Persson PB, Skälweit A, Thiele BJ. Controlling the release and production of renin. *Acta Physiol Scand*. 2004 Aug;181(4):375-81.

Pimenta E, Gaddam KK, Oparil S, Aban I, Husain S, Dell'Italia LJ, Calhoun DA. Effects of dietary sodium reduction on blood pressure in subjects with

resistant hypertension: results from a randomized trial. *Hypertension*. 2009 Sep;54(3):475-81.

Pöschke A, Kern N, Maruyama T, Pavenstädt H, Narumiya S, Jensen BL, Nüsing RM. The PGE(2)-EP4 receptor is necessary for stimulation of the renin-angiotensin-aldosterone system in response to low dietary salt intake in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012 Nov 15;303(10):F1435-42.

Prozialeck WC, Edwards JR, Woods JM. The vascular endothelium as a target of cadmium toxicity. *Life Sci*. 2006 Sep 13;79(16):1493-506.

Quinn SJ, Williams GH. Regulation of aldosterone secretion. *Annu Rev Physiol*. 1988;50:409-26.

Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*. 1996 Apr 15;97(8):1916-23.

Rattmann, Y.D, Mecanismos vasculares envolvidos nos efeitos vasculares da *Dicksonia sellowiana* (PRESL.) HOOK. 2009.145f. Tese de Doutorado em Farmacologia. Universidade Federal do Paraná.

Raz-Pasteur A, Gamliel-Lazarovich A, Gantman A, Coleman R, Keidar S. Mineralocorticoid receptor blockade inhibits accelerated atherosclerosis induced by a low sodium diet in apolipoprotein E-deficient mice. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2014 Sep;15(3):228-35.

Rogacz S, Williams GH, Hollenberg NK. Time course of enhanced adrenal responsiveness to angiotensin on a low salt diet. *Hypertension*. 1990 Apr;15(4):376-80.

Ruivo GF, Leandro SM, do Nascimento CA, Catanozi S, Rocha JC, Furukawa LN, Dolnikoff MS, Quintão EC, Heimann JC. Insulin resistance due to chronic salt restriction is corrected by alpha and beta blockade and by L-arginine. *Physiol Behav.* 2006 Jul 30;88(4-5):364-70.

Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM, Appel LJ, Bray GA, Harsha D, Obarzanek E, Conlin PR, Miller ER 3rd, Simons-Morton DG, Karanja N, Lin PH; DASH-Sodium Collaborative Research Group. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. DASH-Sodium Collaborative Research Group. *N Engl J Med.* 2001 Jan 4;344(1):3-10.

Savoia C, Schiffrin EL. Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Clin Sci (Lond).* 2007 Jun;112(7):375-84.

Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol.* 2005 Jun;43(1):19-29.

Schmid C, Castrop H, Reitbauer J, Della Bruna R, Kurtz A. Dietary salt intake modulates angiotensin II type 1 receptor gene expression. *Hypertension.* 1997 Apr;29(4):923-9.

Schönbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1999 Oct;155(4):1281-91.

Schwab JM, Schluesener HJ, Meyermann R, Serhan CN. COX-3 the enzyme and the concept: steps towards highly specialized pathways and precision therapeutics? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003 Nov;69(5):339-43.

Seals DR, Jablonski KL, Donato AJ. Aging and vascular endothelial function in humans. *Clin Sci (Lond)*. 2011 May;120(9):357-75.

Sindhu RK, Ehdai A, Farmand F, Dhaliwal KK, Nguyen T, Zhan CD, Roberts CK, Vaziri ND. Expression of catalase and glutathione peroxidase in renal insufficiency. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Mar 22;1743(1-2):86-92.

Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem*. 1996 Dec 27;271(52):33157-60.

VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq Bras Cardiol. Sociedade Brasileira de Cardiologia / Sociedade Brasileira de Hipertensão / Sociedade Brasileira de Nefrologia*. 2010; 95(1 supl.1): 1-51.

