

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLÓGIA**

JULIANA SANTOS DA ROCHA ALVES

**SOBRECARGA DE SÓDIO DURANTE A GESTAÇÃO
INDUZ ALTERAÇÕES FUNCIONAIS E ESTRUTURAS EM ARTÉRIAS DA PROLE
ADULTA: PAPEL DA
ANGIOTENSINA II**

**RECIFE
2018**

JULIANA SANTOS DA ROCHA ALVES

**SOBRECARGA DE SÓDIO DURANTE A GESTAÇÃO
INDUZ ALTERAÇÕES FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS EM ARTÉRIAS DA PROLE
ADULTA: PAPEL DA
ANGIOTENSINA II**

Tese de Doutorado apresentado como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Fabiano Elias Xavier

**RECIFE
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Alves, Juliana Santos da Rocha

Sobrecarga de sódio durante a gestação induz alterações funcionais e estruturais em artérias da prole adulta : papel da Angiotensina II / Juliana Santos da Rocha Alves – 2018.

141 f. : il.

Orientador: Fabiano Elias Xavier.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências.

Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife 2018.

Inclui referências.

1. Gravidez – Aspectos nutricionais 2. Fetos – Doenças I. Xavier, Fabiano Elias (Orientador). II. Título.

616.39

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 380

JULIANA SANTOS DA ROCHA ALVES

SOBRECARGA DE SÓDIO DURANTE A GESTAÇÃO
INDUZ ALTERAÇÕES FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS EM ARTÉRIAS DA PROLE
ADULTA: PAPEL DA
ANGIOTENSINA II

Tese de Doutorado apresentado como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovada em: 28/06/2018

Banca Examinadora:

Fabiano Elias Xavier/ UFPE
(Orientador)

Glória Isolina Boente Pinto Duarte/ UFPE
(Examinadora interna)

Leucio Duarte Vieira Filho/ UFPE
(Examinador interno)

Luiza Antas Rabêlo/ UFAL
(Examinadora externa)

Valéria Nunes de Souza/ UFPE
(Examinadora externa)

A Deus.

É Dele as vitórias alcançadas em minha vida

Meu esposo

Minha família

Pelo incentivo, apoio, compreensão, confiança e amor durante esses anos de estudo

AGRADECIMENTOS

Chego ao fim de mais um ciclo da minha vida e tenho muito a agradecer, ao longo desses 9 anos de pesquisa (incluindo iniciação científica, mestrado e doutorado) cresci como profissional e como pessoa também, vivenciei muitas experiências que vou levar para toda minha vida. Todo o êxito dessa minha trajetória é composto por momentos especiais passados ao lado de pessoas a quem eu quero expressar meus mais sinceros agradecimentos.

Começo agradecendo ao meu orientador, professor Fabiano Elias Xavier, sou muito grata por todo suporte científico, obrigada por todos esses anos, pelos ensinamentos, pelas conversas, pelas broncas, suas orientações só me fizeram crescer como profissional.

A professora Glória Isolina pelos conselhos profissionais visando sempre os desafios futuros.

A Hicla e Geórgia Leal, que juntas formamos um belo trio. Vocês foram um grande suporte nos experimentos, nos momentos de tristezas, frustrações, alegrias e descontração, tornaram a caminhada mais leve durante, principalmente, esses últimos 4 anos de trabalho.

A todos os meus amigos que fizeram ou fazem o LFFCV e o LRV: Fernanda, Francine, Diego, Leonardo, Luís, Jairo, Geórgia Félix, Ivson Silva, Odair, Marcelo, Rebeca, Luiza, Brydja, Lavínia.

A professora Valéria pelo ajuda, paciência e orientação nos experimentos do PCR.

Às professoras Cristina e Dayane pela atenção, disponibilidade e apoio demonstrados.

Aos técnicos de laboratório José Antônio, Felipe, Thaís e a Veterinária Cláudia pelo cuidado com os animais em estudo. A secretária de pós-graduação Fernanda pela paciência e disponibilidade para ajudar.

A todos os professores e amigos da pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e a FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, Edital Multiusuário) pelo apoio financeiro.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização desse trabalho, minha eterno OBRIGADA.

Se tiverdes fé do tamanho de um grão de mostarda, direis a este monte:
Passa daqui para acolá, e ele passará. E nada vos será impossível"
(Mt17.20)

RESUMO

Durante a vida intrauterina, o feto está suscetível a mudanças do ambiente uterino que podem acarretar alterações fenotípicas na vida adulta. Se essas alterações ocorrerem durante o período crítico de desenvolvimento fetal podem alterar a estrutura e função de órgãos e tecidos com consequências precoces e tardias. A sobrecarga de sódio perinatal é um dos fatores capazes de promover estas alterações. A prole de mães alimentadas com dieta rica em sódio apresenta alterações cardíacas, renais e metabólicas, tornando-os propensos ao surgimento de doenças cardiovasculares e metabólicas na vida adulta. Porém, ainda não existem dados sobre o impacto desta sobrecarga de sódio sobre o sistema vascular da prole. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da sobrecarga de sódio materna sobre a função (mecanismos de contração e relaxamento) e a estrutura (remodelamento e propriedades mecânicas) vasculares da prole e o envolvimento da angiotensina II. Para isso, ratas "Wistar" foram alimentadas com dieta hipersódica (HS: 8% de NaCl) ou normossódica (NS: 1,3% de NaCl) durante o período de gestação e lactação. A partir da 16ª semana de vida, uma parte da prole foi tratada com o losartan (15 mg/kg/dia, via oral, por gavagem) durante 8 semanas. Na 24ª semana, a prole foi submetida a experimentos de medida da pressão arterial, avaliação do relaxamento à acetilcolina (ACh) em aorta e artéria mesentérica de resistência (AMR), da reposta contrátil induzida pela fenilefrina ou noradrenalina, medida das propriedades mecânicas e estruturais em AMR e experimentos de "western blot" e PCR para estudo da expressão de alguns componentes da parede arterial. Comparado à prole NS, os animais HS apresentaram prejuízo do relaxamento à ACh em ambas artérias e hiper-reatividade à fenilefrina na aorta, sem apresentarem alterações na pressão arterial. Estas alterações foram acompanhadas com aumento da atividade da enzima conversora de angiotensina e aumento da expressão da ciclooxigenase (COX-2). Na presença de inibidores da ciclooxigenase (indometacina) e do estresse oxidativo (apocinina e tempol) estas alterações foram revertidas, sugerindo um aumento do perfil inflamatório (ciclooxigenase) e do estresse oxidativo (NADPH oxidase) nas artérias do grupo HS. Os diâmetros interno e externo, a espessura da parede e a área da seção transversal foram aumentados, enquanto a relação parede/lúmen não foi modificada na AMR do HS em comparação com o NS. Por outro lado, a distensibilidade da AMR do grupo HS foi semelhante à do grupo NS. O tratamento

crônico com o losartan foi capaz de reverter o prejuízo da função endotelial em ambas artérias e a hiper-reatividade à fenilefrina na aorta, porém não reverteu as alterações estruturais (hipertrofia) na AMR da prole HS; apenas houve uma diminuição da resposta miogênica nesses animais após tratamento com losartan. Os resultados aqui obtidos demonstram que a sobrecarga de sódio materna foi capaz de programar importantes alterações funcionais sobre o sistema vascular da prole, as quais parecem ser mediadas através do aumento da formação de radicais livres derivados da NADPH oxidase e de metabólitos derivados da COX-2, que por sua vez são dependentes dos efeitos estimulatórios da angiotensina II. Apesar de a angiotensina II ser um fator indutor de hipertrofia vascular, as alterações estruturais observadas em artérias de resistência da prole HS são independentes deste fator.

Palavras-chave: Programação fetal. Disfunção vascular. Sobrecarga de sódio. Angiotensina II

ABSTRACT

The concept of "fetal programming" suggests that an individual can be "programmed" during intrauterine and perinatal stages to develop diseases in adulthood. The literature shows that maternal sodium overload causes important cardiac, renal and metabolic changes in adult offspring, predisposing them to the emergence of cardiovascular diseases. However, there is yet no data on the impact of this maternal sodium overload on the offspring's vascular system. Thus, the aim of this study was to investigate the effect of maternal sodium overload on the function (contracting and relaxing mechanisms) and vascular structure (arterial remodeling and mechanical properties) of the offspring and whether these effects would be mediated by the actions of angiotensin II via AT₁ receptor activation. Dams were fed a high sodium diet (HS: 8% NaCl) or normal sodium concentration (NS: 1.3% NaCl) during pregnancy and lactation periods. At 16 weeks of age, part of the male offspring was treated with losartan (15 mg/kg day, via gavage) for 8 weeks. Blood pressure, acetylcholine and phenylephrine/noradrenaline responses were analyzed in aorta and mesenteric resistance arteries (MRA) from 24-week-old male offspring. The vascular structure and mechanics of the MRA were assessed with pressure myography. Expression of some protein of the arterial wall was measured by western blot. Compared to NS, HS offspring was normotensive. Contraction to phenylephrine increased (aorta) and relaxation to acetylcholine was decreased only in aorta and MRA from HS than age-matched NS. These changes were accompanied by an increase in the activity of the angiotensin converting enzyme and increased COX-2 expression. Preincubation with tempol, apocynin or indomethacin decreased contraction to phenylephrine (aorta) and potentiated relaxation to acetylcholine in HS aorta and MRA, suggesting an increase in the inflammatory (COX-2) and oxidative stress (NADPH oxidase) profile in HS arteries. Internal and external diameters, wall thickness and cross-sectional area were increased, whereas the wall-to-lumen ratio was unchanged in MRA from HS compared with NS. On the other hand, the distensibility of HS MRA was similar to NS MRA. Chronic treatment with losartan could reverse the impairment of endothelium-dependent relaxation in both HS aorta and MRA and decreased hyperreactivity to phenylephrine in HS aorta. Losartan treatment did not produce any detectable effect on structural properties in MRA from NS or HS offspring. The results obtained here demonstrate that maternal sodium overload during perinatal period

“programs” important functional changes on the vascular system of the offspring, which appear to be mediated by increased formation of reactive oxygen species derived from NADPH oxidase and increased metabolites derived from COX-2, which in turn are dependent on the stimulatory effects of angiotensin II. Although angiotensin II is a factor that induces vascular hypertrophy, the structural changes observed in HS arteries are independent of angiotensin II.

Keywords: Fetal programming. Vascular dysfunction. Sodium overload. Angiotensin II

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação da estrutura da artéria.....	25
Figura 2- Biossíntese de óxido nítrico (\bullet NO) e sua ação nos vasos sanguíneos.....	27
Figura 3- Formação e metabolismo de espécies reativas de oxigênio.....	30
Figura 4- Síntese e mecanismos de sinalização dos prostanóides.....	34
Figura 5- Revisão esquemática do sistema renina-angiotensina.....	36
Figura 6- Classificação dos tipos de remodelamento vascular de acordo com as alterações na área de secção transversal e diâmetro interno.....	40
Figura 7- Esquema demonstrativo da relação entre a angiotensina II, as espécies reativas de oxigênio (EROs), a ciclooxigenase (COX) e seu papel na disfunção endotelial.....	49
Figura 8- Foto representativa de miógrafo para vasos de resistência.....	56
Figura 9- Foto representativa de uma artéria de resistência pressurizada.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	ácido araquidônico
ABIA	Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação
Ang II	Angiotensina II
AMR	Artéria mesentérica de resistência
AP-1	Proteína ativadora 1
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
DAG	Diacilglicerol
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
eNOS	Sintase de óxido nítrico endotelial
EP ₁	Subtipo 1 do receptor da prostaglandina E ₂
ET-1	Endotelina-1
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
IL-6	Interleucina-6
IP ₃	Inositol trifosfato
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
NaCl	Cloreto de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
MAPK	Proteína quinase de atividade mitogênica
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
NO	Óxido nítrico
NF-κB	Fator nuclear kappa B
PKC	Proteína quinase C
PGI ₂	Prostaciclina
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
SRA	Sistema renina-angiotensina
SHR	Ratos espontaneamente hipertenso
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

TLR4	Receptor <i>Toll-Like</i> 4
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TP	Receptor de tromboxano A ₂
VCAM-1	Molécula celular de adesão vascular 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1 PROGRAMAÇÃO FETAL DAS DOENÇAS DO ADULTO.....	21
2.2 CONSUMO DE SÓDIO <i>VERSUS</i> PROGRAMAÇÃO FETAL DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	22
2.3 O SISTEMA VASCULAR: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E FUNCIONAIS.....	24
2.3.1 Regulação do tônus vascular	25
2.3.1.1 Óxido nítrico.....	26
2.3.1.2 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	28
2.3.1.3 Derivados vasoativos da via da ciclooxigenase (COX).....	32
2.3.1.4 Sistema renina-angiotensina (SRA).....	34
2.4 O SRA COMO MEDIADOR DA DISFUNÇÃO ENDOTELIAL, INFLAMAÇÃO, ESTRESSE OXIDATIVO E REMODELAMENTO DA PAREDE VASCULAR.....	38
2.4.1 Relação entre o SRA e as alterações estruturais do sistema cardiovascular	38
2.4.2 Efeitos pro-inflamatórios e pro-oxidativos da angiotensina II	42
2.4.3 Envolvimento da angiotensina II no desenvolvimento da disfunção endotelial	46
2.5 CONSUMO ELEVADO DE SÓDIO DURANTE A GRAVIDEZ: IMPLICAÇÕES SOBRE O SISTEMA VASCULAR E ENVOLVIMENTO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA.....	50
3 MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1 ANIMAIS.....	53
3.2 MEDIDA DA PRESSÃO ARTERIAL.....	54
3.3 ESTUDO DE REATIVIDADE VASCULAR E PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	54
3.3.1 Aorta Torácica	54
3.3.2 Artéria mesentérica de resistência (AMR)	55
3.3.3 Protocolos Experimentais	55

3.4 METODOLOGIA UTILIZADA PARA O ESTUDO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E ESTRUTURAIS DE ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA DE RATO.....	57
3.4.1 Cálculos das propriedades mecânicas e estruturais das artérias mesentéricas de resistência.....	58
3.5 DETERMINAÇÃO IN SITU DA PRODUÇÃO DE ÂNIONS SUPERÓXIDO....	60
3.6 INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DE COMPONENTES DA PAREDE VASCULAR.....	60
3.7 MEDIDA DA ATIVIDADE DA ECA.....	62
3.8 EXPRESSÃO DE RNAM POR REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) QUANTITATIVA EM TEMPO REAL.....	62
3.9 FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS.....	64
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
4 RESULTADOS.....	65
4.1 INGESTÃO DE ÁGUA E NA _{CL} DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO....	65
4.2 PESO CORPORAL E PRESSÃO ARTERIAL DA PROLE.....	65
4.3 ESTUDOS DE REATIVIDADE VASCULAR.....	66
4.3.1 Resposta contráctil induzida pelo cloreto de potássio (KCl).....	66
4.3.2 Relaxamento dependente e independente do endotélio.....	66
4.3.3 Efeito das espécies reativas de oxigênio (EROs), da NADPH oxidase, da ciclooxigenase e da angiotensina II no relaxamento dependente do endotélio.....	67
4.3.4 Vasoconstrição induzida por estimulação alfa-adrenérgica.....	76
4.3.5 Vasoconstrição induzida por angiotensina I e angiotensina II, medida da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) e expressão gênica dos receptores AT₁.....	81
4.4 DETERMINAÇÃO IN SITU DA PRODUÇÃO DE ÂNIONS SUPERÓXIDO....	84
4.5 EXPRESSÃO PROTEICA DA COX-1, COX-2, ENOS E NOX -4.....	86
4.6 ESTUDOS DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E ESTRUTURAIS EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA.....	91
4.7 EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM O LOSARTAN SOBRE AS ALTERAÇÕES FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS DA PROLE EXPOSTA À	

SOBRECARGA DE SÓDIO DURANTE A VIDA INTRAUTERINA E PERINATAL.....	96
4.7.1 Relaxamento dependente do endotélio e contração induzida por estimulação alfa adrenérgica.....	96
4.7.2 Expressão proteica da COX-2.....	101
4.7.3 Propriedades mecânicas e estruturais de artérias mesentéricas de resistência.....	103
5 DISCUSSÃO.....	106
6 CONCLUSÃO.....	116
REFERÊNCIAS.....	117

1 INTRODUÇÃO

Inúmeras publicações científicas têm demonstrado que modificações do ambiente intrauterino durante os períodos críticos de desenvolvimento fetal estão associados ao aparecimento de várias doenças crônicas durante a vida adulta. O grupo liderado pelo epidemiologista britânico David Barker foi o primeiro a demonstrar essas observações em regiões da Inglaterra e do País de Gales (BARKER *et al.*, 1986). Concretamente este grupo evidenciou uma associação positiva entre as taxas de mortalidade por doença coronariana entre 1968 e 1978, e as respectivas taxas de mortalidade infantil nessas mesmas regiões cerca de 50 anos. Estes estudos sócios demográficos deram origem à “Hipótese de Barker” ou “teoria da origem fetal das doenças do adulto”, segundo a qual, a nutrição deficiente durante a gestação e infância precoce originaria uma adaptação metabólica e/ou estrutural permanente que aumenta o risco de desenvolvimento de doença coronariana e outras doenças associadas, como a hipertensão arterial, o diabetes e o acidente vascular cerebral (AVC) na vida adulta – fenômeno conhecido como ‘programação fetal’ (BARKER *et al.*, 1989; BARKER *et al.*, 1994; BARKER *et al.*, 2007). Apesar da ‘Hipótese de Barker’ ter sido elaborada a partir de dados epidemiológicos, ela tem sido confirmada experimentalmente através do uso de animais, sobretudo roedores.

A maioria dos estudos epidemiológicos e experimentais tem dado maior ênfase ao efeito da desnutrição materna sobre a ‘programação fetal’ de algumas doenças na vida adulta. Contudo, já existem hoje inúmeros estudos demonstrando que a exposição fetal a outros insultos, como a hiperglicemia (RAMOS-ALVES *et al.*, 2012; DE QUEIROZ *et al.*, 2015; DE SÁ *et al.*, 2017), os glicocorticoides (KHORRAM *et al.*, 2013) ou o excesso de sódio (CABRAL *et al.*, 2012) têm uma contribuição importante para o aparecimento de complicações desde a vida intrauterina até a vida adulta.

Estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado uma estreita relação entre o consumo elevado de sódio e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (TUOMILEHTO *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2009; STOLARZ-SKRZYPEK *et al.*, 2011). Quando ingerido em excesso, o sódio, pode causar elevação da pressão arterial, hipertrofia cardíaca, disfunção diastólica, arritmias ventriculares e alterações da função e da estrutura vascular (SCHMIEDER *et al.*, 1988; dos SANTOS *et al.*, 2006; JESSUP *et al.*, 2010; BALDO *et al.*, 2011, 2012).

A partir de 2011 o governo brasileiro passou a celebrar acordos com a Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação (ABIA) para reduzir gradativamente a quantidade de sódio presente em alimentos industrializados. A meta é reduzir em 28,5 mil toneladas a presença de sódio na mesa dos brasileiros até 2020, para se adequar à recomendação da Organização Mundial de Saúde – OMS (PUFF, 2014). Apesar destas tentativas, a população brasileira ainda consome o dobro da quantidade de sódio recomendada pela OMS. As consequências deste consumo sobre o sistema cardiovascular de indivíduos adultos já são bem conhecidas. Contudo, nos últimos anos vários grupos de pesquisa têm se dedicado a estudar o impacto da sobrecarga de sódio durante a gestação e lactação sobre aspectos fisiológicos e/ou estruturais da prole em diferentes idades (CONTRERAS *et al.*, 1989, CARDOSO *et al.*, 2009, PIECHA *et al.*, 2012, RAMOS *et al.*, 2012).

Está descrito na literatura que durante a gestação, mulheres e ratas preferem dietas com teor de sódio mais elevado (BROWN *et al.*, 1986; MORRIS *et al.*, 2008). Um estudo realizado em roedores revelou que o fluido amniótico de ratas alimentadas com dieta rica em sódio apresenta concentrações mais elevadas deste íon quando comparadas às que receberam dieta normossódica (HAZON *et al.* 1988). Além disso, indivíduos que foram expostos a concentrações elevadas de sódio durante a vida intrauterina desenvolvem na vida adulta uma preferência por dietas mais salgadas (CRYSTAL *et al.*, 1998).

A sobrecarga de sódio durante a gestação tem sido apontada como um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento de hipertensão arterial na prole adulta. Um estudo realizado por CONTRERAS *et al.* (1983), demonstrou que a prole adulta oriunda de ratas alimentadas com dieta rica em sódio (3% de NaCl) apresentou pressão arterial mais elevada em comparação com a prole de ratas que foram alimentadas com dieta normossódica. A sobrecarga de sódio durante a gravidez está ainda associada ao desenvolvimento de alterações da função renal e metabólica da prole. Estudos com ratos têm demonstrado glomeruloesclerose, proteinúria, alterações no perfil lipídico, aumento da infiltração de macrófagos renais e estresse oxidativo na prole de ratas que foram expostos a sobrecarga de sódio durante a gravidez e lactação (MARIN *et al.*, 2008; CARDOSO *et al.*, 2009; CABRAL *et al.*, 2012). Além desses efeitos, a ingestão materna elevada de sódio tem sido associada ao desenvolvimento de alterações estruturais (hipertrofia) da parede ventricular esquerda e da parede de algumas artérias da prole, como a aorta, a carótida e a artéria

mesentérica, independentemente dos níveis de pressão arterial (PIECHA *et al.*, 2012; ALVES-RODRIGUES *et al.*, 2013).

Os mecanismos responsáveis pelas alterações cardiovasculares na prole de ratas alimentadas com dieta rica em sódio ainda não foram totalmente elucidados. Entretanto, o sistema renina-angiotensina tem sido apontado como um importante modulador desse processo. Um estudo publicado por da SILVA *et al.* (2003) demonstrou que a sobrecarga de sódio materna é capaz de induzir alterações no sistema renina-angiotensina da prole e que estas alterações parecem estar associadas a algumas alterações funcionais e estruturais observadas.

Diante dos estudos citados acima, evidencia-se que o consumo de dietas ricas em sódio pela mãe tem um importante impacto sobre o desenvolvimento da prole, sobretudo no que diz respeito ao aparecimento de doenças que acometem o sistema cardiovascular. Desta forma, estudos que visem caracterizar a fisiopatologia desses processos são de grande relevância, não só para o seu entendimento, mas também para sua prevenção e/ou tratamento. Portanto, o presente estudo tem como principal objetivo investigar se a sobrecarga de sódio durante a gestação e lactação é capaz de alterar a função, a estrutura e as propriedades mecânicas de artérias da prole adulta e ainda investigar a contribuição do sistema renina-angiotensina nestas possíveis alterações.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PROGRAMAÇÃO FETAL DAS DOENÇAS DO ADULTO.

O conceito de que doenças crônicas como, a hipertensão arterial, o diabetes mellitus tipo-2 e a doença coronariana podem ser ‘programadas’ através de alterações do ambiente intrauterino foi descrito a partir de estudos publicados pelo médico e epidemiologista britânico David Barker e seus colaboradores ainda na década de 1980 (BARKER *et al.*, 1987). Eles constataram que condições precárias de desenvolvimento fetal, como a desnutrição materna e infantil, comuns às regiões mais carentes da Inglaterra e do País de Gales no início do século XX, estava intimamente relacionada às taxas de mortalidade por doença coronária nestas regiões, 50 anos mais tarde, entre os anos de 1968 e 1978 (BARKER *et al.*, 1986). Estas observações originaram a “Hipótese de Barker” ou “Teoria da origem fetal das doenças do adulto”, segundo a qual a nutrição deficiente durante a vida intrauterina e infância precoce origina uma adaptação metabólica e/ou estrutural permanente que aumenta o risco de desenvolvimento de doença coronariana e outras doenças associadas, como a hipertensão arterial e o diabetes na vida adulta (BARKER, 1998).

A Hipótese de Barker se baseia no conceito de plasticidade do desenvolvimento, que é a capacidade de um genótipo poder originar diferentes estados morfológicos ou fisiológicos em resposta à exposição a diferentes insultos durante o desenvolvimento. Essas adaptações ocorreriam na vida intrauterina, durante um período de desenvolvimento conhecido como “período crítico de desenvolvimento fetal”. As vias e mecanismos exatos implicados na programação fetal de doenças crônicas ainda estão por esclarecer, mas suspeita-se que as modificações epigenéticas desempenham um papel fundamental, tendo em vista que durante o desenvolvimento do indivíduo, o epigenoma está significativamente mais sensível aos fatores ambientais (AKYOL *et al.*, 2012; MORTENSEN *et al.*, 2014; INGUL *et al.*, 2016; MASLOVA *et al.*, 2017). Esta sensibilidade do epigenoma ao ambiente representa um mecanismo adaptativo pelo qual o organismo em desenvolvimento ajusta os seus sistemas metabólicos e homeostáticos para se moldar ao ambiente extrauterino com que irá contatar.

A discrepância entre o ambiente intrauterino e extrauterino pode prever a susceptibilidade individual ao desenvolvimento de doença no futuro. Estas alterações

epigenéticas podem influenciar o funcionamento de determinados genes, podendo assim ter um papel silenciador ou ativador. Desta forma, a susceptibilidade para o desenvolvimento do diabetes mellitus tipo-2 e/ou da síndrome metabólica na vida adulta, por exemplo, pode estar relacionada com ambientes intrauterinos caracterizados tanto por excesso de aporte nutricional como por carência de aporte nutricional (STANKOV *et al.*, 2013).

Os principais tipos de alterações epigenéticas são: a metilação do DNA, modificação de histonas e regulação de microRNAs. Um estudo publicado por SINCLAIR *et al.* (2007) demonstrou que os fetos de ovelhas alimentadas com uma dieta pobre em grupos metilo, apresentaram hipometilação do DNA hepático, resistência à insulina e elevação da pressão arterial. Outro estudo demonstrou que a descendência de ratas alimentados com uma dieta hipoproteica durante a gravidez apresenta hipometilação do DNA e, portanto, hiper- expressão de vários genes, cujas alterações foram revertidas quando as mães foram suplementadas com ácido fólico, um doador de grupos metilo (LILLYCROP *et al.*, 2007). Ainda, um estudo realizado por VUCETIC *et al.* (2010) demonstrou que o consumo materno de uma dieta com alto teor de gordura durante a gestação foi capaz de promover hipometilação do DNA, associado a alterações de longo prazo na produção central da dopamina e na alteração no comportamento alimentar da prole. Em humanos, um estudo de EL HAJJ *et al.* (2013) descreveu resultados relativos ao gene *mesoderm-specific transcript* (MEST), que se encontra hipometilado no sangue do cordão umbilical e amostras de placenta de crianças expostas à hiperglicemia materna quando comparadas com amostras de crianças não expostas à hiperglicemia. Existem, portanto, várias evidências de que a modificação do ambiente intrauterino influencia a expressão de genes fetais via metilação de DNA ou outros mecanismos epigenéticos, resultando no aumento de susceptibilidade à doença em várias fases do desenvolvimento.

2.2 CONSUMO DE SÓDIO VERSUS PROGRAMAÇÃO FETAL DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Apesar de inicialmente grande parte dos estudos terem dado maior ênfase ao efeito da desnutrição materna sobre a 'programação fetal' de algumas doenças na vida adulta (BARKER *et al.*, 1986; BONEY *et al.*, 2005; HEERWAGEN *et al.*, 2010), existem dados epidemiológicos e experimentais demonstrando que a exposição fetal a outras condições adversas, como a hiperglicemia (HOLEMANS *et al.*, 1999;

RAMOS-ALVES *et al.*, 2012), os glicocorticoides (MACKINTOSH *et al.*, 1985; KHORRAM *et al.*, 2013) e os níveis elevados de sódio (CONTRERAS *et al.*, 1993; da SILVA *et al.*, 2009; CABRAL *et al.*, 2012) tem uma contribuição importante para o aparecimento de doenças crônicas desde a vida intrauterina até a vida adulta.

Tendo em vista que um dos fatores mais envolvidos na gênese de doenças cardiovasculares, dentre elas a hipertensão arterial, é o consumo elevado de sódio, vários estudos vêm sendo realizados com o objetivo de estabelecer alguma relação entre o consumo de sódio durante a gestação e/ou lactação e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares na prole durante os vários estágios de desenvolvimento (RAMOS *et al.*, 2012; MARUYAMA *et al.*, 2015; SERAVALLI *et al.*, 2016). Os resultados destes estudos têm revelado que a exposição fetal à sobrecarga de sódio pode resultar em alterações renais e/ou cardiovasculares e aumento do risco de desenvolvimento de hipertensão arterial na vida adulta (CONTRERAS *et al.*, 2000; da SILVA, *et al.*, 2009).

Um estudo publicado por GRAY *et al.* (2015) revelou que a ingestão materna de uma dieta com alto teor de lipídios e/ou sódio é capaz de promover, na prole, alterações de parâmetros metabólicos, do crescimento e do desenvolvimento fetal. CARDOSO *et al.* (2009), utilizando ratos, demonstraram que a sobrecarga de sódio a partir da fase pré-natal até o desmame leva a alterações no metabolismo lipídico e na função renal da prole adulta. Nestes animais, a exposição pré-natal a um ambiente rico em sódio prejudica a nefrogênese, reduz o número de néfrons (KOLEGANOVA *et al.*, 2011), induz glomeruloesclerose (MARIN *et al.*, 2008) e proteinúria (CARDOSO *et al.*, 2009) durante várias fases do desenvolvimento. Além disso, o elevado consumo de sódio materno é capaz de promover hipertrofia ventricular esquerda e direita em ratos recém-nascidos (SERAVALLI *et al.*, 2016).

Em um estudo publicado em 2004, VIDONHO *et al.* (2004) demonstraram que a exposição à sobrecarga de sódio durante a gestação e lactação também pode influenciar a pressão arterial a longo prazo, a sensibilidade à insulina e os níveis de lipídios plasmáticos da prole adulta. GRAY *et al.* (2015) ainda demonstrou que a ingestão materna de uma dieta com alto teor de lipídeos e/ou sódio é capaz de promover alterações na função vascular da prole, caracterizada por redução do relaxamento arterial à acetilcolina, desde as primeiras semanas de vida até a vida adulta. Entretanto, os mecanismos envolvidos nestas alterações vasculares têm sido muito pouco estudados.

2.3 O SISTEMA VASCULAR: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E FUNCIONAIS.

Os vasos sanguíneos são anatomicamente e funcionalmente organizados em três camadas; a túnica íntima, a túnica média e a túnica adventícia, que são compostas de diferentes tipos celulares incorporados à matriz extracelular (Figura 1). As diferentes camadas da parede vascular exercem sua própria influência no controle vasomotor e na estrutura vascular, sendo o efeito final o resultado da participação inter-relacionada das três camadas (MARTINEZ-LEMUS *et al.*, 2012).

A túnica íntima delimita a parede do vaso em relação ao lúmen e é formada pelo endotélio, constituído por uma camada simples de epitélio e sua lâmina basal subjacente composta predominantemente de colágeno tipo IV. As células endoteliais são geralmente lisas e alongadas na direção do fluxo sanguíneo, muitas vezes com média de 0,2 a 0,5 μm de espessura, 10 a 15 μm de largura e 25 a 50 μm de comprimento. A túnica íntima é separada da túnica média pela lâmina elástica interna que está localizada acima do tecido conjuntivo (RHODIN *et al.*, 1980).

A túnica média contém células de músculo liso que estão incorporadas em uma matriz extracelular de elastina e colágeno e proteoglicanos. Esses constituintes estão organizados em uma estrutura 3D complexa. As células do músculo liso vascular têm forma de fuso, tipicamente de 100 μm de comprimento e cerca de 5 μm de diâmetro. Nas artérias elásticas, o músculo liso medial é organizado em camadas concêntricas de 5 a 15 μm de espessura, separadas por finas lâminas fenestradas de elastina. As células do músculo liso estão cercadas por colágeno interlamelar (principalmente de tipo I, III e IV) e fibras de elastina. As fibras de colágeno são onduladas e estão entre as lamelas elásticas e as camadas de células musculares lisas. Por outro lado, nas artérias musculares, o músculo liso aparece como uma única camada espessa delimitada por uma lâmina elástica interna e uma externa menos marcada. Exceções são as artérias cerebrais que não possuem lâmina externa. As fibras de colágeno na camada média são formadas em feixes ondulados e a orientação das fibras é dispersa (STARY *et al.*, 1992).

Finalmente, a adventícia, ou seja, a camada mais externa da parede consiste principalmente em uma rede densa de fibras de colágeno de tipo I, com elastina, fibras e terminações nervosas, fibroblastos e "vasa vasorum" (pequenas artérias responsáveis pela irrigação sanguínea e nutrição da parede do vaso). Da mesma

forma que na túnica média, o colágeno na adventícia é ondulado e sua orientação principal é distribuída aleatoriamente. No entanto, tem uma maior dispersão angular e forma feixes mais espessos em comparação com o colágeno na túnica média. (RHODIN *et al.*, 1967).

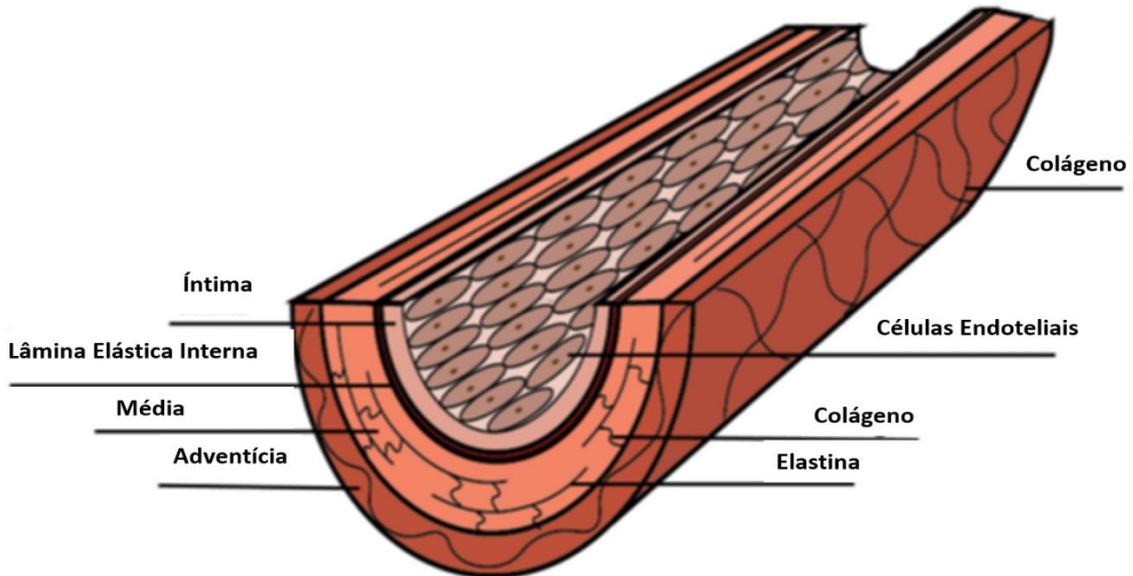


Figura 1 - Representação da estrutura da arterial. As artérias são compostas por três camadas: íntima, média e adventícia. A camada íntima contém basicamente células endoteliais, é separada da túnica média pela lâmina elástica interna. A túnica média apresenta grande quantidade de fibras elásticas e colágenas. Entre outros constituintes, a adventícia é também formada por fibras de colágeno. (Modificado de KOHN *et al.*, 2015).

Como um dos componentes da túnica íntima, o endotélio já não é considerado apenas como uma barreira mecânica entre o sangue e os tecidos adjacentes; ele atua como receptor e transdutor de vários tipos de sinais entre o sangue circulante e os demais componentes da parede vascular. As células endoteliais têm funções exócrinas, parácrinas e autócrinas e estão envolvidas na regulação de várias funções no sistema vascular, como a regulação do tônus arterial, a angiogênese, a coagulação sanguínea, a fibrinólise e a inflamação (BLATOUNI *et al.*, 2001).

2.3.1 Regulação do tônus vascular

O tônus e a estrutura da parede vascular são regulados através do equilíbrio entre fatores vasodilatadores e vasoconstritores, antiproliferativos e proliferativos, antifibróticos e pró-fibróticos, que são sintetizados em grande parte, pelas células endoteliais e as células musculares lisas em resposta a estímulos mecânicos e/ou químicos. O desequilíbrio entre estas substâncias leva a disfunção endotelial e/ou ao remodelamento vascular observados em várias situações de risco cardiovascular

(PRIES *et al.*, 2006). Alguns dos fatores mais envolvidos nas alterações vasculares são o óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$), as espécies reativas de oxigênio (EROs) e os prostanóides derivados da ciclooxigenase (COX), que são regulados pelo sistema renina-angiotensina (SRA) (VIRDIS *et al.*, 2010). O papel destes fatores será descrito a seguir.

2.3.1.1 Óxido nítrico

O $\bullet\text{NO}$ é o principal mediador do relaxamento dependente do endotélio. Ele é um radical livre, gasoso, muito difuso e com meia-vida curta. A produção de $\bullet\text{NO}$ é catalisada pela enzima sintase de óxido nítrico (NOS), que é responsável pela conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina e $\bullet\text{NO}$ (PALMER *et al.*, 1988; FLEMING *et al.*, 2003). As isoformas da NOS pertencem a uma família de redutases semelhantes ao citocromo P450 ligadas à enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase (NADPH).

Existem três isoformas da NOS que diferem em sua expressão e atividade. A isoforma endotelial (eNOS) ou NOS3 (principalmente expressa em células do endotélio vascular), a isoforma neuronal (nNOS) e NOS1 (expressa principalmente em neurônios) e a isoforma induzível (iNOS) ou NOS2, inicialmente descrita em macrófagos e mais tarde em células endoteliais e células musculares lisas durante ou após estimulação com vários agentes inflamatórios. As duas primeiras são constitutivamente expressas e sua atividade depende da formação intracelular do complexo Ca^{2+} -calmodulina; já a última funciona independente da formação deste complexo (ALDERTON *et al.*, 2001).

A produção de $\bullet\text{NO}$ também é modulada pela dimetilarginina assimétrica (ADMA), um inibidor endógeno da NOS e pelo seu cofator tetrahydrobiopterina (BH4) (WERNER *et al.*, 2011). Após a sua produção, o $\bullet\text{NO}$ se difunde para o músculo liso subjacente, onde ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs), que converte o trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), isso leva a uma redução da concentração de Ca^{2+} citoplasmática e o relaxamento muscular (Figura 2) (MARTINELLI *et al.*, 2018).

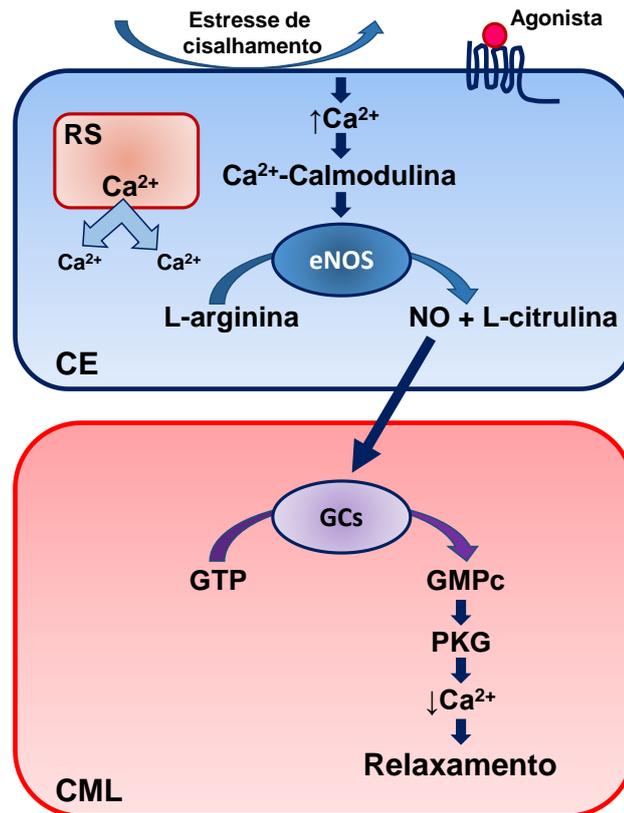


Figura - 2. Biossíntese de óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) e sua ação nos vasos sanguíneos. A biossíntese do vasodilatador endógeno $\bullet\text{NO}$ é realizada principalmente nas células endoteliais (CE) pela sintase de $\bullet\text{NO}$ endotelial (eNOS). Isso é desencadeado por agonistas ou pelo estresse de cisalhamento que induzem um aumento da concentração intracelular de cálcio (Ca^{2+}). O aminoácido L-Arginina é convertido pela eNOS em $\bullet\text{NO}$ e L-citrulina como subproduto. O $\bullet\text{NO}$ se difunde para as células de músculo liso adjacentes (CML), onde ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), que converte o trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), isso leva a uma redução da concentração de Ca^{2+} intracelular e o ao relaxamento da CML.

A eNOS está localizada em invaginações da membrana plasmática denominadas cavéolas, que são ricas em caveolina-1 (Cav-1) e outras proteínas especializadas, como a proteína de choque térmico 90 (HSP90). A associação com a Cav-1 mantém baixa atividade da eNOS, enquanto a interação de eNOS com a HSP90 aumenta a atividade desta (XI *et al.*, 2005). Existem várias vias pelas quais a atividade da eNOS pode ser aumentada. A ativação de receptores específicos com agonistas, como acetilcolina ou a bradicinina, pode ativar rapidamente eNOS por deslocamento dependente do complexo cálcio-calmodulina (Figura 2) e de Cav-1 (DRAB *et al.*, 2001). A eNOS também pode ser estimulada pela fosforilação do seu sítio Ser¹¹⁷⁷ por várias quinases, como a Akt, proteína quinase dependente de AMPc (PKA) e proteína quinase ativada pelo AMPc (AMPK) (BIRD 2011). A ativação da Akt pela fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) medeia a ativação da eNOS induzida pelo estresse

de cisalhamento, pelo fator de crescimento endotelial, pelo estrogênio ou pela insulina (CONTRERAS *et al.*, 2011).

A atividade da Akt também pode ser estimulada pela PKA, tanto diretamente quanto através da PI3K. A PKA é a principal via para muitos receptores ativados por agonistas e, além de ativar a eNOS através da fosforilação da Ser¹¹⁷⁷, também pode estimular a eNOS através da desfosforilação da Thr⁴⁹⁵ (sítio inibitório da eNOS) mediada pela proteína fosfatase 1 (PP1) (FLEMING *et al.*, 2001). Já a proteína quinase C (PKC) inibe a atividade da eNOS através da fosforilação da Thr⁴⁹⁵ (MATSUBARA *et al.*, 2003). Este processo é mediado pelo diacilglicerol (DAG), formado a partir da hidrólise do 2,4-fosfatidilinositol (PIP₂) pela fosfolipase C (PLC), que ativa a PKC (MOUNT *et al.*, 2007). Esta complexa regulação da eNOS e a interconexão entre as várias vias regulatórias são de fundamental importância para uma produção adequada de •NO. A alteração em qualquer destas vias pode resultar em redução da produção de •NO e de seus efeitos biológicos.

