ÁLVARO YOGI

**MECANISMOS DE REGULAÇÃO E FUNÇÃO CELULAR DO
MAGNÉSIO NA HIPERTENSÃO INDUZIDA PELA ALDOSTERONA
EM UM MODELO GENÉTICO DE HIPOMAGNESEMIA: PAPEL DOS
CANAIS TRPM7**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Doutor
em Ciências

Área de concentração: Farmacologia

São Paulo
2009

ÁLVARO YOGI

**MECANISMOS DE REGULAÇÃO E FUNÇÃO CELULAR DO
MAGNÉSIO NA HIPERTENSÃO INDUZIDA PELA ALDOSTERONA
EM UM MODELO GENÉTICO DE HIPOMAGNESEMIA: PAPEL DOS
CANAIS TRPM7**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Doutor
em Ciências

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Dra Rita de Cássia Aleixo
Tostes Passaglia

São Paulo
2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Yogi, Alvaro.

Mecanismos de regulação e função celular do magnésio na hipertensão induzida pela aldosterona em um modelo genético de hipomagnesemia: papel dos canais TRPM7 / Alvaro Yogi. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Hipertensão arterial.

Versão do título para o inglês: Mechanism of regulation and cell function of magnesium in aldosterone-induced hypertension in a genetic model of hypomagnesemia: role of TRPM7.

Descritores: 1. Aldosterona 2. Magnésio 3. Hipertensão arterial 4. Estresse oxidativo 5. Inflamação 6. Rim I. Passaglia, Rita de Cássia Aleixo Tostes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Farmacologia. III. Título.

ICB/SBIB224/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Alvaro Yogi.

Título da Tese: Mecanismos de regulação e função celular do magnésio na hipertensão induzida pela aldosterona em um modelo genético de hipomagnesemia: papel dos canais TRPM7 .

Orientador(a): Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Dedico este trabalho a meus pais Leda e Ioshiaki, minha fonte de inspiração, pelo apoio incondicional em todos os momentos de minha vida.

A meus irmãos, a Bá e minha família por compartilharem todos momentos de alegria, tristeza, vitórias e derrotas.

A Anna Beatriz por sempre acreditar em mim, sua paciência e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Rita Tostes pelo constante ensinamento e inúmeros momentos de apoio, amizade e confiança. Agradeço por numa aula de Farmacologia ter me proporcionado um momento de epifania que mudou meu rumo. A isso serei eternamente grato.

À Dra. Rhian Touyz pela confiança em meu trabalho, pela orientação, inspiração e crítica que tanto contribuíram para a minha formação.

Às Dras. Maria Helena C. de Carvalho, Zuleica B. Fortes, Dorothy Nigro e Lucia R. Lopes pelo apoio, sugestões e suporte acadêmico.

À Dra. Glaucia E Callera, pela grande amizade e ensinamento em todos os momentos. Em especial pelo divertido apoio na finalização da tese.

Aos amigos do laboratório da Dra. Rita Tostes: Andréia, Elke, Fernanda, Fernando, Cris, Patrícia, Débora pela colaboração, ensinamentos e agradável convívio.

Aos amigos do laboratório da Dra. Rhian Touyz: Bia, Mona, Sarah, Hiba, Augusto, Bruno, Nobu, Faïçal, Mahmoud, Carlos, Elisandra, Shaoping, Ying, Fatiha e Jordan que de alguma forma contribuíram para o êxito desse trabalho.

Aos amigos do Grupo de Hipertensão, Eli, Graziela, Stephen, Rodrigo, Fernando, Núbia, Rossana, André, Maria Aparecida pelos momentos agradáveis proporcionados.

À Dra. Luciana V. Rossoni e o laboratório de fisiologia vascular (Ana Paula, Gi, Camila e toda a gangue) pelas reuniões científicas e pizzas pós-reunião.

Aos amigos Manuel, Alice, Antonio, Sonia “Ba”, Martinha, Ritinha, Rosângela por toda ajuda, amizade e momentos de diversão.

Aos amigos do Departamento de Fisiologia e seus churrascos filosóficos.

Aos amigos da turma 99D da FCF-USP pelo companherismo e amizade ao longo dos anos.

Às secretárias do Departamento de Farmacologia, Selma e Julieta pelo auxílio nos assuntos burocráticos.

À FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro dado ao desenvolvimento desse trabalho.

"Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento..."

Clarice Lispector

RESUMO

YOGI A. **Mecanismos de regulação e função celular do magnésio na hipertensão induzida pela aldosterona em um modelo genético de hipomagnesemia**: Papel dos canais TRPM7. 2008. 124 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009

Em células endoteliais (CE) e músculo liso vascular (CMLV), aldosterona regula processos associados ao remodelamento vascular como crescimento, expressão de marcadores inflamatórios e estresse oxidativo. Os mecanismos exatos desses efeitos ainda são desconhecidos, mas é sugerido que o influxo de Mg^{2+} através recém caracterizados TRPM7 seja importante. O objetivo de nosso estudo foi determinar o papel do Mg^{2+} na função celular e hipertensão induzida pela aldosterona em camundongos com níveis normais (MgH) e baixos (MgL) de Mg^{2+} . CE e CMLV isoladas foram estimuladas com aldosterona (10^{-7} mol/L). O influxo de Mg^{2+} e atividade da α -quinase do TRPM7 estavam reduzidas em células vasculares provenientes de camundongos MgL. Esse efeito estava associado à maior atividade da NADPH oxidase e translocação da p47phox mediada pela aldosterona. Em células vasculares de camundongos MgL a fosforilação da c-Src, p38 e ERK1/2, e expressão da Cox-2 e VCAM-1 induzidos pela aldosterona estava aumentados. A inibição farmacológica do TRPM7 com 2-APB aumentou a fosforilação da c-Src, p38 e ERK1/2 e expressão de marcadores pró-inflamatórios em CE e CMLV de camundongos MgH mas não MgL. Em camundongos MgH e MgL a infusão de aldosterona (350 μ g/kg/dia) por 3 semanas aumentou a pressão arterial caudal. Esse efeito foi acompanhado da deposição de colágeno no coração e rins, além de danos na função renal, com tendência a efeitos mais pronunciados em camundongos MgL. O estresse oxidativo sistêmico induzido pela aldosterona foi maior em camundongos MgL quando comparados a MgH. As mudanças na concentração de eletrólitos plasmáticos e urinários foram associadas às alterações na expressão de TRPM7 e TRPM6 nos rins desses animais. Em resumo, a deficiência de Mg^{2+} e inibição do TRPM7 aumentaram a