Sofola OA, Knill A, Hainsworth R, Drinkhill M. Change in endothelial function in mesenteric arteries of Sprague-Dawley rats fed a high salt diet. *J Physiol*. 2002 Aug 15;543(Pt 1):255-60.

Steckelings UM, Kaschina E, Unger T. The AT2 receptor--a matter of love and hate. *Peptides*. 2005 Aug;26(8):1401-9.

Stolarz-Skrzypek K, Kuznetsova T, Thijs L, Tikhonoff V, Seidlerová J, Richart T, Jin Y, Olszanecka A, Malyutina S, Casiglia E, Filipovský J, Kawecka-Jaszcz K, Nikitin Y, Staessen JA; European Project on Genes in Hypertension (EPOGH) Investigators. Fatal and nonfatal outcomes, incidence of hypertension, and blood pressure changes in relation to urinary sodium excretion. *JAMA*. 2011 May 4;305(17):1777-85.

Strazzullo P, D'Elia L, Kandala NB, Cappuccio FP. Salt intake, stroke, and cardiovascular disease: meta-analysis of prospective studies. *BMJ*. 2009 Nov 24;339:b4567.

Suematsu N, Ojaimi C, Recchia FA, Wang Z, Skayian Y, Xu X, Zhang S, Kaminski PM, Sun D, Wolin MS, Kaley G, Hintze TH. Potential mechanisms of low-sodium diet-induced cardiac disease: superoxide-NO in the heart. *Circ Res*. 2010 Feb 19;106(3):593-600.

Sun J, Druhan LJ, Zweier JL. Reactive oxygen and nitrogen species regulate inducible nitric oxide synthase function shifting the balance of nitric oxide and superoxide production. *Arch Biochem Biophys*. 2010 Feb 15;494(2):130-7.

Suzuki H, Motley ED, Frank GD, Utsunomiya H, Eguchi S. Recent progress in signal transduction research of the angiotensin II type-1 receptor: protein kinases, vascular dysfunction and structural requirement. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2005 Oct;3(4):305-22.

Suzuki H, Swei A, Zweifach BW, Schmid-Schönbein GW. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography. *Hypertension*. 1995 May;25(5):1083-9.

Szasz T, Thakali K, Fink GD, Watts SW. A comparison of arteries and veins in oxidative stress: producers, destroyers, function, and disease. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2007 Jan;232(1):27-37.

Szöcs K, Lassègue B, Sorescu D, Hilenski LL, Valppu L, Couse TL, Wilcox JN, Quinn MT, Lambeth JD, Griendling KK. Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Jan;22(1):21-7.

Taddei S, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to endothelin in the rat aorta are mediated by thromboxane A₂. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993;22 Suppl 8: S328-31.

Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. *Hypertension*. 1997 Jan;29(1 Pt 2):274-9.

Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*. 2003 Dec;42(6):1075-81.

Tikellis C, Pickering RJ, Tsorotes D, Huet O, Chin-Dusting J, Cooper ME, Thomas MC. Activation of the Renin-Angiotensin system mediates the effects of dietary salt intake on atherogenesis in the apolipoprotein E knockout mouse. *Hypertension*. 2012 Jul;60(1):98-105.

Triggle CR, Hollenberg M, Anderson TJ, Ding H, Jiang Y, Ceroni L, Wiehler WB, Ng ES, Ellis A, Andrews K, McGuire JJ, Pannirselvam M. The endothelium in health and disease--a target for therapeutic intervention. *J Smooth Muscle Res*. 2003 Dec;39(6):249-67.

Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circ Res*. 1981 Mar;48(3):309-19.

Tuomilehto J, Jousilahti P, Rastenyte D, Moltchanov V, Tanskanen A, Pietinen P, Nissinen A. Urinary sodium excretion and cardiovascular mortality in Finland: a prospective study. *Lancet*. 2001 Mar 17;357(9259):848-51.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006 Mar 10;160(1):1-40.

Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, Willoughby DA. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Mar 15;91(6):2046-50.