2.3.1.2 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

As EROs são formas reduzidas de oxigênio energeticamente mais reativas que o oxigênio molecular, ou seja, são compostos que tem maior facilidade em reagir com outras substâncias podendo gerar uma cascata de reações. As formas mais comuns de EROs são o ânion superóxido (O₂⁻), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o radical hidroxil (OH⁻) e o peroxinitrito (ONOO⁻). Existe um aparente paradoxo entre o papel das EROs como biomoléculas essenciais na regulação de muitas funções celulares e como subprodutos tóxicos do metabolismo que podem estar relacionados, pelo menos em parte, a diferenças nas concentrações de EROs produzidas. Assim, em baixas concentrações intracelulares, as EROs têm um papel fundamental na regulação fisiológica do tônus vascular, crescimento celular, adesão, diferenciação, senescência e apoptose (SENA *et al.*, 2012). No entanto, níveis excessivos de EROs podem estar associados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, entre elas a hipertensão arterial (WARD *et al.*, 2006) e a insuficiência cardíaca (BYRNE *et al.*, 2006)

O O₂⁻ é altamente reativo, tem meia-vida curta (2-4 μs) e é incapaz de se difundir através das membranas biológicas, exceto possivelmente via canais iônicos (BRIONES *et al.*, 2010). O O₂⁻ é prontamente dismutado em H₂O₂, espontaneamente e enzimaticamente, através de qualquer uma das três isoformas da superóxido

dismutase (SOD): Cu/Zn-SOD citossólica (SOD1), Mn-SOD mitocondrial (SOD2) e EC-SOD extracelular (SOD3) (LIOCHEV *et al.*, 2007) (Figura 3). O H_2O_2 é mais estável que o O_2^- e atravessa membranas através de alguns membros da família das aquaporinas (HENZLER *et al.*, 2000). O H_2O_2 é rapidamente metabolizado em água e oxigênio por diversos sistemas enzimáticos, como a glutatona peroxidase, a catalase e o sistema tiorredoxina (TRX), que inclui a TRX redutase e a TRX peroxidase (peroxiredoxina) (MEYE *et al.*, 2009) (Figura 3). Na presença de metais de transição (como Fe^{2+}), o H_2O_2 pode ser convertido em radicais hidroxila (OH^-) (Figura 3), que são altamente reativos e podem causar danos aos lipídios, proteínas e DNA (VALKO *et al.*, 2007).

Além disso, o $\bullet\text{NO}$ que tem uma meia vida muito curta, pode reagir com o O_2^- para formar o ONOO^- , que é capaz de modificar a estrutura e função das proteínas (WOLIN *et al.*, 2000) (Figura 3). A biodisponibilidade das EROs é rigidamente regulada para manter níveis fisiológicos através de um delicado equilíbrio entre a sua geração e o seu metabolismo. Portanto, alterações em qualquer dos sistemas mencionados acima podem levar a níveis patológicos de EROs.

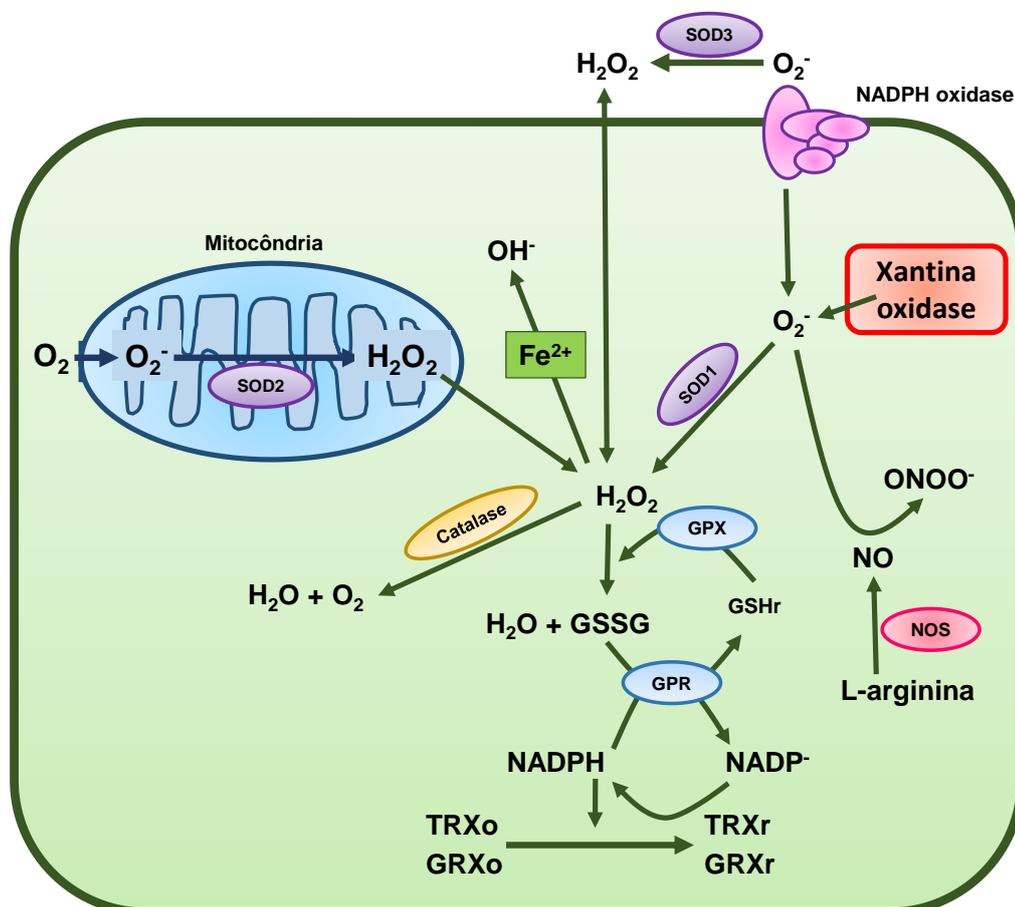


Figura - 3. Formação e metabolismo de espécies reativas de oxigênio. As principais fontes de geração das EROs incluem a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, a NADPH oxidase e a xantina oxidase. O ânion superóxido (O_2^-) é o principal ERO que pode ser convertido em outras espécies reativas. Na mitocôndria, o O_2^- é gerado pela captura de elétrons que escapam da cadeia de transporte de elétrons pelo oxigênio molecular (O_2). O O_2^- pode ser rapidamente convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela superóxido dismutase (SOD), que é convertido em H_2O pelos sistemas catalase, glutatona peroxidase (GPX) ou tioredoxina (TRX). Na presença de metais de transição (como o Fe^{2+}), o H_2O_2 pode ser convertido em radicais hidroxil (OH^\cdot). O óxido nítrico ($\cdot NO$) tem uma meia vida muito curta e pode reagir com o O_2^- para formar o peroxinitrito ($ONOO^-$). Glutaciona redutase (GPR); glutaredoxina oxidada (GRXo); glutaredoxina reduzida (GRXr); glutaciona reduzida (GSHr); glutaciona oxidada (GSSG); tioredoxina oxidada (TRXo); tioredoxina reduzida (TRXr).

A NADPH oxidase é a principal fonte de EROs em diferentes tecidos (CROSAS *et al.*, 2015; GARCÍA-REDONDO *et al.*, 2016; QIU *et al.*, 2016). Nos mamíferos, há sete membros da família de NADPH oxidases, NOX1-NOX5, DUOX1-DUOX2. As NOX1, 2, 4 e 5 são expressos em múltiplos tecidos, incluindo a parede vascular, com localização e regulação celular e subcelular específicas, enquanto a NOX3 e a DUOX são expressas em tecidos específicos (KONIOR *et al.*, 2014). Todas as NOXs são proteínas transmembrana que têm uma subunidade catalítica central (NOX) e um número de subunidades reguladoras que diferem dependendo da isoforma da NOX (BEDARD *et al.*, 2007). A NOX2, o protótipo fagocítico da NADPH oxidase, é ativada quando a subunidade reguladora p47phox é fosforilada, complexada com p67phox e p40phox e translocada para a membrana celular para interagir com a p22phox e a NOX2, a qual transfere elétrons do substrato NADPH para O_2 formando o O_2^- (DRUMMOND *et al.*, 2014).

Além das diferenças em sua estrutura e localização, as subunidades catalíticas também diferem nos tipos de EROs que produzem. As NOX1, 2, 3 e 5 produzem O_2^- , enquanto a NOX4, a DUOX1 e a DUOX2 produzem H_2O_2 (LASSÈGUE *et al.*, 2012, MONTEZANO *et al.*, 2015). Enquanto a NOX4 mostra alta atividade constitutiva, outros membros da família podem ser ativados através de alguns estímulos (CHEN *et al.*, 2012).

Outras fontes de EROs na parede vascular são: as mitocôndrias, a xantina oxidase, a eNOS desacoplada, o retículo endoplasmático, a via da ciclooxigenase (COX), o citocromo P450 e a lipoxigenase (FÖRSTERMANN, 2008; PI *et al.*, 2014). As mitocôndrias são uma importante fonte celular de EROs. Existem vários locais na cadeia de transporte de elétrons em que o O_2 pode ser reduzido a O_2^- , sendo complexo I e III os locais com maior capacidade. O complexo I produz O_2^- na matriz, enquanto que o complexo III produz O_2^- na matriz ou no espaço inter-membranar (MURPHY,

2009). A xantina oxidase, expressa principalmente no endotélio, catalisa a oxidação sequencial da hipoxantina em xantina e xantina em urato e pode gerar O_2^- e H_2O_2 (KELLEY, 2015). O estresse do retículo endoplasmático está associado a um aumento na geração de EROs associado a uma diminuição no nível de antioxidantes como consequência de um aumento no limiar de geração de EROs (ZEESHAN *et al.*, 2016). Embora seja aceito que as principais fontes de EROs durante o estresse do retículo endoplasmático são a oxidação das proteínas do retículo endoplasmático e as mitocôndrias, nos últimos anos o envolvimento da NADPH oxidase também tem sido sugerido. Curiosamente, isso tem sido associado a várias doenças cardiovasculares (LASSÈGUE *et al.*, 2012).

Até o momento, há um crescente número de evidências sugerindo que a ativação de uma fonte específica de EROs pode levar à ativação de outra, fornecendo uma explicação para o fenômeno bem conhecido da produção de EROs pelas EROs (MARTÍNEZ-REVELLES *et al.*, 2013). De particular interesse é a interação entre a NADPH oxidase e a mitocôndria. Assim, a ativação da NADPH oxidase pode aumentar a produção mitocondrial de EROs e vice-versa. As EROs mitocondriais são capazes de ativar a NADPH oxidase em várias situações. Portanto, os antioxidantes direcionados às mitocôndrias quebram o ciclo vicioso reduzindo a produção de EROs tanto pela mitocôndria quanto pela NADPH oxidase (OYEWOLE *et al.*, 2015).

Outro exemplo desse *crosstalk*, é o fato das EROs produzidas nas mitocôndrias e da NADPH oxidase influenciarem a atividade e a expressão da xantina oxidase (MCNALLY *et al.*, 2003), bem como o desacoplamento da eNOS (WASSMANN *et al.*, 2004). A produção de EROs em autoperpetuação afeta praticamente todas as EROs. Assim, o H_2O_2 ativa a NADPH oxidase levando a mais produção de O_2^- (NISIMOTO *et al.*, 2014). Curiosamente, o H_2O_2 induz a transição da xantina desidrogenase em xantina oxidase, o que gera H_2O_2 e O_2^- (VEAL *et al.*, 2007). Também o ONOO⁻ aumenta a geração de O_2^- e diminui a produção de NO pelo desacoplamento da eNOS (LIAUDET *et al.*, 2009). Além disso, ONOO⁻ participa na produção de H_2O_2 mitocondrial induzida por Ang II (HITOMI *et al.*, 2007). Estes dados, portanto, indicam que existe um mecanismo de retroalimentação positiva pelo qual as EROs podem ser importantes para a produção persistente de O_2^- na parede vascular, particularmente em condições patológicas.

Está bem estabelecido na literatura que as EROs são poderosas moduladoras da contração vascular, do vasorrelaxamento e do remodelamento estrutural e que

participam das alterações vasculares em várias condições patológicas (GARCÍA-REDONDO *et al.*, 2016). Os mecanismos responsáveis por esses efeitos incluem a diminuição do efeito vasodilatador do $\bullet\text{NO}$ vasodilatador pelo O_2^- , a geração de produtos de peroxidação lipídica, a produção de substâncias vasoconstritoras, a depleção de BH4 e a indução de fibrose através da ativação de metaloproteinasas (MMP) (LASSÈGUE *et al.*, 2012; SCHRÖDER *et al.*, 2014; BROWN *et al.*, 2015). Ao nível intracelular, as EROs induzem diferentes processos como aumento do cálcio intracelular, ativação de fatores de crescimento e inflamação e ativação de diferentes vias de sinalização, como as proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK), as proteínas tirosina fosfatases e as tirosina quinases, PI3K e RhoA/ROCK (FINKEL *et al.*, 2011; BRANDES *et al.*, 2014; BRETÓN-ROMERO *et al.*, 2014).

2.3.1.3 Derivados vasoativos da via da ciclooxygenase (COX)

Os prostanóides funcionam como moduladores importantes do tônus vascular e da agregação plaquetária em condições fisiológicas e patológicas. Essas substâncias são derivadas biologicamente ativas do ácido araquidônico, liberado de fosfolípidios da membrana (sobretudo a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina) através da ação da fosfolipase A₂. A transformação inicial do ácido araquidônico em prostanóide envolve a produção de um intermediário endoperóxido instável, a PGG₂, pela COX, que também reduz a PGG₂ em PGH₂ (Figura 4). A COX está localizada na membrana do retículo endoplasmático e/ou microssomas. Em vasos sanguíneos saudáveis, a maioria dos prostanóides é produzida pela isoforma constitutiva COX, a COX-1. No entanto, esses mediadores também podem ser sintetizados pela COX-2, que pode ser induzida por estímulos inflamatórios e outros fatores, como a angiotensina II ou a endotelina-1 (ANTMAN *et al.*, 2005; ÁLVAREZ *et al.*, 2007).

A COX-2 pode ser também constitutivamente expressa em condições patológicas em vários órgãos e tipos celulares, incluindo a parede vascular (ADEAGBO *et al.*, 2003). Após a síntese inicial da PGH₂, a produção dos diferentes prostanóides depende da atividade de sintases específicas. A PGE₂, o prostanóide mais abundante no corpo humano, pode ser sintetizado a partir da ação de três sintases (PGES): a cPGES (PGES citossólica) e duas PGES ligados à membrana (mPGES-1 e mPGES-2) (Figura 4). Destas três, a cPGES e a mPGES-2 são constitutivas, enquanto a mPGES-1 é regulada positivamente por estímulos inflamatórios (YANG *et al.*, 2016). A prostaciclina (PGI₂), a PGD₂ a PGF_{2α} e o

tromboxano A₂ (TxA₂) são formados pela ação de enzimas específicas denominadas, prostaciclina sintase (PGIS), PGD₂ sintase (PGDS), PGF_{2α} sintase (PGFS) e tromboxano sintase (TXAS), respectivamente (Figura 4).

Estes prostanóides apresentam diferentes efeitos vasculares, dependendo do tipo de receptor ao qual se ligam (Figura 4). Assim, a ligação da PGE₂ aos quatro subtipos de receptores (EP₁-EP₄), tem múltiplos efeitos vasculares. O receptor EP₁ ativa o metabolismo do fosfatidilinositol via proteína G_q, levando à formação de inositol trifosfato (IP₃) com mobilização de cálcio intracelular e a indução da contração vascular. O receptor EP₃, via G_i, aumenta o cálcio intracelular, pela inibição da formação de AMPc, levando à vasoconstrição. Os receptores EP₂ e EP₄ medeiam a vasodilatação por meio da ativação da adenilil ciclase via G_s, como formação de AMPc e ativação da PKA (COLEMAN *et al.*, 1994). Além de modular a função vascular, os receptores EP podem influenciar a agregação plaquetária, a migração de monócitos e macrófagos, a proliferação e migração de células musculares lisas, a produção de citocinas vasculares ou ativação de metaloproteinases (LEBENDER *et al.*, 2018).

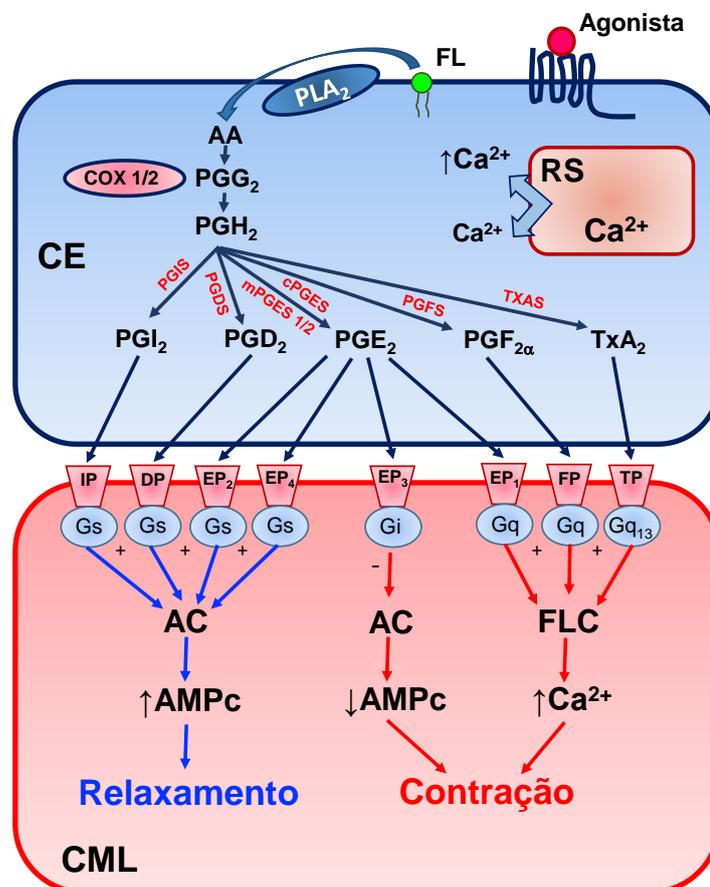


Figura - 4. Síntese e mecanismos de sinalização dos prostanóides. A partir do ácido araquidônico (AA), as enzimas COX-1 e COX-2 catalisam etapas chave na biossíntese do endoperóxido cíclico PGH₂, que é subsequentemente convertida em cinco prostanóides primários estruturalmente relacionados: as prostaglandinas PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ e tromboxano A₂ (TxA₂). Esses prostanóides se ligam a seus próprios receptores EP₁₋₄, DP₁₋₂, FP, IP e TP, respectivamente, que compreendem uma família distinta de receptores acoplados a proteínas G. Os receptores DP₁, EP_{2-EP4} e IP ativam a adenilil ciclase (AC), resultando na conversão de ATP em cAMP, induzindo relaxamento. Os receptores EP₁, FP e TP medeiam a mobilização do Ca²⁺ citossólico através da ativação da fosfolipase C (FLC), resultando em contração. O receptor EP₃ inibe a via de sinalização do cAMP, produzindo contração. CE, célula endotelial; CML, célula muscular lisa; FL, fosfolípido.

A ligação da PGI₂ ao receptor IP e da PGD₂ ao receptor DP induz vasodilatação e desagregação plaquetária, via proteína G_s, através da formação de AMPc e consequente ativação da PKA. Curiosamente, em várias condições patológicas, a PGI₂ também pode induzir vasoconstrição por ligação aos receptores TP (GLUAIS *et al.*, 2005; XAVIER *et al.*, 2010).

O receptor TP se acopla principalmente a dois tipos de proteínas G, as famílias G_q e G₁₃, resultando na ativação da fosfolipase C para induzir vasoconstrição (BREYE *et al.*, 2001) (Figura 4). Estão envolvidos na agregação plaquetária, na contração da musculatura lisa, na expressão de moléculas de adesão e na adesão e infiltração de monócitos/macrófagos (MATSUOKA *et al.*, 2007, XAVIER *et al.*, 2010). Curiosamente, embora o TxA₂ produzido pela tromboxano sintase seja o ligante fisiológico preferencial para os receptores TP, a PGH₂ e outras prostaglandinas, os isoprostanos e os ácidos hidroxieicosatetraenóicos também podem ativar este receptor (NOREL, 2007). Uma via de sinalização semelhante à do receptor TP é ativada pela ligação da PGF_{2α} ao receptor FP.

2.3.1.4 Sistema renina-angiotensina (SRA)

A ativação do SRA tem um papel fundamental na regulação fisiológica do volume e do fluxo sanguíneo e da pressão arterial (de MELO *et al.*, 2017). Os componentes deste sistema, particularmente o angiotensinogênio, a renina e as angiotensinas I e II, são encontrados normalmente na circulação. A partir do sangue, a angiotensina II, a principal substância biologicamente ativa deste sistema, é distribuída para órgãos e tecidos, nos quais, através da ligação a receptores específicos, promove seus efeitos biológicos (DOSTAL *et al.*, 1992). A formação da angiotensina II pode ainda ocorrer localmente em vários órgãos e tecidos como: o coração, os vasos sanguíneos, os rins, os pulmões e o sistema nervoso central, os quais expressam todos os componentes deste sistema. As ações deste, podem em

muitos casos serem complementares ou independentes do SRA clássico/circulante (BICKERTON *et al.*, 1961; CORNISH *et al.*, 1979; BALCELLS *et al.*, 1996).

Os sistemas locais parecem ter sua importância ligada ao fato de que exercem efeitos diretos sobre mecanismos regulatórios locais, que contribuem para um grande número de mecanismos homeostáticos teciduais de desenvolvimento mais lento, porém, de caráter mais permanente, como o crescimento celular, a formação da matriz extracelular dos tecidos, a proliferação vascular, a modulação da função do endotélio e o controle do processo apoptótico (RESENDE *et al.*, 2002).

O SRA é composto de uma série de peptídeos formados através de uma sequência complexa de reações enzimáticas, a partir de um substrato chamado angiotensinogênio. A renina catalisa a conversão do angiotensinogênio em um decapeptídeo, a angiotensina I, que é subsequentemente hidrolisado pela enzima conversora de angiotensina (ECA) para formar a angiotensina II (Figura 5) (MEHTA *et al.*, 2007). A ECA também é responsável pelo catabolismo de vários outros peptídeos biologicamente importantes, como por exemplo, a substância P e a bradicinina (COSTEROUSSE *et al.*, 1992). Também existem caminhos alternativos independentes da ECA para a produção de angiotensina II. O angiotensinogênio pode ser convertido diretamente em angiotensina II por enzimas, tais como, o ativador de plasminogênio tecidual, a catepsina G e a tonina, enquanto que a enzima geradora de angiotensina II, a quimase e a catepsina G, podem catalisar a hidrólise da angiotensina I à angiotensina II (JOHNSTON *et al.*, 1996).

Independentemente da via pela qual é formada, a angiotensina II medeia seus efeitos biológicos através da ligação a receptores altamente específicos, localizados na membrana de várias células. Em seres humanos, dois subtipos de receptores da angiotensina II foram caracterizados: o tipo 1 (AT₁) e tipo 2 (AT₂), os quais exibem uma distribuição bastante heterogênea nos tecidos periféricos e no sistema nervoso central. Apesar de pertencerem à mesma família de receptores, o AT₁ e o AT₂ diferem acentuadamente na cascata de sinalização e atividades biológicas (de GASPARO *et al.*, 2000). No sistema vascular, os efeitos mediados pela ativação dos receptores AT₁ incluem: vasoconstrição, fibrose, crescimento e migração celular, inflamação e geração de radicais livres (HIGUCHI *et al.*, 2007). A ativação dos receptores AT₂ promove vasodilatação, formação de •NO e, geralmente, inibe o crescimento da parede vascular (FYHRQUIST *et al.*, 2008).

Os receptores AT₁ são acoplados a múltiplos processos de transdução de sinais através dos quais promove diversas ações biológicas. Sua ação é mediada pela proteína G_q que ativa a fosfolipase C, induzindo a formação do trifosfato de inositol (IP₃) e do diacilglicerol (DAG) a partir da hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP₂). O IP₃ promove um aumento subsequente do cálcio (Ca²⁺) intracelular, que desencadeia a fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC) por meio da MLC quinase (MLCK), que resulta em contração. A angiotensina II também induz a contração dos vasos através da via RhoA/Rho quinase, que aumenta a sensibilidade do cálcio pela inibição da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) (TOUYZ, 2003).

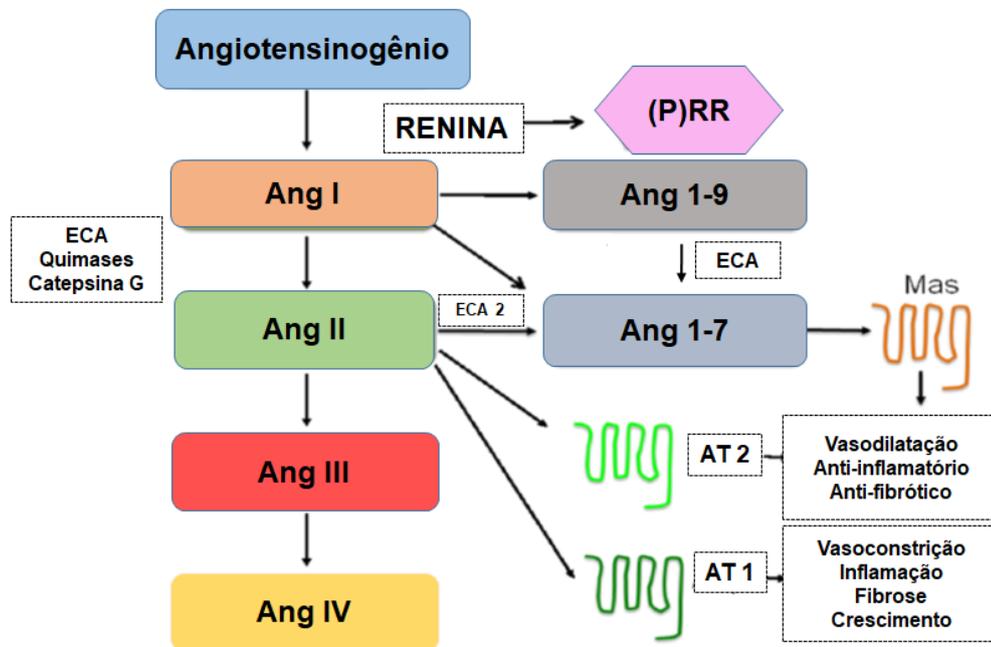


Figura - 5. Revisão esquemática do sistema renina-angiotensina. No sistema renina-angiotensina (SRA) clássico, a renina produzida no rim é secretada na circulação, onde cliva o angiotensinogênio derivado do fígado em angiotensina (Ang) I, que é hidrolisada em angiotensina II pela enzima conversora da angiotensina (ECA). A ECA também metaboliza a bradicinina em metabólitos inativos. O SRA local pode utilizar outras enzimas como catepsinas e quimase, para a síntese de angiotensina II. Essa, por sua vez, é capaz de se ligar ao receptor tipo 1 da angiotensina II (AT₁) para desencadear diferentes ações, como vasoconstrição, liberação de aldosterona, fibrose, hipertrofia, estresse oxidativo e inflamação. A Ang II é convertida a Ang III e posteriormente a Ang IV. Ang I pode ainda ser metabolizado a peptídeos como a Ang-(1-9), que através da ECA é convertido a Ang-(1-7). A ECA-2 converte a Ang II a Ang 1-7. Essa atua em receptores MAS e induz vasodilatação, efeitos anti-inflamatórios e antifibróticos. Modificado de (MONTEZANO *et al.*, 2014).

O receptor AT₂ é também um membro da família de receptores acoplados à proteína G, com algumas características próprias. O mecanismo de sinalização do receptor AT₂ é diversificado, e apenas alguns deles foram razoavelmente caracterizados. Em alguns casos, ocorre ativação de fosfatase PP2A, que resulta na

hiperpolarização das membranas plasmáticas que leva à supressão de algumas atividades celulares estimuladas pela despolarização (HUANG *et al.*, 1996).

Uma segunda via de sinalização envolve a ativação de fosfotirosina e é de fundamental importância para a inibição do crescimento tecidual, resultante da ação da angiotensina II (HORIUCH *et al.*, 1998). Através destas vias, a ativação do receptor AT₂ pela angiotensina II induz a geração de •NO e vasodilatação, estimula a natriurese, promove ações anti-inflamatórias e antifibróticas e inibe o crescimento celular (CAREY, 2017).

Além da angiotensina II ser indiscutivelmente a substância ativa mais importante do SRA, seus metabólitos, tais como a angiotensina 1-7, a angiotensina 1-9, a angiotensina III e a angiotensina IV, também possuem atividade biológica. A angiotensina 1-7 apresenta efeitos opostos aos da angiotensina II, atuando como um agente vasodilatador e inibidor do crescimento celular (ARDAILLOU *et al.*, 1997). A angiotensina 1-9 é provavelmente o principal produto do metabolismo de angiotensina II em plaquetas (SNYDER *et al.*, 1985); há indícios demonstrando que ela induz agregação de plaquetas em ratos (MOGIELNICK *et al.*, 2003), porém sua concentração fisiológica no plasma humano e de ratos é muito baixa (CAMPBELL *et al.*, 1990), no rim atinge cerca de 50% de sua concentração (CAMPBELL *et al.*, 1991 (Figura 5).

Dentre os peptídeos secundários do sistema renina-angiotensina, a angiotensina III parece ser um dos mais importantes, porque compartilha muitas das funções fisiológicas com a angiotensina II sobre o sistema cardiovascular e sobre o sistema nervoso central, incluindo respostas pressoras, liberação de vasopressina, potencialização da atividade simpática e indução da secreção de aldosterona, além do efeito vasoconstritor similar ao da angiotensina II (FYHRQUIST *et al.*, 2008, YATABE *et al.*, 2011).

A angiotensina IV é outro importante peptídeo originado a partir da angiotensina II com potencial papel sobre a fisiopatologia vascular. A angiotensina IV aumenta a proliferação celular (PAWLIKOWSKI *et al.*, 2001); além disso, em células musculares lisas vasculares, ativa a expressão do NF-κB (ESTEBAN *et al.*, 2005).

2.4 O SRA COMO MEDIADOR DA DISFUNÇÃO ENDOTELIAL, INFLAMAÇÃO, ESTRESSE OXIDATIVO E REMODELAMENTO DA PAREDE VASCULAR.

É bem conhecido que a infusão crônica e/ou aguda de angiotensina II aumenta a pressão arterial (OJEDA *et al.*, 2011; COLLISTER *et al.*, 2016). Este peptídeo pode influenciar a pressão arterial, por induzir a liberação de catecolaminas nas terminações nervosas noradrenérgicas (RUPP, 2007).

A angiotensina II também induz alterações vasculares, tais como aumento das respostas vasoconstritoras e diminuição das respostas vasodilatadoras dependentes do endotélio (MONTEZANO *et al.*, 2014). Além disso, a angiotensina II influencia a arquitetura e a integridade da parede vascular, modulando o crescimento celular e regulando a composição da matriz extracelular (TOUYZ, 2005). Assim, tanto *in vitro* como *in vivo*, a angiotensina II induz o crescimento ou hipertrofia das células musculares lisas, aumenta a deposição de colágeno e altera a estrutura da elastina (VAN THIEL *et al.*, 2015). Em condições patológicas, a exemplo da hipertensão arterial, a ativação excessiva do SRA tem sido ligada ao desenvolvimento de diversas alterações vasculares, sobretudo àquelas relacionadas à função endotelial e à estrutura da parede arterial.

2.4.1 Relação entre o SRA e as alterações estruturais do sistema cardiovascular

Apesar da organização estrutural minimalista, comparado com outros sistemas e órgãos, a estrutura da parede vascular possui uma regulação complexa, apresentando características peculiares. Esta estrutura é regulada através de vários estímulos, como as forças mecânicas geradas pelo sangue e pelo tecido circunjacente, assim como através de estímulos químicos locais, neurais e circulantes. Desde 1987, quando Glagov relatou a descoberta de que o estreitamento da luz arterial aterosclerótica não é simplesmente o resultado do aumento de lesões ateroscleróticas, um novo conceito surgiu sugerindo que a parede do vaso pode mudar sua estrutura para manter o tamanho apropriado do lúmen para permitir o fluxo sanguíneo. Isso foi denominado remodelamento vascular. Essa capacidade das artérias de adaptar sua estrutura em resposta às condições fisiológicas e patológicas é essencial em situações como gravidez ou envelhecimento, mas também em muitas doenças arteriais. Assim, a incapacidade dos vasos de remodelar adequadamente é considerada uma forma de "falência vascular" que pode levar a estados patológicos, como hipertensão ou aterosclerose (TANAKA *et al.*, 2017).

O remodelamento vascular é um processo ativo de alteração estrutural que envolve mudanças no crescimento, morte e migração celular e produção ou degradação da matriz extracelular (MULVANY *et al.*, 1999). É um processo complexo e está presente em uma ampla gama de doenças cardiovasculares, incluindo a aterosclerose, a hipertensão arterial, a hipertensão pulmonar, o aneurisma, o diabetes mellitus, dentre outras enfermidades (GIBBONS *et al.*, 1994). Este processo inclui várias etapas: percepção de alterações hemodinâmicas e/ou da liberação de fatores humorais (locais e/ou circulantes), transmissão do sinal dentro de uma célula e entre células adjacentes, síntese, ativação ou liberação de substâncias que afetam o crescimento, a morte e a migração celular ou a construção de matriz extracelular que, em conjunto promovem mudanças estruturais, mecânicas e/ou funcionais da parede vascular (GIBBONS *et al.*, 1994).

Segundo Mulvany (1999) o remodelamento vascular pode ser classificado de acordo com a quantidade de material na parede arterial como, hipertrófico, hipotrófico ou eutrófico; e conforme as alterações no diâmetro do lúmen vascular, “para dentro”, quando ocorre redução do diâmetro, ou “para fora”, quando o diâmetro aumenta (Figura 6).

O remodelamento eutrófico é caracterizado por uma diminuição dos diâmetros interno e externo do vaso, por um aumento da espessura da parede e da relação parede/lúmen, sem alteração na área da seção transversal da parede (MULVANY *et al.*, 1999) (Figura 6). Este tipo de remodelamento se deve ao rearranjo da mesma quantidade de material da parede em torno de um diâmetro interno menor. Os mecanismos que conduzem a este tipo de remodelamento são pouco conhecidos, mas foi sugerido que uma combinação de crescimento interno mais apoptose periférica ou vasoconstrição prolongada de células musculares lisas em uma matriz extracelular expandida poderia levar a esse tipo de remodelamento.

O remodelamento hipotrófico está associado a uma diminuição da quantidade de material (ou seja, área de seção transversal diminuída) em torno da parede do vaso (MULVANY *et al.*, 1999) (Figura 6). Este tipo de remodelamento pode estar relacionado com processos de apoptose e/ou rearranjo do material ao redor da circunferência do vaso. O remodelamento hipotrófico tem sido descrito em vários modelos, dentre eles em arteríolas renais de ratos espontaneamente hipertensos SHR e nas artérias mesentéricas de resistência de animais hipertensos induzidos por ouabaína (BRIONES *et al.*, 2004).

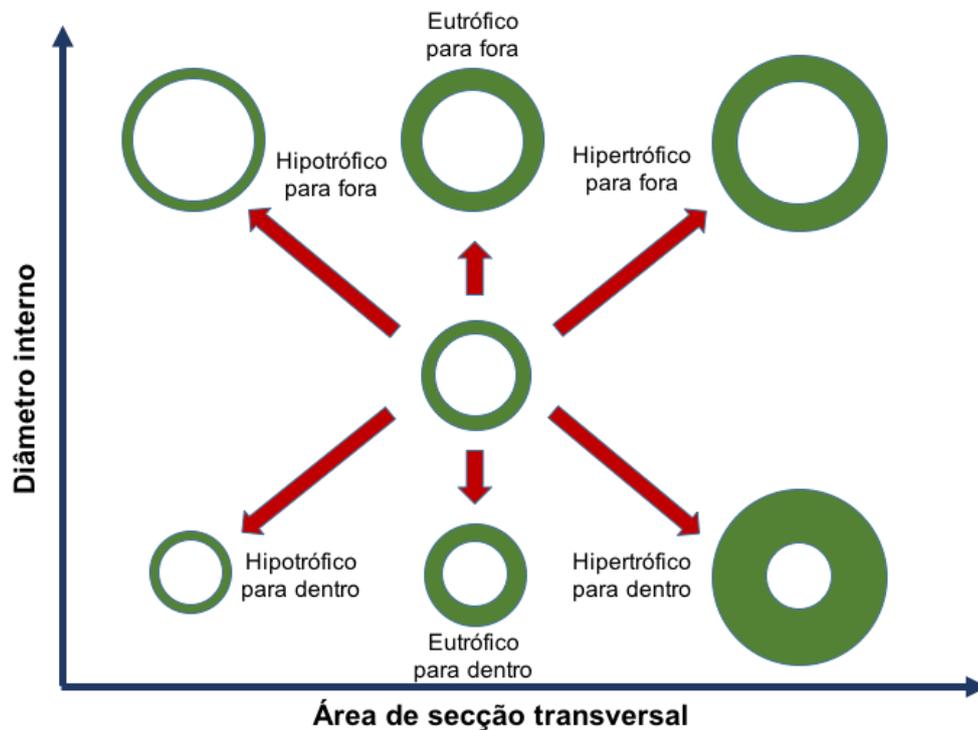


Figura - 6. Classificação dos tipos de remodelamento vascular de acordo com as alterações na área de secção transversal e diâmetro interno. O remodelamento vascular pode modificar a área de secção transversal do vaso por alterações tanto na quantidade de material da parede vascular quanto no diâmetro do lúmen do vaso. O vaso considerado como normal está representado no centro da figura. O remodelamento pode ser hipertrófico (quando há aumento da área de secção transversal, vasos representados na parte direita superior e inferior da figura), hipotrófico (com redução da área de secção transversal indicados na parte esquerda superior e inferior da figura) ou eutrófico (sem mudanças na área de secção transversal, vasos representados ao centro da figura). Quanto ao diâmetro do vaso, quando há redução do diâmetro (parte inferior na figura) é considerado “para dentro” e quando há aumento do diâmetro interno (parte superior na figura) indica que o remodelamento é “para fora”. Modificado de MULVANY, 1999.

O remodelamento hipertrófico é caracterizado por um aumento da espessura de parede, da relação parede/lúmen e da área de secção transversal, associados a uma contribuição mais evidente do crescimento celular (MULVANY *et al.*, 1996) (Figura 6). Isso, juntamente com as alterações da lâmina elástica e o aumento da deposição de colágeno e fibronectina, contribuem muitas vezes para aumentar a rigidez. As artérias de condutância normalmente passam por remodelamento hipertrófico e maior rigidez com o envelhecimento e na hipertensão arterial, levando a uma maior pressão de pulso (GE *et al.*, 2017).

O remodelamento hipertrófico é descrito em modelos animais com hipertensão severa, nos quais o sistema endotelina está mais ativado, como: o modelo DOCA-Sal (DENG *et al.*, 1992), o modelo Um-Rim Um-Clípe (KORSGAARD *et al.*, 1988; DENG

et al., 1991) e o modelo Dahl-Sal sensível (D'USCIO *et al.*, 1997). Crescimento, apoptose, inflamação e fibrose são eventos que parecem contribuir para o remodelamento vascular na hipertensão, onde vários fatores, como o a endotelina-1 e o sistema renina-angiotensina parecem exercer um importante papel (GIBBONS *et al.*, 1998; INTEGAN *et al.*, 2001).

Alguns estudos têm demonstrado que a angiotensina II induz a expressão de integrinas em fibroblastos, fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular em miócitos cardíacos, bem como a proliferação e hipertrofia de células musculares lisas vasculares (SCHUPP *et al.*, 2011). Além disso, está bem documentado que fármacos inibidores da enzima conversora de angiotensina impedem o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca em modelos animais (LI *et al.*, 2010) e em pacientes hipertensos (KJELDSEN *et al.*, 2002).

Antagonistas dos receptores AT₁ também foram eficazes na regressão da hipertrofia em pacientes hipertensos (PARADIS *et al.*, 2000). Em um estudo randomizado, duplo-cego, com pacientes hipertensos não tratados previamente, o tratamento anti-hipertensivo com valsartan (antagonista de receptores AT₁) durante 8 meses induziu uma regressão significativa da hipertrofia ventricular esquerda (THURMANN *et al.*, 1998).

MARTINEZ-LEMUS *et al.* (2005) demonstraram que a infusão sistêmica de angiotensina II em animais é capaz de aumentar a pressão arterial sistólica, induzir hipertrofia ventricular esquerda, e reduzir o diâmetro do lúmen aórtico, além de aumentar a espessura da camada média. Outros estudos demonstram que o tratamento com candesartan, em longo prazo, em ratos espontaneamente hipertensos, propensos a acidente vascular cerebral, reduziu significativamente a massa ventricular esquerda. De forma interessante, na dose mais elevada de candesartan (10 mg/kg), a massa ventricular esquerda foi, na verdade, mais baixa do que o controle normotenso, os ratos Wistar Kyoto, refletindo a potência da resposta trófica à angiotensina II mediada através do receptor AT₁ (INADA *et al.*, 1997). Uma redução na hipertrofia cardíaca também foi relatada com o telmisartan em ratos hipertensos transgênicos (BOHM *et al.*, 1996) e com o losartan em ratos espontaneamente hipertensos (GOHLKE *et al.*, 1996).

A angiotensina II através do receptor AT₁ promove alterações fenotípicas na parede vascular; de um fenótipo contrátil a um fenótipo proliferativo e sintético de células musculares lisas, levando a mudanças na maquinaria contrátil,

hipertrofia/proliferação celular e secreção de mediadores contráteis, miogênicos, inflamatórios e pró-fibróticos (INTENGAN *et al.*, 2001). Os mecanismos responsáveis em parte pelos efeitos da angiotensina II sobre o crescimento celular e fibrose são mediados pela produção endógena de fatores mitogênicos, como o TGF- β (fator de necrose tumoral tipo beta), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), EGF (fator de crescimento endotelial), IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1), endotelina-1 e ativação de vias mitogênicas e pró-fibróticas (SATO *et al.*, 2001).