ativação de vias pró-inflamatórias e fibrogênicas induzidas pela aldosterona. Nós também demonstramos que a infusão de aldosterona é acompanhada de efeitos deletérios sobre o rim e coração, associados ao estresse oxidativo e alterações na concentração de eletrólitos. Esses resultados fornecem novos mecanismos pelos quais aldosterona modula a função celular e ressaltam a importância do Mg^{2+} e seus transportadores nesses processos e na hipertensão induzida pela aldosterona.

Palavras-chave: Magnésio. Aldosterona. TRPM7. Hipertensão.

ABSTRACT

YOGI A. **Mechanism of regulation and cell function of magnesium in aldosterone-induced hypertension in a genetic model of hypomagnesemia: Role of TRPM7.** 2008. 124 p. Ph.D. Thesis – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

In vascular smooth muscle (VSMC) and endothelial cells (EC), aldosterone induces growth, inflammation and oxidative stress. Exact mechanisms underlying aldo-mediated vascular effects remain unclear, but intracellular magnesium (Mg^{2+}) influx through the novel Mg^{2+} transporter, TRPM7 may be important. Here we sought to determine the role of Mg^{2+} in cell function and in aldosterone-induced hypertension in mice genetically bred to have normal (MgH) or low (MgL) intracellular Mg^{2+} levels. Cultured VSMC and EC from MgH and MgL were stimulated with aldosterone (10^{-7} mol/L). Aldosterone-induced Mg^{2+} influx and activity of its α -kinase domain were reduced in vascular cells from MgL mice. This was associated with increased aldosterone-induced NADPH oxidase activity, c-Src and MAPK phosphorylation and expression of VCAM-1 and Cox-2. TRPM7 blockade with 2-APB increased c-Src and MAPKs phosphorylation and expression of pro-inflammatory markers in cells from MgH, but not in MgL mice. In MgH and MgL mice, infusion of aldosterone (350 μ g/kg/day) for 3 weeks increased systolic blood pressure. This was accompanied by increased collagen deposition in the heart and kidney and impaired kidney function with more pronounced effects in MgL mice. Electrolyte concentration changes induced by aldosterone were associated to differential expression of TRPM7 and TRPM6 in the kidney. Sistemic

oxidative stress was increased by aldosterone in MgL mice but not MgH. Findings from the present study demonstrate that Mg^{2+} deficiency and inhibition of TRPM7 amplify aldosterone-induced activation of vascular inflammatory, fibrogenic and growth signaling pathways. We also show that aldosterone infusion in MgH and MgL mice are accompanied by end-organ damage, associated to oxidative stress and changes in electrolytes concentration. Our results provide novel insights into putative mechanisms whereby aldo influences VSMC and EC function and highlights the important role of Mg^{2+} in the development of aldosterone-induced hypertension.

Key words: Magnesium. Aldosterone. TRPM7. Hypertension

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema representativo do controle da homeostase do magnésio (Mg^{2+}) no intestino, ossos e rim	26
Figura 2: Esquema representativo da estrutura do TRPM6 e TRPM7 e as proteínas alvo de seu domínio quinase anexina-1, calpaína e a cadeia pesada II da miosina	32
Figura 3: Efeito da aldosterona sobre o influxo de Mg^{2+} em CE e CMLV de camundongos MgH e MgL	53
Figura 4: Efeito da inibição dos canais TRPM7 pelo 2-APB sobre o influxo de Mg^{2+} induzido pela aldosterona em CMLV	54
Figura 5: Efeito da inibição dos canais TRPM7 pelo 2-APB sobre o influxo de Mg^{2+} induzido pela aldosterona em CE	55
Figura 6: Efeito da aldosterona (10^{-7} mol/L) sobre a expressão protéica da anexina-1 em frações de citosol e membrana de CE	57
Figura 7: Efeito da aldosterona sobre a expressão protéica da calpaína em frações de citosol e membrana de CE	58
Figura 8: Efeito da inibição dos canais TRPM7 com 2-APB sobre a expressão protéica da anexina-1 induzida pela aldosterona em fração de citosol e membrana de CE e CMLV de camundongos MgH e MgL	59
Figura 9: Efeito da inibição dos canais TRPM7 com 2-APB sobre a expressão protéica da calpaína induzida pela aldosterona em frações de citosol e membrana de CE e CMLV	60

Figura 10: Expressão protéica do canal TRPM7 em CE e CMLV	62
Figura 11: Expressão protéica do canal TRPM6 em CE e CMLV	62
Figura 12: Efeito da aldosterona sobre a expressão protéica do TRPM7 em CE e CMLV	63
Figura 13: Efeito da aldosterona sobre a expressão protéica do TRPM6 em CE e CMLV	64
Figura 14: Efeito da aldosterona (10^{-7} mol/L) sobre a expressão protéica da p47phox em frações de citosol e membrana de CE e CMLV	66
Figura 15: Efeito da aldosterona sobre a atividade da NAD(P)H oxidase em CE e CMLV	67
Figura 16: Fosforilação da c-Src induzida pela aldosterona em CE e CMLV	68
Figura 17: Fosforilação da ERK1/2 induzida pela aldosterona em CE e CMLV	69
Figura 18: Fosforilação da p38MAPK induzida pela aldosterona em CE e CMLV	70
Figura 19: Efeito da aldosterona sobre a expressão protéica da VCAM-1 em CE e CMLV	71
Figura 20: Efeito da aldosterona sobre a expressão protéica da Cox-2 em CE e CMLV	72