Vanhoutte PM, Boulanger CM. Endothelium-dependent responses in hypertension. *Hypertens Res.* 1995 Jun;18(2):87-98.

Vanhoutte PM, Feletou M, Taddei S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol.* 2005 Feb;144(4):449-58.

Varagic J, Frohlich ED, Díez J, Susic D, Ahn J, González A, López B. Myocardial fibrosis, impaired coronary hemodynamics, and biventricular dysfunction in salt-loaded SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 Apr;290(4):H1503-9.

Weseler AR, Bast A. Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacologic treatments. *Curr Hypertens Rep.* 2010 Jun;12(3):154-61.

Westendorp B, Schoemaker RG, Buikema H, de Zeeuw D, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH. Dietary sodium restriction specifically potentiates left ventricular ACE inhibition by zofenopril, and is associated with attenuated hypertrophic response in rats with myocardial infarction. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2004 Mar;5(1):27-32.

Whelton PK, Appel LJ, Sacco RL, Anderson CA, Antman EM, Campbell N, Dunbar SB, Frohlich ED, Hall JE, Jessup M, Labarthe DR, MacGregor GA, Sacks FM, Stamler J, Vafiadis DK, Van Horn LV. Sodium, blood pressure, and cardiovascular disease: further evidence supporting the American Heart Association sodium reduction recommendations. *Circulation.* 2012 Dec 11;126(24):2880-9.

WHO. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2003;916:i-viii, 1-149, backcover.

WHO. Guideline: Sodium Intake for Adults and Children. Geneva: World Health Organization; 2012.

WHO. Prevention of cardiovascular disease: guidelines for assessment and management of cardiovascular risk: World Health Organization; 2007.

Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Oct 1;42(7):1149-60.

Wolf G. Free radical production and angiotensin. *Curr Hypertens Rep*. 2000 Apr;2(2):167-73.

Wright DH, Abran D, Bhattacharya M, Hou X, Bernier SG, Bouayad A, Fouron JC, Vazquez-Tello A, Beauchamp MH, Clyman RI, Peri K, Varma DR, Chemtob S. Prostanoid receptors: ontogeny and implications in vascular physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001 Nov;281(5):R1343-60.

Wu KK. Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. *Adv Pharmacol*. 1995; 33:179-207.

Wu R, Millette E, Wu L, de Champlain J. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens*. 2001 Apr;19(4):741-8.

Yang T, Singh I, Pham H, Sun D, Smart A, Schnermann JB, Briggs JP. Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt intake. *Am J Physiol*. 1998 Mar;274(3 Pt 2):F481-9.

Yu HC, Burrell LM, Black MJ, Wu LL, Dilley RJ, Cooper ME, Johnston CI. Salt induces myocardial and renal fibrosis in normotensive and hypertensive rats. *Circulation*. 1998 Dec 8;98(23):2621-8.

Zeng ZH, Luo BH, Gao YJ, Su CJ, He CC, Yi JJ, Li N, Lee RM. Control of vascular changes by renin-angiotensin-aldosterone system in salt-sensitive hypertension. *Eur J Pharmacol.* 2004 Oct 25;503(1-3):129-33.

Zhou MS, Nishida Y, Chen QH, Kosaka H. Endothelium-derived contracting factor in carotid artery of hypertensive Dahl rats. *Hypertension.* 1999 Jul;34(1):39-43.

Zhu J, Huang T, Lombard JH. Effect of high-salt diet on vascular relaxation and oxidative stress in mesenteric resistance arteries. *J Vasc Res.* 2007;44(5):382-90.

Zhu J, Mori T, Huang T, Lombard JH. Effect of high-salt diet on NO release and superoxide production in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004 Feb;286(2):H575-83.

Zinkevich NS, Gutterman DD. ROS-induced ROS release in vascular biology: redox-redox signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011 Sep;301(3):H647-53.

ANEXO I - Artigo publicado referente a tese de doutorado