A família das proteínas quinases de atividade mitogênica (MAPK) é uma das vias de sinalização de crescimento mediado pela angiotensina II. Em células do músculo liso vascular, a angiotensina II ativa as quatro principais MAPKs, incluindo as quinases extracelulares reguladas por sinal (ERK1/2), p38MAPK, C-Jun N-terminal quinase (JNK) e ERK5. A ERK1/2 fosforilada é uma quinase chave de sinalização de crescimento, enquanto que a JNK e p38MAPK, quando fosforiladas influenciam a sobrevivência celular, a apoptose, a diferenciação e a inflamação. A ERK5 está envolvida na indução da síntese proteica, progressão do ciclo celular e crescimento celular (XI *et al.*, 1999).

A angiotensina II também estimula a produção de metaloproteinases (MMP) de matriz extracelular, que são necessárias para o remodelamento da parede vascular (DZAU *et al.*, 1991). Vias dependentes de MAPK podem participar na formação e regulação da matriz extracelular induzida por angiotensina II. Um estudo realizado por TOUYZ *et al.* (2001) evidenciou que a produção de colágeno induzida por angiotensina II em SHR é influenciada positivamente pela p38MAPK.

A angiotensina II derivada de fibroblastos exerce ainda efeitos parácrinos locais, estimulando a produção de colágeno (JU *et al.*, 1996). Aumentos da MMP-2 e do colágeno IV em resposta à angiotensina II também tem sido evidenciado (LIBBY *et al.*, 2000). Assim, a angiotensina II atua em vários componentes diferentes da formação e deposição de matriz extracelular contribuindo efetivamente para o remodelamento da parede vascular em várias situações. Parte destes efeitos da angiotensina II também são induzidos através de eventos inflamatórios e/ou oxidativos que também afetam a composição estrutural da parede vascular.

2.4.2 Efeitos pro-inflamatórios e pro-oxidativos da angiotensina II

A angiotensina II tem sido apontada como uma das principais moléculas envolvidas nos processos pro-inflamatórios e pro-oxidativos no sistema cardiovascular e renal, uma vez que estimula a liberação de vários mediadores inflamatórios como, moléculas de adesão celular, quimiocinas e citocinas pro-inflamatórias, além de estimular a geração de EROs (ALIQUE *et al.*, 2015; MENG *et al.*, 2015; CHAN *et al.*, 2017). A angiotensina II induz ainda a adesão e migração de monócitos e neutrófilos na parede vascular através da produção de moléculas de adesão celular como: selectinas, ICAM-1 (molécula de adesão intercelular) e VCAM-1 (molécula celular de adesão vascular 1) (INTENGAN *et al.*, 1999a; PUEYO *et al.*, 2000) e de moléculas quimiotáticas como a MCP-1 proteína quimiotáctica de monócitos do tipo 1) (CHEN *et al.*, 1998). Tem sido reportado que uma variedade de receptores e cascatas de sinalização celular estão envolvidos na mediação das ações pró-inflamatórias da angiotensina II.

Como já descrito, a angiotensina II ao se ligar ao receptor AT₁, ativa a fosfolipase C; esta por sua vez, induz a formação de IP₃ e DAG, que provoca aumento da concentração citoplasmática de Ca²⁺ e ativação da proteína quinase C (PKC). Em várias células, incluindo as da parede vascular, a ativação da PKC induz a translocação do fator de transcrição gênica NF-κB (MCALLISTER-LUCAS *et al.*, 2007, BRASIER, 2010), que por sua vez, leva à produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF-α (fator de necrose tumoral do tipo alfa) e a IL-1β (interleucina do tipo 1 beta) (GUO *et al.*, 2011).

A ação pró-inflamatória da angiotensina II, via receptor AT₁ nas células do músculo liso vascular, também envolve a interação com proteínas G acopladas a outras vias de sinalização, dentre elas a da fosfolipase A₂ (PLA₂) (TOUYZ *et al.*, 2000). A estimulação da PLA₂ promove a liberação de ácido araquidônico a partir de fosfolípidios de membrana, que são metabolizados pelas ciclooxigenases (BONVENTRE *et al.*, 1992). ACCORSI-MENDONÇA *et al.* (2006) demonstraram que a indometacina, um inibidor não seletivo da COX, foi capaz de reduzir a contração induzida por angiotensina II em artérias carótidas de ratos. Esses achados mostram a capacidade da angiotensina II de promover, via COX, alterações vasculares importantes. Além disso, MARTINEZ-LEMUS *et al.* (2005) evidenciaram que o tratamento com celecoxib (inibidor seletivo da COX-2) foi capaz de atenuar o aumento da pressão arterial induzido por angiotensina II, diminuir a hipertrofia cardíaca e normalizar a espessura da parede da aorta. Aumento da expressão da COX-2 pela

angiotensina II também tem sido demonstrado em vários tecidos (MARTÍNEZ-REVELLES *et al.*, 2013).

Além dos receptores AT₁ e AT₂, a angiotensina II também pode se ligar ao receptor Toll-like 4 (TLR4) (JI *et al.*, 2009). O TLR4 destaca-se como um regulador chave da inflamação crônica e está associado a várias doenças cardiovasculares. Estudos recentes demonstram que algumas das ações da angiotensina II, incluindo a inflamação, o estresse oxidativo, a hipertrofia celular e a deposição de matriz extracelular, estão ligadas à ativação do TLR4 (DANGE *et al.*, 2014). Além disso, a fosforilação induzida por angiotensina II da quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e a ativação do fator nuclear NF-κB, ambas importantes proteínas de sinalização da via do TLR4, contribuem para a expressão de citocinas inflamatórias (CARDINALE *et al.*, 2012). Essas citocinas incluem o TNF-α, a MCP-1 e a IL-6, as quais estão envolvidas em muitas lesões inflamatórias induzidas pela angiotensina II (SPRAGUE *et al.*, 2009).

Por outro lado, o receptor AT₂ apresenta um potencial papel antiinflamatório. Na verdade, no contexto da aterosclerose, SALES *et al.* (2005) demonstraram que a expressão do receptor AT₂ estava aumentada em ratos ApoE-*knockout* após oito semanas de dieta rica em colesterol, estabelecendo que o receptor AT₂ é capaz de modular negativamente a aterogênese. Usando um modelo de duplo-*knockout* ApoE/AT₂, os autores constataram que a perda do receptor AT₂ resultou em aumento da quantidade de macrófagos, de células musculares lisas e do conteúdo de colágeno nas lesões ateroscleróticas (SALES *et al.*, 2005)

A angiotensina II é também uma potente indutora da geração de EROs na vasculatura. Como descrito anteriormente, essas EROs, tais como os ânions superóxido e o peróxido de hidrogênio, atuam como mensageiros intercelulares e intracelulares que podem desempenhar um papel fisiológico no crescimento celular e um papel fisiopatológico na inflamação, hipertensão arterial e aterosclerose (ABE *et al.*, 1989; ALEXANDER *et al.*, 1995; FINKEL *et al.*, 1998; TOUYZ *et al.*, 2004). Na vasculatura, o aumento da produção de EROs pela angiotensina II produz ativação da quimiotaxia leucocitária, proliferação de células musculares lisas, hipertrofia e deposição de colágeno (MARCHESI *et al.*, 2008).

A ativação da NADPH oxidase corresponde ao principal mecanismo de geração de EROs pela angiotensina II, a qual é mediada através da ativação do receptor AT₁ (SHEN *et al.*, 2006). A ação da angiotensina II sobre a NADPH oxidase não se resume

apenas ao aumento da sua atividade; este peptídeo também aumenta a expressão desta enzima, a qual, como já mencionado, representa a principal fonte de EROs na vasculatura (DRUMMOND *et al.*, 2011). Assim, a angiotensina II induz a expressão da Nox1 e Nox4 *in vivo* e *in vitro* (LASSÈGUE *et al.*, 2001, DIKALOV *et al.*, 2008). Neste sentido, camundongos com deficiência da Nox1 apresentaram um menor aumento na pressão arterial após a infusão de angiotensina II (GAVAZZI *et al.*, 2006).

Além disso, demonstrou-se que a Nox1 contribui para o aumento da matriz extracelular induzido por angiotensina II na aorta (GAVAZZI *et al.*, 2007) e está implicada no prejuízo do relaxamento dependente do endotélio através do desacoplamento da eNOS (DIKALOVA *et al.*, 2010), sugerindo um papel importante da NOX1 na disfunção endotelial e remodelamento vascular. Já o papel da NOX4 é controverso. Sugere-se que a NOX4 pode atuar como uma proteína vasoprotetora, através de mecanismos que incluem geração de H₂O₂, manutenção da produção de NO e expressão da enzima antioxidante heme oxigenase-1. Em apoio a essa hipótese, camundongos deficientes de NOX4 infundidos com angiotensina II apresentaram disfunção endotelial aumentada e estrutura vascular comprometida, sem alterações na pressão arterial (SCHRÖDER *et al.*, 2012). No entanto, outros autores sugeriram um papel da NOX4 na produção de O₂⁻ induzida por angiotensina II (TOPCHIY *et al.*, 2013, KURODA *et al.*, 2014) e na hipertensão induzida por este peptídeo (BRIONES *et al.*, 2011).

O estresse oxidativo induzido pela angiotensina II não envolve apenas a ativação da NADPH oxidase. Na mitocôndria, a angiotensina II induz a geração de EROs e disfunção mitocondrial, caracterizadas pelo aumento da produção de peróxido de hidrogênio e a diminuição da glutatona mitocondrial (DE CAVANAGH *et al.*, 2009; DIKALOVA *et al.*, 2010). Estudos mostram que as EROs derivadas das mitocôndrias, induzidas pela angiotensina II, têm um papel importante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (KIMURA *et al.*, 2005; de CAVANAGH *et al.*, 2006; DOUGHAN *et al.*, 2008). A utilização de antioxidantes direcionado às mitocôndrias, a fim de diminuir significativamente as EROs mitocondriais, tem sido apontada como uma estratégia promissora no tratamento da hipertensão arterial e da disfunção vascular induzida pela angiotensina II (DIKALOVA *et al.*, 2010).

2.4.3 Envolvimento da angiotensina II no desenvolvimento da disfunção endotelial

O equilíbrio da função do endotélio vascular é essencial para a saúde do sistema cardiovascular, em grande parte devido às suas propriedades antiproliferativas, anti-hipertróficas, antiinflamatórias e de controle do tônus da musculatura lisa vascular, através da produção de vários mediadores (BLATOUNI *et al.*, 2001). A disfunção endotelial é geralmente definida como a incapacidade do endotélio de manter adequadamente a homeostase vascular. Isso se refere a um desequilíbrio entre a liberação de fatores vasodilatadores e vasoconstritores derivados do endotélio (BRIONES *et al.*, 2000; TOUYZ, 2005; DRUMMOND *et al.*, 2011). Na grande maioria dos casos, a disfunção endotelial se desenvolve cronicamente em várias condições de risco, como o tabagismo, o envelhecimento, a obesidade, a resistência à insulina, o diabetes, os distúrbios lipídicos, a hipertensão, as doenças inflamatórias ou as infecções (KEI *et al.*, 2014, DE SÁ *et al.*, 2017; YIN *et al.*, 2017, MOREIRA *et al.*, 2018). Nestas situações, o endotélio pode apresentar disfunção, mas está relativamente intacto. No nível molecular, a disfunção endotelial pode ser promovida por uma variedade de fatores, como produtos de estresse oxidativo, produtos finais de glicação avançada, partículas de LDL oxidadas, ácidos graxos livres e seus metabólitos e moléculas de inflamação, incluindo citocinas ou endotoxinas bacterianas (VIRDIS, 2016; INCALZA *et al.*, 2018).

Uma das manifestações mais importantes da disfunção endotelial é o relaxamento dependente do endotélio prejudicado (PERAMAIYAN *et al.*, 2013), devido ao prejuízo da biodisponibilidade ou sinalização do •NO. No entanto, dependendo do leito vascular, outros fatores vasodilatadores derivados do endotélio, como a prostaciclina, o EDHF ou as substâncias gasosas, como o H₂S, entre outros, também podem ser afetados (VIRDIS *et al.*, 2010).

É bem conhecido que diferentes vasos de diferentes modelos de hipertensão e de pacientes hipertensos exibem diminuição do relaxamento dependente do endotélio (PARK *et al.*, 2001; PÚZSEROVÁ *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2011). No entanto, o aumento das respostas vasoconstritoras ou a modulação alterada das respostas vasoconstritoras pela remoção do endotélio ou pelo bloqueio da síntese de •NO também são características fundamentais da disfunção endotelial (XAVIER *et al.*, 2004, XAVIER *et al.*, 2009, DE QUEIROZ *et al.*, 2010). É importante notar que em

muitas situações patológicas associadas à disfunção endotelial, como a hipertensão, a resposta do músculo liso vascular ao •NO é em geral normal, sugerindo que a disfunção endotelial é devido à biodisponibilidade alterada do •NO, causada principalmente pela síntese prejudicada deste fator ou pelo aumento da sua inativação (SIMPLICIO *et al.*, 2017; ALBA *et al.*, 2018; SHAMSALDEEN *et al.*, 2018)

A angiotensina II se destaca como um dos principais fatores vasoconstritores derivados das células endoteliais e tem sido apontada como um importante mediador da disfunção endotelial em várias situações de risco cardiovascular (BOEGEHOLD *et al.*, 2016). Os mecanismos pelos quais a angiotensina II participa da disfunção endotelial são variados. Como já descrito anteriormente, a angiotensina II, além de ser um potente vasoconstritor, induz estresse oxidativo e inflamação, induz a síntese de prostanóides vasoconstritores e diminui a biodisponibilidade de •NO (SCHIFFRIN *et al.*, 2000; WASSMANN *et al.*, 2002; YAVUZ *et al.*, 2003; MARTÍNEZ-REVELLES *et al.*, 2013).

O aumento do estresse oxidativo induzido pela angiotensina II provoca aumento da formação de ânions superóxido, o qual reage com o •NO, inativando-o e comprometendo suas atividades biológicas (RAJAGOPALAN *et al.*, 1996). O estresse oxidativo aumentado tem um papel no desacoplamento da eNOS e causa oxidação do •NO para formar o peroxinitrito (ONOO⁻), o qual afeta múltiplas enzimas celulares incluindo a própria eNOS. O ONOO⁻ também prejudica a ação do •NO alterando a atividade da guanilato ciclase nas células alvo. Além disso, através do dano ao DNA, as EROs induzem apoptose, senescência das células endoteliais e estimula a produção de ADMA (um inibidor endógeno da síntese de •NO) (KOSKA, 2012). A angiotensina II também diminui a expressão da eNOS, promovendo uma menor produção de •NO (MONTEZANO *et al.*, 2014).

Tem sido também descrito que a angiotensina II estimula a expressão da isoforma induzível da COX, a COX-2, promove maior produção de prostanóides vasoconstritores, diminui a capacidade do endotélio de induzir vasorrelaxamento ou aumenta a capacidade contrátil do músculo liso vascular (ALVAREZ *et al.*, 2005; XAVIER *et al.*, 2008; WONG *et al.*, 2011; RAMOS-ALVES *et al.*, 2012a). Artérias de animais hipertensos ou diabéticos apresentam aumento da expressão e da atividade da COX-2 em nível vascular (ALVAREZ *et al.*, 2005; XAVIER *et al.*, 2008; RAMOS-ALVES *et al.*, 2012a), a qual é normalizada pelo tratamento com antagonistas do receptor AT₁ (ALVAREZ *et al.*, 2007; DE QUEIROZ *et al.*, 2017), apoiando um papel

para a angiotensina II no aumento da expressão vascular de COX-2. De acordo com estes resultados, tem sido demonstrado que a angiotensina II é capaz de induzir a expressão de COX-2 e a produção de prostanóides em diferentes tipos de células, incluindo células musculares lisas e fibroblastos adventícios (BELTRAN *et al.*, 2009).

Existe uma estreita relação entre as EROs e a COX-2. O estresse oxidativo é capaz de induzir a atividade da COX-2 (GARCÍA-REDONDO *et al.*, 2009) ou aumentar sua expressão (FENG *et al.*, 1995). Além disso, a atividade aumentada da COX-2 também está envolvida na geração de EROs em vasos de ratos espontaneamente hipertensos (TANG *et al.*, 2007), contribuindo para a redução da vasodilatação dependente do endotélio, além de aumentar as respostas contrateis observadas em vários leitos vasculares (ADEAGBO *et al.*, 2005). Um estudo realizado por MARTÍNEZ-REVELLES *et al.* (2011) demonstrou que essa relação entre a COX-2 e o estresse oxidativo pode ser mediada pela ação da angiotensina II (Figura 7). Em células da parede vascular, como as células musculares e endoteliais, a angiotensina II se liga aos receptores AT₁ e induz a ativação de NADPH oxidase, da COX-2 e a produção de EROs e de prostanóides. Esses prostanóides ativam a NADPH oxidase e a geração de EROs que ativam a COX-2, e provavelmente a COX-1. Além disso, as EROs derivadas das mitocôndrias, diretamente, ou através da ativação de NADPH oxidase, ativam a COX-2. Esses eventos resultam em maior ativação dos receptores EP₁ (decorrente da maior produção de PGE₂) e do receptor TP (devido, sobretudo, a maior produção de tromboxano A₂), os quais promovem aumento da contração do músculo liso vascular.

A angiotensina II também induz a diminuição da expressão da eNOS e da produção de •NO, cuja biodisponibilidade pode ainda ser reduzida após sua reação com os ânions superóxido. Todos esses eventos, isolados ou em conjunto, mediam a disfunção endotelial induzida por angiotensina II (Figura 7) (MARTÍNEZ-REVELLES *et al.*, 2011).

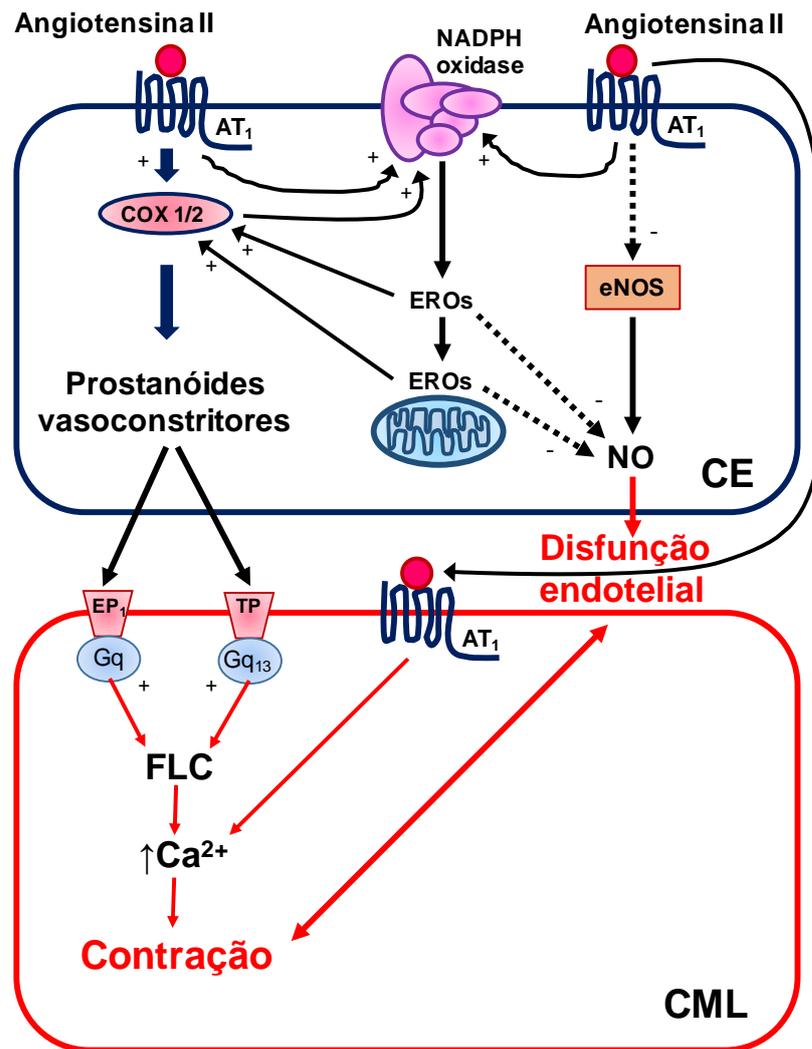


Figura - 7. Esquema demonstrativo da relação entre a angiotensina II, as espécies reativas de oxigênio (EROs), a ciclooxigenase (COX) e seu papel na disfunção endotelial. Em células vasculares como células musculares lisas (CML) e endoteliais (CE), a Ang II se liga a receptores AT₁ e induz a atividade e/ou expressão da NADPH oxidase e da COX-1/COX-2, gerando EROs. As EROs derivadas das mitocôndrias, quer diretamente ou através de NADPH oxidase, ativa a COX-2. Tais eventos estimulam a produção de PGE₂ e TxA₂, que através dos receptores EP₁ e TP induzem contração da CML do vaso. A angiotensina II também induz a diminuição da expressão de eNOS. As EROs reagem com •NO diminuindo sua biodisponibilidade. Em conjunto, esses eventos induzem a disfunção endotelial. FLC, fosfolipase C. Modificado de MARTÍNEZ-REVELLES *et al.*, 2011.

Existe um número crescente de evidências demonstrando a associação da disfunção endotelial com marcadores de dano vascular e eventos cardiovasculares em pacientes com várias enfermidades cardiovasculares (LANDMESSER *et al.*, 2002; FRANK *et al.*, 2008; VANHOUTTE *et al.*, 2009). Assim, tem sido descrito que a disfunção endotelial funciona como um indicador precoce de eventos cardiovasculares, independentemente dos fatores de risco tradicionais. Portanto, uma melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pela disfunção endotelial pode

levar não só à descoberta de novos alvos terapêuticos, mas também à prevenção precoce e melhora de doenças cardiovasculares.

2.5 CONSUMO ELEVADO DE SÓDIO DURANTE A GRAVIDEZ: IMPLICAÇÕES SOBRE O SISTEMA VASCULAR E ENVOLVIMENTO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

A exposição ao excesso de sódio durante os primeiros períodos de desenvolvimento pode implicar em modificações, em longo prazo, na fisiologia de diversos órgãos, como o coração (ALVES-RODRIGUES *et al.*, 2013), os rins (CARDOSO *et al.*, 2009) e os vasos sanguíneos (PIECHA *et al.*, 2012). O envolvimento do sistema renina angiotensina nestas modificações também tem sido evidenciado (MCBRIDE *et al.*, 2008; RAMOS *et al.*, 2011).

Um estudo realizado por da SILVA *et al.* (2003) animais oriundos de mães alimentadas com uma dieta rica em sódio durante a gestação e lactação revelou uma elevação da pressão arterial, diminuição do peso corporal, da massa renal ou do número de glomérulos. Além disso, CABRAL *et al.* (2012), demonstraram que a sobrecarga materna de sódio durante a gestação e lactação promoveu alterações em transportadores renais de sódio e na sua regulação, bem como lesões estruturais nos rins da prole adulta. Essas alterações foram caracterizadas por aumento da expressão e da atividade da Na⁺, K⁺-ATPase, da proteína quinase C (PKC), do aumento do estresse oxidativo e por aumento da deposição de colágeno nos tecidos renais (CABRAL *et al.*, 2012).

Também tem sido discutido na literatura o impacto da sobrecarga de sódio materna sobre o sistema renina angiotensina na mãe e na prole. Um estudo realizado por DING *et al.* (2010) demonstrou que a sobrecarga de sódio materna foi capaz de diminuir os níveis plasmáticos de angiotensina II, tanto na mãe, quanto no feto, indicando que a ingestão de alto teor de sódio suprimiu o sistema renina angiotensina na circulação periférica em ambos estágios de desenvolvimento. Por outro lado, o mesmo estudo mostrou níveis aumentados de angiotensina II no coração do feto, associados a um aumento da expressão proteica e gênica do receptor AT₁ cardíaco. LEANDRO *et al.* (2008) observaram uma menor expressão gênica dos componentes do sistema renina angiotensina e menor concentração de angiotensina I e II na placenta de mães que receberam dieta hipersódica durante a gestação. Esses

estudos indicam que a inibição do sistema renina angiotensina materno causada pela sobrecarga de sódio também pode ser transferida para a prole (WELLS, 2007).

Entretanto, alguns outros estudos mostram que a prole oriunda de mães alimentadas com dieta rica em sódio, quando adultas, apresenta aumento dos níveis de angiotensina II (CABRAL *et al.*, 2012), sem alteração da atividade da renina plasmática (DA SILVA *et al.*, 2003), porém com aumento da atividade da enzima conversora de angiotensina em alguns tecidos (DOS SANTOS *et al.*, 2006). Esses estudos sugerem que quando há exposição à sobrecarga de sódio desde a concepção até o desmame, a atividade da renina da prole adulta não responde a uma alta ingestão de sódio, ou seja, a alta ingestão deste íon não suprime a secreção de renina e a expressão de angiotensina II nos rins aumenta (DA SILVA *et al.*, 2003). Portanto, a sobrecarga de sódio perinatal pode levar a um aumento da atividade do SRA durante a fase adulta (DA SILVA *et al.*, 2003).

O consumo de uma dieta rica em sódio durante as fases iniciais do desenvolvimento pode ainda influenciar a função e/ou estrutura do sistema vascular da prole adulta. Segundo um estudo publicado por PIECHA *et al.* (2012), a sobrecarga de sódio em ratas grávidas produziu efeitos duradouros sobre a estrutura de artérias centrais e musculares da prole, como o aumento da espessura da parede da aorta, da carótida e artérias intrapulmonares, independentemente da ingestão de sódio pós-natal ou dos níveis de pressão arterial da prole. Além disso, um estudo publicado por GRAY *et al.* (2015) evidenciou que o consumo elevado de sódio durante a gravidez induziu aumento da pressão arterial da prole adulta, a qual foi acompanhada por um prejuízo da função endotelial, relacionada a uma diminuição da liberação de EDHF.

A ingestão de dieta hipersódica durante a gestação de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), induziu disfunção cardíaca e vascular na prole, caracterizadas, respectivamente, por redução da função ventricular esquerda (sistólica e diastólica) e diminuição da resposta vasodilatadora da aorta ao •NO (MARUYAMA *et al.*, 2015). RAMOS *et al.* (2011) demonstraram que a sobrecarga de sódio durante a gestação induziu a ativação do SRA na prole, caracterizado pelo aumento da atividade da renina renal, além da maior expressão gênica e proteica da COX-2 e da menor expressão gênica da isoforma neuronal da sintase de •NO. Trabalhos como esses dão suporte a hipótese que o SRA pode ter um papel fundamental não apenas nas alterações renais (CABRAL *et al.*, 2012) ou cardíacas (DING *et al.*, 2010), mas também em alterações vasculares.

Apesar de existirem alguns poucos estudos sobre os efeitos da sobrecarga materna de sódio sobre a função vascular da prole, ainda não está claro por quais mecanismos estes efeitos ocorrem, nem tampouco a influência do SRA. Sendo assim, é evidente a necessidade de estudos mais minuciosos que investiguem os efeitos da sobrecarga de sódio materna sobre a função e a estrutura arterial da prole (artérias de resistência e de condutância) e se o SRA de alguma forma participa na indução desses efeitos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo estão de acordo com as normas sugeridas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório, com as normas internacionais estabelecidas pelo *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*, e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (Processo: 23076.038874/2014-65).

3.1 ANIMAIS

Ratos Wistar machos e fêmeas foram obtidos e mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco. Ratas Wistar virgens foram mantidas em gaiolas com ratos machos, na proporção de 3:1, para serem acasaladas. A constatação da cópula foi realizada mediante a presença de espermatozoides no esfregaço vaginal e 24 h após esta constatação foi considerado o primeiro dia de gestação. Um grupo de ratas foi alimentado com dieta normossódica (AIN-93, NaCl 1,3 %, Rhostrer, Araçoiaba da Serra, SP, Brasil/ n = 26) e outro grupo foi alimentado com dieta hipersódica (AIN-93, NaCl 8,0 %, Rhostrer, Araçoiaba da Serra, SP, Brasil/ N=26), durante a gestação e aleitamento. Nesses períodos, o consumo da ingestão de água e sódio na dieta, foram calculados mediante a medição do volume de água e o peso diário da ração por animal. Para o cálculo do consumo de sódio foi considerado a quantidade de sódio presente em cada dieta (NS=0,5 de Na⁺ e HS=3,12 de Na⁺). Os animais foram mantidos individualmente em gaiolas ventiladas (425mm x 266mm x 185mm, Tecniplast, Buguggiate, Itália) durante a fase de gestação e aleitamento. Durante a fase de aleitamento, a prole foi limitada a oito animais por rata. Após desmame, a prole foi alojada nas gaiolas acima descritas, com três animais em cada. Os animais foram pesados semanalmente, até o dia do experimento, a fim de avaliar o impacto do consumo da dieta no desenvolvimento corporal dos animais. Os experimentos descritos a seguir foram realizados apenas com ratos machos de 24 semanas de idade, provenientes de ratas alimentadas com dieta normossódica (grupo NS, N=67) ou hipersódica (grupo HS, N=54). Parte das proles NS (NS-Los, N=18) e HS (HS-Los, N=20) foram tratadas com losartan 15 mg/Kg/dia (por gavagem), a partir da décima sexta semana de vida, durante 8

semanas, enquanto o grupo NS recebeu apenas veículo. A prole de ambos os grupos teve livre acesso à água e alimentação (Labina, Agribands Purina, São Paulo, Brasil).

3.2 MEDIDA DA PRESSÃO ARTERIAL

A pressão arterial foi analisada, na prole HS e NS, com os animais acordados. Os animais foram anestesiados com isoflurano e em seguida foram submetidos à canulação da artéria carótida com um cateter de polietileno (PE-50) preenchido com solução salina heparinizada (100 U/mL). Após 24 h, a pressão arterial foi medida em animais conscientes através de um transdutor de pressão (modelo MLT844, ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Austrália) conectado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab 8/35, ML870 / P ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Austrália).

3.3 ESTUDO DE REATIVIDADE VASCULAR E PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.

A reatividade da artéria mesentérica de resistência (AMR) e aorta torácica foi avaliada nos grupos experimentais, os ratos foram anestesiados com isoflurano e em seguida foram eutanasiados por exsanguinação. O leito vascular mesentérico e a aorta torácica foram removidos e colocados em solução de Krebs Henseleit (KHS) a 4 °C (Composição em mM: 115 NaCl, 2,5 CaCl₂, 4,6 KCl, 1,2 KH₂PO₄, 1,2, MgSO₄.7H₂O, 25 NaHCO₃, 11,1g de glicose e 0,03 EDTA).

3.3.1 Aorta torácica

Segmentos de aorta torácica (~3 mm de comprimento), livres de gordura e tecido conjuntivo, foram montados entre dois fios de aço inoxidável, em câmaras de vidro (5 mL) contendo solução KHS, gaseificada continuamente com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) para manter o pH em 7,4. Os segmentos foram submetidos a uma tensão de 1,0 g (tensão de repouso ideal), que foi reajustado a cada 15 min durante um período de estabilização de 45 minutos. A tensão isométrica gerada por cada segmento foi registrada usando um transdutor isométrico de deslocamento de força (Letica TRI 201; Panlab, SL, Barcelona, Espanha) conectado a um amplificador (Bridge Amp, ML119; ADInstruments) e a um sistema de aquisição (PowerLab 8/35, ML870/P ADInstruments).

3.3.2 Artéria mesentérica de resistência (AMR)

Para estudar a reatividade vascular em AMR, realizou-se o método descrito por Mulvany & Halpern (1977). Artérias de terceira ordem do leito mesentérico (diâmetro interno ~300 μm) foram dissecadas e cortadas em segmentos de 1,5 - 2,0 mm de comprimento. Para medir a tensão isométrica, os segmentos arteriais foram montados em um miógrafo para vasos de resistência (Figura 8) (Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Dinamarca) entre dois fios de tungstênio (40 μm de diâmetro). Este sistema foi conectado a um sistema de aquisição (PowerLab 8/35; ADInstruments) e este a um computador PC. Após um período de estabilização de 15 minutos em KHS gaseificada (95% de O_2 e 5% de CO_2) a 37 °C e pH 7,4, os segmentos foram estirados a um diâmetro luminal ideal para desenvolvimento de tensão ativa máxima. Isto foi determinado com base na relação de diâmetro interno/ tensão de parede de cada segmento, ajustando seu diâmetro interno, L_0 , em 90% do diâmetro que cada artéria teria se estivesse exposta a uma tensão que fosse equivalente àquela produzida por uma pressão transmural de 100 mmHg (Mulvany & Halpern, 1977). O diâmetro interno (l_1) foi determinado de acordo com a equação $l_1=L_1/\pi$, utilizando um software específico para normalização de cada segmento arterial (DMT Normalization Module, ADInstruments). L_1 representa a tensão passiva equivalente a 100 mmHg de pressão transmural.

3.3.3 Protocolos experimentais

Após um período de estabilização de 45 minutos em KHS, a aorta e a AMR foram contraídas com KCl 75mM, para verificar sua integridade funcional. Após um período de 30 minutos, seguido desta contração, as artérias foram precontraídas com fenilefrina (10 μM , em anéis de aorta) ou noradrenalina (10 μM , em anéis de AMR) e curvas concentração-resposta à acetilcolina (para verificar o relaxamento dependente do endotélio) (0,1 nM – 10 μM) foram construídas de forma cumulativa. Após 60 min da curva à acetilcolina, curvas concentração-repostas à fenilefrina (1 nM – 100 μM , aorta) ou noradrenalina (10 nM – 100 μM , AMR) foram construídas de forma cumulativa. O relaxamento independente do endotélio foi avaliado através do relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (0,1 nM – 10 μM), em artérias precontraídas com fenilefrina (aorta) ou noradrenalina (AMR). Em alguns segmentos aórticos, a resposta contrátil induzida pela adição cumulativa de angiotensina I (cuja contração é mediada pela angiotensina II convertida a partir da angiotensina I pela

ECA, 10 nM – 10 μ M) ou angiotensina II (10 nM – 10 μ M) também foram analisados. Na AMR não foi possível a construção de uma curva concentração-reposta à angiotensina I ou II, devido à taquifilaxia dos receptores AT₁ nestas artérias, por esta razão a resposta contrátil a estes peptídeos foi avaliada através da adição de uma única concentração de angiotensina I ou II.

A fim de investigar a participação de espécies reativas de oxigênio ou da via da ciclooxigenase sobre a resposta da acetilcolina e fenilefrina/noradrenalina, algumas artérias foram pré-incubadas com tempol (mimético da superóxido dismutase 10 μ M), apocinina (inibidor da NADPH oxidase, 100 μ M) ou indometacina (inibidor da ciclooxigenase, 10 μ M). Com a finalidade de avaliar o papel do sistema renina angiotensina sobre as possíveis alterações induzidas pela exposição à sobrecarga de sódio durante a gestação e lactação no relaxamento dependente do endotélio (acetilcolina) e na contração induzida pela estimulação alfa-adrenérgica, as artérias foram incubadas com losartan (antagonista dos receptores AT₁ para angiotensina II, 1 mM) e captopril (inibidor da enzima conversora de angiotensina II, 100 mM).

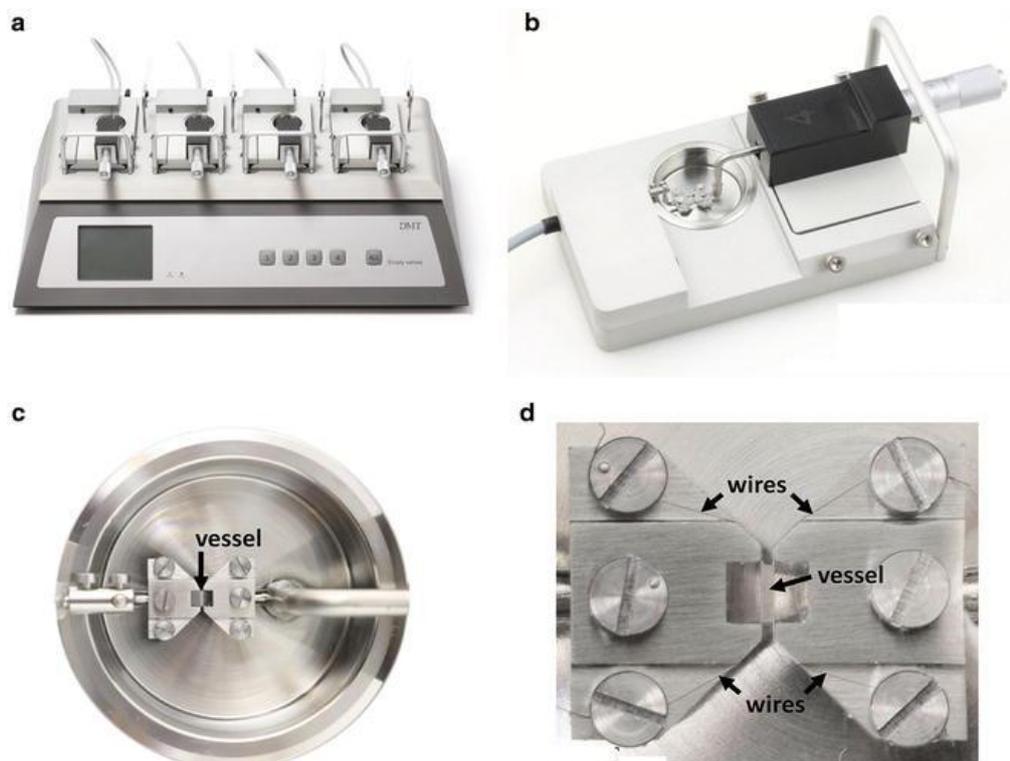


Figura - 8. Foto representativa de miógrafo para vasos de resistência modelo 620M (Danish Myo Technology A/ S, Aarhus, Dinamarca, www.dmt.dk).

3.4 METODOLOGIA UTILIZADA PARA O ESTUDO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E ESTRUTURAIS DE ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA DE RATO.

As propriedades mecânicas e estruturais das AMR foram estudadas pelo método inicialmente descrito por HALPERN *et al.* (1978). Segmentos de aproximadamente 3 mm de artérias de terceira ordem do leito mesentérico foram montados em um miógrafo de pressão (Danish Myo Tech, Modelo 115FP, J.P. Trading I/S, Aarhus, Dinamarca). As duas extremidades da AMR foram canuladas com micropipetas de vidro e amarradas com fio de sutura de nylon. Em seguida o comprimento da artéria foi ajustado aumentando a pressão intravascular até aproximadamente 140 mmHg, de maneira que as paredes arteriais estivessem paralelas e sem estiramento (Figura 9). Com esse procedimento foi possível verificar também se a artéria estava adequadamente pressurizada. A pressão foi ajustada para 60 mmHg e sob este valor de pressão foi aguardado um período de estabilização de 60 minutos, em KHS, gaseificada continuamente com mistura carbogênica, pH 7,4 e temperatura de 37 °C.

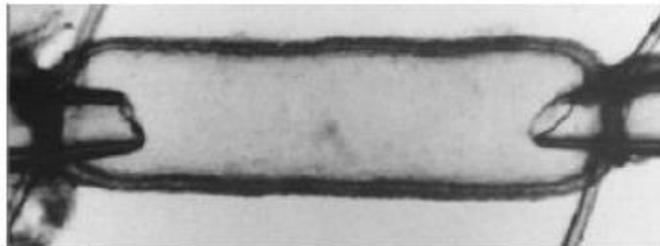


Figura - 9. Foto representativa de uma artéria mesentérica de resistência (terceiro ramo da artéria mesentérica superior) canulada e pressurizada a 60 mmHg.

Após o período de estabilização, a pressão intravascular foi reduzida a 5 mmHg e uma curva de pressão foi construída, aumentando a pressão intravascular de 5 a 140 mmHg, em aumentos de 20 mmHg em intervalos de 5 minutos. Esta curva foi construída na presença e na ausência de cálcio (Ca^{2+}). A KHS sem Ca^{2+} foi preparada omitindo o CaCl_2 e adicionando EGTA 10 mM. Para cada valor de pressão intravascular, ao final dos 5 minutos, o diâmetro interno (D_i) e externo (D_e) foram medidos.

3.4.1 Cálculos das propriedades mecânicas e estruturais das artérias mesentéricas de resistência

As medidas de diâmetro interno e externo (D_i e D_e) utilizadas para o cálculo dos parâmetros estruturais e mecânicos arteriais foram realizadas em condições passivas (em KHS sem cálcio, 0_{Ca}). Os seguintes parâmetros estruturais e mecânicos foram calculados:

1. Espessura da Parede (EP)

$$EP = \frac{(D_{e0Ca} - D_{i0Ca})}{2}$$

2. Área de Secção Transversal (AST)

$$AST = \frac{\pi}{4} \times (D_{e0Ca} - D_{i0Ca})^2$$

3. Relação Parede/Lúmen (P/L)

$$P/L = \frac{(D_{e0Ca} - D_{i0Ca})}{(2 \times D_{i0Ca})}$$

As propriedades mecânicas das artérias foram calculadas de acordo o método inicialmente descrito por BAUMBACH & HEISTAD (1989).

4. Distensibilidade arterial

$$\frac{(\Delta D_{i0Ca})}{(\Delta D_{i0Ca} \times \Delta P)} \times 100$$

A distensibilidade representa a porcentagem de mudança do diâmetro arterial interno para cada valor de pressão intravascular.

5. *Strain* (ϵ). Representa a variação nas dimensões da artéria (deformação, ϵ) em consequência de uma dada tensão aplicada.

$$\varepsilon = \frac{(D_{i0Ca} - D_{00Ca})}{D_{00Ca}}$$

Onde: D_{00Ca} é o diâmetro a 5 mm Hg e D_{i0Ca} é o diâmetro interno observado para um dado valor de pressão intravascular sob condições de completo relaxamento. O valor de D_{00Ca} foi medido a 3 mmHg porque é difícil determinar o diâmetro interno em valores inferiores a este.

6. *Stress* de parede (σ) – Tensão (medida por unidade de área) produzida na parede arterial frente às alterações da pressão intravascular, do diâmetro interno e da espessura da parede.

$$\sigma = \frac{(P \times D_{i0Ca})}{(2EP)}$$

Onde: P é a pressão intravascular (1 mmHg = 133,4 N/m²) e EP é a espessura da parede arterial para cada valor de pressão intravascular em KHS sem Ca²⁺.

7. A rigidez arterial independente da geometria foi determinada pelo módulo elástico de Young, o qual pode ser expresso pela relação entre tensão e deformação ($E = \text{Stress}/\text{Strain}$). No caso de vasos sanguíneos esta relação *stress-strain* exibe um comportamento curvilíneo. Assim, torna-se mais apropriado o cálculo da relação tangencial ou *incremental elastic modulus* (E_{Inc}), o qual pode ser determinado pela inclinação (β) da curva *stress-strain* (DOBRIN, 1978).

$$E_{Inc} = \delta\sigma / \delta\varepsilon$$

O E_{Inc} foi calculado plotando os dados obtidos de *stress* e de *strain* para cada experimento utilizando a equação exponencial abaixo (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, E.U.A):

$$\sigma = \sigma_{orig} e^{\beta\varepsilon}$$

Onde: σ_{orig} representa o *stress* de parede para o valor inicial de diâmetro (diâmetro a 5 mmHg). De acordo com a derivação das equações acima é possível obter-se que $E_{Inc} = \beta\sigma$. Para um dado valor de σ , E_{Inc} é diretamente proporcional a β . Um aumento

de \hat{a} implica um aumento de E_{Inc} , o qual representa um aumento da rigidez (DOBRIN, 1978).