Figura 21: Efeito do 2-APB sobre a fosforilação da c-Src induzida pela aldosterona em CE e CMLV	74
Figura 22: Efeito da inibição dos canais TRPM7 com 2-APB sobre a fosforilação da ERK1/2 induzida pela aldosterona em CE e CMLV	76
Figura 23: Efeito da inibição dos canais TRPM7 com 2-APB sobre a fosforilação da p38MAPK induzida pela aldosterona em CE e CMLV	77
Figura 24: Efeito da inibição dos canais TRPM7 com 2-APB sobre a expressão protéica da VCAM-1 induzida pela aldosterona em CE e CMLV	79
Figura 25: Efeito da inibição dos canais TRPM7 com 2-APB sobre a expressão protéica da Cox-2 induzida pela aldosterona em CE e CMLV	80
Figura 26: Efeito da inibição dos canais TRPM7 com 2-APB sobre a expressão protéica da p47phox em frações de citosol e membrana de CE e CMLV	82
Figura 27: Efeito da inibição dos canais TRPM7 com 2-APB sobre a atividade da NAD(P)H oxidase induzida pela aldosterona	83
Figura 28: Evolução temporal da pressão arterial caudal.....	84
Figura 29: Concentração plasmática de Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} e Cl^- em camundongos MgH e MgL antes e após o tratamento com aldosterona	87
Figura 30: Concentração urinária de Mg^{2+} , K^+ , Na^+ e Cl^- em camundongos MgH e MgL antes e após o tratamento com aldosterona.....	88
Figura 31: Índice de hipertrofia cardíaca e renal induzida pela aldosterona	89

Figura 32: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do coração de animais tratados com aldosterona	91
Figura 33: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do rim de animais tratados com aldosterona	92
Figura 34: Efeitos do tratamento com aldosterona sobre a excreção de albumina na urina	93
Figura 35: Efeito do tratamento com aldosterona sobre a expressão protéica do TRPM7 no coração e rins	95
Figura 36: Efeito do tratamento com aldosterona sobre a expressão protéica do TRPM6 (A) e paracelina-1 em rins	96
Figura 37: Efeito do tratamento com aldosterona sobre a concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de anticorpos primários e seus respectivos anticorpos secundários	49
--	----

Tabela 2: Efeitos do tratamento com aldosterona sobre a pressão arterial caudal e a massa copórea de camundongos MgH e MgL	85
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

[Mg²⁺]_i - Concentração intracelular de magnésio
2-APB - 2-aminoetoxidifenil borato
ADP - Adenosina difosfato
ATP - Adenosina trifosfato
Ca²⁺ - Íons cálcio
CE - Células endoteliais
Cl⁻ - Íons cloreto
CMLV - Células de músculo liso vascular
Cox-2 - Ciclooxygenase-2
DMEM - Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMEM CE - Meio de seleção para células endoteliais
EGFR - Receptor para fator de crescimento epidermal
eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial
ERO - Espécies reativas de oxigênio
FBS - Soro bovino fetal
GAPDH - Gliceraldeído fosfato desidrogenase
ICAM-1- Molécula de adesão intercelular 1
IL-6 - Interleucina-6
K⁺ - Íons potássio
MAPKs - Proteínas quinase ativadas por mitógenos
Mg²⁺ - Íons magnésio
Na⁺ - Íons sódio
NAD(P)H oxidase - *Nicotine adenine dinucleotide phosphate*
NF-κB - Fator nuclear kappa B
NO - Óxido nítrico
PAI-1 - Inibidor de ativação do plasminogênio-1
PIP2 - Fosfatidilinositol bifosfato
PKC - Proteína quinase C
PLC - Fosfolipase C

RM - Receptores para mineralocorticóides
SGK-1 - Quinase induzida por soro e glicocorticóide
SHR - Ratos espontaneamente hipertensos
SRAA - Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TBARS - Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
TRP - Receptores transientes de potencial
TRPA - Receptores transientes de potencial anquirina
TRPC - Receptores transientes de potencial canônicos
TRPM6 - Receptores transientes de potencial da melastatina 6
TRPM7 - Receptores transientes de potencial da melastatina 7
TRPML - Receptores transientes de potencial mucolipina
TRPP - Receptores transientes de potencial policistina
TRPV - Receptores transientes de potencial vaniloide
VCAM-1- Molécula de adesão de célula vascular 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Regulação da homeostase de Mg^{2+}	23
1.2 Controle renal da homeostase de Mg^{2+}	24
1.3 Outros mecanismos envolvidos na homeostase de Mg^{2+}	25
1.4 Efeitos bioquímicos e fisiológicos do magnésio	26
1.5 Mecanismos moleculares da regulação de Mg^{2+}	27
1.5.1 Efluxo de magnésio	27
1.5.2 Influxo de magnésio	28
1.6 Canais de Receptores Transientes de Potencial	28
1.6.1 Os canais TRPM	29
1.7 Aldosterona e a regulação de Mg^{2+} na hipertensão.....	33
2 OBJETIVOS.....	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1 Hipertensão induzida pela aldosterona	38
3.1.1 Animais experimentais	38

3.1.2 Modelo MgH e MgL	38
3.1.3 Grupos experimentais	39
3.1.4 Indução de hipertensão arterial	39
3.1.5 Medida da pressão arterial.....	39
3.1.6 Determinação da massa corpórea.....	40
3.1.7 Estudo da hipertrofia cardíaca e renal induzida pela aldosterona.....	40
3.1.7.1 Morfologia cardíaca e renal.....	40
3.1.7.2 Estudo histológico.....	41
3.1.8 Estudo da função renal.....	41
3.1.8.1 Amostras de urina.....	41
3.1.8.2 Excreção de albumina na urina.....	41
3.1.8.3 Excreção de creatinina na urina.....	41
3.1.9 Determinação de eletrólitos plasmáticos e urinários.....	42
3.1.9.1 Coleta de amostras de sangue.....	42
3.1.9.2 Determinação das concentrações de Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺.....	42

3.1.10 Estudo dos efeitos do tratamento com aldosterona sobre a expressão protéica de transportadores de Mg^{2+} e MAPKs nos rins e coração de camundongos MgH e MgL	42
3.1.10.1 Extrato total.....	42
3.1.10.2. Imunoblot.....	43
3.1.11 Determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	43
3.2 Efeitos da aldosterona em células endoteliais e de Músculo Liso Vascular	44
3.2.1 Isolamento de células de músculo liso vascular.....	44
3.2.2 Isolamento de células endoteliais.....	45
3.2.3 Estímulo de CE e CMLV.....	46
3.2.4 Extração de proteínas.....	47
3.2.5 Isolamento de frações de citosol e membrana.....	47
3.2.6 Imunoblot.....	48
3.2.7 Estudo do influxo de Mg^{2+} induzido pela aldosterona.....	50
3.2.8 Avaliação da atividade da NADPH oxidase pelo método de quimioluminescência da lucigenina.....	51
3.3 Análise estatística	51

4 RESULTADOS	52
4.1 Efeitos da estimulação com aldosterona sobre células vasculares de camundongos Mgh E Mgl	52
4.1.1 Influxo de Mg^{2+} induzido pela aldosterona em CE e CMLV	52
4.1.2 Translocação da anexina-1 e calpaína do citosol para a membrana induzida pela aldosterona	55
4.1.3 Expressão protéica dos canais TRPM6 e TRPM7 em CE e CMLV	61
4.1.4 Efeito da aldosterona sobre a atividade da NAD(P)H oxidase.....	64
4.1.4.1 Translocação da p47phox do citosol para a membrana.....	64
4.1.4.2 Atividade da NAD(P)H oxidase induzida pela aldosterona	66
4.1.5 Efeito da aldosterona sobre a fosforilação da c-Src.....	67
4.1.6 Efeito da aldosterona sobre a fosforilação de MAPKs (ERK$^{1/2}$ e p38 MAPK)	68
4.1.7 Efeito da aldosterona sobre a expressão de marcadores pró-inflamatórios (Cox-2 e VCAM-1)	70
4.2 Efeitos da inibição do Trpm7 sobre os efeitos mediados pela aldosterona em células vasculares provenientes de camundongos Mgh E Mgl	72

4.2.1 Efeito da inibição do TRPM7 sobre a fosforilação da c-Src.....	73
4.2.2 Efeito da inibição do TRPM7 sobre a fosforilação de MAPKs (ERK1/2, p38MAPK) induzida pela aldosterona	75
4.2.3 Efeito da inibição do TRPM7 sobre a expressão de marcadores pró-inflamatório (VCAM – Cox-2	78
4.2.4 Efeito da inibição do TRPM7 sobre a translocação da p47phox do citosol para a membrana.....	81
4.2.5 Efeito da inibição do TRPM7 sobre a atividade da NAD(P)H oxidase.....	82
4.3 Efeitos do tratamento com aldosterona em camundongos Mgh E Mgl	84
4.3.1 Efeito do tratamento com aldosterona sobre a pressão arterial caudal	84
4.3.2 Avaliação da massa corpórea dos camundongos MgH e MgL	85
4.3.3 Concentrações plasmáticas e urinárias de Mg^{2+}, K^+, Na^+ Ca^{2+} e Cl^-.....	85
4.3.4 Efeito do tratamento com aldosterona sobre a massa do coração e do rim.....	89

4.3.5 Análise de cortes histológicos do coração e rim de animais tratados com aldosterona.....	90
4.3.6 Efeitos do tratamento com aldosterona sobre a microalbuminúria.....	92
4.3.7 Estudo da expressão de transportadores de Mg ²⁺ no coração e rins.....	93
4.3.8 Estudo do estresse oxidativo induzido pela aldosterona.....	96
5 DISCUSSÃO.....	97
6 CONCLUSÃO.....	110
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial é uma das patologias com maior prevalência no mundo moderno e também um grande fator de risco sobre a mortalidade e morbidade mundial (ANDERSON et al., 2007). O aumento na pressão arterial é associado a mudanças funcionais e estruturais da vasculatura, coração e rins que podem levar a doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral e insuficiência renal crônica (SCHIFFRIN et al., 2004a; SCHIFFRIN et al., 2004b). A forma mais comum de aumento na pressão arterial é a “hipertensão primária”, cuja causa ainda permanece desconhecida. Muitos fatores contribuem para a patogênese da hipertensão primária como o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), o consumo de sal, a hiperativação do sistema nervoso simpático e alterações nas concentrações de íons como o magnésio (Mg^{2+}) (SCHIFFRIN et al., 2004a; AVIV et al., 2002; RESNICK et al., 1997; RESNICK et al., 1983).

1.1 Regulação da homeostase do magnésio

Magnésio é o segundo cátion intracelular com maior concentração, após o potássio, e o cátion divalente mais abundante no corpo humano (RUBIN et al., 2007; GRUBBS et al., 1987; ALTURA et al., 1985). Um adulto saudável possui em média 1000 mmol (24 g) de Mg^{2+} , sendo que 60% estão armazenados nos ossos, e os 40% restantes distribuídos entre músculo esquelético e outros tecidos, como coração e fígado (ROMANI et al., 2007; ELIN et al., 1994). Essa fração tecidual de Mg^{2+} está em geral ligada à adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), proteínas, RNA, DNA, fosfolípidos carregados negativamente e citrato (MURPHY et al., 2000). Desse total, somente 2-3% não estão complexados, no entanto essa pequena fração é crítica para a regulação de diversas funções celulares (ROMANI et al., 2007; RUBIN et al., 2007; MURPHY et al., 2000).