8. Tônus miogênico – representa a contração induzida pelo aumento da pressão intravascular em condições ativas (na presença de Ca^{2+}).

$$\text{Contração (\%)} = \frac{(D_{iOCa} - D_{iCa})}{D_{iOCa}} \times 100$$

3.5 DETERMINAÇÃO *IN SITU* DA PRODUÇÃO DE ÂNIONS SUPERÓXIDO

A fluorescência oxidativa ao dihidroetídio (DHE) foi utilizada para avaliar a produção de ânion superóxido na parede arterial. Após isolamento e dissecação as artérias AMR e aorta foram imersas em um meio para congelamento (OCT, Electron Microscopy Science, E.U.A.) e armazenadas a -80°C até o momento de realização dos cortes. As secções de AMR (10 μm de espessura) ou aorta (5 μm de espessura) foram feitas em criostato e colocadas em lâminas silanizadas (Star Frost, Alemanha). Para a medida da produção de ânions superóxido, os cortes foram incubados com tampão fosfato durante 10 minutos a 37°C , em seguida com tampão fosfato contendo dihidroetidina (5 μM , Invitrogen, E.U.A.), durante 30 minutos, a 37°C em câmara úmida e protegidos da luz (MILLER *et al.*, 1998). Para avaliar a contribuição da NADPH oxidase e da angiotensina II na geração destes radicais, algumas artérias foram incubadas com apocinina (10 μM) ou losartan (10 μM) durante 30 minutos, a 37°C , antes de serem congeladas em OCT. Após 30 minutos, as lâminas foram observadas em microscópio óptico (Eclipse Ni-U, Nikon, Tóquio, Japão) equipado com filtro padrão para rodamina e câmara fotográfica (DS-Ri1, Nikon, Tóquio, Japão), utilizando uma objetiva para fluorescência de 20X. A densidade de fluorescência média foi calculada usando o *software Image J* (Wayne Rasband, National Institutes of Health, E.U.A.). A fluorescência foi medida em pelo menos três locais em cada imagem e feita a média das medidas.

3.6 INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DE COMPONENTES DA PAREDE VASCULAR.

A expressão das isoformas da ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), da eNOS, e da NOX 4 foram determinadas através da técnica de *Western blot*. Para isso, as artérias (aorta e AMR) foram homogeneizadas em solução tampão composta de Tris

(10 mM, pH 7,4), Lauril sulfato de sódio (SDS, 1%) e Metavanadato de sódio (1 mM). Os homogenatos foram centrifugados a 500g por 10 minutos e a concentração de proteína foi medida no sobrenadante pelo método de Bradford (1976).

Alíquotas do homogenato proteico (30 µg de proteína) e do padrão de peso molecular foram carregadas em géis de SDS-poliacrilamida 10% para 1,5 M Tris HCl pH 8,8, acrilamida 40%, glicerol 100%, SDS 10%, APS 10% e Temed, previamente imersos em um tampão para eletroforese (25 mM de Tris HCl, 190 mM de glicina e 0,1% de SDS) e submetidas a uma corrente constante de 80V por aproximadamente 3 horas (Power Pac™ HC, BioRad, Singapura). Após o término da eletroforese, as amostras foram transferidas para uma membrana de Nitrocelulose (Amersham, UK) durante 40 minutos. Ao final da transferência, as membranas foram incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com solução bloqueadora (leite desnatado 5%, Tris HCl 10 mM, NaCl 100 mM e Tween 20 a 0,1%, pH 7,5) para evitar a união não-específica com reativos não imunológicos. Em seguida, as membranas foram incubadas durante toda a noite à 4°C, sob agitação, em solução a 5% de albumina com tampão TBS-T (Tris HCl 10 mM, NaCl 100 mM e Tween 20 a 0,1%, pH 7,5) adicionados aos anticorpos primários para COX-1 (1:500, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, E.U.A.), COX-2 (1:200, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, E.U.A.), eNOS: (1:500, BD Biosciences), NOX 4 (1: 500 abcan) ou α -actina (1:3000, Sigma; St. Louis, MO, E.U.A.). Após quatro lavagens com tampão Tris, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário IgG anti-camundongo ou anti-coelho conjugado com peroxidase (GE Healthcare do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil). As bandas correspondentes foram detectadas por uma reação de quimiluminescência por meio da exposição da membrana, durante 5 minutos, a um sistema de detecção ECL plus (GE Healthcare do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil). Os imunocomplexos foram detectados por um sistema fotodocumentador ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, E.U.A.). A análise densitométrica das bandas foi realizada com o *software* Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, E.U.A.). Os dados de conteúdo das proteínas de interesse nos homogenatos de aorta e AMR foram expressos como a razão entre os sinais correspondentes da proteína estudada em relação à banda identificada para a α -actina.

3.7 MEDIDA DA ATIVIDADE DA ECA

Amostras de aorta, AMR, plasma e pulmão foram mantidas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da sua utilização para a dosagem da atividade da ECA. Para isto, as amostras foram descongeladas, pesadas e homogeneizadas em solução tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Em seguida, o material foi centrifugado a 10.000 r.p.m. durante 15 minutos, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A concentração de proteína foi quantificada de acordo com o método descrito por BRADFORD, 1976. O volume correspondente a 30 μg de proteína foi incubado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ em 40 μL de solução de substrato da ECA Hipuril-Histidil-Leucina (Sigma; St. Louis, MO, E.U.A.) em tampão borato de sódio (0,4 M). Após 15 min de incubação foram adicionados 190 μL de NaOH (0,34 M) para interromper a reação enzimática. O dipeptídeo Hipuril-Histidil-Leucina foi detectado pela adição de 17 μL de o-phataldialdehyde (OPTA) 2% (massa/volume, em metanol). Após 10 minutos, as medidas de fluorescência foram realizadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ em uma placa de leitura com 96 poços com filtros de excitação de 365 nm e emissão de 495 nm (Varioskan, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, E.U.A.). Uma curva de calibração com substrato da ECA foi incluída em cada placa.

3.8 EXPRESSÃO DE RNAM POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) QUANTITATIVA EM TEMPO REAL.

Após a eutanásia dos animais, amostras de aorta e artéria mesentérica de resistência dos grupos NS e HS foram armazenadas à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o processamento para análises gênicas. A extração do RNAm das amostras foi realizada com o reagente Trizol[®] (Ambion, Life Technologies Corporation). Para isso, em tubos contendo esferas de cerâmica e um fragmento de ~30-40 mg do tecido, pipetou-se 1mL de Trizol e realizou-se a trituração das amostras através de agitação em alta velocidade (TissueLyser II QIAGEN Group) por 40 min. Após esse processo, seguiu-se com a fase de separação do RNA. Para tanto, pipetou-se 200 μL de clorofórmio nos tubos com as amostras homogeneizadas, os tubos foram agitados manualmente por 15 segundos e incubados à temperatura ambiente por 3 min. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rotações por minuto (r.p.m.) durante 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A fase que continha o RNA, fase aquosa superior (~ 500 μL), foi pipetada em

outro tubo contendo 500 µL de isopropanol a fim de precipitar e isolar o RNAm. Os tubos foram vertidos 3 vezes manualmente para mistura e incubados à temperatura ambiente durante 10 min. Foi realizada nova centrifugação por 12.000 r.p.m. durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento formado de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75 % (preparado com água isenta de RNase), os tubos foram agitados e centrifugados a 7.500 r.p.m. por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e os tubos foram vertidos em superfície limpa para permitir total secagem do sedimento de RNA à temperatura ambiente por 10 min. Realizou-se a ressuspensão do mesmo com cerca de 20 µL de água isenta de RNase seguida de incubação à 55 °C por 10 min. O RNA foi quantificado na absorvância de 260 nm (Varioskan, Thermo Fisher Scientific®). A fim de avaliar o grau de pureza das amostras, realizou-se a medida da absorvância em 230 nm e 280 nm. A relação 260/280 avalia a contaminação com proteína e 260/230 a contaminação com fenol. O resultado de ambas ficou dentro dos valores aceitáveis (entre 1,8-2,2). Para o cálculo do RNA, utilizou-se a fórmula: RNA µg/mL = (Absorvância 260-Branco) x 40 x (10/0,5). Na sequência, 2 µg do RNA total tratado com a enzima DNAase (Promega®) foi transcrito a DNA complementar (cDNA) utilizando-se a enzima transcriptase reversa (Reverse Transcriptase – Invitrogen®). Em 10 µL de volume de RNA tratado com DNAase adicionou-se 1 µL de random hexamer primer e 2 µL de desoxinucleotídeos (dNTPs) (Invitrogen®). A mistura foi incubada em termociclador 65 °C por 10 min (SureCycler 8800, Agilent Technologies®). A transcrição reversa foi realizada com adição de 1µL de transcriptase reversa, 4 µL de tampão (contendo 250 mM de Tris-HCl, pH 8,3; 375 mM de KCl, 15 mM de Cloreto de Magnésio), 2 µL de ditiotreitól (DTT-Dithiothreitól) e 0,5 µL de inibidor de ribonuclease (Invitrogen®) seguida de incubação a 25 °C/10 min, 37 °C/50 min e 70 °C/15 min em termociclador. O cDNA (100 ng/µL em volume final de 20 µL) foi posteriormente armazenado à -80 °C. O cDNA obtido foi diluído para concentração final de 25 ng/µl e, na sequência, amplificado usando a enzima Taq polimerase (GoTaq qPCR Master Mix, Promega®) por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (*Real time* qPCR) em AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies). Foram utilizados os seguintes primers: Receptor AT₁ (Foward –CATCTTTGTGGTGGGAATATTTGG / Reverse - TGGCCACAGTCTTCAGCTTC) e GAPDH (Foward – CCATCACCATCTTCCAGGAG / Reverse - GTGGTTCACACCCATCACAA) como controle interno de cada amostra. A reação foi realizada em duplicata nos protocolos seguintes: 95 °C por 2 min e 15

segundos, durante 40 ciclos e 60 °C por 1 min. O RNA foi quantificado como um valor relativo em comparação com uma referência interna, o GAPDH. A análise da expressão foi obtida pela elevação negativa do $\Delta\Delta CT$ (*threshold cycle*) na base 2 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). O valor de CT representa o momento da reação onde a fluorescência da amostra é detectada acima do ruído de fundo (*background*). O resultado foi expresso em unidades arbitrárias.

3.9 FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS-

Acetilcolina, cloridrato (Sigma), Ácido aminoacético (Glicina) (Sigma), Ácido clorídrico (Sigma), Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Sigma), Albumina bovina (Sigma), Apocinina (Acetovanilona) (Sigma), Azul de bromofenol (Sigma), Bicarbonato de sódio (Sigma), Captopril (Sigma), Cloreto de cálcio dihidratado (Sigma), Cloreto de potássio (Sigma), Cloreto de sódio (Sigma), Dihidroetídio (Sigma), Dodecil-sulfato de sódio (SDS) (Sigma), Fosfato de potássio monobásico (Sigma), Glicerol (Sigma), Glicose (Sigma), Hidróxido de sódio (Synth), Indometacina (Sigma), Leite desnatado (Nestlé), L-fenilefrina hidrocloreto (Sigma), Losartan (Sigma), Metanol (Merck), N,N,N',N'- Tetrametil-etilenodiamina (Temed) (Sigma), N,N'- Metilenbisacrilamida 40% Solução 37, 5:1 (Acrilamida) (Sigma), Noradrenalina (Sigma) Nitroprussiato de sódio (Sigma), Persulfato de amônio (APS) (Sigma), Polioxietileno sorbitam monolaurato (Tween 20) (Sigma), Reagente para detecção de Western Blot (ECL Plus) (GE), Sulfato de magnésio heptahidratado (Sigma), Tempol (Sigma), Tris HCl (Sigma). Todas as soluções foram preparadas com água destilada, exceto a indometacina que foi diluída em etanol, e mantidas a -20 °C (fármacos) e a 8 °C (soluções de Krebs).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos resultados foi realizada através de teste *t* de student pareados e análise de variância (ANOVA, uma ou duas vias), completamente randomizada, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni, com auxílio do programa GraphPad Prism (San Diego, CA, E.U.A). Os resultados foram considerados estaticamente significantes para valores $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 INGESTÃO DE ÁGUA E NaCl DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

As ratas que receberam a dieta contendo 8% de NaCl apresentaram aumento da ingestão de água, tanto na gestação quanto na lactação, em comparação com as ratas que receberam dieta normossódica (Gestação: Dieta normossódica: $15 \pm 0,56$ mL vs. Dieta hipersódica: $39 \pm 0,23$ mL, $P < 0,05$; Lactação: Dieta normossódica: $43 \pm 3,7$ mL vs. Dieta hipersódica: $68 \pm 9,3$ mL, $P < 0,05$). A ingestão diária de sódio foi aumentada nas ratas alimentadas com uma dieta hipersódica durante os períodos de gestação e lactação, em comparação com as ratas que receberam dieta normossódica (Gestação: Dieta normossódica: $39 \pm 3,5$ mg vs. Dieta hipersódica: $261 \pm 9,1$ mg, $P < 0,05$; Lactação: Dieta normossódica: 72 ± 16 vs. Dieta hipersódica: 481 ± 70 mg, $P < 0,05$). A gestação ocorreu normalmente e as ratas pariram entre 8 e 12 filhotes espontaneamente após 21 dias de gestação.

4.2 PESO CORPORAL E PRESSÃO ARTERIAL DA PROLE

O peso corporal da prole ao nascimento não foi afetado pela dieta materna com alto teor de sódio (NS: $5,7 \pm 0,10$ g vs. HS: $5,9 \pm 0,09$ g, $P > 0,05$). No entanto, aos seis meses de idade (idade em que foram realizados os experimentos), o grupo HS mostrou aumento do peso corporal em comparação ao grupo NS (NS: 372 ± 22 g vs. HS: 415 ± 14 g, $P < 0,05$).

Neste estudo, não houve diferenças significativas na pressão arterial sistólica (PAS) ou diastólica (PAD) entre as proles estudadas (PAS: NS: $133 \pm 0,62$ mmHg vs. HS: $136 \pm 1,9$ mmHg, $P > 0,05$; PAD; NS: $86 \pm 1,5$ mmHg vs. HS: $95 \pm 3,8$ mmHg, $P > 0,05$).

4.3 ESTUDOS DE REATIVIDADE VASCULAR

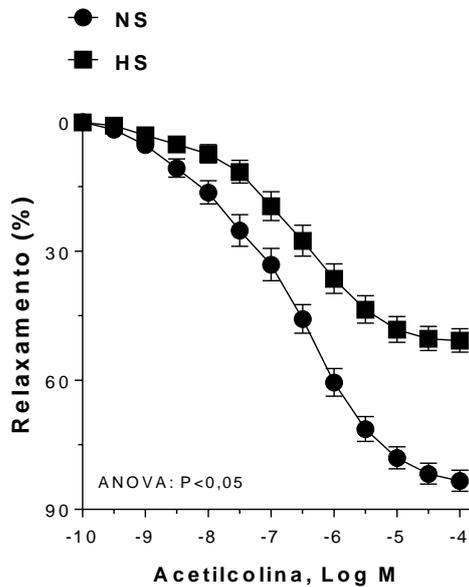
4.3.1 Resposta contráctil induzida pelo cloreto de potássio (KCl)

A contração induzida pelo KCl (75 mM, aorta ou 120 mM, AMR) foi semelhante na aorta e AMR de ratos NS e HS (Aorta: NS: $1,5 \pm 0,06$ g vs. HS: $1,6 \pm 0,10$ g, $P > 0,05$; NS: $16,15$ mN $\pm 1,2$ vs. HS $16,99$ mN $\pm 1,5$ $P > 0,05$).

4.3.2 Relaxamento dependente e independente do endotélio

A acetilcolina induziu relaxamento dependente do endotélio na aorta e na AMR dos grupos NS e HS. Como pode ser observada na Figura 1A e 1B, esta resposta foi diminuída na aorta e na AMR do grupo HS, comparado ao NS. A resposta de relaxamento independente do endotélio induzida pelo doador de óxido nítrico (\bullet NO), nitroprussiato de sódio, foi semelhante nas artérias (aorta e AMR) de ambos os grupos (Aorta: NS: $100\% \pm 0,0$ vs. HS: $97,90\% \pm 0,95$, $P > 0,05$; AMR: NS: $94,86\% \pm 0,98$ vs. HS: $95,14\% \pm 2,49$, $P > 0,05$).

A- Aorta



B- AMR

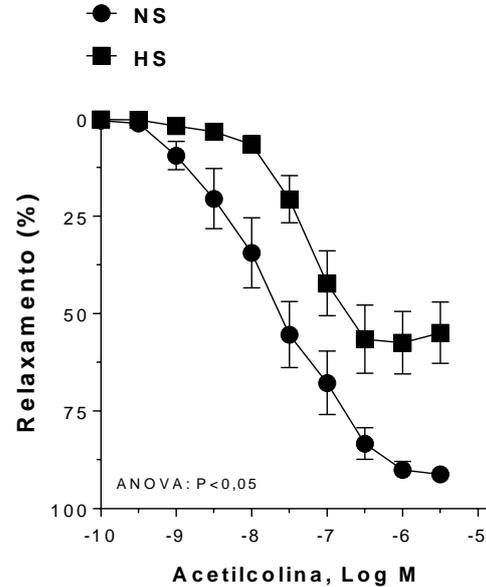
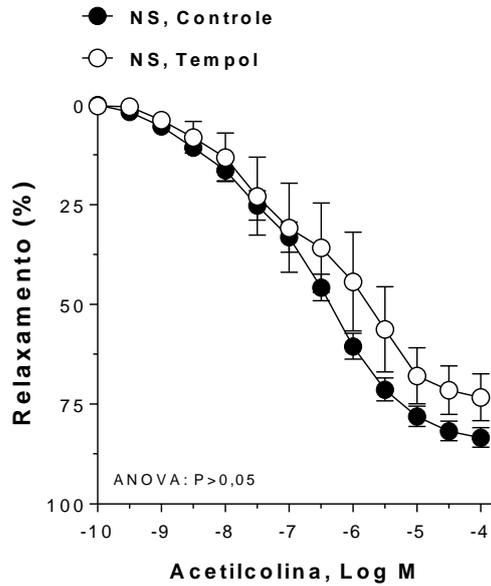


Figura 1. Relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina em aortas (A) e em artérias mesentéricas de resistência (AMR, B) da prole proveniente de ratas alimentadas com uma dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS). Os resultados são expressos como média \pm EPM. N=6-8 ratos em cada grupo.

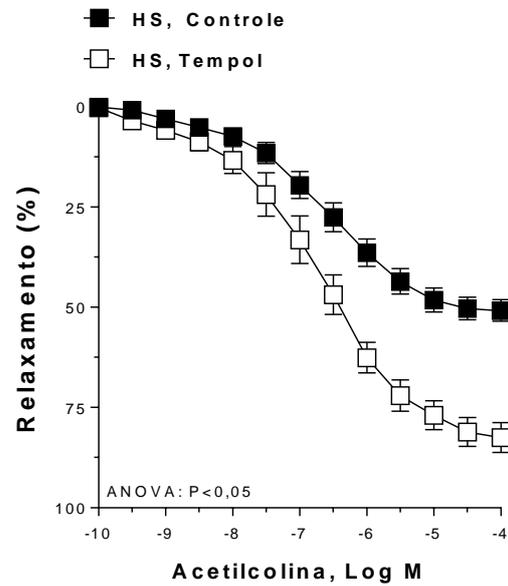
4.3.3 Efeito das espécies reativas de oxigênio (EROs), da NADPH oxidase, da ciclooxigenase e da angiotensina II no relaxamento dependente do endotélio

Para avaliar a participação de radicais livres na resposta vasodilatadora à acetilcolina, as artérias foram pré-incubadas com um mimético da SOD, o tempol. Este pré-tratamento não alterou o relaxamento à acetilcolina nas artérias do grupo NS (Figura 2A e 2C). Contudo, no grupo HS, o tempol potencializou o relaxamento à acetilcolina tanto na aorta (Figura 2B), como na AMR (Figura 2D).

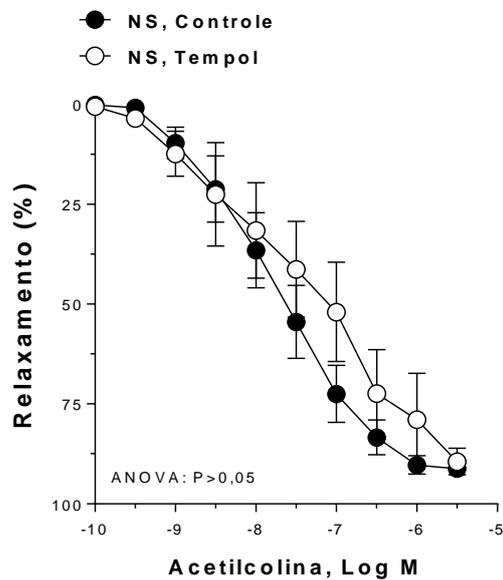
A- Aorta



B- Aorta



C- AMR



D- AMR

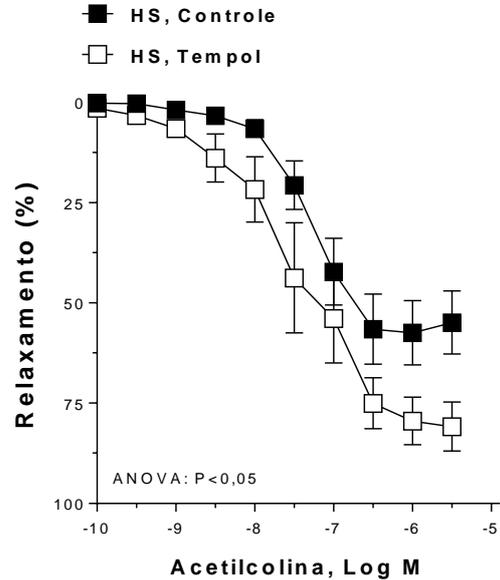
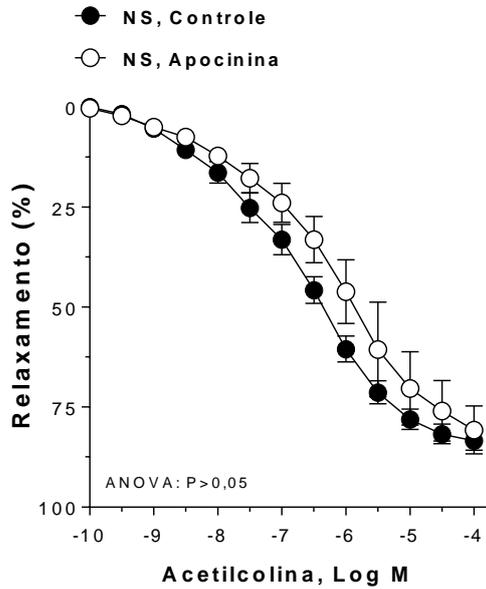


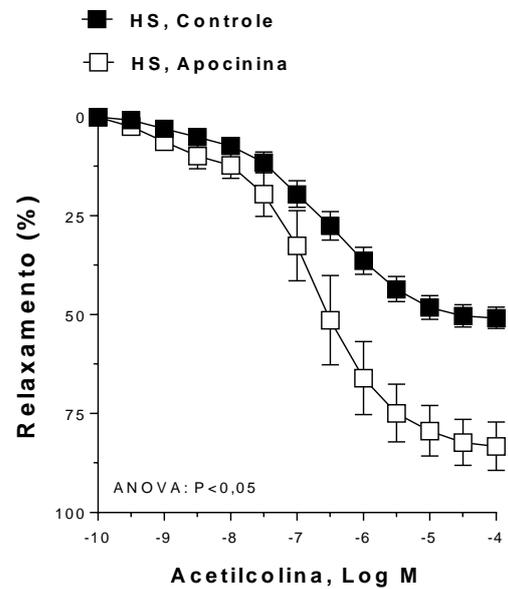
Figura 2. Efeito do tempol na vasodilatação dependente do endotélio induzida por acetilcolina na aorta (A, B) e em artéria mesentérica de resistência (AMR, C, D) da prole de ratas alimentadas com uma dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. N=6-8 ratos em cada grupo.

Como as EROs podem ser produzidas por diversas enzimas que podem ser expressas nos vasos sanguíneos, foi investigado o papel de uma das principais enzimas envolvidas na produção de ânions superóxido na parede vascular, a NADPH oxidase. A apocinina, em concentrações menores que 100 μM atua como inibidor seletivo da NADPH oxidase. De forma semelhante ao tempol, na aorta e na AMR do grupo HS, a apocinina melhorou o relaxamento à acetilcolina (Figura 3B e 3D), sem alterar no grupo NS (Figura 3A e 3C).

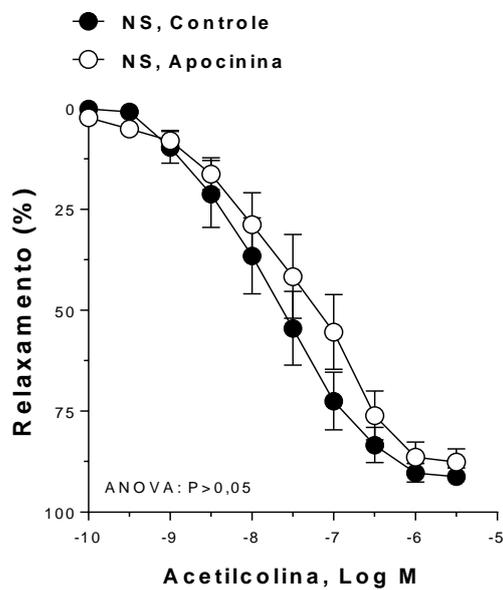
A- Aorta



B- Aorta



C- AMR



D- AMR

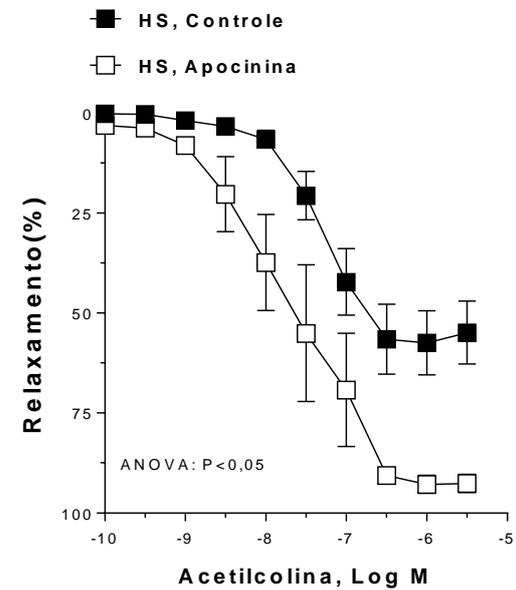
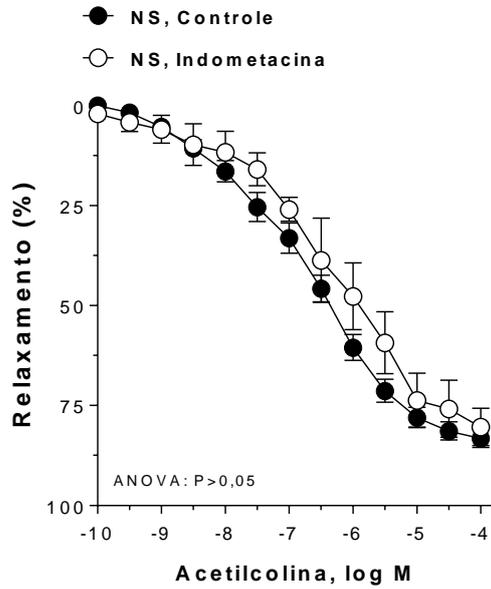


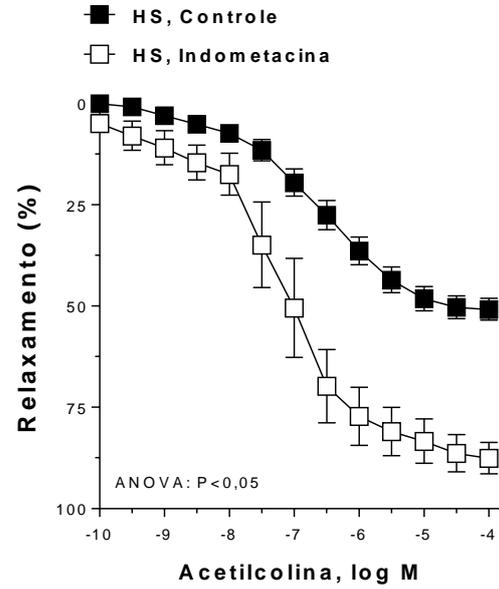
Figura 3. Efeito da inibição da NADPH oxidase (apocinina) na vasodilatação dependente do endotélio induzida por acetilcolina na aorta (A, B) e em artéria mesentérica de resistência (AMR, C, D) da prole de ratos alimentadas com uma dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. N=6-8 ratos em cada grupo.

Apointa-se que a ativação da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase como um dos principais mecanismos indutores de disfunção endotelial em várias situações de risco cardiovascular, como na hipertensão arterial, diabetes, hiperaldosteronismo, etc. No presente estudo, avaliou-se o papel desta via na disfunção endotelial do grupo HS através da pré-incubação com indometacina, um inibidor não seletivo da ciclooxigenase. Como pode ser evidenciado na Figura 4, a indometacina aumentou significativamente o relaxamento à acetilcolina na aorta e AMR do grupo HS (Figura 4B e 4D), mas não no grupo NS (Figura 4A e 4C).

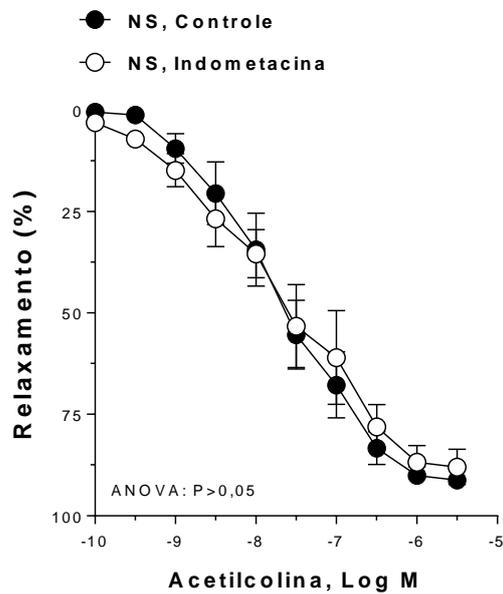
A- Aorta



B- Aorta



C- AMR



D- AMR

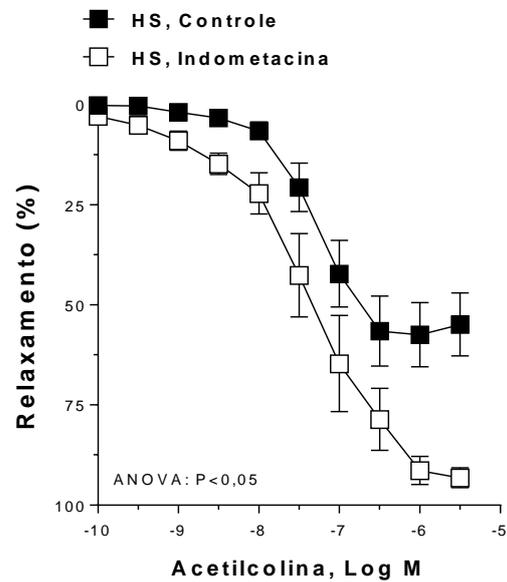
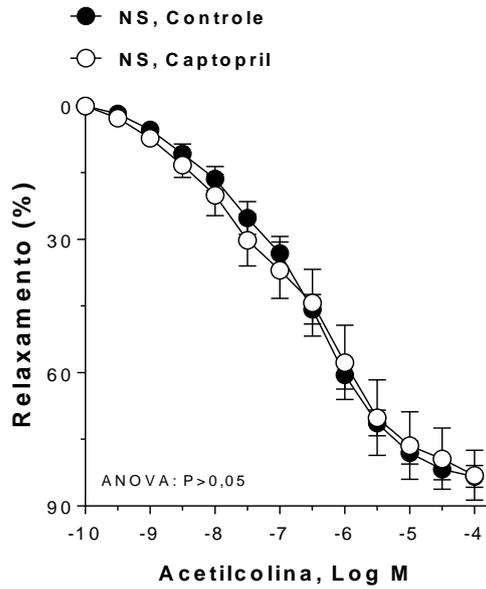


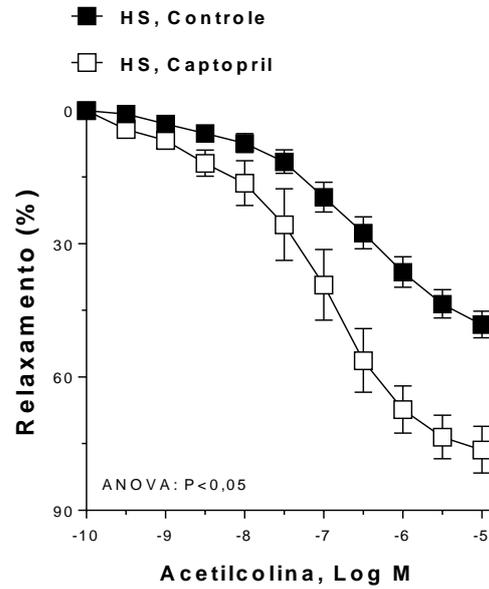
Figura 4. Efeito da inibição da ciclooxygenase (indometacina) na vasodilatação dependente do endotélio induzida por acetilcolina na aorta (A, B) e em artéria mesentérica de resistência (AMR, C, D) da prole de ratos alimentadas com uma dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. N=6-8 ratos em cada grupo.

Alguns estudos têm demonstrado alterações sobre o sistema renina-angiotensina da prole exposta à sobrecarga de sódio durante a vida intrauterina e amamentação. No presente estudo, os animais HS apresentaram disfunção endotelial dependente da geração de radicais livres derivados da NADPH oxidase e da produção de metabólitos da via da ciclooxigenase. Sabe-se que ambas as vias podem ser estimuladas pela angiotensina II. Portanto, para investigar a participação da angiotensina II sobre as alterações observadas na aorta e AMR do grupo HS, ambas as artérias foram incubadas com captopril (um inibidor da ECA) ou com losartan (um antagonista dos receptores AT_1 para a angiotensina II). Ambos os fármacos promoveram aumento do relaxamento dependente do endotélio nas artérias do grupo HS (Figura 5 e 6). Nas artérias do grupo NS, o relaxamento à acetilcolina não foi afetado nem pelo captopril, nem pelo losartan (Figura 5 e 6).

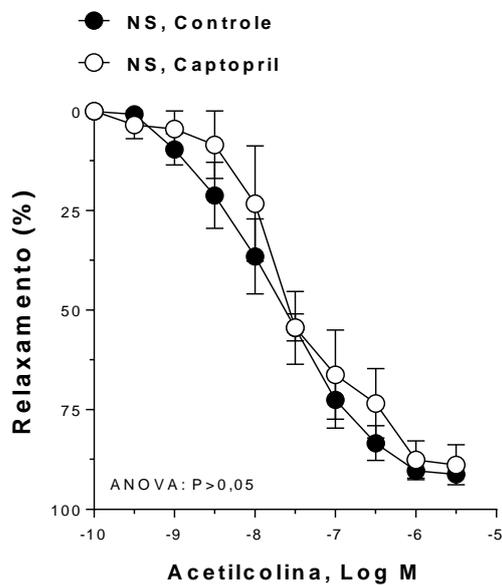
A- Aorta



B- Aorta



C- AMR



D- AMR

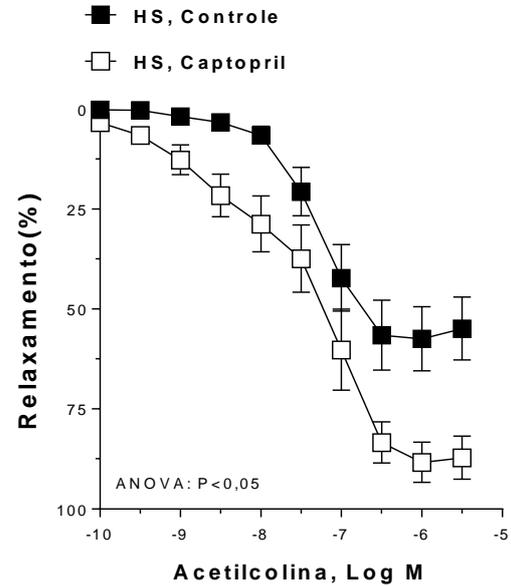
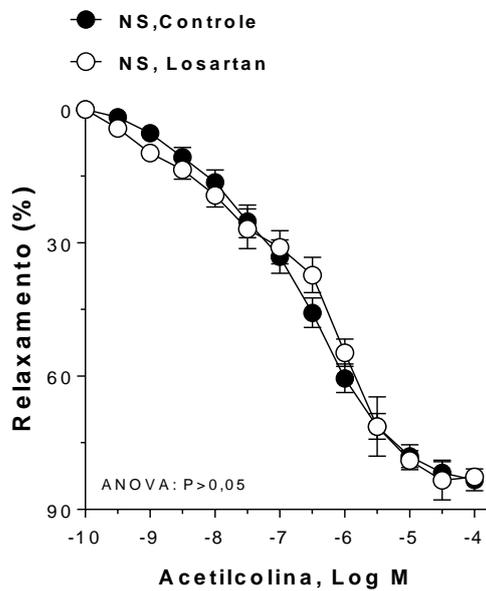
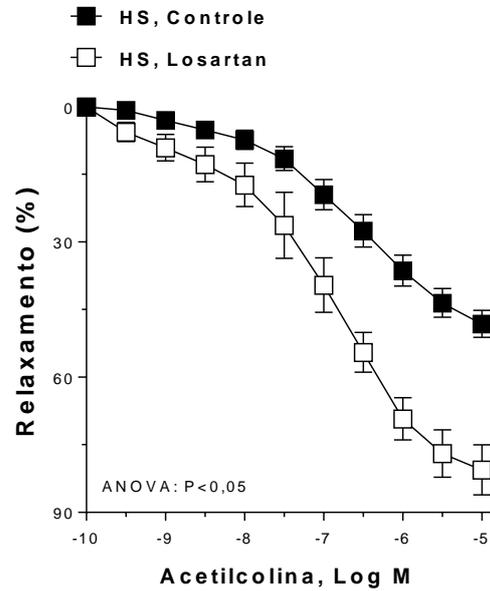


Figura 5. Efeito da inibição da ECA (captopril) na vasodilatação dependente do endotélio induzida por acetilcolina na aorta (A, B) e em artéria mesentérica de resistência (AMR, C, D) da prole de ratas alimentadas com uma dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. N=6-8 ratos em cada grupo.

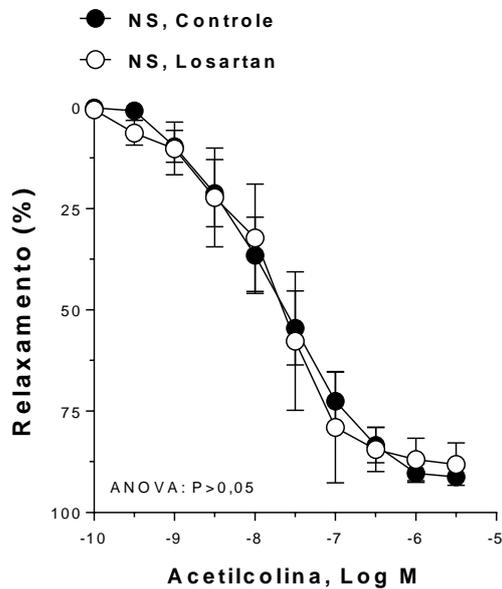
A- Aorta



B- Aorta



C- AMR



D- AMR

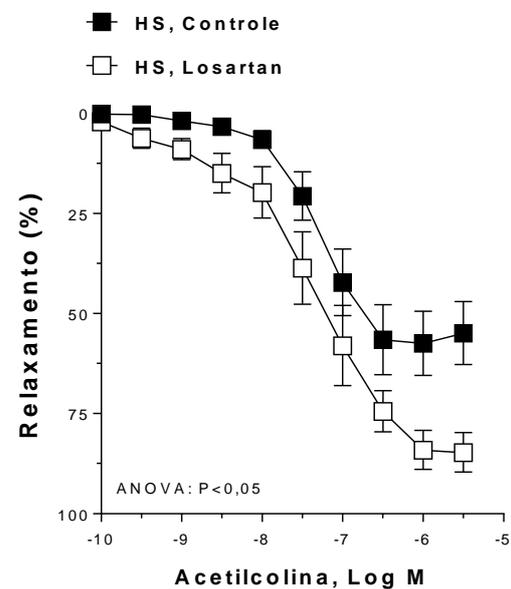
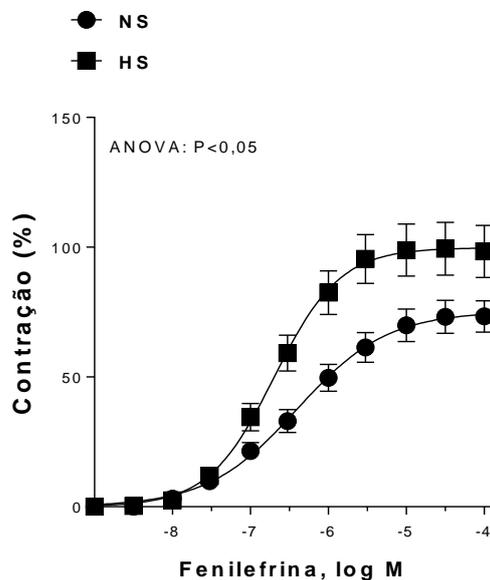


Figura 6. Efeito da pré-incubação com losartan na vasodilatação dependente do endotélio induzida por acetilcolina na aorta (A, B) e em artéria mesentérica de resistência (AMR, C, D) da prole de ratas alimentadas com uma dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. N=6-8 ratos em cada grupo.

4.3.4 Vasoconstrição induzida por estimulação alfa-adrenérgica

A fenilefrina (na aorta) e a noradrenalina (na AMR) induziram contração concentração-dependente nas artérias de ambos os grupos. Na aorta do grupo HS, a resposta à fenilefrina foi potencializada em comparação ao grupo NS (Figura 7A). Entretanto, na AMR, a resposta à noradrenalina foi semelhante nos grupos HS e NS (Figura 7B).

A- Aorta



B- AMR

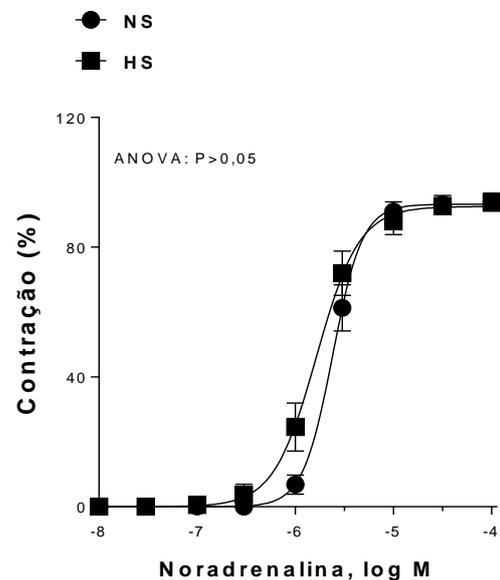


Figura 7. Curva concentração-resposta à fenilefrina (A) ou noradrenalina (B) em anéis de aorta, (A) e em artérias mesentéricas de resistência (AMR, B) da prole proveniente de ratas alimentadas com uma dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS). Os resultados são expressos como média \pm EPM. N=6-8 ratos em cada grupo.

A partir desses resultados, os próximos experimentos foram realizados com o intuito de avaliar as principais vias envolvidas na hiper-reatividade à fenilefrina na aorta dos animais HS. Como na AMR, a contração à noradrenalina foi semelhante entre os grupos NS e HS, o papel destas vias na AMR não foi estudado.

A fim de investigar se o aumento na reatividade vascular à fenilefrina no grupo HS envolvia uma maior degradação de \bullet NO por EROs, as artérias foram incubadas com tempol ou com apocinina. A incubação com o “sequestrador ou varredor” de ânions superóxido, o tempol, não modificou a curva concentração resposta à fenilefrina no grupo NS, no entanto, reduziu no grupo HS (Figura 8A e 8B). De forma

semelhante, a apocinina, um inibidor da NADPH oxidase, também reduziu a vasoconstrição à fenilefrina no grupo HS, sem alterar no NS (Figura 9A e 9B).

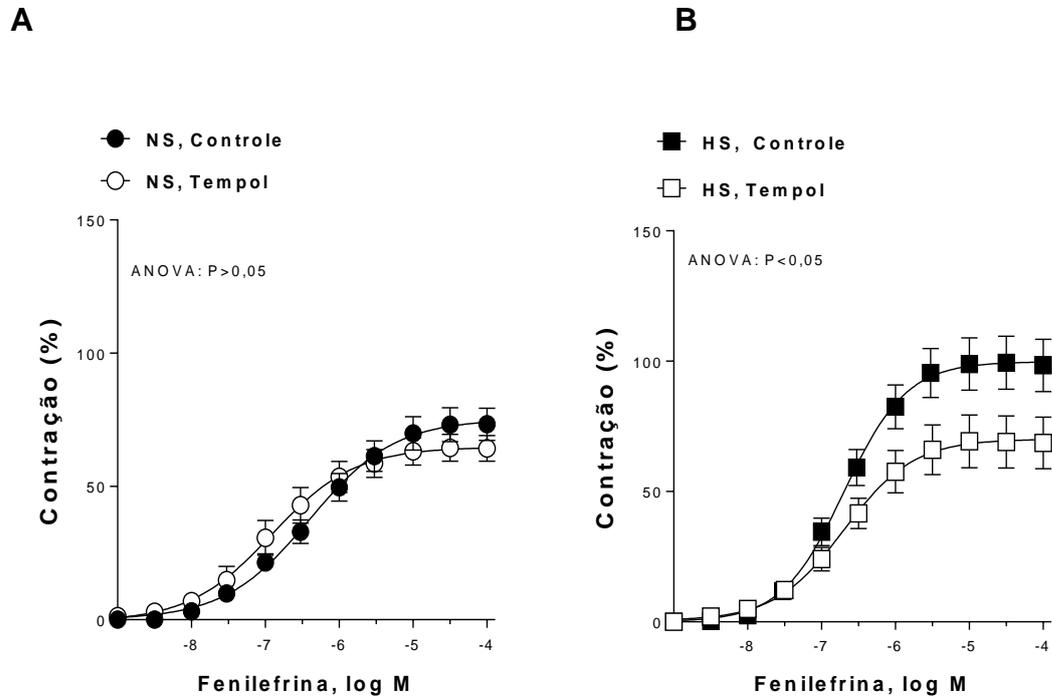
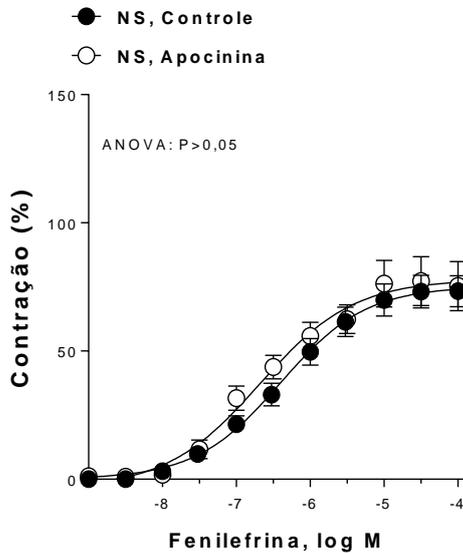


Figura 8. Efeito da pré-incubação com tempol sobre a contração induzida por fenilefrina em aorta com endotélio da prole de ratos alimentadas com uma dieta normossódica (NS, A) ou hipersódica (HS, B). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. N=6-8 ratos em cada grupo.

A



B

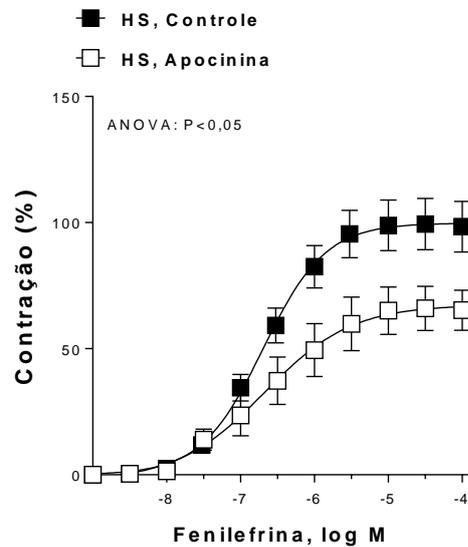
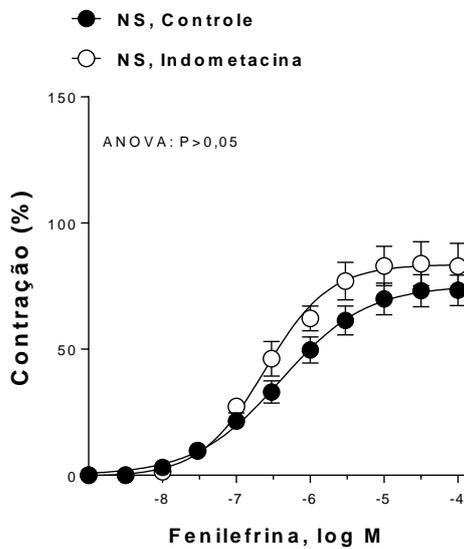


Figura 9. Efeito da pré-incubação com apocinina sobre a contração induzida por fenilefrina em aorta com endotélio da prole de ratos alimentadas com uma dieta normossódica (NS, A) ou hipersódica (HS, B). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. N=6-8 ratos em cada grupo.

Com o objetivo de avaliar o papel modulatório da via da COX sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em aortas de ratos NS e HS, o efeito da indometacina foi avaliado. A pré-incubação com indometacina reduziu a contração à fenilefrina no grupo HS (Figura 10B), sem alterá-la no grupo NS (Figura 10A).

A



B

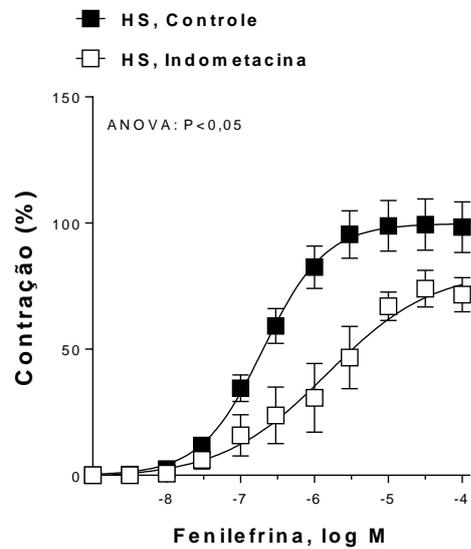


Figura 10. Efeito da pré-incubação com indometacina sobre a contração induzida por fenilefrina em anéis de aorta com endotélio da prole de ratas alimentadas com uma dieta normossódica (NS, A) ou hipersódica (HS, B). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. N=6-8 ratos em cada grupo. .

Da mesma forma que foi realizada para o relaxamento à acetilcolina, o papel da angiotensina II sobre a contração induzida por fenilefrina foi avaliado na presença de captopril ou losartan. Ambas as situações promoveram redução da resposta à fenilefrina nas artérias do grupo HS (Figuras 11B e 12B), sem alterar esta resposta no grupo NS (Figuras 11A e 11B).

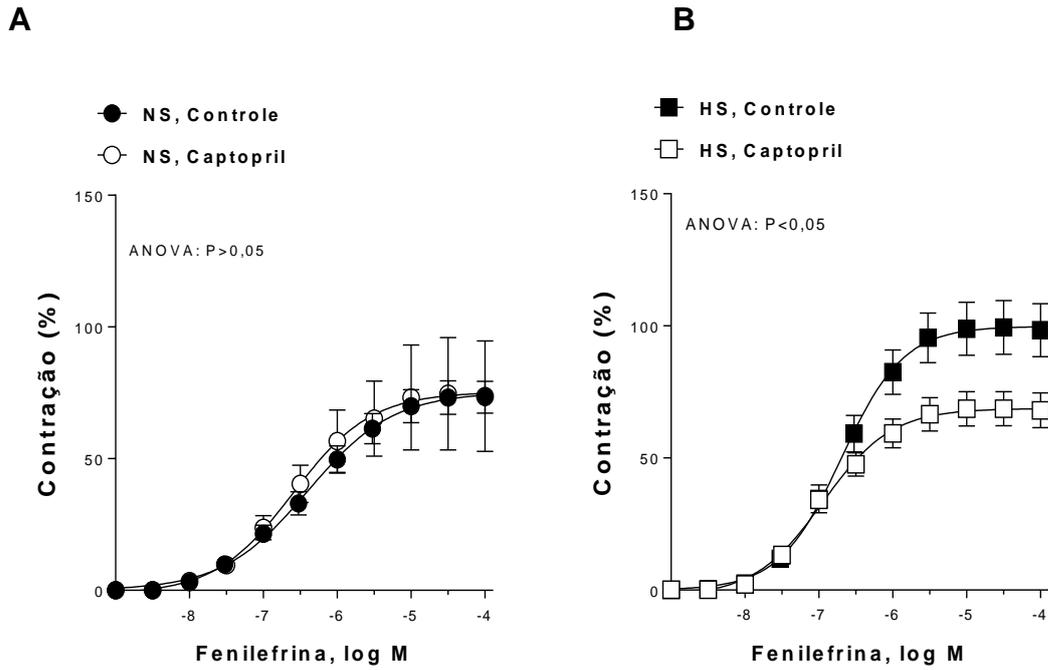


Figura 11. Efeito da inibição da ECA (captopril) na contração induzida por fenilefrina em aorta com endotélio da prole de ratas alimentadas com uma dieta normossódica (NS, A) ou hipersódica (HS, B). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. N=6-8 ratos em cada grupo.

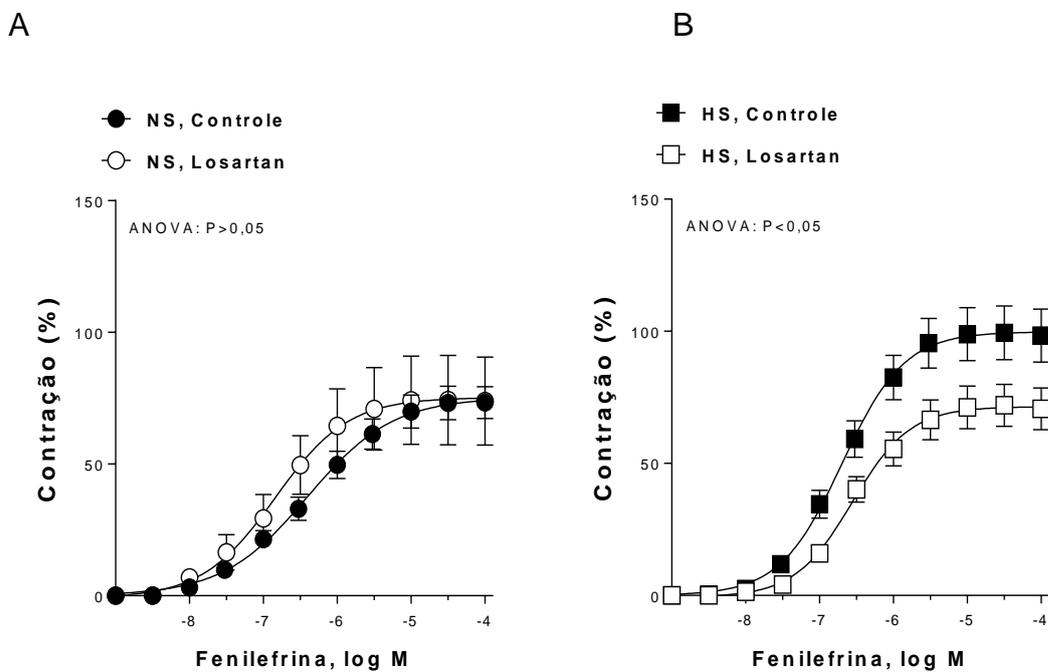


Figura 12. Efeito do losartan na contração induzida por fenilefrina em aorta com endotélio da prole de ratas alimentadas com uma dieta normossódica (NS, A) ou hipersódica (HS, B). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. N=6-8 ratos em cada grupo.

4.3.5 Vasoconstrição induzida por angiotensina I e angiotensina II, medida da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) e expressão gênica dos receptores AT₁

A exposição das artérias à angiotensina I promove contração destas devido à conversão, pela ECA, da angiotensina I em angiotensina II. Trata-se de uma ferramenta indireta e funcional da atividade da ECA na parede arterial. Como esperado, a administração de angiotensina I induziu contração na aorta e na AMR de ambos os grupos, sendo esta reposta de maior magnitude no grupo HS (Figura 13A, C). Por outro lado, a resposta contrátil à angiotensina II foi semelhante nas artérias de ambos os grupos (Figura 13B, D).

Corroborando estes dados funcionais, a atividade da ECA foi aumentada na aorta e na AMR do grupo HS comparado ao grupo NS (Figura 14A e 14B). No plasma e no pulmão, a atividade da ECA foi semelhante entre os grupos NS e HS, (Figura 14C e 14D).

A expressão gênica do RNAm do receptor AT₁ em aorta e AMR foi semelhante entre os grupos NS e HS (Figura 15).

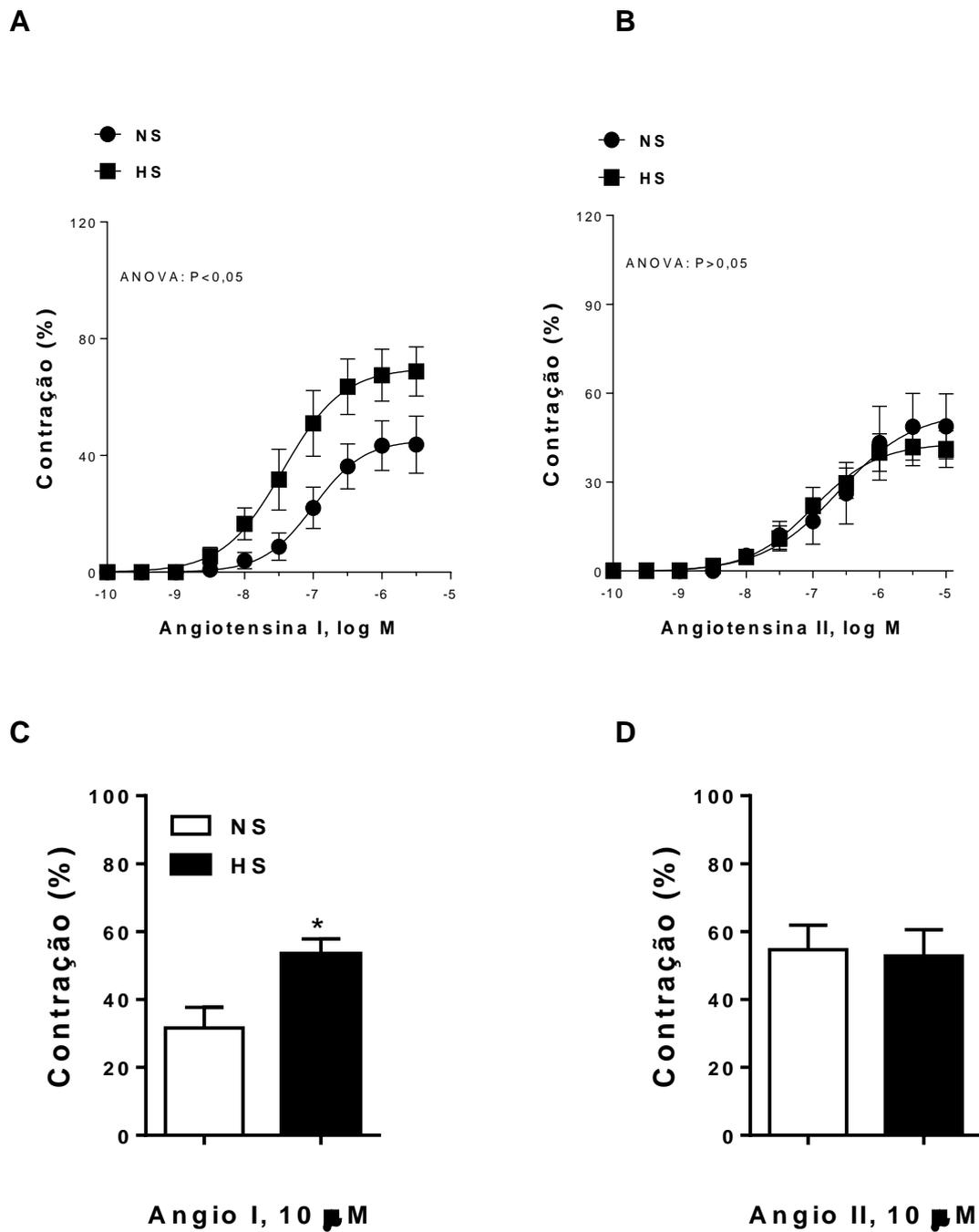
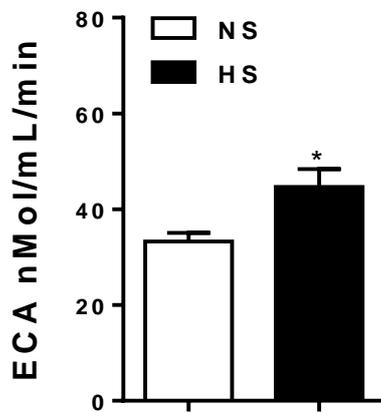
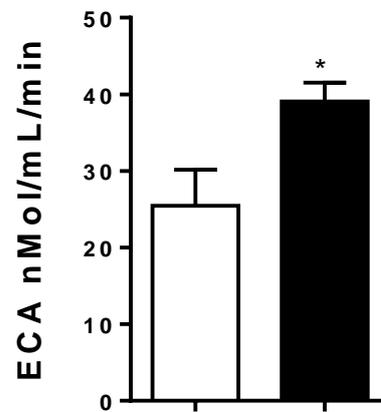


Figura 13. Curva concentração resposta à angiotensina (Angio) I (A) e angiotensina II (B) em anéis de aorta da prole de ratas alimentadas com uma dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS). (C,D) Contração induzida pela angiotensina I, ($10 \mu\text{M}$, C) e pela angiotensina II, ($10 \mu\text{M}$, D) em AMR de ratos NS e HS. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. $N = 6-8$ ratos em cada grupo.

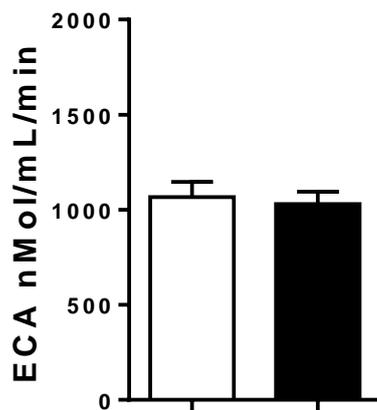
A- Aorta



B- AMR



C- Plasma



D- Pulmão

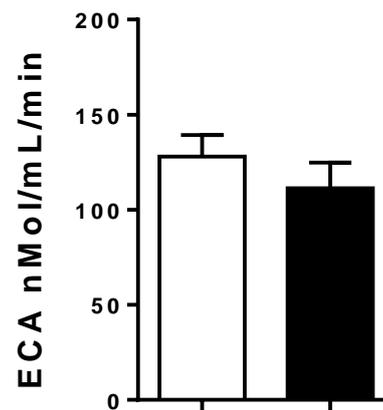


Figura 14. Atividade da enzima conversora de angiotensina na aorta (A), artéria mesentérica de resistência (B, AMR), plasma (C) e pulmão (B) de animais NS e HS. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. N = 5 ratos em cada grupo. Teste t, *P<0.05 vs. NS.

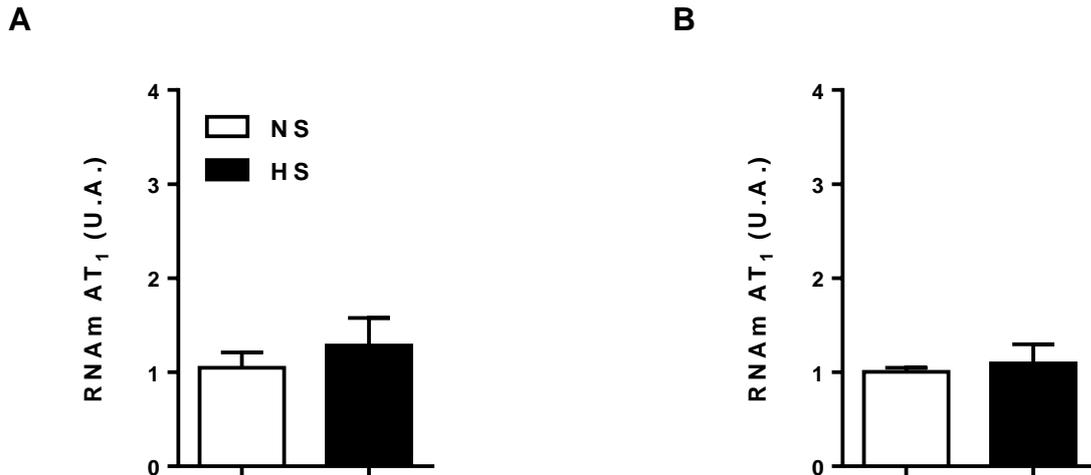


Figura 15. Expressão gênica do RNAm do receptor AT₁ para a angiotensina II em aorta (A) e AMR (B) de ratos NS e HS. Os resultados estão como média ± erro padrão. N=5 ratos em cada grupo.

4.4 DETERMINAÇÃO IN SITU DA PRODUÇÃO DE ÂNIONS SUPERÓXIDO

Como demonstrado na Figura 16 e 17, a fluorescência emitida pelo DHE foi maior na AMR e em anéis de aorta do grupo HS, respectivamente, comparada ao grupo NS, a qual indica uma maior geração de ânions superóxido no grupo HS. Em ambas artérias do grupo HS, a incubação com a apocinina foi capaz de diminuir significativamente a fluorescência emitida pelo DHE, indicando que a geração de ânions superóxido nas artérias destes animais é em parte decorrente da atividade da NAPDH oxidase. Em ambas artérias do grupo HS, o pré-tratamento com losartan foi capaz de reduzir ao nível do grupo NS a fluorescência do DHE. Este resultado indica que no grupo HS, a maior geração vascular de ânions superóxido é mediada pela angiotensina II através da estimulação de receptores AT₁.

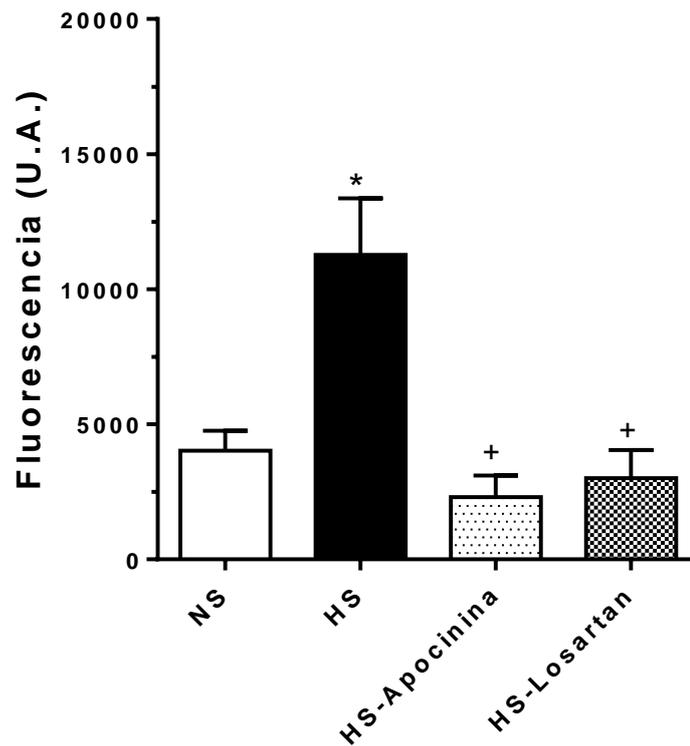
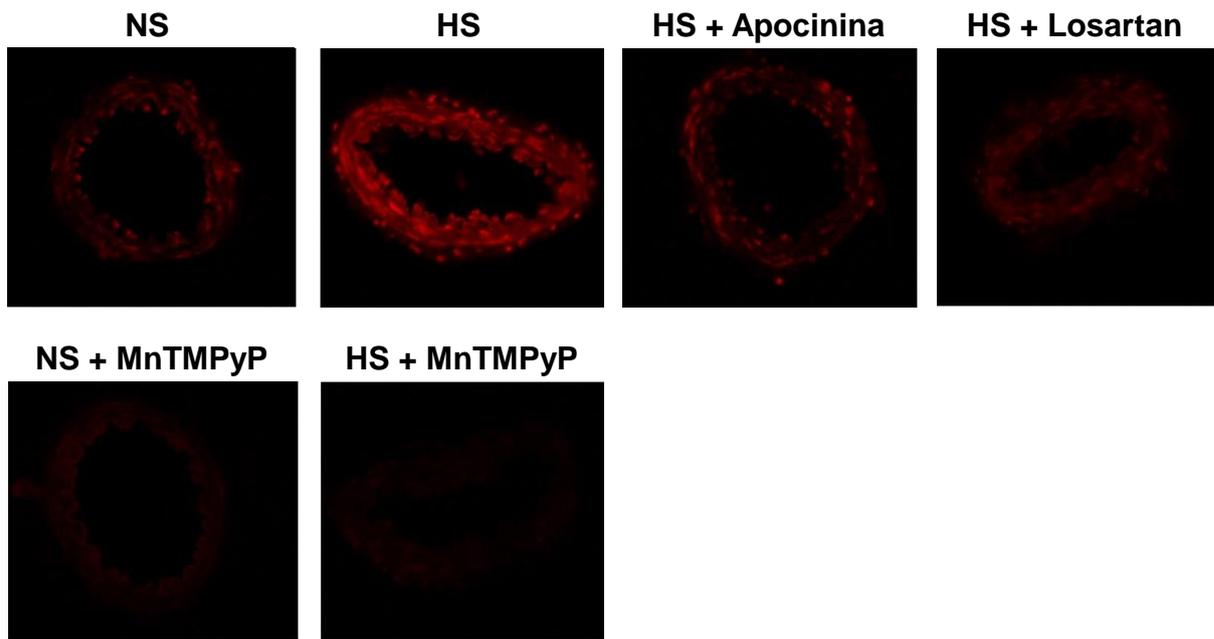


Figura 16. (A) Imagens representativas da fluorescência emitida pela geração de ânions superóxido em artéria mesentérica de resistência (AMR) de ratos NS e HS, na ausência e na presença de apocinina ou losartan. (B). Análise quantitativa média da produção de ânions superóxido em artérias do grupo NS e HS (na ausência e na presença de apocinina ou losartan). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. U.A., unidades arbitrárias. N=5-6 ratos em cada grupo. ANOVA (uma via), * $P < 0,05$ vs. NS; + $P < 0,05$ vs. HS.

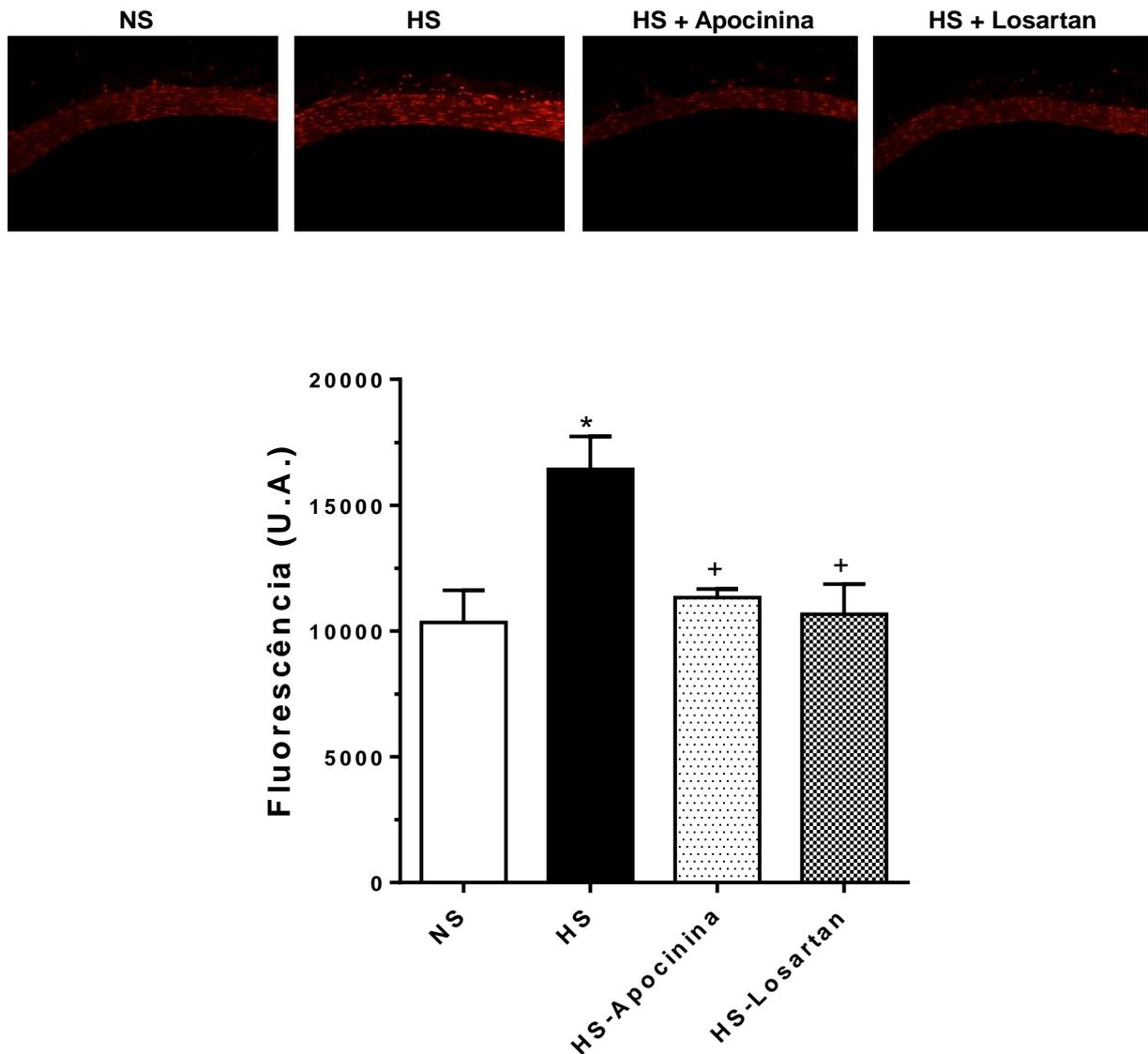


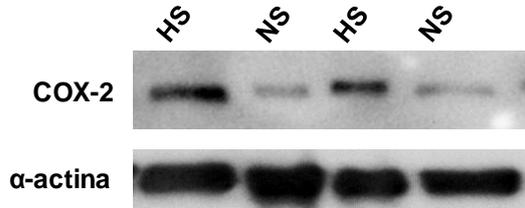
Figura 17. (A) Imagens representativas da fluorescência emitida pela geração de ânions superóxido em anéis de aorta de ratos NS e HS, na ausência e na presença de apocinina ou losartan. (B). Análise quantitativa média da produção de ânions superóxido em artérias do grupo NS e HS. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. U.A., unidades arbitrárias. N=5-6 ratos em cada grupo. ANOVA (uma via), *P<0,05 vs. NS; +P<0,05 vs. HS.

4.5 EXPRESSÃO PROTEICA DA COX-1, COX-2, ENOS E NOX-4

As Figuras 18 e 19 mostram a expressão da COX-1 e da COX-2 em aorta e AMR de ratos NS e HS. Nestas artérias, a dieta materna rica em sódio durante a gestação e lactação foi capaz de aumentar significativamente a expressão proteica da COX-2 na prole adulta (Figura 18). Por outro lado, a expressão da COX-1 foi semelhante nas artérias no grupo NS e HS (Figura 19).

A expressão da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS) (Figura 20) e da NOX-4 (Figura 21) foi semelhante na aorta e AMR de ratos NS e HS.

A- Aorta



B- AMR

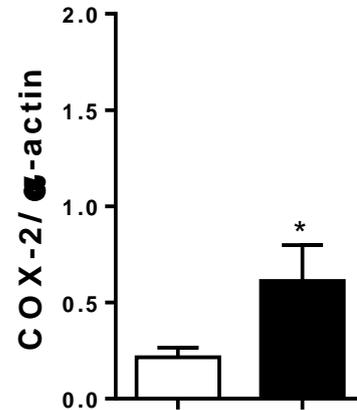
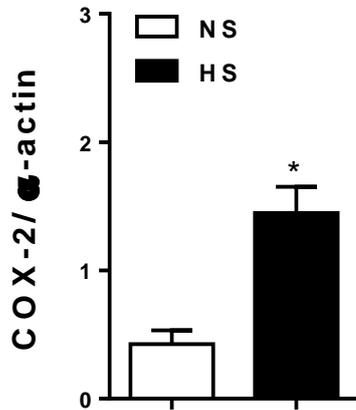
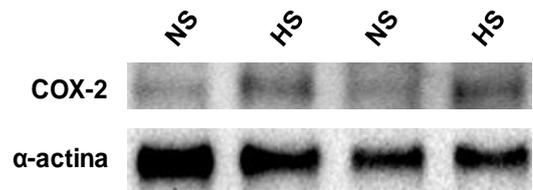
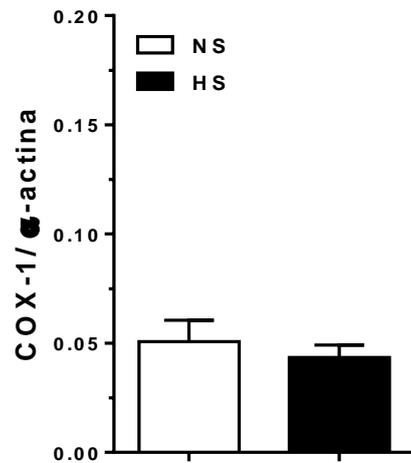
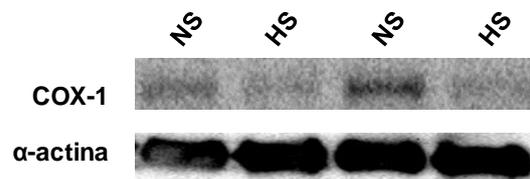


Figura 18. Expressão da COX-2 em aorta e AMR de ratos NS e HS. Painel superior mostra as bandas representativas da expressão da COX-2 e da α -actina em aorta (A) e AMR (B). Painel inferior mostra a análise densitométrica da COX-2 normalizada pelo conteúdo de α -actina. Os resultados estão como média \pm erro padrão. N=4 ratos em cada grupo. Teste t, *P<0.05 vs. NS.

A- Aorta



B- AMR

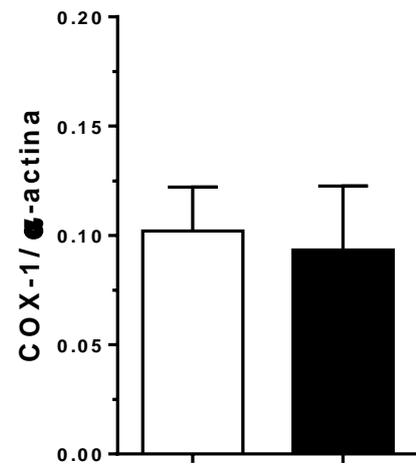
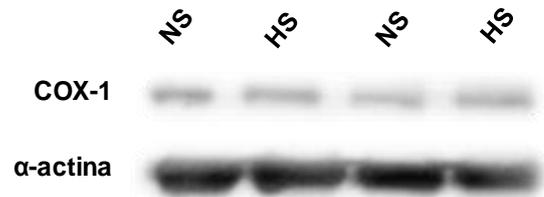
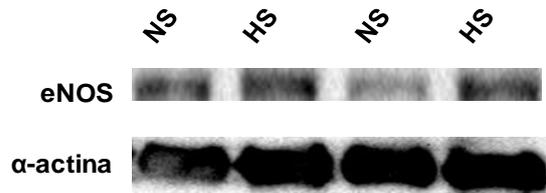


Figura 19. Expressão da ciclooxigenase-1 (COX-1) em aorta e AMR de ratos NS e HS. Painel superior mostra as bandas representativas da expressão da COX-2 e da α -actina em aorta (A) e AMR (B). Painel inferior mostra a análise densitométrica da COX-2 normalizada pelo conteúdo de α -actina. Os resultados estão como média \pm erro padrão. N=4 ratos em cada grupo. Teste t, *P<0.05 vs. NS.

A- Aorta



B- AMR

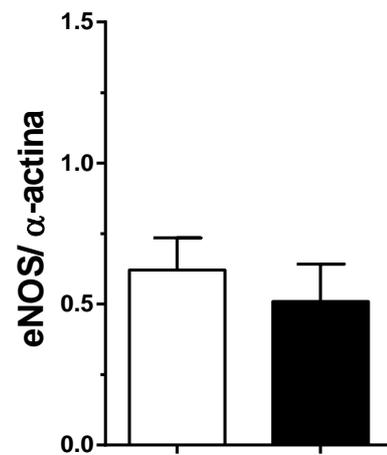
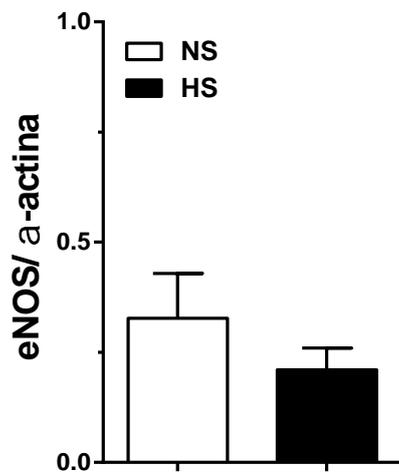
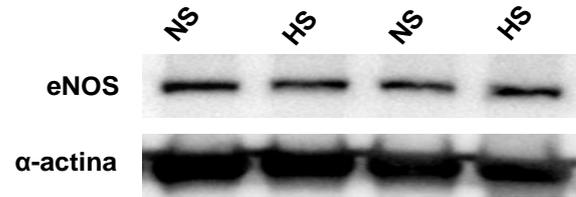
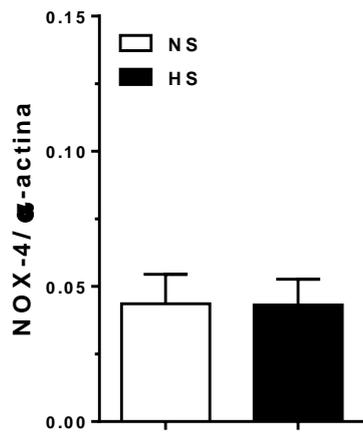
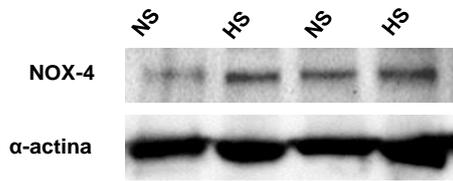


Figura 20. Expressão da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS) em aorta (A) e AMR (B) de ratos NS e HS. Painel superior mostra as bandas representativas da expressão da eNOS e da α -actina em aorta (A) e AMR (B). Painel inferior mostra a análise densitométrica da COX-2 normalizada pelo conteúdo de α -actina. Os resultados estão como média \pm erro padrão. N=4 ratos em cada grupo. Teste t, *P<0.05 vs. NS.