As concentrações séricas normais de Mg^{2+} são mantidas numa faixa estreita (0,7-1,1 mmol/L) (ROMANI et al., 2007; RUBIN et al., 2007). Esse balanço

é regulado pela interação entre a absorção intestinal, a reabsorção e excreção renal e o equilíbrio ósseo de íons Mg^{2+} . Por sua vez, esse controle pode ser influenciado pela aldosterona, hormônios paratireoidiano e tireoidianos, entre outros; ou drogas como diuréticos, aminoglicosídeos, digoxina e ciclosporina; além situações de hipercalemia ou expansão do volume extracelular (SABATIER et al., 2003; INNERARITY et al., 2000).

1.2 Controle renal da homeostase do Mg^{2+}

A regulação renal de Mg^{2+} ocorre ao longo dos néfrons (COLE et al., 2000). Aproximadamente 80% de Mg^{2+} sérico livre total são filtrados pelos glomérulos. Desse total 15% são reabsorvidos no túbulo proximal, 70% no ramo ascendente da alça de Henle e 15% no túbulo contorcido distal. O ramo ascendente da alça de Henle e o túbulo contorcido distal são alvos de ação do hormônio paratireoidiano, insulina, aldosterona, prostaglandina e drogas como diuréticos, que afetam a excreção de Mg^{2+} (COLE et al., 2000). A maior parte dos íons Mg^{2+} filtrado é reabsorvida no ramo ascendente da alça de Henle por mecanismos paracelulares via paracelina-1, que está presente nas junções entre células epiteliais (SIMON et al., 1999). Mutações que levam à perda da atividade da paracelina-1 reduzem a permeabilidade ao Mg^{2+} , levando a uma profunda perda desse cátion na urina (SIMON et al., 1999).

Embora somente 15% de Mg^{2+} filtrado sejam reabsorvidos no túbulo contorcido distal, essa região determina a concentração final desse íon na urina, uma vez que sua reabsorção não ocorre após esse segmento (QUAMME et al., 1997). A reabsorção no túbulo contorcido distal ocorre de maneira ativa e por um mecanismo transcelular. Essa via consiste no transporte apical dirigido por um gradiente eletroquímico favorável seguido da sua extrusão contra o gradiente eletroquímico na face basolateral. Estudos em pacientes com doenças hereditárias relacionadas a uma maior perda de Mg^{2+} na urina identificaram que o transporte apical desse cátion envolve um canal iônico específico para Mg^{2+} . Essa proteína foi recentemente identificada como canais de receptores transientes de potencial da melastatina (*transient receptor potential melastatin*, TRPM) 6 e 7

(TRPM6 e TRPM7, respectivamente) (SCHLINGMANN et al., 2007; SCHMITZ et al., 2004). De fato, o TRPM6 está presente na porção apical das células epiteliais do túbulo contorcido distal e sua expressão gênica está aumentada em situações de hipomagnesemia, demonstrando a importância desse canal na reabsorção ativa de Mg^{2+} (RONDÓN et al., 2008).

1.3 Outros mecanismos envolvidos na homeostase de Mg^{2+}

A absorção intestinal de Mg^{2+} ocorre principalmente no jejuno e no íleo. Esse processo envolve ao menos dois tipos de transporte. A maior parte do Mg^{2+} é absorvida por uma rota paracelular (SCHWEIGEL et al., 2000; KAYNE et al., 1993). O transportador responsável por esse processo, assim como nos rins, é também a paracelina-1. Outro mecanismo pelo qual o Mg^{2+} é absorvido é através de vias transcelulares. Esse mecanismo ocorre principalmente pelo transportador Na^+/Mg^{2+} (SCHWEIGEL et al., 2000; JUTTNER et al., 1998). Canais específicos para Mg^{2+} também parecem estar envolvidos na via transcelular de absorção. Os recém identificados TRPM6 e TRPM7 estão presentes não apenas túbulos renais, mas também no epitélio intestinal. Foi demonstrado que pacientes com mutações nos canais TRPM6 possuem uma menor absorção intestinal de magnésio e hipomagnesemia (SCHLINGMANN et al., 2002).

Figura 1: Esquema representativo do controle da homeostase do magnésio (Mg^{2+}) no intestino, ossos e rim.

A maior parte do Mg^{2+} no corpo está nos ossos (MARTINI et al., 1999). Uma fração desse reservatório está em equilíbrio com o Mg^{2+} extracelular. Quando as concentrações séricas de Mg^{2+} diminuem, ocorre saída rápida desse cátion da superfície dos ossos (MARTINI et al., 1999). De maneira contrária, quando os níveis séricos de Mg^{2+} estão elevados, o mesmo liga-se à superfície dos ossos. Cerca de 30% do Mg^{2+} ósseo pode ser rapidamente envolvido nesse equilíbrio (RUDE et al., 1998). Por isso esse reservatório tem função importante de tampão controlador das concentrações extracelulares de Mg^{2+} .

1.4 Efeitos bioquímicos e fisiológicos do magnésio

Magnésio é um cofator para mais de 300 reações enzimáticas, particularmente aquelas associadas à transferência, armazenamento e transporte de energia (RUBIN et al., 2007). Esse íon é necessário para reações envolvendo a

hidrólise e transferência do grupamento fosfato e quando complexado ao ATP é um substrato para outras proteínas da via de sinalização como quinases e fosfatases. Ele também é um componente intrínseco da Na^+, K^+ -ATPase, HCO_3^- -ATPase e $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase regulando assim o transporte de sódio (Na^+), potássio (K^+), prótons e cálcio (Ca^{2+}) (GABRIEL et al., 2007; RYAN et al., 1991).

1.5 Mecanismos moleculares da regulação do Mg^{2+}

Pequenas mudanças na concentração intracelular de Mg^{2+} ($[\text{Mg}^{2+}]_i$) podem modular a atividade de diversos processos e vias de sinalização que regulam a função celular. Sendo assim, a $[\text{Mg}^{2+}]_i$ deve ser estritamente controlada por mecanismos regulatórios sobre o seu influxo, efluxo, o seu tamponamento intracelular e sua compartimentalização. Embora o Mg^{2+} seja tão abundante no citoplasma e importante para tantos processos biológicos, pouco se sabe sobre os mecanismos que controlam o influxo e efluxo de Mg^{2+} das células. Sistemas que estão associados ao transporte de Mg^{2+} entre a membrana celular incluem os trocadores $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ e $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ e os recém identificados TRPM6 e TRPM7 (SCHLINGMANN et al., 2007; SCHMITZ et al., 2007; ROMANI et al., 2007a; MONTEILH-ZOLLER et al., 2003; SCHMITZ et al., 2005; SCHMITZ et al., 2004).

1.5.1 Efluxo de magnésio

O efluxo do Mg^{2+} envolve mecanismos dependentes e independentes do co-transporte de Na^+ . O processo dependente de Na^+ é mediado principalmente pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$, enquanto os mecanismos independentes envolvem a troca do Mg^{2+} por outros íons extracelulares como o Ca^{2+} , pelo trocador $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, o Mn^{2+} pelo trocador $\text{Mn}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, e cloro (Cl^-) através do co-transporte com o $\text{Mg}^{2+}/\text{Cl}^-$ (GUNTHER et al., 2007; FEILLET-COUDRAY et al., 2006; EBEL et al., 2005). O trocador $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ está presente em diversas células do sistema cardiovascular como células de músculo liso vascular (CMLV) e cardiomiócitos. O transporte de Mg^{2+} pode ser modulado por múltiplos agentes como angiotensina II (Ang II), vasopressina, isoproterenol, endotelina-1 (ET-1) e insulina (TOUYZ et al., 2003;

EBEL et al., 2005; GUNTHER et al., 1992). Os mecanismos de extrusão de Mg^{2+} independentes de Na^+ foram demonstrados em eritrócitos e células hepáticas, mas não vasculares (GUNTHER et al., 2007; GUNTHER et al., 1992).

1.5.2 Influxo de magnésio

Ao contrário de outros íons como o Na^+ , Ca^{2+} e K^+ , pouco se conhece sobre os mecanismos que regulam o influxo de magnésio. Estudos funcionais sugerem que o influxo de Mg^{2+} nas células ocorre pelo co-transporte com outros íons utilizando o gradiente eletroquímico do Na^+ e através de canais para cátions. Ao menos 7 canais para Mg^{2+} foram clonados. O primeiro dessa categoria caracterizado foi o Mrs2p (KOLISEK et al., 2003). Outras proteínas envolvidas no transporte de Mg^{2+} incluem o SLC41A1, SLC41A2, MagT1 e ACDP2 (SAHNI et al., 2007; SCHMITZ et al., 2007), identificadas pela análise de genes cuja expressão está aumentada em condições de hipomagnesemia. Embora essas moléculas tenham sido descritas no sistema cardiovascular, o significado biológico e os mecanismos regulatórios dessas vias ainda são desconhecidas. Recentemente dois novos transportadores específicos para o magnésio foram identificados. Eles pertencem à família dos canais de receptores transientes de potencial (TRP) e foram identificados durante a elucidação dos mecanismos moleculares responsáveis por defeitos hereditários na homeostase do Mg^{2+} (SCHLINGMANN et al., 2007; SCHLINGMANN et al., 2002; SCHLINGMANN et al., 2004).

1.6 Canais de Receptores Transientes de Potencial

Os canais TRP são uma família de canais iônicos com uma topologia semelhante a dos canais sensíveis ao potencial de membrana. Eles possuem 6 domínios transmembrânicos e são capazes de formarem homo ou heterotetrâmeros (PEDERSEN et al., 2005; CLAPHAM et al., 2003). Os canais TRP são ativados por estímulos múltiplos como fatores físicos (temperatura, voltagem, fatores mecânicos), químicos (pH, íons), humorais (bradicinina, Ang II, aldosterona) e proteínas de cascatas de sinalização como a proteína quinase C

(*protein kinase C*, PKC) (PEDERSEN et al., 2005; CLAPHAM et al., 2003). A família dos canais TRP consiste de diversos canais para cátions, presentes em diversos tecidos, sendo a maioria permeável a cátions monovalentes e divalentes (HSU et al., 2007; PEDERSEN et al., 2005; CLAPHAM et al., 2003). Até o presente momento 28 canais TRP foram identificados e eles estão divididos em 6 subfamílias: canais TRPC (canônicos), TRPV (vanilóide), TRPM (melastatina), TRPP (policistina), TRPML (mucolipina), TRPA (anquirina).

1.6.1 Os canais TRPM

O nome da subfamília TRPM é baseado no primeiro membro descoberto dessa classe, o TRPM1 cujo gene foi identificado a partir de melanomas (DUNCAN et al., 1998). Os membros dessa família são divididos em 4 grupos: TRPM1/3, TRPM2/8, TRPM4/5 e TRPM6/7 (MONTELL et al., 2006; KRAFT et al., 2005). Os canais TRPM exibem uma alta variabilidade quanto a sua permeabilidade a cátions, sendo desde impermeáveis ao Ca^{2+} (TRPM4/5) como altamente permeáveis ao Mg^{2+} e ao Ca^{2+} (TRPM6/7).