A- Aorta



B- AMR

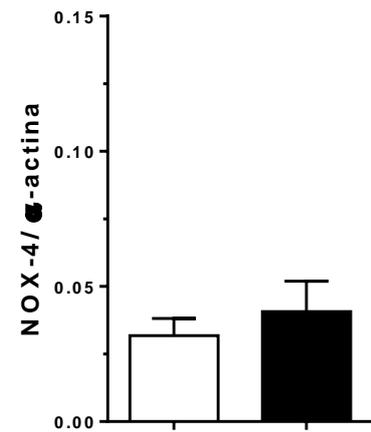
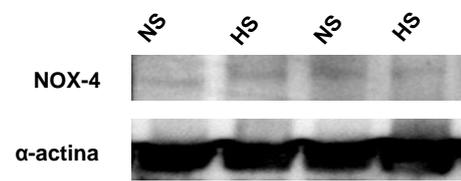
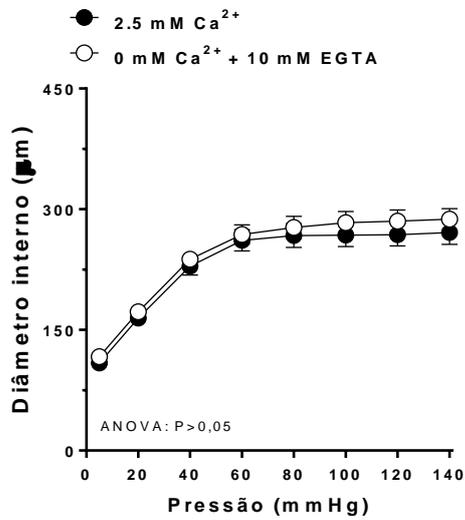


Figura 21. Expressão da NOX-4 em aortas (A) e AMR (C) de ratos NS e HS. Painéis superiores mostram as bandas representativas da expressão da NOX-4 e da α -actina. Painéis inferiores mostram as análises densitométrias normalizada pelo conteúdo de α -actina. Os resultados estão como média \pm erro padrão. N=8 ratos em cada grupo

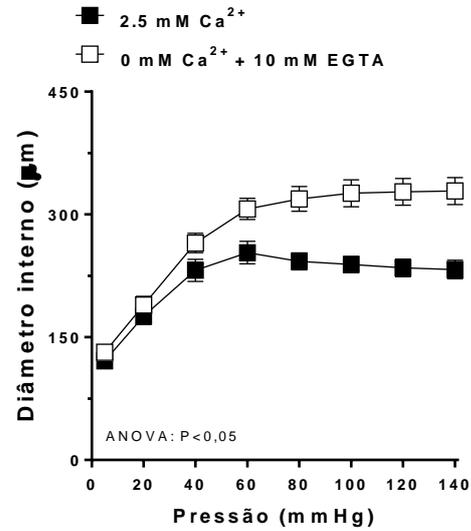
4.6 ESTUDOS DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E ESTRUTURAIS EM ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA

As propriedades mecânicas e estruturais em artérias mesentéricas de resistência (AMR) foram avaliadas através do método de artéria pressurizada. A Figura 22 mostra a relação pressão/ diâmetro em AMR de ratos NS (Figura 22A) e HS (Figura 22B), em condições ativas (na presença de 2,5 mM de Cálcio) e passivas (em meio livre de cálcio). Como é possível observar nas AMR de ambos os grupos, tanto na presença como na ausência de cálcio, o aumento da pressão intravascular induziu um aumento progressivo do diâmetro interno. No grupo NS, essa resposta foi similar em ambas as situações experimentais, ou seja, na presença e na ausência de cálcio (Figura 22A). Entretanto, no grupo HS, o aumento do diâmetro interno foi menor na presença de cálcio, sugerindo a presença da resposta miogênica. Este resultado é mais bem evidenciado pelo resultado da Figura 22C que expressa a contração ativa (%) das AMR de ambos os grupos, a qual está significativamente aumentada no grupo HS.

A- NS



B- HS



C

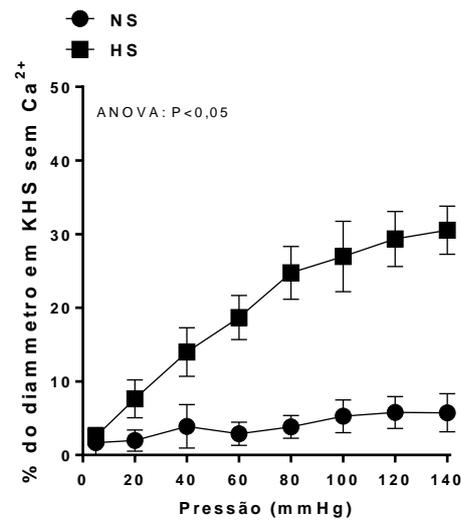


Figura 22. Relação pressão-diâmetro em artérias mesentéricas de resistência (AMR) de ratos NS (A, N=10) e HS (B, N=10) em condições ativas e passivas (Cálcio zero, 0 Ca²⁺). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média dos valores de diâmetro (µm) interno frente às alterações de pressão intravascular. (C) Contração miogênica induzida pela elevação da pressão intraluminal em AMR de ratos NS e HS. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média dos valores percentuais da variação de diâmetro interno frente às elevações da pressão intravascular sob condições ativas (CaCl₂ 2,5 mM).

A Figura 23 mostra os parâmetros morfológicos obtidos em AMR pressurizadas de ratos NS e HS em condições de máximo relaxamento (meio livre Ca^{2+} + 10 mM de EGTA). Para todos os valores de pressão intravascular avaliados, o diâmetro interno (Figura 23A), o diâmetro externo (Figura 23B), a espessura de parede (Figura 23C) e a área de secção transversal (Figura 23D) das AMR de ratos HS apresentaram-se significativamente aumentados quando comparado ao grupo NS. Embora estes parâmetros estivessem aumentados nas artérias do grupo HS a relação parede/lúmen (Figura 24A), o stress de parede (Figura 24B) e a rigidez arterial (relação *stress/strain*) (Figura 24C) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

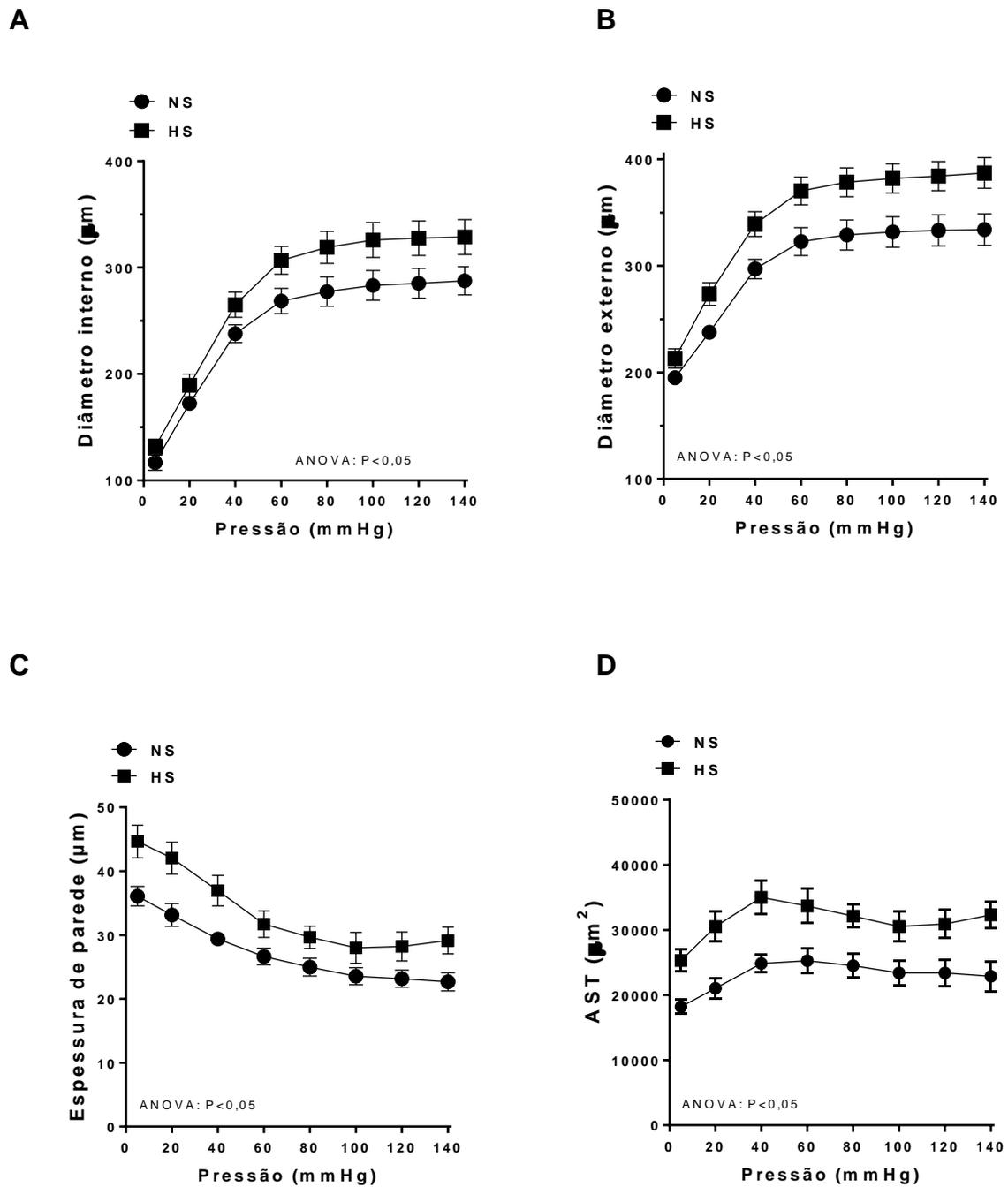


Figura 23. Comparação dos parâmetros estruturais de artérias mesentéricas de resistência (AMR, em condições passivas, 0 Ca^{2+}) de ratos NS (N=10) e HS (N=10). (A) Relação pressão/ diâmetro interno, (B), relação pressão/ diâmetro externo, (C) espessura da parede arterial e (D) área de secção transversal (AST, E). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média

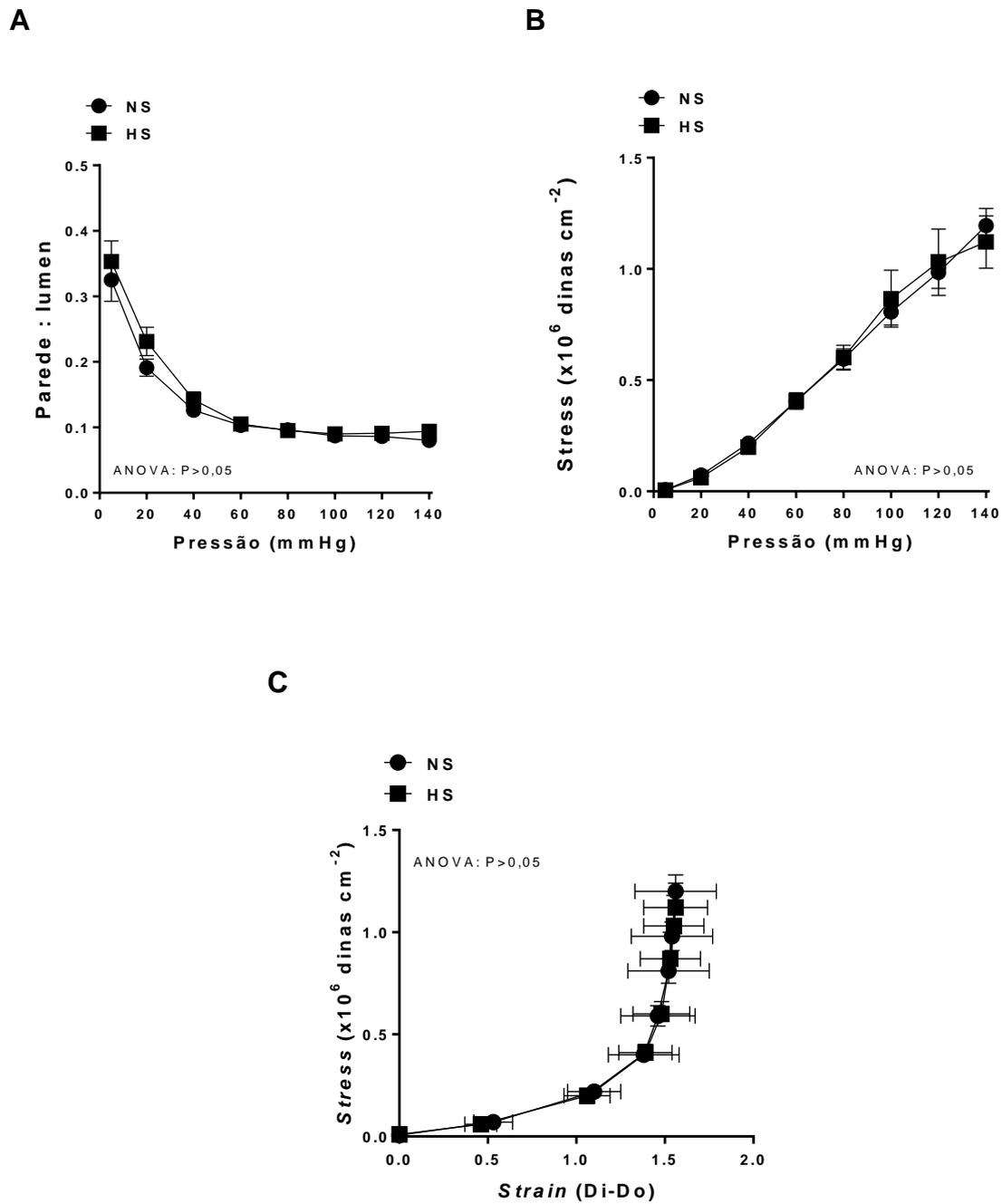


Figura 24. Relação parede: lúmen (A), *stress* de parede (B) e relação *stress-strain* (C) das artérias mesentéricas de resistência (AMR, em condições passivas, 0 Ca^{2+}) de ratos NS (N=10) e HS (N=10). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média.

4.7 EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM O LOSARTAN SOBRE AS ALTERAÇÕES FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS DA PROLE EXPOSTA À SOBRECARGA DE SÓDIO DURANTE A VIDA INTRAUTERINA E PERINATAL

4.7.1 Relaxamento dependente do endotélio e contração induzida por estimulação alfa adrenérgica.

Os resultados obtidos *in vitro* sugeriam a participação da angiotensina II como um mediador das alterações funcionais em artérias do grupo HS. Estas alterações envolvem a geração de EROs derivados do metabolismo da NADPH oxidase e a geração de fatores vasoconstrictores derivados da COX-2. Além disso, sabe-se que a angiotensina II induz hipertrofia vascular em várias situações onde a sua formação está aumentada, como parece ser o caso das artérias do grupo HS. Portanto, o próximo objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do antagonismo crônico dos receptores AT₁ para a angiotensina II (losartan) sobre os parâmetros funcionais e estruturais de artérias do grupo HS. A administração crônica do losartan foi capaz de reverter o prejuízo do relaxamento dependente do endotélio em aorta e AMR do HS (Figura 25A e 25B) e a hiper-reatividade à fenilefrina em anéis de aorta na prole HS (Figura 25C). No grupo NS, o tratamento crônico com losartan melhorou o relaxamento dependente do endotélio na aorta, mas não na AMR. A resposta contrátil induzida por estimulação alfa adrenérgica não foi modificada pelo tratamento do grupo NS com losartan, nem na aorta (Figura 25C), nem na AMR (resultados não mostrados).

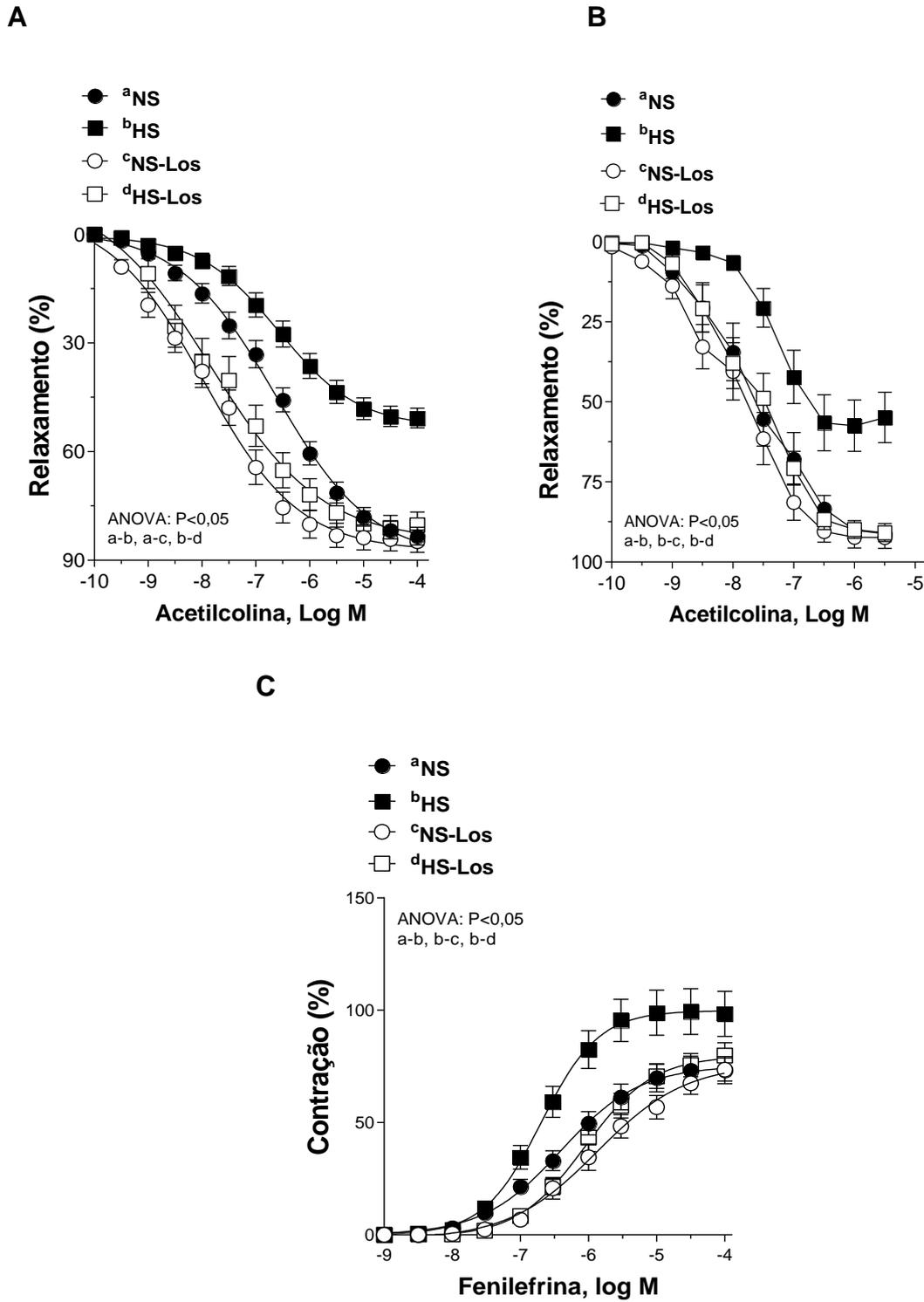


Figura 25. Relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina (A), contração induzida por fenilefrina (C) em anéis de aorta e relaxamento à acetilcolina em artérias mesentéricas de resistência (AMR, B) do grupo NS e HS tratados com losartan (NS-Los e HS-Los). Os resultados são expressos como média \pm EPM. N=8 ratos em cada grupo.

O tratamento com losartan aboliu o efeito do tempol (Figuras 26 e 29), apocinina (Figuras 27 e 30) ou indometacina (Figuras 28 e 31) sobre relaxamento dependente do endotélio na aorta e AMR de ratos HS e sobre a contração induzida por fenilefrina na aorta do grupo HS. No grupo NS tratado com losartan, semelhante ao que foi observado no grupo NS sem tratamento, o tempol, a apocinina ou a indometacina não modificaram o relaxamento dependente do endotélio, bem como a contração induzida por estimulação alfa adrenérgica na aorta e AMR (resultados não mostrados).

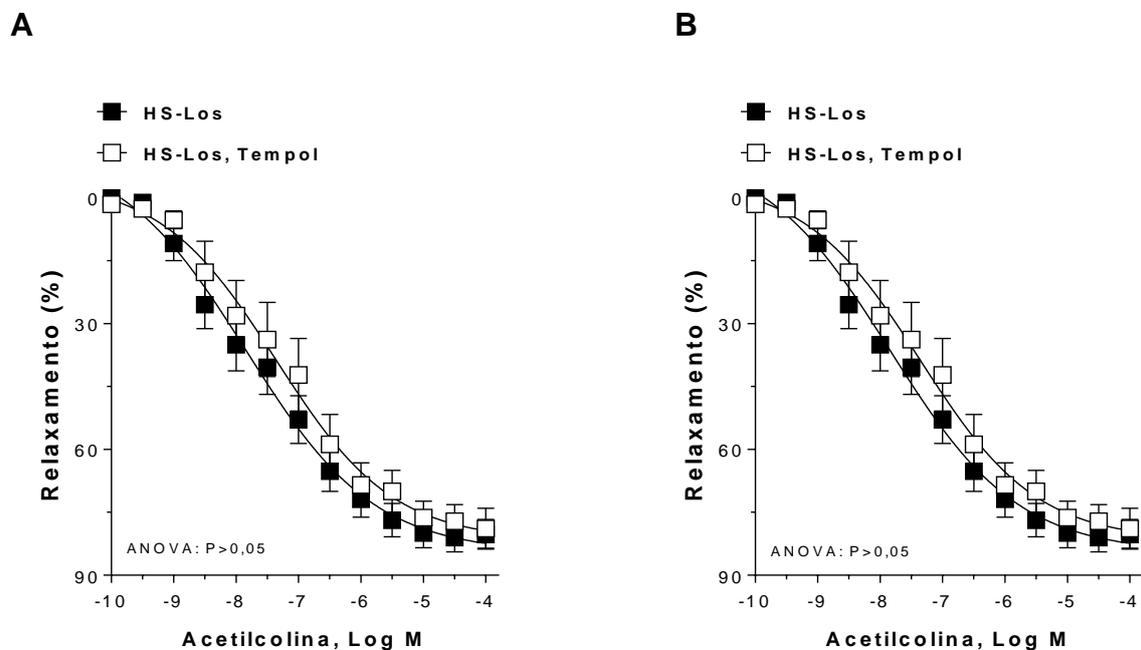


Figura 26. Efeito do tempol na vasodilatação dependente do endotélio induzida por acetilcolina na aorta (A) e na artéria mesentérica de resistência (AMR, B) da prole de ratos alimentadas com uma dieta hipersódica tratados com Losartan (HS-Los). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. N=8 em cada grupo.

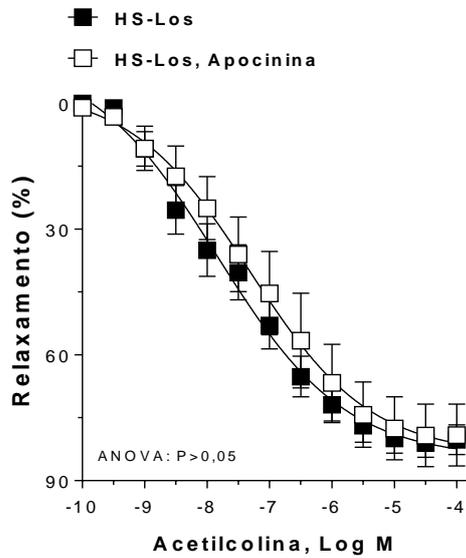
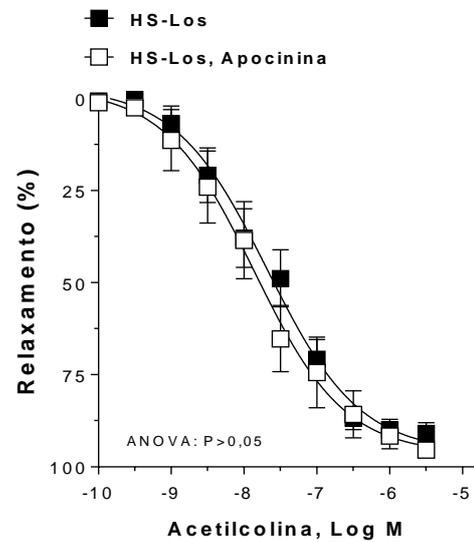
A**B**

Figura 27. Efeito da inibição da NADPH oxidase (apocinina) na vasodilatação dependente do endotélio induzida por acetilcolina na aorta (A) e na artéria mesentérica de resistência (AMR, B) da prole de ratas alimentadas com uma dieta hipersódica tratados com Losartan (HS-Los). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. N=8 em cada grupo.

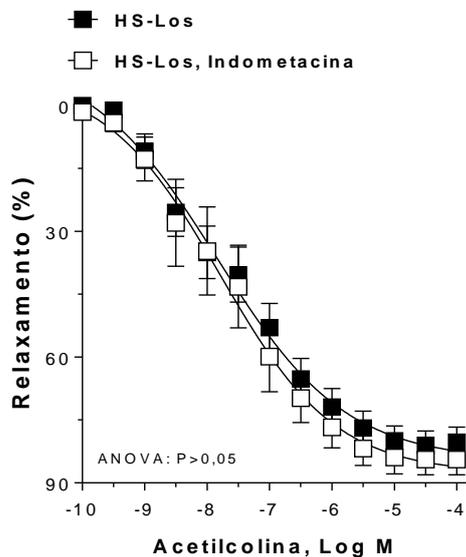
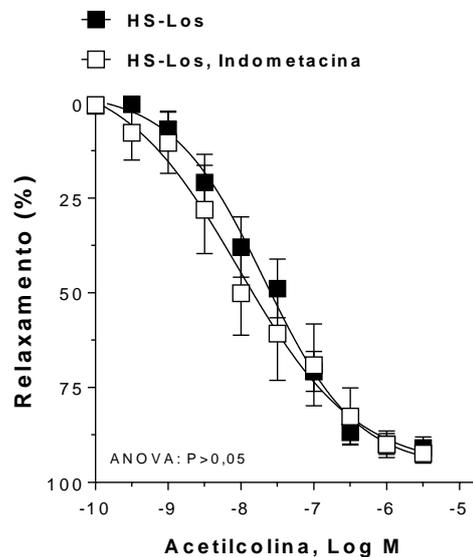
A**B**

Figura 28. Efeito da inibição da ciclooxigenase (indometacina) na vasodilatação dependente do endotélio induzida por acetilcolina na aorta (A) e na artéria mesentérica de resistência (AMR, B) da prole de ratas alimentadas com uma dieta hipersódica tratados com Losartan (HS-Los). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. N=8 em cada grupo.

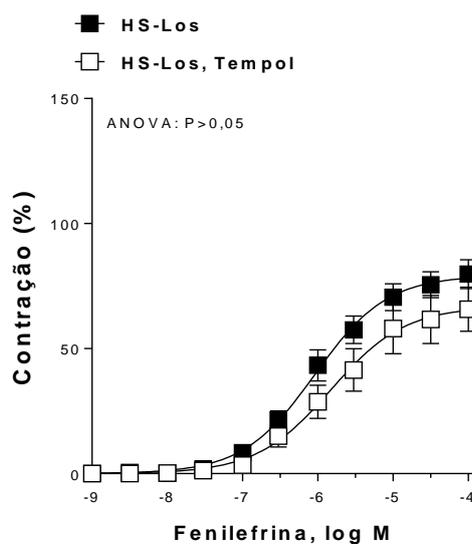


Figura 29. Efeito da pré-incubação com tempol na contração induzida por fenilefrina na aorta da prole de ratas alimentadas com uma dieta hipersódica tratados com Losartan (HS-Los). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. N=8 em cada grupo.

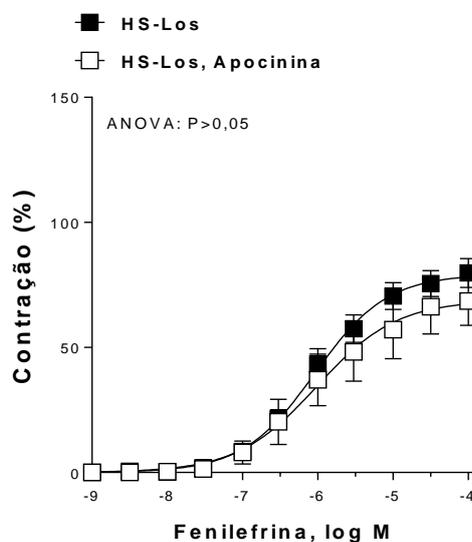


Figura 30. Efeito da pré-incubação com apocinina na contração induzida por fenilefrina na aorta da prole de ratas alimentadas com uma dieta hipersódica tratados com Losartan (HS-Los). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. N=8 em cada grupo.

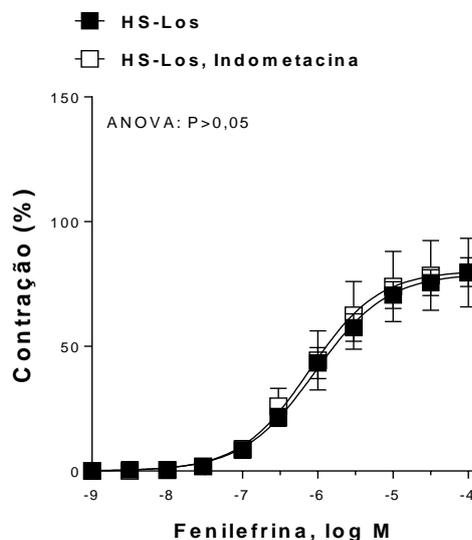
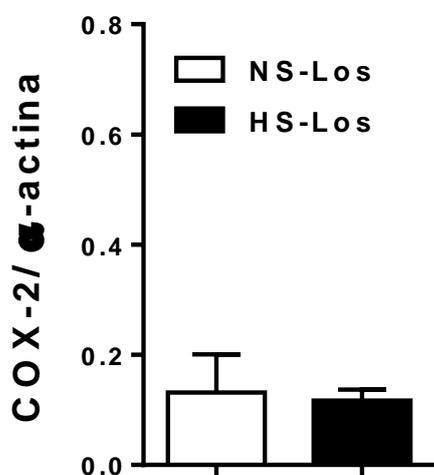
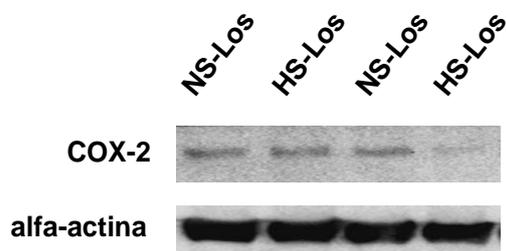


Figura 31. Efeito da pré-incubação com indometacina na contração induzida por fenilefrina na aorta da prole de ratas alimentadas com uma dieta hipersódica tratados com Losartan (HS-Los). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média. N=8 em cada grupo.

4.7.2 Expressão proteica da COX-2

Para investigar se o aumento da expressão da COX-2 nas artérias no grupo HS é dependente da angiotensina II, experimentos de *Western blot* para COX-2 foram realizados nas artérias dos animais tratados cronicamente com losartan. Como é possível observar na Figura 32, o tratamento crônico com losartan aboliu as diferenças na expressão da COX-2 na aorta (Figura 32A) e na AMR (Figura 32B) do grupo HS, indicando que o aumento de expressão da COX-2 observado no grupo HS é dependente da angiotensina II.

A- Aorta



B- AMR

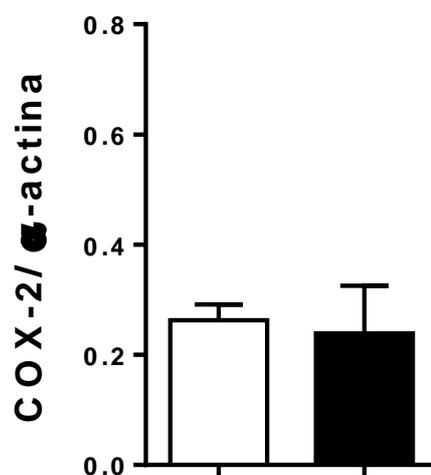
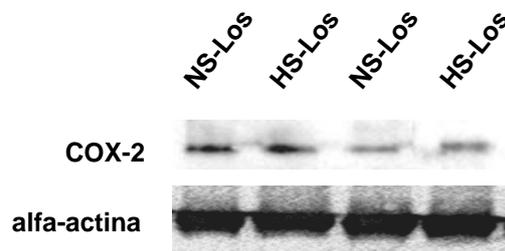


Figura 32. Expressão proteica da ciclooxygenase-2 (COX-2) na aorta (A) e na AMR (B) de ratos NS e HS tratados com losartan (NS-Los e HS-Los). Os painéis superiores mostram as bandas representativas da expressão da COX-2 e da α -actina. Painéis inferiores mostram as análises densitométrias normalizada pelo conteúdo de α -actina. Os resultados estão como média \pm erro padrão. N=5 em cada grupo

4.7.3 Propriedades mecânicas e estruturais de artérias mesentéricas de resistência

O tratamento crônico com losartan foi incapaz de reverter as alterações sobre o diâmetro interno (Figura 33A) e externo (resultado não mostrado), sobre a área de secção transversal (Figura 33B), bem como sobre a espessura de parede (Figura 33C). A relação *stress/strain* em ambos os grupos não foi modificada pelo tratamento com losartan (Figura 33D). Por outro lado, no grupo HS o tratamento com losartan inibiu a resposta miogênica antes observada no grupo HS sem tratamento (Figura 34).

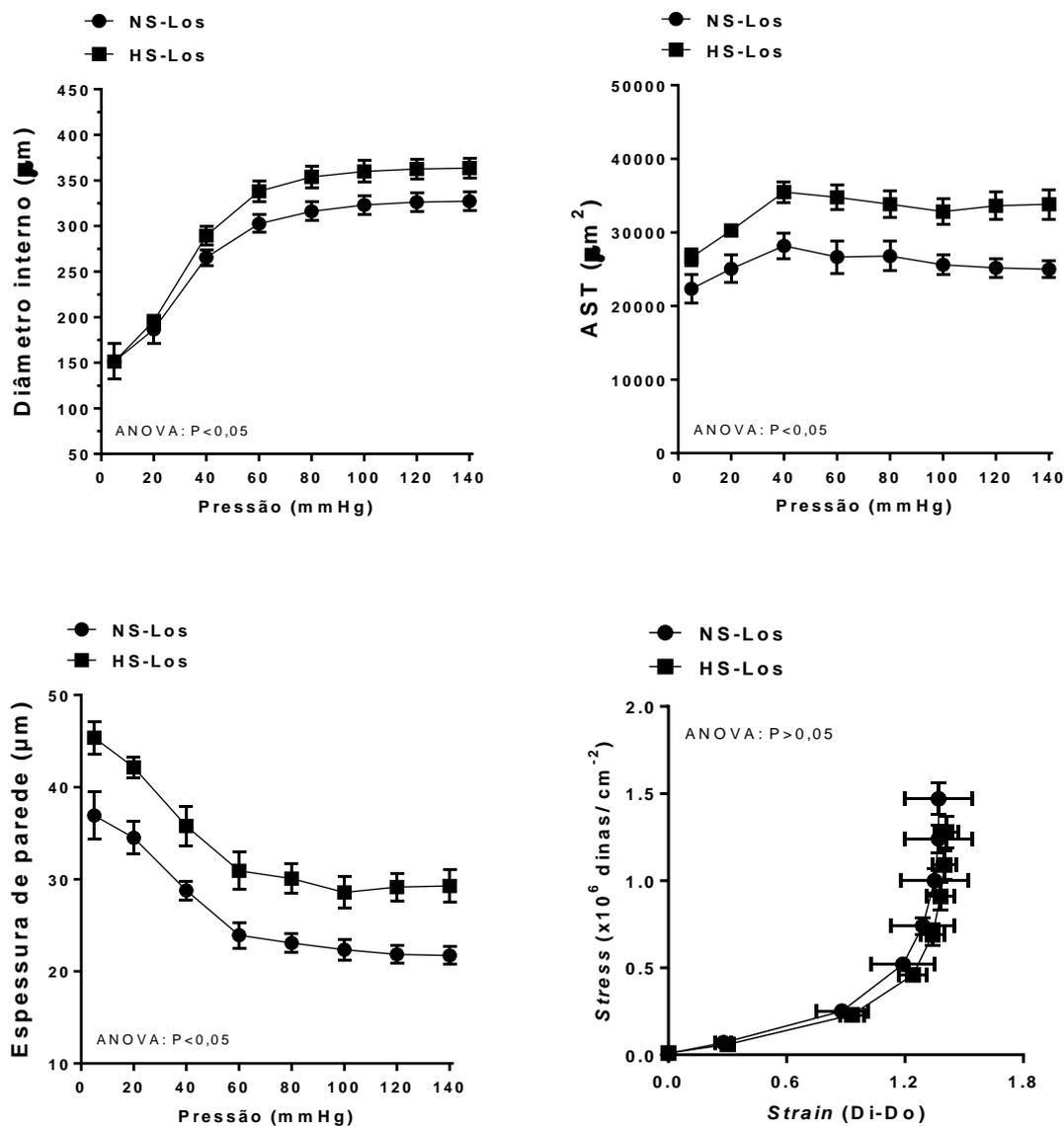


Figura 32. Comparação dos parâmetros estruturais de artérias mesentéricas de resistência (AMR, em condições passivas, 0 Ca^{2+}) de ratos NS-Los (N=8) e HS-Los (N=8). (A) Relação pressão/ diâmetro interno, (B) área de secção transversal (AST), (C) espessura da parede arterial e (D) relação *stress-strain*. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média.

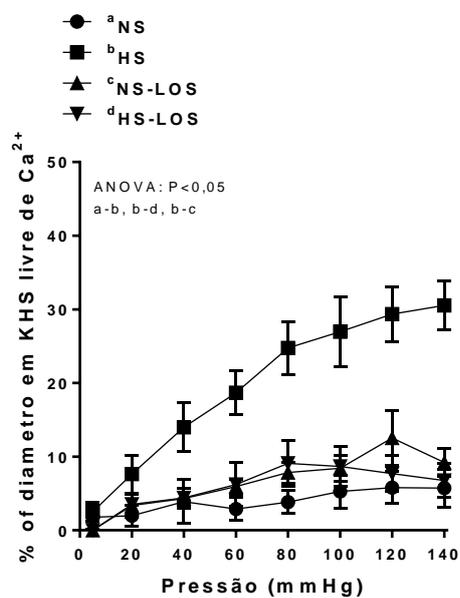


Figura 34. Contração miogênica induzida pela elevação da pressão intraluminal em artérias mesentéricas de resistência (AMR) de ratos NS (N=10), HS (B, N=10), não tratados e tratados com losartan (Los), (NS-Los, N=8; HS-Los, N=8). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média dos valores percentuais da variação de diâmetro interno frente às elevações da pressão intravascular sob condições ativas (CaCl_2 2,5 mM).

5 DISCUSSÃO

A hipótese de que doenças vasculares podem ser programadas ainda no ambiente intrauterino vem sendo confirmada ao longo dos anos (VIDONHO *et al.*, 2004; RAMOS-ALVES *et al.*, 2012a; MENDES *et al.*, 2018). Evidências experimentais crescentes indicam que a exposição à sobrecarga de sódio durante o período crítico de desenvolvimento como a gestação, é um fator de risco significativo para o desenvolvimento de alterações cardiovasculares (MARUYAMA *et al.*, 2015). Os resultados apresentados neste estudo demonstraram que a prole de ratas alimentadas durante a gestação e lactação com dieta rica em sódio (8% de NaCl), apresentaram disfunção vascular caracterizada por uma diminuição do relaxamento dependente do endotélio tanto em leitos vasculares de condutância (aorta) quanto nos de resistência (AMR), acompanhada de aumento na vasoconstrição induzida por estimulação alfa adrenérgica, embora não tenham sido detectadas alterações na pressão arterial.

O efeito da sobrecarga de sódio materna sobre a pressão arterial da prole é bastante controverso. Estudos como os de CONTRERAS *et al.* (2000) mostram aumento da pressão arterial da prole de mães alimentadas com dieta rica em sódio, já os de CABRAL *et al.* (2012) a pressão desses animais mostrou-se inalterada. Razões para essas diferenças não são claras. No presente estudo, as pressões arteriais sistólica e diastólica da prole de ratas submetidas à sobrecarga de sódio durante a gestação e aleitamento não foram diferentes das pressões de animais oriundos de ratas alimentadas com dieta normossódica.

Ainda é discutível se a disfunção endotelial é uma consequência da hipertensão ou pode preceder o início da hipertensão arterial, como um defeito primário que pode estar envolvido em sua patogênese (DHARMASHANKAR *et al.*, 2010). No presente estudo, e em um estudo anterior do nosso grupo (RAMOS-ALVES *et al.*, 2012a) a vasodilatação dependente do endotélio (um indicador da função endotelial) está prejudicada nos animais HS, mesmo sem modificações da pressão arterial. Da mesma forma, BHARANI *et al.* (2011) demonstraram que a vasodilatação mediada pelo fluxo da artéria braquial foi prejudicada nos filhos normotensos de pais hipertensos em comparação com filhos de pais normotensos. Em conjunto, esses estudos sugerem que a disfunção endotelial pode preceder a hipertensão arterial e pode ter um papel

na patogênese dessa enfermidade. Os resultados aqui obtidos são corroborados por estudos prévios que mostram que a sobrecarga de sódio pode afetar a função vascular, independentemente das alterações na pressão arterial (PIECHA *et al.*, 2012, DUPONT *et al.*, 2013).

Estudos em animais e humanos revelaram que uma das características fundamentais do efeito deletério da sobrecarga de sódio sobre a função endotelial é a redução da biodisponibilidade do óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$), o que limita a dilatação dependente do endotélio (NI *et al.*, 1999; BRAGULAT *et al.*, 2001). Esse efeito está relacionado com níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio (EROs), dentre elas os ânions superóxido, gerados pelo metabolismo da NADPH oxidase, xantina oxidase ou pelo desacoplamento da sintase de $\bullet\text{NO}$ endotelial (eNOS) (CAI *et al.*, 2000; LIAUDET *et al.*, 2009; TOUYZ *et al.*, 2011). É descrito, na literatura que fetos ou neonatos oriundos de ratas submetidas à alta ingestão de sódio apresentam níveis elevados de sódio circulantes, o que pode aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio (VIJANDE *et al.*, 1996; MAO *et al.*, 2007). Nesse sentido, investigou-se se o prejuízo do relaxamento dependente do endotélio e a hiper-reatividade à fenilefrina no grupo HS estaria relacionada ao aumento de ânions superóxido.

A pré-incubação com tempol, um mimético permeável da superóxido dismutase (SOD), aumentou o relaxamento induzido pela acetilcolina na aorta e AMR de ratos HS e reduziu a resposta contrátil à fenilefrina na aorta desses animais, sem induzir qualquer efeito detectável nas artérias do grupo NS. Estes resultados indicam que o prejuízo no relaxamento dependente do endotélio nas artérias do grupo HS provavelmente ocorre em consequência da diminuição da biodisponibilidade do $\bullet\text{NO}$, desencadeada pelo aumento da geração de ânions superóxido. Corroborando com estes dados funcionais, em ambas as artérias (aorta e AMR) do grupo HS, observou-se um aumento da geração de ânions superóxido, avaliadas *in situ* através da fluorescência emitida pela dihidroetidina (DHE). É sabido que o ânion superóxido pode reagir com o $\bullet\text{NO}$, o que resulta na formação de peroxinitrito, uma espécie oxidante altamente reativa. Além de reduzir a biodisponibilidade do $\bullet\text{NO}$ e seus efeitos biológicos, o ânion superóxido induz danos vasculares e pode ser protonado a radical hidroxiperoxil, o qual desempenha um papel importante na peroxidação lipídica e aterogênese (ABE & BERK, 1998). No presente estudo, não foram observadas

alterações na expressão da eNOS em ambas artérias do grupo HS, o que reforça que nesses animais parece não ocorrer redução da síntese de $\bullet\text{NO}$, mas sim um aumento da sua degradação, conseqüente da maior geração de ânions superóxido.

Sendo a via da NADPH oxidase uma das principais fontes de ânions superóxido na vasculatura (SAHOO *et al.*, 2016), utilizou-se a apocinina (um inibidor da NADPH oxidase) para investigar o papel desta via nas alterações vasculares observadas no grupo HS. Na presença deste inibidor, a resposta contrátil à fenilefrina e o relaxamento induzido pela acetilcolina na aorta e AMR do grupo HS foram modificados de forma semelhante ao observado na presença de tempol. Isso indica a NADPH oxidase como principal fonte geradora de ânions superóxido envolvida na disfunção endotelial do grupo HS. No grupo NS, a apocinina não modificou a resposta à acetilcolina, nem à fenilefrina, indicando que em condições controle estes ânions não parecem afetar estas respostas, como previamente demonstrado (DE SÁ *et al.*, 2017). Os dados funcionais aqui descritos foram confirmados através da medida da fluorescência emitida pelo DHE em cortes transversais de aorta e AMR. Em ambas as artérias do grupo HS, a apocinina reduziu a fluorescência emitida pelo DHE ao nível do grupo controle (NS), indicando a participação da NADPH oxidase como fonte geradora de ânions superóxido nas artérias do grupo HS.

Está bem descrito na literatura que o estresse oxidativo também pode induzir a atividade e/ ou expressão da isoforma induzível da ciclooxigenase (COX-2) (FENG *et al.*, 1995; GARCÍA-REDONDO *et al.*, 2009). Além disso, alguns autores demonstraram que produtos derivados da COX-2 (prostanóides vasoconstritores) também induzem a produção de EROs, as quais, em conjunto, contribuem para a redução da vasodilatação dependente do endotélio, além de aumentar as respostas contráteis observadas em vários leitos vasculares (ADEAGBO *et al.*, 2005; TANG *et al.*, 2007). O aumento da liberação de fatores contráteis derivados da COX também é descrito em animais submetidos à sobrecarga de sódio (DOS SANTOS *et al.*, 2006). Assim, no presente estudo, as artérias foram tratadas com um inibidor da COX, a indometacina, para investigar o envolvimento desta via nas alterações vasculares observadas no grupo HS.

A indometacina foi capaz de melhorar o relaxamento induzido por acetilcolina nas artérias do grupo HS, além de reduzir a hiper-reatividade à fenilefrina na aorta do

grupo HS, indicando o envolvimento de produtos derivados da COX nas alterações vasculares observadas neste grupo. No grupo NS, a indometacina não modificou a resposta à acetilcolina ou à fenilefrina, indicando que não há modulação de fatores derivados da COX nestas repostas em condições controle (XAVIER *et al.*, 2008; RAMOS-ALVES *et al.*, 2012a,b). Os resultados obtidos em artérias pré-incubadas com indometacina são corroborados pelos resultados dos experimentos de *Western blot*, que demonstram que em ambas as artérias do grupo HS há um aumento da expressão da COX-2. Nessas artérias, a expressão da isoforma constitutiva da COX (COX-1) foi semelhante em ambos os grupos, descartando a participação desta isoforma nas alterações vasculares observadas nos animais HS.

Alguns estudos têm revelado um papel recíproco entre as EROs e os prostanóides derivados da COX-2 na parede vascular em algumas situações de dano cardiovascular (HERNANZ *et al.*, 2014). Dentre estas EROs, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) aumenta expressão gênica e proteica da COX-2 em células endoteliais ou em células musculares lisas (LI *et al.*, 2011; MARTIN *et al.*, 2012). A geração aumentada de EROs no endotélio estimula a expressão e a atividade da COX-2 e aumenta a liberação de PGF_{2α}, a qual induz contração e prejudica o relaxamento dependente do endotélio através do receptor TP (WONG *et al.*, 2013). Neste sentido, MARTÍNEZ-REVELLES *et al.* (2013) demonstraram um círculo vicioso entre as EROs e os prostanóides derivados da COX-2 na parede arterial como um dos principais mecanismos indutores de lesão endotelial. Tanto a NADPH oxidase quanto as EROs de origem mitocondrial parecem contribuir para o aumento da expressão e da atividade da COX-2. Além disso, derivados de COX-2 também aumentam a geração de EROs via NADPH oxidase (ALVAREZ *et al.*, 2005; MARTÍNEZ-REVELLES *et al.*, 2013). Portanto, nas artérias do grupo HS, o aumento das EROs derivadas da NADPH oxidase, juntamente com o aumento da liberação de produtos derivados da COX-2, podem interagir para produzir nestes animais um prejuízo da função endotelial, como observado na aorta e AMR

A exposição à sobrecarga de sódio no período de gestação e lactação é capaz de modular o sistema renina-angiotensina da prole. Durante a vida intrauterina, o sistema renina-angiotensina fetal é suprimido em decorrência da sobrecarga de sódio materna (LEANDRO *et al.*, 2008). Porém, tem sido demonstrado que quando a prole é exposta à sobrecarga de sódio desde a concepção até o desmame, a atividade da

renina da prole adulta não responde a uma alta ingestão de sal, ou seja, a alta ingestão de sódio não suprime a secreção de renina, nem a produção de angiotensina II. Portanto, a sobrecarga perinatal de sódio leva à hiperatividade do sistema renina angiotensina durante a idade adulta (DA SILVA *et al.*, 2003). Além disso, o sistema renina-angiotensina parece ser responsável, pelo menos em parte, pelas alterações funcionais renais, produzidas pela exposição perinatal à sobrecarga de sódio (CABRAL *et al.*, 2012). Um estudo realizado por DING *et al.* (2010) demonstrou que a sobrecarga de sódio durante a gestação está relacionada com a redução dos níveis plasmáticos de angiotensina II, tanto na mãe, quanto no feto e níveis aumentados de angiotensina II no coração da prole, associados a um aumento da expressão proteica e gênica do receptor AT₁ cardíaco (DING *et al.*, 2010).

No estudo publicado por CABRAL *et al.* (2012), observou-se que a injúria renal induzida pela exposição perinatal à sobrecarga de sódio foi prevenida pelo tratamento com um inibidor da ECA, apesar dos níveis renais de angiotensina II não terem sido modificados. Além disso, LV *et al.* (2014) demonstraram que uma dieta com alto teor de sódio durante o período perinatal reprogramou o sistema renina angiotensina através do aumento da expressão proteica dos receptores AT₁ e AT₂, responsáveis pela resposta apoptótica no miocárdio na prole. Com base nesses resultados, no presente estudo foi avaliada a possibilidade das alterações vasculares observadas nos ratos HS terem a participação da angiotensina II. Para este fim, as artérias foram pré-tratadas com um inibidor da ECA (captopril) ou com um antagonista dos receptores AT₁ (losartan).

Os resultados obtidos indicam a participação da angiotensina II como um potencial mediador das alterações vasculares do grupo HS, uma vez que na aorta e AMR desse grupo, tanto o captopril, como o losartan, foram capazes de melhorar o relaxamento dependente do endotélio e de reduzir a vasoconstrição induzida por estimulação alfa-adrenérgica. Nas artérias do grupo HS, embora a resposta vasoconstritora induzida pela angiotensina II e a expressão gênica dos receptores AT₁ terem sido semelhantes às observadas no grupo NS, a resposta contrátil induzida pela administração de angiotensina I (um indicador da produção tecidual de angiotensina II) foi significativamente potencializada nas artérias do grupo HS. Esses resultados sugerem um aumento na formação vascular da angiotensina II; resultado este corroborado pelo aumento da atividade da ECA em ambas as artérias do grupo HS.

Além disso, o tratamento crônico com o losartan foi capaz de reverter o prejuízo do relaxamento induzido pela acetilcolina e a resposta contrátil à fenilefrina. Esses dados reafirmam, portanto, a participação da angiotensina II como um potencial indutor das alterações vasculares induzidas pela exposição da prole à sobrecarga de sódio durante o desenvolvimento perinatal.

O papel da angiotensina II na disfunção vascular, deve-se, pelo menos em parte, a sua capacidade de se ligar ao receptor AT₁, induzindo aumento da atividade da NADPH oxidase, a geração de EROs e aumento da atividade e expressão da COX-2 (TOUYZ *et al.*, 1999; SHEN *et al.*, 2006; DRUMMOND *et al.*, 2011; ROSENBAUGH *et al.*, 2013). Em vários tecidos, a angiotensina II é um potente indutor de expressão de COX-2 (HU *et al.*, 2002; JAIMES *et al.*, 2005; BELTRAN *et al.*, 2009, WONG *et al.*, 2011). Nos glomérulos renais de ratos, este peptídeo induziu um aumento de seis vezes na expressão de COX-2; nas células mesangiais, a liberação de PGE₂ e PGI₂ aumentou 200% e 100% em resposta a angiotensina II, respectivamente (JAIMES *et al.*, 2005). O aumento da expressão de COX-2 também demonstrou em células vasculares estimuladas por angiotensina II, incluindo fibroblastos, músculo liso e células endoteliais (HU *et al.*, 2002; BELTRAN *et al.*, 2009; WONG *et al.*, 2011). Em animais hipertensos, diabéticos ou na prole adulta de ratas diabéticas, os distúrbios vasculares dependentes de COX-2 também foram atribuídos, pelo menos em parte, a angiotensina II (ALVAREZ *et al.*, 2005; MATSUMOTO *et al.*, 2010; ISHIDA *et al.*, 2011, DE QUEIROZ *et al.*, 2017). Este efeito parece ser mediado pela ativação do receptor AT₁, uma vez que foi inibido pelos antagonistas deste receptor, como o losartan. (ALVAREZ *et al.*, 2005; DE QUEIROZ *et al.*, 2017). No presente estudo, o tratamento crônico com losartan foi capaz de reverter a expressão aumentada de COX-2 na aorta e AMR de animais HS, indicando o papel da angiotensina II como um indutor da expressão desta enzima na prole oriunda de ratas alimentadas com dieta rica em sódio. Além disso, nos animais HS tratados com losartan (HS-Los), a indometacina foi incapaz de alterar o relaxamento à acetilcolina ou a contração induzida pela estimulação alfa adrenérgica. Esse resultado é indicativo de uma redução da produção de fatores vasoconstritores derivados da COX-2 após o bloqueio dos receptores AT₁, o que reforça a hipótese de que o aumento de metabólitos da COX-2 nos animais HS é dependente da angiotensina II.

Os prostanóides derivados da COX-2 são capazes de ativar a NADPH oxidase, aumentando assim a geração de EROs; estas, por sua vez, diretamente, ou através de NADPH oxidase, induzem aumento da atividade e/ou expressão da COX-2 (GARCÍA-REDONDO *et al.*, 2009; MARTÍNEZ-REVELLES *et al.*, 2013). Estes eventos levam a maior liberação de prostanóides vasoconstritores, como a PGE₂, PGF_{2α} e o TxA₂, induzindo maior contração do musculo liso vascular (ALVAREZ *et al.*, 2005; DE QUEIROZ *et al.*, 2017). Além disso, a angiotensina II em algumas situações também induz diminuição da expressão da eNOS e da biodisponibilidade de •NO, a qual pode ser ainda diminuída pela inativação por EROs. Este ciclo vicioso, por sua vez, induz disfunção endotelial (MARTÍNEZ-REVELLES *et al.*, 2013).

No presente estudo, a participação da angiotensina II como um indutor da produção de EROs nas artérias do grupo HS foi confirmada pela diminuição da fluorescência emitida pelo DHE em artérias pré tratadas com losartan. Além disso, no grupo HS tratado com losartan (HS-Los), tanto o tempol, como a apocinina falharam em induzir qualquer efeito detectável no relaxamento à acetilcolina ou na contração à fenilefrina. Estes resultados funcionais são indicadores da participação da angiotensina II como um indutor de estresse oxidativo nos animais HS. Portanto, os achados do presente estudo indicam a participação da angiotensina II tecidual como um mediador das alterações vasculares programadas pela exposição à sobrecarga de sódio durante o período perinatal. Os resultados ainda indicam que a participação da angiotensina II neste processo envolve a geração de ânions superóxido derivados da NADPH oxidase e o aumento da expressão da COX-2.

A NADPH oxidase é a principal fonte de EROs na parede vascular em condições fisiológicas e patológicas (DRUMMOND *et al.*, 2011; LASSÈGUE *et al.*, 2012; MONTEZANO *et al.*, 2014). Existem sete isoformas de NADPH oxidases em mamíferos e todos eles têm uma subunidade catalítica chamada de NOX (NOX-1-5) ou DUOX (DUOX-1-2 também chamado NOX-6-7) e até sete subunidades reguladoras (KONIOR *et al.*, 2014). Dessas isoformas, a NOX-1 e NOX-4 parecem ser particularmente importantes nas células vasculares. É conhecido na literatura que a angiotensina II é capaz de estimular essas isoformas a formar EROs (AGUADO *et al.*, 2016). Desta forma, investigamos a expressão proteica da NOX-4 e não observamos diferença significativa na sua expressão nas artérias dos grupos estudados. Isso mostra que a NOX-4 não parece ser a fonte geradora de EROs nessas artérias. Outra

isoforma, como a NOX-1, pode ser responsável pela maior formação de EROs em artérias do grupo HS. Além disso, não se pode descartar a possibilidade de que a angiotensina II nas artérias do grupo HS apenas aumente a atividade das isoformas da NADPH oxidase (SESHIAH *et al.*, 2002), sem necessariamente afetar a sua expressão proteica.

O fenômeno do remodelamento vascular está relacionado frequentemente com várias doenças que afetam o sistema cardiovascular, contribuindo para o aumento da resistência periférica em situações de risco cardiovascular (BAUMBACH *et al.*, 1989). Além de promover alterações importantes que contribuem para o aparecimento das complicações cardiovasculares associadas à hipertensão (SCHIFFRIN *et al.*, 1997), como a isquemia miocárdica (BRUSH *et al.*, 1988; HASDAI *et al.*, 1997), o acidente vascular cerebral (COLLINS *et al.*, 1990) e a insuficiência renal crônica (KLAHR & MORRISSEY *et al.*, 2003).

O remodelamento vascular consiste em alterações do diâmetro luminal (para fora ou para dentro), em alterações na área de secção transversal da parede arterial (hipertrófica, eutrófica ou hipotrófica), ou em alterações da matriz extracelular (MULVANY *et al.*, 1996). O remodelamento da parede arterial normalmente se dá em decorrência de mudanças da pressão transmural, fluxo sanguíneo ou da exposição dos constituintes celulares e/ou da matriz extracelular a determinados mediadores químicos (MULVANY *et al.*, 1996). O remodelamento eutrófico corresponde à reorganização do conteúdo da parede arterial, sem alteração da área de secção transversal; o remodelamento hipertrófico ocorre quando há aumento da área de secção transversal e o remodelamento hipotrófico quando esta área está reduzida (MULVANY *et al.*, 1996).

Estudos publicados por ALVES-RODRIGUES *et al.* (2012) demonstraram um quadro de hipertrofia ventricular esquerda concêntrica na prole de ratos alimentados com dieta rica em sódio. Na literatura existem até então, pouquíssimas evidências experimentais de que a sobrecarga de sódio materna pode estar associada a alterações estruturais em artérias de resistência. Portanto, no presente estudo foram realizados experimentos com artérias de resistência pressurizadas da circulação

mesentérica de ratos HS, com o intuito de avaliar possíveis modificações na estrutura e nas propriedades mecânicas. Os resultados destes experimentos demonstraram que exposição fetal a uma dieta rica em sódio durante a gestação e lactação foi capaz de promover nas AMR um aumento do diâmetro interno e externo, da espessura de parede e da área de secção transversal, sem apresentar alterações no *stress* de parede, relação parede/lúmen ou da rigidez arterial. Em conjunto esses resultados sugerem que a exposição materna à sobrecarga de sódio é capaz de promover nas AMR da prole adulta um remodelamento do tipo hipertrófico para fora. Um estudo publicado por PIECHA *et al.* (2012) dão suporte aos nossos achados, tendo em vista que estes demonstraram que a sobrecarga de sódio materna foi capaz de aumentar a espessura da parede das artérias aorta, carótida, mesentérica superior e intrapulmonares da prole com 12 semanas de vida. É importante aqui mencionar que este remodelamento vascular ocorre independente da elevação da pressão arterial. Além do mais, o fato deste remodelamento ocorrer com aumento do diâmetro interno (o que reduziria a resistência vascular periférica), talvez ajude a explicar a ausência de hipertensão nos animais do grupo HS. É possível ainda hipotetizar que este remodelamento se comporte como o mecanismo compensatório aos mecanismos deletérios que reduzem o relaxamento dependente do endotélio nas artérias do grupo HS.

A angiotensina II é capaz de estimular a geração de EROs, produção de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão através de fatores de transcrição, como o NF- κ B e a AP-1 (TOUYZ *et al.*, 2000). Ademais, demonstrou-se que, através da ligação ao receptor AT₁, a angiotensina promove remodelamento hipertrófico, mediante a produção de EROs via estimulação da NADPH oxidase. Através dessas ações, a angiotensina II promove inflamação e remodelamento vascular (TOUYZ *et al.*, 2005). Desta forma, o sistema renina angiotensina, via produção de espécies reativas de oxigênio, poderia ser o responsável pelo desenvolvimento da hipertrofia nas artérias de resistência da prole de mães alimentadas com dieta rica em sódio. Entretanto, foi observado no presente estudo, que o tratamento crônico com o losartan não foi capaz de reverter o remodelamento hipertrófico nas AMR do grupo HS, indicando que o remodelamento vascular nestes animais ocorre independente da estimulação pela angiotensina II. É possível que algum outro fator, provavelmente durante o período de desenvolvimento intrauterino, possa influenciar a formação da parede vascular da prole em resposta a sobrecarga de sódio. Entretanto, outros

experimentos são necessários para melhor elucidar o mecanismo envolvido nas alterações estruturais em artérias de resistência da prole HS. É importante aqui mencionar que o estudo de ALVES-RODRIGUES *et al.* (2013) também demonstrou que a hipertrofia cardíaca presente na prole de mães submetidas a dieta rica em sódio é independente da angiotensina II. Isso reforça os resultados aqui obtidos demonstrando que a hipertrofia vascular observada nos animais HS ocorre independentemente dos efeitos da angiotensina II através do receptor AT₁.

Outro fator vascular importante que foi avaliado neste trabalho foi a resposta miogênica vascular. Esta se refere à capacidade intrínseca de pequenas artérias de resistência de responder a uma gama de pressões fisiológicas com um nível de contração, independente das influências neuro-hormonais (MARTINEZ-LEMUS *et al.*, 2005). No presente estudo, os animais HS apresentaram um aumento na resposta miogênica e o tratamento crônico com o losartan foi capaz de reverter esta resposta nas artérias do grupo HS. Isso indica um papel da angiotensina II na indução do tônus miogênico na prole de mães submetidas a dieta rica em sódio.

Há evidências no sistema vascular, que o receptor AT₁ é um mecanosensor. O estiramento mecânico desse receptor ou a ligação da angiotensina II é capaz de aumentar a densidade de correntes de Ca²⁺ via canais do tipo TRPM4 (canais que permite o influxo de Ca²⁺ liberado do retículo sarcoplasmático através dos receptores IP₃), o que favorece a constrição miogênica arterial (HONG *et al.*, 2016; PIRES *et al.*, 2017) . Portanto, a ativação do receptor AT₁ dependente da pressão intraluminal ou pela ligação da angiotensina II pode contribuir para o aumento da resistência vascular periférica e/ou o desenvolvimento de doenças vasculares em várias situações onde este mecanismo está aumentado (GRIFFIN *et al.*, 1991), como é o caso da prole HS.

Apesar das evidências aqui observadas de que o sistema renina-angiotensina está envolvido no desenvolvimento de alterações funcionais em artérias da prole de ratas expostas à sobrecarga de sódio, faz-se necessário a realização de mais estudos que esclareçam os mecanismos pelos quais essa sobrecarga induz remodelamento vascular na prole.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo revelam que o consumo elevado de sódio durante a gestação e lactação é capaz de programar o desenvolvimento de disfunção endotelial e remodelamento vascular na prole adulta, sem modificar os níveis de pressão arterial. As alterações sobre a função parecem ser decorrentes de um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e do perfil inflamatório vascular, com envolvimento do metabolismo da COX-2 e da NADPH-oxidase, tendo como um potencial estimulador desses processos a angiotensina II. As alterações estruturais presentes nas artérias de resistência destes animais se caracterizam por remodelamento hipertrófico para fora, o qual ocorre independentemente da ação da angiotensina II.

REFERÊNCIAS

- ABE J AND BERK BC. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease. **Trends Cardiovasc Med.**, v. 8, p. 59-64, 1998.
- ACCORSI-MENDONÇA D, CORRÊA FM, OLIVEIRA AM. α_2 -receptor modulation of the reactivity to phenylephrine and angiotensin II in the carotid artery of normotensive rats after trandolapril treatment. **J Smooth Muscle Res.**, v. 42, p. 21-31, 2006.
- ADEAGBO, AS, PATEL, D, IDDRISU, A, WALKER, J, THIRUMALAI, S, JOSHUA, IG, SCHUSCHKE, D & WANG, Y. NS-398, a selective cyclooxygenase-2 blocker, acutely inhibits receptor-mediated contractions of rat aorta: role of endothelium. **Eur J Pharmacol.**, v. 458, p. 145-154, 2003.
- 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.**, v. 23, p. 1025-1036, 2005.
- ALBA BK, GREANEY JL, FERGUSON SB2, ALEXANDER LM. Endothelial function is impaired in the cutaneous microcirculation of adults with psoriasis through reductions in nitric oxide-dependent vasodilation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 314, p. 343-349, 2018.
- ALDERTON WK, COOPER CE, KNOWLES RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J.**, v. 357, p. 593-615, 2001.
- ALEXANDER RW. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: A new perspective. **Hypertension**, v. 25, p. 155-161, 1995.
- ALIQUE M, SÁNCHEZ-LÓPEZ E, RAYEGO-MATEOS S, EGIDO J, ORTIZ A, RUIZ-ORTEGA M. Angiotensin II, via angiotensin receptor type 1/nuclear factor- κ B activation, causes a synergistic effect on interleukin-1- β -induced inflammatory responses in cultured mesangial cells. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.**, v. 16, p. 23-32, 2015.
- AGUADO A, FISCHER T, RODRÍGUEZ C, MANEA A, MARTÍNEZ-GONZÁLEZ J, TOUYZ RM, HERNANZ R, ALONSO MJ, DIXON DA, BRIONES AM, SALAICES M. Hu antigen R is required for NOX-1 but not NOX-4 regulation by inflammatory stimuli in vascular smooth muscle cells. **J Hypertens.**, v. 34, p. 253-265, 2016.
- 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.**, v. 23, p. 767-777, 2005.

AKYOL A, MCMULLEN S, LANGLEY-EVANS SC. Glucose intolerance associated with early-life exposure to maternal cafeteria feeding is dependent upon post-weaning diet. **Br L Nutr.**, v 107, p. 964-978, 2012.

ÁLVAREZ 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.**, v. 321, p. 381-388, 2007.

ALVES-RODRIGUES EN, VERAS MM, ROSA KT, DE CASTRO I, FURUKAWA LN, OLIVEIRAIB, SOUZARM, HEIMANNJC. Salt intake during pregnancy alters offspring's myocardial structure. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.**, v. 23, p. 481-486, 2013.

ANTMAN, E.M.; DEMETS, D.; LOSCALZO, J. Cyclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. **Circulation**, v. 112, p. 759-770; 2005.

ARDAILLOU R AND CHANSEL D. Synthesis and effects of active fragments of angiotensin II. **Kidney Int.**, v. 52, p. 1458-1468, 1997.

BALCELLS E, MENG QC, HAGEMAN GR, PALMER RW, DURAND JN, DELL'ITALIA LJ. Angiotensin II formation in dog heart is mediated by different pathways in vivo and in vitro. **Am J Physiol.**, v. 271, p. 417-421 ,1996.

BALDO MP, ZANIQUELI D, FORECHI L, MACHADO RC, RODRIGUES SL, MILL JG. Effects of spironolactone in spontaneously hypertensive adult rats subjected to high salt intake. **Clinics**, v. 66, p. 477-482, 2011.

BALDO MP, TEIXEIRA AK, RODRIGUES SL, MILL JG. Acute arrhythmogenesis after myocardial infarction in normotensive rats: influence of high salt intake. **Food Chem Toxicol.**, v. 50, p. 473–477, 2012.

BARKER DJ AND OSMOAD C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **The Lancet**, v. 327, p. 1077-1081, 1986.

BARKER DJ, OSMOND C. Death rates from stroke in England and Wales predicted from past maternal mortality. **Br Med J.**, v. 295, p. 83-86, 1987.

BARKER DJ, WINTER PD, OSMOND C, MARGETTS B, SIMMONDS SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **The Lancet**, v. 334, p. 577–580, 1989.

BARKER DJ. In utero programming of chronic disease. **Clin Sci.**, v. 95, p. 115-128, 1998.

BAUERSACHS J, BOULOUMIÉ A, MÜLSCH A. Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and, in superoxide anion production. **Cardiovasc Res.**, v. 37, p. 772-779, 1998.

BEDARD K. AND KRAUSE KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol Rev.**, v. 87, p. 245–313, 2007

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.**, v. 27, p. 142-154, 2009.

BHARANI A, JAIN N, JAIN A, DEEDWANIA P. Endothelium-dependent vasodilation is impaired in healthy offspring of hypertensive parents. **Indian Heart J.**, v. 63, p. 255-258, 2011.

BIAN K, DOURSOUT MF, MURAD F. Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases. **J Clin Hypertens.**, v. 10, p. 304-310, 2008

BICKERTON R AND BUCKLEY JP. Evidence for a central mechanism of angiotensin induced hypertension. **Proc Soc Exp Biol Med.**, v. 106, p. 834–837, 1961.

BIRD IM. Endothelial nitric oxide synthase activation and nitric oxide function: new light through old windows. **J Endocrinol.**, v. 210, p. 239-241, 2011.

BOEGEHOLD MA, DRENJANCEVIC I, LOMBARD JH. Salt, Angiotensin II, Superoxide, and Endothelial Function. **Compr Physio.**, v. 6, p. 215-254, 2016.

BOHM M, LIPPOLDT A, WIENEN W, GANTEN D, BADER M. Reduction of cardiac hypertrophy in TGR (mREN2)27 by angiotensin II receptor blockade. **Mol Cell Biochem.**, v.163, p. 217–221, 1996.

BONEY CM, VERMA A, TUCKER R, VOHR BR. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. **Pediatrics**, v. 115, p. 290-296, 2005.

BONVENTRE JV. Phospholipase A2 and signal transduction. **J Am Soc Nephrol.**, v.3, p. 128-150, 1992.

BRASIER AR. The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. **Cardiovasc Res.**, v. 86, p. 211-218. 2010

BRANDES RP, WEISSMANN N, SCHRÖDER K. Redox-mediated signal transduction by cardiovascular Nox NADPH oxidases. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 73, p. 70-79, 2014.

BRAGULAT E, de LA SIERRA A, ANTONIO MT, JIMÉNEZ W, URBANO MÁRQUEZ A, COCA A. Effect of salt intake on endothelium-derived factors in a group of patients with essential hypertension. **Clin Sci.**, v. 101, p. 73–78, 2001.

BRETÓN-ROMERO R, LAMAS S. Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. **Redox Biol.**, v. 2, p. 529-534, 2014.

BREYER RM, BAGDASSARIAN CK, MYERS SA, BREYER MD. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v. 41, p. 661-690, 2001.

BRIONES, AM, ALONSO, MJ, MARIN, J, BALFAGON, G & SALAICES, M. Influence of hypertension on nitric oxide synthase expression and vascular effects of lipopolysaccharide in rat mesenteric arteries. **Br J Pharmacol.**, v. 131, p. 185-194, 2000.

BRIONES AM, XAVIER FE, ARRIBAS SM, GONZÁLEZ MC, ROSSONI LV, ALONSO MJ, SALAICES M. Alterations in structure and mechanics of resistance arteries from ouabain-induced hypertensive rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 291, p. 193-201, 2006.

BRIONES AM, TOUYZ RM. Oxidative stress and hypertension: current concepts. **Curr Hypertens Rep.**, v. 12, p. 135-142, 2010.

BRIONES AM, TABEL F, CALLERA GE, MONTEZANO AC, YOGI A, HE Y, QUINN MT, SALAICES M, TOUYZ RM. Differential regulation of Nox1, Nox2 and Nox4 in vascular smooth muscle cells from WKY and SHR. **J Am Soc Hypertens.**, v. 5, p. 137-153, 2011.

BROWN JE, TOMA RB. Taste changes during pregnancy. **Am J Clin Nutr.**, v. 43, p. 414-418, 1986.

BROWN DI, GRIENGLING KK. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. **Circ Res.**, v. 116, p. 531-549, 2015.

BRUSH JE, CANNON RO, SCHENKE WH, BONOW RO, LEON MB, MARON BJ, EPSTEIN SE. Angina due to coronary microvascular disease in hypertensive patients without left ventricular hypertrophy. **N Engl J Med.**, v. 319, p. 1302-1307, 1988.

BYRNE JA, GRIEVE DJ, CAVE AC, SHAH AM. Oxidative stress and heart failure. **Arch Mal Coeur Vaiss.**, v. 96, p. 214-221, 2003.

CABRAL EV, VIEIRA-FILHO LD, SILVA PA, NASCIMENTO WS, AIRES RS. Perinatal Na⁺ Overload Programs Raised Renal Proximal Na⁺ Transport and Enalapril-Sensitive Alterations of Ang II Signaling Pathways during Adulthood. **Plos One**, v. 7, p. e43791, 2012.

CAI H AND HARRISON DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circ Res.**, v. 87, p. 840-844, 2000.

CAMPBELL DJ AND KLADIS A. Simultaneous radioimmunoassay of six angiotensin peptides in arterial and venous plasma of man. **J Hypertens.**, v. 8, p. 165-172, 1990.

CAMPBELL DJ, LAWRENCE AC, TOWRIE A, KLADIS A, VALENTIJN AJ. Differential regulation of angiotensin peptide levels in plasma and kidney of the rat. **Hypertension**, v. 18, p. 763-773, 1991.

CARDINALE JP, SRIRAMULA S, MARIAPPAN N, AGARWAL D, FRANCIS J. Angiotensin II-induced hypertension is modulated by nuclear factor-kappa B in the paraventricular nucleus. **Hypertension**, v. 59, p. 113-121, 2012.

CARDOSO HD, CABRAL EV, VIEIRA-FILHO LD, VIEYRA A, PAIXÃO AD. Fetal development and renal function in adult rats prenatally subjected to sodium overload. **Pediatr Nephrol.**, v. 4, p. 1959-1965, 2009.

CAREY RM. Update on angiotensin AT2 receptors. **Curr Opin Nephrol Hypertens.**, v. 26, p. 91-96, 2017.

CHAN SMH, LAU YS, MILLER AA, KU JM, POTOČNIK S, YE JM, WOODMAN OL, HERBERT TP. Angiotensin II Causes α -Cell Dysfunction Through an ER Stress-Induced Proinflammatory Response. **Endocrinology**, v. 158, p. 3162-3173, 2017

CHEN XL, TUMMALA PE, OLBRYCH MT, ALEXANDER RW, MEDFORD, RM. Angiotensin II induces monocyte chemo attractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. **Circulation Research.**, v. 83, p. 952-959, 1998.

CHEN F, HAIGH S, BARMAN S, FULTON DJ. From form to function: the role of Nox4 in the cardiovascular system. **Front Physiol.**, v. 3, p. 1-12, 2012.

COLEMAN, RA, SMITH, WL & NARUMIYA, S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacol Rev.**, v. 46, p. 205-229, 1994.

COLLINS R, PETO F, MACMAHON S. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease, part 2: short term reductions in blood pressure: overview of randomized drug trials in their epidemiological context. **Lancet**, v. 335, p. 827-838, 1990.

COLLISTER JP, TAYLOR-SMITH H, DREBES D, NAHEY D, TIAN J, ZIMMERMAN MC. Angiotensin II-Induced Hypertension Is Attenuated by Overexpressing Copper/Zinc Superoxide Dismutase in the Brain Organum Vasculosum of the Lamina Terminalis. **Oxid Med Cell Longev.**, v. 2016, p. 1-9, 2016.

CORNISH KG, JOYNER WL, GILMORE JP. Direct evidence for the presence of a different converting enzyme in the hamster cheek pouch. **Circ Res.**, v. 44, p. 540-544, 1979.

CONTRERAS RJ AND KOSTEN T. Prenatal and early postnatal sodium chloride intake modifies the solution preferences of adult rats. **J Nutr.**, v. 113, p. 1051-1062, 1983.

CONTRERAS RJ. Differences in perinatal NaCl exposure alters blood pressure levels of adult rats. **Am J Physiol.**, v. 256, p. 70-77, 1989.

CONTRERAS RJ, WONG DL, HENDERSON R, CURTIS KS, SMITH JC. High dietary NaCl early in development enhances mean arterial pressure of adult rats. **Physiol Behav.**, v. 71, p. 173-181, 2000.

- CONTRERAS C, SÁNCHEZ A, GARCÍA-SACRISTÁN A, MARTÍNEZ MC, ANDRIANTSITOHAINA R, PRIETO D. Preserved insulin vasorelaxation and up-regulation of the Akt/eNOS pathway in coronary arteries from insulin resistant obese Zucker rats. **Atherosclerosis**, v. 217, p.331-339, 2011.
- CROSAS-MOLIST E, FABREGAT I. Role of NADPH oxidases in the redox biology of liver fibrosis. **Redox Biol.**, v. 6, p. 106-111, 2015.
- CRYSTAL SR, BERNSTEIN IL. Infant salt preference and mother's morning sickness. **Appetite**, v. 30, p. 297–307, 1998.
- COSTEROUSSÉ O, JASPARD E, ALLEGRINI J, WEI L, ALHENC-GELAS F. Angiotensin converting enzyme (kininase II). Molecular and physiological aspects. **C R Seances Soc Biol Fil.**, v. 186, p. 586-598, 1992.
- DAVIS MJ. Perspective: physiological role(s) of the vascular myogenic response. **Microcirculation**, v.19, p. 99-114, 2012.
- da SILVA AA, DE NORONHA IL, DE OLIVEIRA IB, MALHEIROS DM, HEIMANN JC. Renin-angiotensin system function and blood pressure in adult rats after perinatal salt overload. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.**, v. 13, p. 133-139, 2003.
- de CAVANAGH EM, TOBLLI JE, FERDER L, PIOTRKOWSKI B, STELLA I, INSERRA F. Renal mitochondrial dysfunction in spontaneously hypertensive rats is attenuated by losartan but not by amlodipine. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 290, p. 1616-1625, 2006.
- de CAVANAGH EM, INSERRA F, FERDER L. Angiotensin II blockade: a strategy to slow ageing by protecting mitochondria? **Cardiovasc. Res.**, v. 89, p. 31-40, 2011.
- de MELLO WC. Local renin angiotensin aldosterone systems and cardiovascular diseases. **Med Clin North Am.**, v. 101, p. 117-127, 2017.
- de GASPARO M, CATT KJ, INAGAMI T, WRIGHT JW, UNGER T. International Union of Pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. **Pharmacol Rev.**, v. 52, p. 415-472, 2000.
- de QUEIROZ DB, RAMOS-ALVES FE, FERNANDES RL, ZUZU CP, DUARTE GP, XAVIER FE. Perinatal L-arginine and antioxidant supplements reduce adult blood pressure but not ameliorate the altered vascular function in spontaneously hypertensive rats. **J Physiol Biochem.**, v. 66, p. 301-309, 2010.
- de QUEIROZ DB, RAMOS-ALVES FE, SANTOS-ROCHA J, DUARTE GP, XAVIER FE. Losartan reverses COX-2-dependent vascular dysfunction in offspring of hyperglycaemic rats. **Life Sci.**, v. 184, p. 71-80, 2017.
- de SÁ FG, DE QUEIROZ DB, RAMOS-ALVES FE, SANTOS-ROCHA J, DA SILVA OA, MOREIRA HS, LEAL GA, DA ROCHA MA, DUARTE GP, XAVIER FE. Hyperglycaemia in pregnant rats causes sex-related vascular dysfunction in adult offspring: role of cyclooxygenase-2. **Exp Physiol.**, v. 102, p. 1019-1036, 2017.

DENG LY AND SCHIFFRIN EL. Morphologic and functional alterations of mesenteric small resistance arteries in early renal hypertension in the rat. **Am J Physiol.**, v. 261, p. 1171-1177, 1991.

DENG LY AND SCHIFFRIN EL. Effects of endothelin on resistance arteries of DOCA-salt hypertensive rats. **Am J Physiol.**, v. 262, p. 1782-1787, 1992.

DING Y, LV J, MAO C, ZHANG H, WANG A, ZHU L, ZHU H, XU Z. High-salt diet during pregnancy and angiotensin-related cardiac changes. **China J Hypertens.**, v. 28, p.1290-1297, 2010.

DIKALOV SI, DIKALOVA AE, BIKINEYEVA AT, SCHMIDT HH, HARRISON DG, GRIENGLING KK. Distinct roles of Nox1 and Nox4 in basal and angiotensin II-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production. **Free Radic Biol.**, v. 45, p. 1340-1351, 2008.

DIKALOVA AE, GÓNGORA MC, HARRISON DG, LAMBETH JD, DIKALOV S, GRIENGLING KK. Upregulation of Nox1 in vascular smooth muscle leads to impaired endothelium-dependent relaxation via eNOS uncoupling. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 299, p. 673-679, 2010.

DRAB M, VERKADE P, ELGER M, KASPER M, LOHN M, LAUTERBACH B, MENNE J, LINDSCHAU C, MENDE F, LUFT FC, SCHEDL A, HALLER H, KURZCHALIA T. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. **Science**, v. 293, p. 2449-2452, 2001.

DHARMASHANKAR K, WIDLANSKY ME. Vascular Endothelial Function and Hypertension: Insights and Directions. **Curr Hypertens Rep.**, v. 12, p. 448- 455, 2010.

DRUMMOND GR, SELEMIDIS S, GRIENGLING KK, AND SOBEY CG. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 10, p. 453-471, 2011.

DRUMMOND GR, SOBEY CG. Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? **Trends Endocrinol Metab.** v. 25, p. 452-463, 2014.

dos SANTOS L, GONCALVES 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.**, v. 78, p. 2272-2279, 2006.

DOSTAL DE, ROTHBLUM KC, CHERNIN MI, COOPER GR, BAKER KM. Intra-cardiac detection of angiotensinogen and renin: a localized renin-angiotensin system in neonatal rat heart. **Am J Physiol.**, v. 263, p. 838-850, 1992.

DOUGHAN AK, HARRISON DG, DIKALOV SI. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction—linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. **Circ. Res.**, v. 102, p. 488-496, 2008.

D'USCIO LV, BARTON M, SHAW S, MOREAU P, LÜSCHER TF. Structure and function of small arteries in salt-induced hypertension: effects of chronic endothelin-subtype-A-receptor blockade. **Hypertension**, v .30, p. 905-911, 1997.

DUPONT JJ, GREANEY JL, WENNER MM, LENNON-EDWARDS SL, SANDERS PW, FARQUHAR WB, EDWARDS DG. High dietary sodium intake impairs endothelium-dependent dilation in healthy salt-resistant humans. **J Hypertens.**, v. 31, p. 530-536, 2013.

DZAU VJ, GIBBONS, GH, PRATT RE. Molecular mechanisms of vascular renin-angiotensin system in myointimal hyperplasia. **Hypertension**, v. 18, p. 100-105, 1991.

ESTEBAN V, RUPEREZ M, SÁNCHEZ-LÓPEZ E, RODRÍGUEZ-VITA J, LORENZO O, DEMAEGDT H, VANDERHEYDEN P, EGIDO J, RUIZ-ORTEGA M. Angiotensin IV activates the nuclear transcription factor-kappaB and related proinflammatory genes in vascular smooth muscle cells. **Circ Res.**, v. 96, p. 965-973, 2005.

FALCONE JC, GRANGER HJ, MEININGER GA. Enhanced myogenic activation in skeletal muscle arterioles from spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol.**, v 265, p. 1847-1855, 1993.

FÉLÉTOU M, VANHOUTTE PM. EDHF: an update. **Clin Sci Lond.**, v. 117, p. 139-155, 2009.

FLEMING I, BUSSE R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. **Am J Physiol Regul Integr Comp. Physiol.**, v 284, p. 1-12, 2003.

FLEMING I, FISSLTHALER B, DIMMELER S, KEMP BE, BUSSE R. Phosphorylation of Thr495 regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. **Circ Res.**, v. 88, p. 68–75, 2001.

FINKEL T. Oxygen radicals and signaling. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 10, p. 248-253, 1998.

FINKEL T. Signal transduction by reactive oxygen species. **J Cell Biol.**; v. 194, p.7-15, 2011.

FÖRSTERMANN U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med.**, v. 5, p. 338-349, 2008.

FRANK DB, LOWERY J, ANDERSON L, BRINK M, REESE J, DE CAESTECKER M. Increased susceptibility to hypoxic pulmonary hypertension in Bmpr2 mutant mice is associated with endothelial dysfunction in the pulmonary vasculature. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.**, v. 294, p. 98-109, 2008.

FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of the endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373–376, 1980.

FYHRQUIST F, SAIJONMA A O. Renin-angiotensin system revisited. **J Intern Med**, v. 264, p. 224-236, 2008.

GARCÍA-REDONDO AB, BRIONES AM, AVENDANÕ MS, HERNANZ R, ALONSO MJ, SALAICES M. Losartan and tempol treatments normalize the increased response to hydrogen peroxide in resistance arteries from hypertensive rats. **J Hypertens.**, v. 27, p. 1814-1822, 2009.

GARCÍA-REDONDO AB, AGUADO A, BRIONES AM, SALAICES M. NADPH oxidases and vascular remodeling in cardiovascular diseases. **Pharmacol Res. Dec.**, v. 114, p. 110-120, 2016.

GAVAZZI G, BANFI B, DEFFERT C, FIETTE L, SCHAPPI M, HERRMANN F, KRAUSE KH. Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. **Febs Lett.**; v. 580, p. 497- 504, 2006.

GAVAZZI G, DEFFERT C, TROCME C, SCHÄPPI M, HERRMANN FR, KRAUSE KH. NOX1 deficiency protects from aortic dissection in response to angiotensin II. **Hypertension**, v. 50, p. 189-196, 2007.

GE L, ZHANG G, YOU B, CHENG G, CHEN L, SHI R. The role of losartan in preventing vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats by inhibition of the H₂O₂/VPO1/HOCl/MMPs pathway. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 493, p. 855-861, 2017.

GIBBONS GH, DZAU VJ. The emerging concept of vascular remodeling. **N Engl J Med**, v. 330, p. 1431-1438, 1994.

GIBBONS GH. The pathophysiology of hypertension. The importance of angiotensin II in cardiovascular remodeling. **Am J Hypertens.**, v. 11, p. 177-181, 1998.

GLUAIS, P, LONCHAMPT, M, MORROW, JD, VANHOUTTE, PM & FELETOU, M. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. **Br J Pharmacol.**, v. 146, p. 834-845, 2005.