O TRPM2 está presente principalmente no cérebro e é um canal para cátions não seletivo, sendo permeável a Na^+ , Ca^{2+} , K^+ e césio (Cs^+). Esse canal pode ser ativado por peróxido de hidrogênio (H_2O_2), atuando como um sensor do estado oxiredutor da célula, e está associado à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e ao influxo de Ca^{2+} e morte celular mediada pelo fator de necrose tumoral-alfa ($\text{TNF-}\alpha$) (PERRAUD et al., 2004; HARA et al., 2002). O TRPM3 é encontrado nos rins e cérebro e é um canal para cátions permeável a íons divalentes, principalmente Ca^{2+} e Mn^{2+} . O TRPM4 está presente principalmente no coração, pâncreas e placenta, enquanto o TRPM5 é encontrado na língua, pulmão, testículo, cérebro e trato gastrointestinal (FONFRIA et al., 2006). Os canais TRPM4 e TRPM5 transportam íons monovalentes, porém são impermeáveis ao Ca^{2+} (EARLEY et al., 2004). O TRPM8, presente nos nervos sensoriais e na próstata, age como um canal intracelular para Ca^{2+} . Esse canal pode ser ativado por baixas temperaturas ou drogas que causam sensação de frio como o mentol ou andrógenos (STORY et al., 2006).

O TRPM6 e TRPM7 transportam preferencialmente Mg^{2+} com baixa afinidade para o Ca^{2+} e outros cátions divalentes (SCHLINGMANN et al., 2007). O TRPM7 está presente em diversos tecidos, sendo essencial para a sobrevivência celular, uma vez que a deleção do seu gene em linhagens celulares é letal (ABED 2007). Já a expressão protéica do TRPM6 é alta nos rins e intestino tendo assim um papel fundamental na absorção e excreção do Mg^{2+} (CHUBANOV et al., 2005a; CHUBANOV et al., 2005b; VOETS et al., 2004). TRPM6 e TRPM7 possuem homologia de 50% em sua sequência e são constitutivamente ativos. Outra característica importante desses canais é a capacidade de formar complexos homo e heteroméricos (SCHMITZ et al., 2005). Os canais TRPM6, TRPM7 e o complexo TRPM6/7 são canais iônicos distintos que exibem diferentes graus de permeabilidade a cátions divalentes, sensibilidade ao pH e condutância. Do ponto de vista funcional, TRPM6 e TRPM7 não são redundantes e a perda da função de um não pode ser compensada pelo outro canal. Isso é evidenciado pelo fato de pacientes com deficiência na atividade do TRPM6 possuírem hipomagnesemia mesmo na presença do TRPM7 (SCHMITZ et al., 2005; SCHMITZ et al., 2004).

Do ponto de vista estrutural, TRPM6 e TRPM7 são únicos. Esses canais possuem não apenas uma região que atua como canal iônico, no caso um poro permeável ao Mg^{2+} , mas também, em sua terminação carboxílica, um domínio com atividade de quinase (Figura 2) (SCHMITZ et al., 2004; CLAPHAM et al., 2003). O papel desse domínio de quinase na regulação desses canais ainda é incerto. Alguns estudos demonstraram que essa região é crítica para a atividade do canal (TAKEZAWA et al., 2004; RUNNELS et al., 2002) enquanto outros sugerem que a quinase não é essencial para sua função (SCHMITZ et al., 2004). A disparidade nesses resultados pode ser explicada em parte pelo fato desses estudos terem sido realizados em diferentes linhagens de células imortalizadas.

O domínio quinase do TRPM6 e TRPM7 possui uma sequência similar a serina/treonina quinase eEF2 e outras proteínas que contém um domínio α -quinase. Embora a quinase do TRPM6 fosforile regiões específicas no TRPM7, outros substratos dessa quinase não são conhecidos. Até o presente momento 3 substratos para a quinase do TRPM7 foram identificados, anexina-1, cadeia

pesada da miosina IIA e calpaína (CLARK et al., 2006; SU et al., 2006; DOROVKOV et al., 2004).

Miosina é uma proteína motora que interage com a actina convertendo energia química em força mecânica, movendo assim a célula durante processos como a contração, citocinese e migração (VOGEL et al., 2006). Proteínas de cascata de sinalização como a PKC e a caseína quinase II fosforilam a cadeia pesada da miosina II (MURAKAMI et al., 1998). Mutações nas vias que controlam a atividade dessa proteína levam a alterações no citoesqueleto e na geometria celular. Essas modificações interferem com diversos processos celulares como o crescimento, diferenciação e morte celular (VOGEL et al., 2006). Estes efeitos contribuem para o desenvolvimento de diversas patologias como insuficiência cardíaca, aterosclerose e hipertensão (INGBER et al., 2003).

Anexina-1, também conhecida como lipocortina-1, está envolvida no controle do crescimento e diferenciação celular (CROXTALL et al., 1992) e ativação de cascatas de sinalização e liberação de ácido araquidônico (CROXTALL et al., 2000; MOSS et al., 1995). Anexina-1 regula os efeitos mediados por glicocorticóides sobre a migração de leucócitos, inflamação crônica e aguda, isquemia dor e febre. De fato, glicocorticóides regulam a síntese, fosforilação e disposição celular da anexina-1 (YANG et al., 2004; LA et al., 2001); FERREIRA et al., 1997; PERRETTI et al., 1996; DAVIDSON et al., 1991).