GOHLKE P, LINZ W, SCHO LKENS BA, WIEMER G, UNGER T. Cardiac and vascular effects of long-term losartan treatment in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 28, p. 397-402, 1996.

GRAY C, HARRISON CJ, SEGOVIA SA, REYNOLDS CM, VICKERS MH. Maternal salt and fat intake causes hypertension and sustained endothelial dysfunction in fetal, weanling and adult male resistance vessels. **Sci Rep.**, v. 5, p. 1-9, 2015.

GRIENDLING KK, MINIERE CA, OLLERESHAW JD AND ALEXANDER RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. **Circ Res.**, v. 74, p. 1141-1148, 1994.

GRIFFIN SA, BROWN WC, MACPHERSON F, MCGRATH JC, WILSON VG, KORSGAARD N, MULVANY MJ, ALAVANCA AF. Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. **Hypertension**, v.17, p. 626-635, 1991.

GUO F, CHEN XL, WANG F. Role of angiotensin II-angiotensin II type 1 receptor pathway in the production of proinflammatory cytokines in macrophage. **Zhonghua Shao Shang Za Zhi.**, v. 27, p. 88-91, 2011.

GUZIK TJ, CHEN W, GONGORA MC, GUZIK B, LOB HE, MANGALAT D, HOCH N, DIKALOV S, RUDZINSKI P, KAPELAK B, SADOWSKI J, HARRISON DG. Calcium-dependent NOX5 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase contributes to vascular oxidative stress in human coronary artery disease. **J Am Coll Cardiol.**, v. 52, p. 1803-1809, 2008.

HASDAI D, GIBBONS RJ, HOLMES DR JR, HIGANO ST, LERMAN A. Coronary endothelial dysfunction in humans is associated with myocardial perfusion defects. **Circulation**, v. 96, p. 3390-3395, 1997.

HEERWAGEN MJ, MILLER MR, BARBOUR LA, FRIEDMAN JE. Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 299, p. 711-722, 2010.

HENZLER T, STEUDLE E. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels. **J Exp Bot.**, v. 51, p. 2053-2066, 2000.

HEINEKE J, MOKKENTIN JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 8, p. 589-600, 2006.

HERNANZ R, BRIONES AM, SALAICES M, ALONSO MJ. New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase in hypertension. **Clin Sci**, v. 126, p. 111-121, 2014.

HITOMI H, KIYOMOTO H, NISHIYAMA A. Angiotensin II and oxidative stress. **Curr Opin Cardiol.**, v. 22, p. 311-315, 2007.

HIGUCHI S, OHTSU H, SUZUKI H, SHIRAI H, FRANK GD, EGUCHI S. Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. **Clin Sci (Lond).**, v. 112, p. 417-428, 2007.

HOLMBERG J, BHATTACHARIYA A, ALAJBEGOVIC A, RIPPE C, EKMAN M, DAHAN D, HIEN TT, BOETTGER T, BRAUN T, SWÄRD K, HELLSTRAND P, ALBINSSON S. Loss of vascular myogenic tone in miR-143/145 knockout mice is associated with hypertension-induced vascular lesions in small mesenteric arteries. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 38, p. 1-11, 2017.

HORIUCHI M, AKISHITA M, DZAU VJ. Molecular and cellular mechanism of angiotensin II-mediated apoptosis. **Endocr Res.**, v. 24, p. 307-14, 1998.

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.**, v. 303, p. 563-573, 2002.

HUANG XC, SUMNERS C, RICHARDS EM. Angiotensin II stimulates protein phosphatase 2A activity in cultured neuronal cells via type 2 receptors in a pertussis toxin sensitive fashion. **Adv Exp Med Biol.**, v. 396, p. 209-215, 1996.

INADA Y, WADA T, OJIMA M, SANADA T, SHIBOUTA Y, KANAGAWA R, ISHIMURA Y, FUJISAWA Y, NISHIKAWA K. Protective effects of candesartan cilexetil (TCV116) against stroke, kidney dysfunction and cardiac hypertrophy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Clin Exp Hypertens.**, v. 19, p. 1079-1099, 1997.

INCALZA MA, D'ORIA R, NATALICCHIO A, PERRINI S, LAVIOLA L, GIORGINO F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascul Pharmacol.**, v. 100, p. 1-19, 2018.

INGUL CB, LORÅS L, TEGNANDER E, EIK-NES SH, BRANTBERG A. Maternal obesity affects fetal myocardial function as early as in the first trimester. **Ultrasound Obstet Gynecol.**, v. 4, p. 433-442, 2016.

INTENGAN HD, THIBAUT G, LI JS, SCHIFFRIN EL. Resistance artery mechanics, structure and extracellular components in spontaneously hypertensive rats: effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition. **Circulation**, v. 100, p. 2267-2275, 1999.

JAIMES EA, TIAN RX, PEARSE D, RAIJ L. Up-regulation of glomerular COX-2 by angiotensin II: role of reactive oxygen species. **Kidney Int.**, v. 68, p. 2143-2153, 2005.

JESSUP JA, LINDSEY SH, WANG H, CHAPPELL MC, GROBAN L. Attenuation of salt-induced cardiac remodeling and diastolic dysfunction by the GPER agonist G-1 in female mRen2.Lewis rats. **PloS One**, v. 5, p. e15433, 2010.

JI Y, LIU J, WANG Z, LIU N. Angiotensin II induces inflammatory response partly via toll-like receptor 4-dependent signaling pathway in vascular smooth muscle cells. **Cell Physiol Biochem.**, v. 23, p. 265-276, 2009.

JOHNSTON CI, RISVANIS J. Preclinical pharmacology of angiotensin II receptor antagonists: update and outstanding tissues. **Am J Hypertens.**, v. 10, p. 306-310, 1997.

LASSÈGUE B, SAN MARTÍN A, GRIENDLING KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. **Circ Res.**, v. 110, p. 1364-1390, 2012.

LEANDRO SM, FURUKAWA LN, SHIMIZU MH, CASARINI DE, SEGURO AC, PATRIARCA G, COELHO MS, DOLNIKOFF MS, HEIMANN JC. Low birth weight in response to salt restriction during pregnancy is not due to alterations in uterine-placental blood flow or the placental and peripheral renin-angiotensin system. **Physiol Behav.**, v. 95, p. 5-51, 2008.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT **Method. Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

KIMURA S, ZHANG GX, NISHIYAMA A, SHOKOJI T, YAO L, FAN YY, RAHMAN M, ABE Y. Mitochondria-derived reactive oxygen species and vascular MAP kinases: comparison of angiotensin II and diazoxide. **Hypertension**, v. 45, p. 438-444, 2005.

KHORRAM O, GHAZI R, CHUANG TD, HAN G, NAGHI J, NI Y, PEARCE WJ. Excess Maternal Glucocorticoids in Response to In Utero Undernutrition Inhibit Offspring Angiogenesis. **Reprod Sci.**, v. 21, p. 601-611, 2014.

KJELDSSEN SE, DAHLÖF B, DEVEREUX RB, JULIUS S, AURUP P, EDELMAN J, BEEVERS G, DE FAIRE U, FYHRQUIST F, IBSEN H, KRISTIANSON K, LEDERBALLE-PEDERSEN O, LINDHOLM LH, NIEMINEN MS, OMKV P, OPARIL S, SNAPINN S, WEDEL H. Study Group. Effects of losartan on cardiovascular morbidity and mortality in patients with isolated systolic hypertension and left ventricular hypertrophy: Losartan Intervention for Endpoint Reduction (LIFE) substudy. **Jama**, v. 25, p. 1491-1498, 2002.

KEI FUKAMI, SHO-ICHI YAMAGISHI, SHUJI IIDA, HIDEHIRO MATSUOKA, SEIYA OKUDA. Involvement of Iron-Evoked Oxidative Stress in Smoking-Related Endothelial Dysfunction in Healthy Young Men. **PLoS One**, v.9, p. e89433, 2014.

KLAHR S & MORRISSEY J. Progression of chronic renal disease. **Am J Kidney Dis.**, v. 41, p. 3-7, 2003.

KOHN JC, LAMPI MC, REINHART-KING CA. Age-related vascular stiffening: causes and consequences. **Front Genet.**, v. 6, p. 1-17, 2015.

KOSKA J. Incretins and preservation of endothelial function. **Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.**, v. 10, p 295-308, 2012.

KONIOR A, SCHRAMM A, CZESNIKIEWICZ-GUZIK M, GUZIK TJ. NADPH oxidases in vascular pathology. **Antioxid Redox Signal.**, v. 20, p. 2794-2814, 2014.

KRAMKOWSKI K, MOGIELNICKI A, BUCZKO W. The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production. **J Physiol Pharmacol.**, v. 57, p. 529-539, 2006.

LASSÈGUE B, SORESCU D, SZÖCS K, YIN QQ, AKERS M, ZHANG Y, GRANT SL, LAMBETH JD, GRIENDLING KK. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth

muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redoxsensitive signaling pathways. **Circ Res.**, v. 88, p. 888-894, 2001.

LEANDRO SM, FURUKAWA LN, SHIMIZU MH, CASARINI DE, SEGURO AC, PATRIARCA G, COELHO MS, DOLNIKOFF MS, HEIMANN JC. Low birth weight in response to salt restriction during pregnancy is not due to alterations in uterine-placental blood flow or the placental and peripheral renin-angiotensin system. **Physiol Behav.**, v. 95, p. 145-151, 2008.

LEBENDER LF, PRÜNTE L, RUMZHUM NN, AMMIT AJ. Selectively targeting prostanoid E (EP) receptor-mediated cell signalling pathways: Implications for lung health and disease. **Pulm Pharmacol Ther.**, v. 49, p. 75-87, 2018.

LI YB, HAN JY, JIANG W, WANG J. Selenium inhibits high glucose-induced cyclooxygenase-2 and P-selectin expression in vascular endothelial cells. **Mol Biol Rep.**, v.38, p. 2301-2306, 2011.

HAZON N, PARKER C, LEONARD R, HENDERSON IW. Influence of an enriched dietary sodium chloride regime during gestation and suckling and postnatally on the ontogeny of hypertension in the rat. **J Hypertens.**, v. 6, p. 517-524, 1988.

HENIKOFF S, MATZKE MA. Exploring and explaining epigenetic effects. **Trends Genet.**, v.13, p. 293-295, 1997.

HONG K, ZHAO G, HONG Z, SUN Z, YANG Y, CLIFFORD PS, DAVIS MJ, MEININGER GA, HILL MA. Mechanical activation of angiotensin II type 1 receptors causes actin remodelling and myogenic responsiveness in skeletal muscle arterioles. **J Physiol.**, v.594, p. 7027-7047, 2016.

INTENGAN HD, SCHIFFRIN EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. **Hypertension**, v. 38, p. 581-587, 2001.

ISHIDA K, MATSUMOTO T, TAGUCHI K, KAMATA K, KOBAYASHI T. Mechanisms underlying altered extracellular nucleotide-induced contractions in mesenteric arteries from rats in later-stage type 2 diabetes: effect of ANG II type 1 receptor antagonism. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v.34, p. 1288-1294, 2011.

KELLEY EE. A new paradigm for XOR-catalyzed reactive species generation in the endothelium. **Pharmacol Rep.**, v; 67, p. 669-674, 2015.

KORSGAARD N & MULVANY MJ. Cellular hypertrophy in mesenteric resistance vessels from renal hypertensive rats. **Hypertension**, v. 12, p. 162-167, 1988.

KOLEGANOVA N, PIECHA G, RITZ E, BECKER LE, MÜLLER A, WECKBACH M, NYENGAARD JR, SCHIRMACHER P, GROSS-WEISSMANN ML. Both high and low maternal salt intake in pregnancy alter kidney development in the offspring. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 301, p. 344–354, 2011.

KURODA J, AGO T, NISHIMURA A, NAKAMURA K, MATSUO R, WAKISAKA Y, KAMOUCHE M, KITAZONO T. Nox4 is a major source of superoxide production in human brain pericytes. **J Vasc Res.**, v. 51, p. 429-438, 2014.

LASSÈGUE B, SAN MARTÍN A, GRIENGLING KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. **Circ Res.** v. 110, p. v.1364-1390, 2012.

LANDMESSER U, SPIEKERMANN S, DIKALOV S, TATGE H, WILKE R, KOHLER C, HARRISON DG, HORNIG B, DREXLER H. Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. **Circulation**, v. 106, p. 3073-3078, 2002.

LI L ZHOU N GONG H WU J LIN L KOMURO I GE J ZOU Y. Comparison of angiotensin II type 1-receptor blockers to regress pressure overload-induced cardiac hypertrophy in mice. **Hypertens Res.**, v. 33, p. 1289–1297, 2010.

LIAUDET L, VASSALLI G, PACHER P. Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways. **Front Biosci.**, v. 14, p. 4809-4814, 2009.

LIBBY P, LEE RT. Matrix matters. **Circulation**, v.102, p. 1874–1876, 2000.

LIOCHEV SI, FRIDOVICH I: The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ formation. **Free Radic Biol Med.**, v. 42, p.1465-1469, 2007.

LV J, ZHANG P, ZHANG Y, KUANG H, CAO L, WU C, JIANG L, LI D, MAO C, XU Z. Maternal high-salt intake during pregnancy reprogrammed renin-angiotensin system-mediated cardiomyocyte apoptosis in the adult offspring heart. **Reprod Sci**, v. 21, p. 52-62, 2014.

MACKINTOSH D, BAIRD-LAMBERT J, DRAGE D, BUCHANAN N. Effects of prenatal glucocorticoids on renal maturation in newborn infants. **Dev Pharmacol Ther**, v. 8, p. 107-114, 1985.

MAO C, LV J, ZHU H, ZHOU Y, CHEN R, FENG X, CUI Y, WANG C, HUI P, XU F, XU Z. Fetal functional capabilities in response to maternal hypertonicity associated with altered central and peripheral angiotensinogen mRNA in rats. **Peptides**, v. 28, p.1178–1184, 2007.

MARCHESI C, PARADIS P, SCHIFFRIN EL. Role of the renin–angiotensin system in vascular inflammation. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 29, p 367-374, 2008.

MARIN EC, BALBI AP, FRANCESCATO HD, ALVES DA SILVA CG, COSTA RS, COIMBRA TM. Renal structure and function evaluation of rats from dams that received increased 61 sodium intake during pregnancy and lactation submitted or not to 5/6 nephrectomy. **Renal Fail.**, v. 30, p. 547–555, 2008.

MARTÍN A, PÉREZ-GIRÓN JV, HERNANZ R, PALACIOS R, BRIONES AM, FORTUÑO A, ZALBA G, SALAICES M, ALONSO MJ. Peroxisome proliferator-activated receptor- α activation reduces cyclooxygenase-2 expression in vascular

smooth muscle cells from hypertensive rats by interfering with oxidative stress. **J Hypertens.**, v. 30, p. 315-326, 2012.

MARTINEZ-LEMUS LA, CROW T, DAVIS MJ, MEININGER GA. Alphavbeta3- and alpha 5 beta1-integrin blockade inhibits myogenic constriction of skeletal muscle resistance arterioles. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 289, p. 322-329, 2005.

MARTINEZ-LEMUS LA. The Dynamic Structure of Arterioles. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.**, v. 110, p. 5-11, 2012.

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.**, v. 18, p. 51-65, 2013.

MARUYAMA K, KAGOTA S, VAN VLIET BN, WAKUDA H, SHINOZUKA K. A maternal high salt diet disturbs cardiac and vascular function of offspring. **Life Sci.**, v. 136, p. 42-51, 2015.

MASLOVA E HANSEN S, GRUNNET LG, STRØM M, BJERREGAARD AA, HJORT L KAMPMANN FB, MADSEN CM, BAUN THUESEN AC, BECH BH, HALLDORSSON TI, VAAG AA, OLSEN SF. Maternal protein intake in pregnancy and offspring metabolic health at age 9-16 y: results from a Danish cohort of gestational diabetes mellitus pregnancies and controls. **Am J Clin Nutr.**, v. 106, p. 623-636, 2017.

MATSUBARA M, HAYASHI N, JING T, TITANI K. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by protein kinase C. **J Biochem.**, v. 133, p. 773-781, 2003.

MATSUMOTO T, ISHIDA K, TAGUCHI K, KOBAYASHI T, KAMATA K. Short-term angiotensin-1 receptor antagonism in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats normalizes endothelin-1-induced mesenteric artery contraction. **Peptides**, v. 31, p. 609-617, 2010.

MATSUOKA T, NARUMIYA S. Prostaglandin receptor signaling in disease. **Scientific World Journal.**, v. 7, p.1329-1347, 2007

MCALLISTER-LUCAS LM, RULAND J, SIU K, JIN X, GU S, KIM DS, KUFFA P, KOHRT D, MAK TW, NUÑEZ G, LUCAS PC. CARMA3/Bcl10/MALT1-dependent NF-kappaB activation mediates angiotensin II-responsive inflammatory signaling in nonimmune cells. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 104, p. 139-144, 2007.

MCBRIDE SM, CULVER B, FLYNN FW. Dietary sodium manipulation during critical periods in development sensitize adult offspring to amphetamines. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 295, p. 899-890, 2008.

MCGUIRE JJ, DING H, TRIGGLE CR. Endothelium-derived relaxing factors: a focus on endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). **J Physiol Pharmacol.**, v. 79, p. 443-470, 2001.

MCNALLY JS, DAVIS ME, GIDDENS DP, SAHA A, HWANG J, DIKALOV S, JO H, HARRISON DG. Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 285, p. 2290-2297, 2003.

MENDES GA, GOBETTO MN, JURIO LV, CANIFFI C, ELESGARAY R, TOMAT AL, ARRANZ C. Developmental programming of vascular dysfunction by prenatal and postnatal zinc deficiency in male and female rats. **J Nutr Biochem.**, v. 56, p. 89-98, 2018.

MEHTA PK AND GRIENGLING KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 292, p. 82–97, 2007.

MENG Y, CHEN C, TIAN C, DU J, LI HH. Angiotensin II-induced Egr-1 expression is suppressed by peroxisome proliferator-activated receptor- α ligand 15d-PGJ₂ in macrophages. **Cell Physiol Biochem.**, v. 35, p. 689-698, 2015.

MEYER Y, BUCHANAN BB, VIGNOLS F, REICHHELD JP. Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. **Annu Rev Genet.**, v. 43, p. 335-367, 2009.

MOGIELNICKI A, KRAMKOWSKI K, CHABIELSKA E, BUCZKO W. Angiotensin 1-9 influences hemodynamics and hemostatics parameters in rats. **Pol J Pharmacol.**, v. 55, p. 503-504, 2003.

MONTEZANO AC, NGUYEN DINH CAT A, RIOS FJ, TOUYZ RM. Angiotensin II and vascular injury. **Curr Hypertens Rep.**, v. 16, p. 431, 2014.

MONTEZANO AC, TSIROPOULOU S, DULAK-LIS M, HARVEY A, CAMARGO LDE L, TOUYZ RM. Redox signaling, Nox5 and vascular remodeling in hypertension. **Curr Opin Nephrol Hypertens.**, v. 24, p. 425-433, 2015.

MOREIRA HS, LIMA-LEAL GA, SANTOS-ROCHA J, GOMES-PEREIRA L, DUARTE GP, XAVIER FE. Phosphodiesterase-3 inhibitor cilostazol reverses endothelial dysfunction with ageing in rat mesenteric resistance arteries. **Eur J Pharmacol.**, v. 822, p. 59-68, 2018.

MORRIS MJ, NA ES, JOHNSON AK. Salt craving: the psychobiology of pathogenic sodium intake. **Physiol Behav.**, v. 94, p. 709-721, 2008.

MORTENSEN OH, LARSEN LH, ØRSTRUP LK, HANSEN LH, GRUNNET N, QUISTORFF B. Developmental programming by high fructose decreases phosphorylation efficiency in aging offspring brain mitochondria, correlating with enhanced UCP5 expression. **J Cereb Blood Flow Metab.**, v. 34, p. 1205-1211, 2014.

MOUNT, P. F.; KEMP, B. E.; POWER, D. A. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. **J Mol Cell Cardiol.**, v. 42, p. 271-279, 2007.

MURPHY MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem J.**, v. 417, p.1-13, 2009.

MULVANY MJ, BAUMBACH GL, AALKJAER C, HEAGERTY AM, KORSGAARD N, SCHIFFRIN EL, HEISTAD DD. Vascular remodeling. **Hypertension**, v. 28, p. 505-506, 1996.

MULVANY MJ AND HALPERN W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circ Res.**, v. 41, p. 19-26, 1977.

MULVANY MJ. Vascular remodeling of resistance vessels: can we define this? **Cardiovasc Res.**, v. 41, p. 9-13, 1999.

NI Z, OVEISI F, VAZIRI ND. Nitric oxide synthase isotype expression in salt-sensitive and salt-resistant Dahl rats. **Hypertension**, v. 34, p. 552-557, 1999.

NICKENIG G, STREHLOW K, BAUMER AT, BAUDLER S, WASSMANN S, SAUER H. Negative feedback regulation of reactive oxygen species on AT1 receptor gene expression. **Br J Pharmacol.**, v. 131, p. 795-803, 2000.

NISIMOTO Y, DIEBOLD BA, COSENTINO-GOMES D, LAMBETH JD. Nox4: a hydrogen peroxide-generating oxygen sensor. **Biochemistry**. v. 12, p. 5111-5120, 2014.

NØRRELUND H, CHRISTENSEN KL, SAMANI NJ, KIMBER P, MULVANY MJ, KORSGAARD N. Early narrowed afferent arteriole is a contributor to the development of hypertension. **Hypertension**, v. 24, p. 301-308, 1994.

NOREL X: Prostanoid receptors in the human vascular wall. **Scientific World Journal.**, v. 7, p. 1359-1374, 2007.

OJEDA NB, INTAPAD S, ROYALS TP, BLACK JT, DASINGER JH, TULL FL, ALEXANDER BT. Hypersensitivity to acute ANG II in female growth-restricted offspring is exacerbated by ovariectomy. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 301, p. 1199-1205, 2011.

OYEWOLE AO, BIRCH-MACHIN MA. Mitochondria-targeted antioxidants. **Faseb J.**, v. 29, p.4766-4771, 2015.

PALMER RMJ, ASHTON DS, MONCADA S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxid from L-arginine. **Nature**, v 333, p. 664-666, 1988.

PARADIS P, DALI-YOUCHEF N, PARADIS FW, THIBAUT G, NEMER M. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 97, p. 931-936, 2000.

PARK JH, STOFFERS DA, NICHOLLS RD, SIMMONS RA. Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. **J Clin Invest.**, v. 118, p. 2316-2324, 2008.

PARK JB, CHARBONNEAU F, SCHIFFRIN EL. Correlation of endothelial function in large and small arteries in human essential hypertension. **J Hypertens.**, v. 19, p. 415-420, 2001.

PAWLIKOWSKI M, GRUSZKA A, MUCHA S, MELEN-MUCHA G. Angiotensins II and IV stimulate the rat adrenocortical cell proliferation acting via different receptors. **Endocr Regul.**, v. 35, p. 139-142, 2001.

PERAMAIYAN RAJENDRAN, THAMARAISELVAN RENGARAJAN, JAYAKUMAR THANGAVEL, YUTAKA NISHIGAKI, DHANAPAL SAKTHISEKARAN, GAUTAM SETHI, IKUO NISHIGAKI. The Vascular Endothelium and Human Diseases, **Int J Biol Sci.**, v. 9, p. 1057–1069, 2013;

PIECHA G, KOLEGANOVA N, RITZ E, MÜLLER A, FEDOROVA OV, BAGROV AY, LUTZ D, SCHIRMACHER P, GROSS-WEISSMANN ML. High salt intake causes adverse fetal programming-vascular effects beyond blood pressure. **Nephrol Dial Transplant.**, v. 27, p. 3464-3476, 2012.

PRIES AR, KUEBLER W. Normal endothelium. **Handb Exp Pharmacol.**, v. 176, p. 1-40, 2006.

PIRES PW , KO EA , PRITCHARD HAT , RUDOKAS M , YAMASAKI E , EARLEY S . The angiotensin II receptor type 1b is the primary sensor of intraluminal pressure in cerebral artery smooth muscle cells. **J Physiol.**, v. 14, p. 4735-4753, 2017.

PI X, XIE L, PORTBURY AL, KUMAR S, LOCKYER P, LI X, PATTERSON C. NADPH oxidase-generated reactive oxygen species are required for stromal cell-derived factor-1 α -stimulated angiogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 34, p. 2023-2032, 2014.

PUEYO ME, GONZALEZ W, NICOLETTI A, SAVOIE F, ARNAL JF, MICHEL JB. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 20, p. 645-651, 2000.

PUFF J. Brasileiro consome mais que o dobro do sal recomendado pela OMS. BBC Brasil no Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2014/08/140812_reducao_sodio_jf_kb>. Acesso em: 07 março de 2017.

PÚZSEROVÁ A, KOPINCOVÁ J, SLEZÁK P, BALIŠ P, BERNÁTOVÁ I. Endothelial dysfunction in femoral artery of the hypertensive rats is nitric oxide independent. **Physiol Res.**, v. 62, p. 615-629, 2013.

QIU LL, JI MH, ZHANG H, YANG JJ, SUN XR, TANG H, WANG J, LIU WX, YANG JJ. NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species in the hippocampus might contribute to microglial activation in postoperative cognitive dysfunction in aged mice. **Brain Behav Immun.**, v. 51, p. 109-118, 2016

RAMOS-ALVES FE, DE QUEIROZ DB, SANTOS-ROCHA J, DUARTE GP, XAVIER FE. Effect of age and COX-2-derived prostanoids on the progression of adult vascular dysfunction in the offspring of diabetic rats. **Br J Pharmacol.**, v. 166, p. 2198-2208, 2012a.

RAMOS-ALVES FE, DE QUEIROZ DB, SANTOS-ROCHA J, DUARTE GP, XAVIER FE. Increased cyclooxygenase-2-derived prostanoids contributes to the hyperreactivity to noradrenaline in mesenteric resistance arteries from offspring of diabetic rats. **PLoS One**, v.7, p. e0593, 2012b.

RAMOS DR, COSTA NL, KAREN LL JANG, OLIVEIRA IB, DA SILVA AA, HEIMANN JC, LUZIA N.S. FURUKAWA. Maternal high-sodium intake alters the responsiveness of the renin–angiotensin system in adult offspring. **Life Sci.**, v. 90, p. 785-792, 2012.

RAYCHAUDHURI N, RAYCHAUDHURI S, THAMOTHARAN M, DEVASKAR SU. Histone code modifications repress glucose transporter 4 expression in the intrauterine growth-restricted offspring. **J Biol Chem.**, v. 283, p. 13611-13626, 2008.

RAJAGOPALAN S, KURZ S, MUNZEL T, TARPEY M, FREEMAN BA, GRIENDLING 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.**, v. 97, p. 1916-1923, 1996.

RODRIGUES SL, BALDO MP, DE SÁ CUNHA R, ANDREÃO RV, DEL CARMEN BISI MOLINA M, GONÇALVES CP, DANTAS EM, MILL JG. Salt excretion in normotensive individuals with metabolic syndrome: a population-based study. **Hypertens Res.**, v. 32, p. 906-910, 2009.

ROSS R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. **N Engl J Med.**, v. 340, p. 115-126, 1999.

RHODIN JAG. The ultrastructure of mammalian arterioles and precapillary sphincters. **J Ultrastruct Res.**, v. 18, p. 181-223, 1967.

RHODIN JAG. Architecture of the vessel wall. **Am Phy Soc.**, v. 2, p. 1-32, 1980.

RESENDE MM, MILL JG. Alternate angiotensin II-forming pathways and their importance in physiological or physiopathological conditions. **Arq Bras Cardiol.**, v. 78, p. 425-38, 2002.

ROSENBAUGH EG, SAVALIA KK, MANICKAM DS, ZIMMERMAN MC. Antioxidant-based therapies for angiotensin II-associated cardiovascular diseases. **Am. J. Physiol.–Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.304, p. 917–928, 2013.

RUPP H. Risk reduction by preventing stroke: need for blockade of angiotensin II and catecholamines? **Curr Med Res Opin.**, v. 23, p. 25-29, 2007.

SALES VL, SUKHOVA GK, LOPEZ-ILASACA MA, LIBBY P, DZAU VJ, PRATT RE. Angiotensin type 2 receptor is expressed in murine atherosclerotic lesions and modulates lesion evolution. **Circulation**, v. 112, p. 3328-3336, 2005.

SAHOO S, MEIJLES DN, PAGANO PJ. NADPH oxidases: key modulators in aging and age-related cardiovascular diseases? **Clin Sci (Lond)**, v. 130, p. 317-335, 2016.

SATOH C, FUKUDA N, HU WY, NAKAYAMA M, KISHIOKA H, KANMATSUSE K. Role of endogenous angiotensin II in the increased expression of growth factors in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v. 37 p. 108-111, 2001.

SHAMSALDEEN YA, UGUR R, BENHAM CD, LIONE LA. Diabetic dyslipidaemia is associated with alterations in eNOS, caveolin-1, and endothelial dysfunction in streptozotocin treated rats. **Diabetes Metab Res Rev.**, v. 22, p. 1-27, 2018.

SCHIFFRIN EL. Resistance arteries as endpoints in hypertension. **Blood Press**, v. 2, p. 24-30, 1997.

SCHIFFRIN EL, PARK JB, INTENGAN HD, TOUYZ RM. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. **Circulation**, v. 101, p.1653-1659, 2000.

SCHRÖDER K, ZHANG M, BENKHOFF S, MIETH A, PLIQUETT R, KOSOWSKI J, KRUSE C, LUEDIKE P, MICHAELIS UR, WEISSMANN N, DIMMELER S, SHAH AM, BRANDES RP. Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. **Circ Res.**, v. 110, p. 1217-1225, 2012.

SCHRÖDER K. NADPH oxidases in redox regulation of cell adhesion and migration. **Antioxid Redox Signal.**, v. 20, p. 2043-2058, 2014.

SCHUPP N, KOLKHOF P, QUEISSER N, GÄRTNER S, SCHMID U, KRETSCHMER A, HARTMANN E, OLI RG, SCHÄFER S AND STOPPER H: Mineralocorticoid receptor-mediated DNA damage in kidneys of DOCA-salt hypertensive rats. **Faseb J.**, v. 25, p. 968-978, 2011.

SERAVALLI P , DE OLIVEIRA IB , ZAGO BC , DE CASTRO I , VERAS MM , ALVES-RODRIGUES EN , HEIMANN JC . High and low salt intake during pregnancy: impact on cardiac and renal structure in newborns **PLoS One**, v. 11, p. 1-12, 2016.

SESHIAH PN, WEBER DS, ROCIC P, VALPPU L, TANIYAMA Y, GRIENGLING KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. **Circ Res.**, v. 91, p. 406-413, 2002.

SENA LA, CHANDEL NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. **Mol Cell.**, v. 48, p. 158-167, 2012.

SHEN WL, GAO PJ, CHE ZQ, JI KD, YIN M, YAN C, BERK BC, ZHU DL. NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species regulate angiotensin-II induced adventitial fibroblast phenotypic differentiation. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 339, p. 337-343, 2006.

SILVA SD JR, JARA ZP, PERES R, LIMA LS, SCAVONE C, MONTEZANO AC, TOUYZ RM, CASARINI DE, MICHELINI LC. Temporal changes in cardiac oxidative stress, inflammation and remodeling induced by exercise in hypertension: Role for local angiotensin II reduction. **PLoS One**, v. 12, p. 1-19, 2017.

SIMPLICIO JA, DO VALE GT, GONZAGA NALEITE LN, HIPÓLITO UV, PEREIRA CA, TOSTES RC, TIRAPELLI CR. Reactive oxygen species derived from NAD(P)H oxidase play a role on ethanol-induced hypertension and endothelial dysfunction in rat resistance arteries. **J Physiol Biochem.**, v. 73, p. 5-16, 2017.

SNYDER RA, WATT KW, WINTROUB BU. A human platelet angiotensin I-processing system. Identification of components and inhibition of angiotensin-converting enzyme by product. **J Biol Chem.**, v. 260, p. 7857-7860, 1985.

SOHI G, MARCHAND K, REVESZ A, ARANY E, HARDY DB. Maternal protein restriction elevates cholesterol in adult rat offspring due to repressive changes in histone modifications at the cholesterol 7 α -hydroxylase promoter. **Mol Endocrinol.**, v. 25, p. 785-798, 2011.

SPRAGUE AH, KHALIL RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. **Biochem Pharmacol.**, v. 78, p. 539-552, 2009.

STANKOV K, BENC D, DRASKOVIC D. Genetic and epigenetic factors in etiology of diabetes mellitus type 1. **Pediatrics**, v. 6, p. 1112-1122, 2013.

STARY HC, BLANKENHORN DH, CHANDLER AB, GLAGOV S, INSULL W JR, RICHARDSON M, ROSENFELD ME, SCHAFFER SA, SCHWARTZ CJ, WAGNER WD. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. **Arterioscler Thromb.**, v. 12, p. 120-134, 1992.

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. Fatal and nonfatal outcomes, incidence of hypertension, and blood pressure changes in relation to urinary sodium excretion. **Jama**, v. 305, p. 1777-1785, 2011.

SHI Y, VANHOUTTE PM. Oxidative stress and COX cause hyper-responsiveness in vascular smooth muscle of the femoral artery from diabetic rats. **Br J Pharmacol.**, v. 154, p. 639-651, 2008

TANG EH, LEUNG FP, HUANG Y, FELETOUM, SO KF, MAN RY, VANHOUTTE PM. Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to

releasers of endothelium derived contracting factor. **Br J Pharmacol.**, v. 151, p. 15–23, 2007.

TANAKA LY, LAURINDO FR. Vascular remodeling: A redox-modulated mechanism of vessel caliber regulation. **Free Radic Biol Med.**, v. 109, p. 11-21, 2017.

TOPCHIIY E, PANZHINSKIY E, GRIFFIN WS, BARGER SW, DAS M, ZAWADA WM. Nox4-generated superoxide drives angiotensin II-induced neural stem cell proliferation. **Dev Neurosci.**, v. 35, p. 293-305, 2013.

TOUYZ RM, SCHIFFRIN EL. Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. **Hypertension**, v. 34, p. 976-982, 1999.

TOUYZ RM AND SCHIFFRIN EL Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. **Pharmacol Rev.**, v. 52, p. 639-672, 2000.

TOUYZ RM, HE G, EL MABROUK M, SCHIFFRIN EL. p38 Map kinase regulates vascular smooth muscle cell collagen synthesis by angiotensin II in SHR but not in WKY. **Hypertension**, v.37, p. 574–580, 2001.

TOUYZ RM. The role of angiotensin II in regulating vascular structural and functional changes in hypertension. **Curr Hypertens Rep.**, v. 5, p. 155-164, 2003

TOUYZ RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells – implications in cardiovascular disease. **Braz J Med Biol Res.**, v. 37, p. 1263–1273, 2004.

TOUYZ RM. Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. **Exp Physiol.**, v. 90, p. 449-455, 2005.

TOUYZ RM, BRIONES AM, SEDEEK M, BURGER D, AND MONTEZANO AC. NOX isoforms and reactive oxygen species in vascular health. **Mol Interv.**, v. 11, p. 27-35, 2011.

VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, CRONIN MT, MAZUR M, TELSNER J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VAN THIEL BS, VAN DER PLUIJM I, TE RIET L, ESSERS J, DANSER AH. The renin–angiotensin system and its involvement in vascular disease. **Eur J Pharmacol.**, v. 763, p. 3-14, 2015.

VANHOUTTE PM, SHIMOKAWA H, TANG EH, FELETOU M. Endothelial dysfunction and vascular disease. **Acta Physiol (Oxf).**, v.196, p. 193-222, 2009.

VANHOUTTE PM, FELETOU M, TADDEI S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. **Br J Pharmacol.**, v. 144, p. 449-458, 2005.

VEAL EA, DAY AM, MORGAN BA. Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. **Molecular Cell.**, v. 26, p. 1-14, 2007.

VIDONHO AF JR, DA SILVA AA, CATANOZI S, ROCHA JC, BEUTEL A, CARILLO BA, FURUKAWA LN, CAMPOS RR, DE TOLEDO BERGAMASCHI CM, CARPINELLI AR, QUINTÃO EC, DOLNIKOFF MS, HEIMANN JC. Perinatal salt restriction: a new pathway to programming insulin resistance and dyslipidemia in adult wistar rats. **Pediatr Res.**, v. 56, p. 842-848, 2004.

VIJANDE M, BRIME JI, LÓPEZ-SELA P, COSTALES M, ARGÜELLES J. Increased salt preference in adult offspring raised by mother rats consuming excessive amounts of salt and water. **Regul Pept.**, v. 66, p. 105–108, 1996.

VIRDIS A, GHIADONI L, TADDEI S. Human endothelial dysfunction: EDCFs. **Eur J Physiol.**, v. 459, 1015-1023, 2010.

VIRDIS A. Endothelial dysfunction in obesity: role of inflammation. **High Blood Press Cardiovasc Prev.**, v. 23, p. 83–85, 2016

VUCETIC Z, KIMMEL J, TOTOKI K, HOLLENBECK E, REYES TM. Maternal high-fat diet alters methylation and gene expression of dopamine and opioid-related genes. **Endocrinology**; v. 151, p. 4756-4764, 2010.

ZEESHAN HM, LEE GH, KIM HR, CHAE HJ. Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, p. 2-20, 2016

WARD N. C., CROFT K. D. Hypertension and oxidative stress. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 33, p. 872–876, 2006.

WASSMANN S, HILGERS S, LAUFS U, BÖHM M, NICKENIG G. Angiotensin II type 1 receptor antagonism improves hypercholesterolemia-associated endothelial dysfunction. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. ;22, p. 1208-1212, 2002.

WASSMANN S, WASSMANN K, NICKENIG G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. **Hypertension**, v. 44, p. 381-386, 2004.

WASSMANN S, NICKENIG G. Pathophysiological regulation of the AT (1)-receptor and implications for vascular disease. **J. Hypertens.**, v. 24, p. 15-21, 2006.

WELLS JC. The thrifty phenotype as an adaptive maternal effect. **Biol Rev Camb Philos Soc.**, v. 82, p. 143-172, 2007.

WENDT MC, DAIBER A, KLESCHYOV AL, MÜLSCH A, SYDOW K, SCHULZ E, CHEN K, KEANEY JF JR, LASSÈGUE B, WALTER U, GRIENDLING KK, MÜNZEL T. Differential effects of diabetes on the expression of the gp91phox homologues nox1 and nox4. **Free Radic Biol Med.**, v. 39, p. 381-391, 2005.

WERNER ER, BLAU N, THONY B. Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology. **Biochem J.**, v. 438, p. 397-414, 2011

WIND S, BEUERLEIN K, ARMITAGE ME, TAYE A, KUMAR AH, JANOWITZ D, NEFF C, SHAH AM, WINGLER K, SCHMIDT HH. Oxidative stress and endothelial dysfunction in aortas of aged spontaneously hypertensive rats by NOX1/2 is reversed by NADPH oxidase inhibition. **Hypertension**, v. 56, p. 490-497, 2010.

WONG SL, LAU CW, WONG WT, XU A, AU CL, NG CF, NG SS, GOLLASCH M, YAO X, AND HUANG Y. Pivotal role of protein kinase C delta in angiotensin II-induced endothelial cyclooxygenase-2 expression: a link to vascular inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 31, p. 1169–1976, 2011.

WONG WT, TIAN XY, HUANG Y. Endothelial dysfunction in diabetes and hypertension: cross talk in RAS, BMP4, and ROS-dependent COX-2-derived prostanoids. **J Cardiovasc Pharmacol.**, v. 61, p. 204-214, 2013.

XAVIER FE, ROSSONI LV, ALONSO MJ, BALFAGÓN G, VASSALLO DV, SALAICES M. Ouabain-induced hypertension alters the participation of endothelial factors in alpha-adrenergic responses differently in rat resistance and conductance mesenteric arteries. **Br J Pharmacol.**, v. 143, p. 215-225, 2004.

XAVIER FE, ARAS-LÓPEZ R, ARROYO-VILLA I, DEL CAMPO L, SALAICES M, ROSSONI LV, FERRER M, BALFAGÓN G. Aldosterone induces endothelial dysfunction in resistance arteries from normotensive and hypertensive rats by increasing thromboxane A2 and prostacyclin. **Br J Pharmacol.**, v. 154, p.1225-1235, 2008.

XAVIER FE, BLANCO-RIVERO J, FERRER M, BALFAGÓN G. Endothelium modulates vasoconstrictor response to prostaglandin I2 in rat mesenteric resistance arteries: interaction between EP1 and TP receptors. **Br J Pharmacol.** v. 158, p. 1787-1795, 2009.

XAVIER, FE, BLANCO-RIVERO, J, SASTRE, E, BADIMON, L & BALFAGON, G. Simultaneous inhibition of TXA(2) and PGI(2) synthesis increases NO release in mesenteric resistance arteries from cirrhotic rats. **Clin Sci (Lond).**, v. 119, p. 283-292, 2010.

XI XP. Central role of the MAPK pathway in Ang II-mediated DNA synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v. 19, p. 73-82, 1999.

XI W, SATOH H, KASE H, SUZUKI K, HATTORI Y. Stimulated HSP90 binding to eNOS and activation of the PI3-Akt pathway contribute to globular adiponectin-induced NO production: vasorelaxation in response to globular adiponectin. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 332, p. 200-205, 2005.

YANG Q, XUE HM, WONG WT, TIAN XY, HUANG Y, TSUI SK, NG PK, WOHLFART P, LI H, XIA N, TOBIAS S, UNDERWOOD MJ, HE GW. AVE3085, an enhancer of endothelial nitric oxide synthase, restores endothelial function and reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Br J Pharmacol.**, v.163, p. 1078-1085, 2011.

YANG G, CHEN L. An Update of Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 and PGE2 Receptors in Cardiovascular Health and Diseases. **Oxid Med Cell Longev.**, v. 2016, p. 1-9, 2016.

YATABE J, YONEDA M, YATABE MS, WATANABE T, FELDER RA, JOSE PA, SANADA H. Angiotensin III stimulates aldosterone secretion from adrenal gland partially via angiotensin II type 2 receptor but not angiotensin II type 1 receptor. **Endocrinology**, v 4, p. 1582-1588, 2011.

YAVUZ D, KOÇ M, TOPRAK A, AKPINAR I, VELIOĞLU A, DEYNELI O, HAKLAR G, AKALIN S. Effects of ACE inhibition and AT1-receptor antagonism on endothelial function and insulin sensitivity in essential hypertensive patients. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.**, v. 4, p.197-203. 2003.

YIN D, WANG Q, ZHOU X, LI Y. Endothelial dysfunction in renal arcuate arteries of obese Zucker rats: The roles of nitric oxide, endothelium-derived hyperpolarizing factors, and calcium-activated K⁺ channels. **PLoS One**, v. 12, p. e0183124, 2017.