Calpaína é um membro da família de proteases ativadas por Ca^{2+} (SUZUKI et al., 2004). Embora sua ação seja seletiva a determinados domínios, essa protease atua em seqüência inespecífica de aminoácidos em seu local de clivagem. Sua atividade pode gerar grandes fragmentos proteicos que podem ser ativos em condições fisiológicas. Um exemplo clássico é a clivagem do domínio da PKC mediada pela calpaína. Esse fragmento é ativo mesmo na ausência de Ca^{2+} ou diacilglicerol (SUZUKI et al., 1992). Essa protease regula diversos eventos mediados por Ca^{2+} como a ativação de cascatas de sinalização, proliferação, progressão do ciclo celular, diferenciação, apoptose, fusão de membranas e ativação plaquetária (GOLL et al., 2003).

Os fatores que regulam a expressão e atividade do TRPM6 e TRPM7 ainda estão sendo investigados. Estudos demonstraram que fosfatidilinositol bifosfato

(*phosphatidylinositol biphosphate*, PIP2) e trifosfato de adenosina (*adenosine triphosphate*, ATP) modulam a atividade do TRPM7 (MUBAGWA et al., 2007; ROHACS et al., 2007). O TRPM7 pode interagir diretamente com diversas isoformas da fosfolipase C (phospholipase C, PLC), como a PLC γ e PLC β . Esse evento pode ser fundamental para a ativação desse canal mediada por receptores acoplados à proteína G. Agentes que modulam o tônus e a estrutura vascular como a aldosterona modulam a atividade e expressão gênica do TRPM7 e TRPM6 (TOUYZ et al, 2006). No entanto, sua habilidade em ativar o domínio quinase do TRPM7 e os efeitos dessa ativação sobre a função celular ainda são desconhecidos.

Figura 2: Esquema representativo da estrutura do TRPM6 e TRPM7 e as proteínas alvo de seu domínio quinase anexina-1, calpaína e a cadeia pesada II da miosina.

1.7 Aldosterona e a regulação de Mg^{2+} na hipertensão

O SRAA tem papel importante na patologia da hipertensão e de doenças cardiovasculares. Renina é um polipeptídeo secretado pelas células justaglomerulares do rim que catalisa a clivagem de angiotensinogênio em angiotensina I. Essa por sua vez, pela atividade da enzima conversora de angiotensina, é convertida em Ang II.

A Ang II é o principal efector do SRAA e um importante alvo da terapia anti-hipertensiva, por regular pressão arterial, volume plasmático e atividade do sistema nervoso simpático. Entre os vários eventos mediados por esse peptídeo está a liberação de aldosterona, principal responsável no controle hidro-eletrolítico no organismo.

Aldosterona é um mineralocorticoide sintetizado a partir do colesterol, através de uma série de reações enzimáticas, na zona glomerular da glândula adrenal. Sua síntese também foi observada em outros locais como o coração e vasos (TAKEDA et al., 2000; SKØTT et al., 2006).

A ação clássica da aldosterona ocorre nos rins mais especificamente nas células tubulares. Esses efeitos ditos genômicos estão associados à interação da aldosterona com receptores de mineralocorticóides (RM) intracelulares, que pertencem à família de fatores de transcrição regulados por ligantes, e a transcrição e síntese protéica (FULLER et al., 2005). Esses mecanismos, associados à atividade de outras moléculas como a quinase induzida por soro e glucocorticoide (*serum and glucocorticoid-induced kinase-1*, SGK-1), K-Ras2A e capsaicina induzem aumento na atividade e expressão protéica de canais para Na^+ e K^+ e da Na^+,K^+ -ATPase (FULLER et al., 2005; ROGERSON et al., 2000). A saída de K^+ da célula é resultado das mudanças no gradiente eletroquímico e ocorre concomitantemente com a perda de hidrogênio (H^+). Desta maneira, as ações clássicas da aldosterona estão associadas a aumento na pressão arterial, hipocalemia e alcalose. No entanto, em função de diversos estudos demonstrando os efeitos da aldosterona sobre outros tecidos que não as células epiteliais renais atualmente há grande interesse em seus efeitos sobre as alterações vasculares presentes na hipertensão e doenças cardiovasculares. De fato, em diversas

patologias é observado aumento na expressão protéica de RM em células endoteliais (CE) e CMLV (FULLER et al., 2005, JAFFE et al., 2005; TAKEDA et al., 1997).

Aldosterona exerce uma série de ações por meio de uma via não genômica. Alguns estudos sugerem que esses efeitos são mediados por receptor de membrana diferente do RM clássico (SKØTT et al., 2006). Isso porque os efeitos rápidos da aldosterona não são observados após ativação de RM por outros agonistas como o cortisol e também porque nem todos antagonistas desses receptores são capazes de inibir essa resposta (FUNDER et al., 2005; WEHLING et al., 1991). Em geral, a resposta máxima dessa via ocorre dentro de minutos e envolve a ativação de mensageiros secundários. Essa via não genômica está associada à modulação das concentrações intracelulares de Ca^{2+} e adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (*cyclic adenosine monophosphate*, AMPc) e à atividade do trocador Na^+/H^+ (MICHEA et al., 2005). Também foi observado que a aldosterona pode ativar diversas proteínas de cascatas de sinalização como a PKC, o receptor para fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor receptor*, EGFR), proteínas quinase ativadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinases*, MAPKs) e a tirosina quinase não acoplada aos receptores c-Src (CALLERA et al., 2005; KRUG et al., 2003; LIU et al., 2003; STOCKAND et al., 2003). Aldosterona também está associada à maior geração de ERO (NISHIYAMA et al., 2004).

Em células vasculares, a principal fonte de ERO é a enzima NAD(P)H oxidase (*nicotine adenine dinucleotide phosphate*) (TOUYZ et al., 2004; TOUYZ et al., 2003) que catalisa a redução de um elétron de uma molécula de oxigênio, usando o NADH ou NADPH como doador, para formar ânion superóxido.

A NAD(P)H oxidase possui uma fração ligada à membrana, o citocromo b558, formado pela gp91phox (Nox2) e pela p22phox. Além disso, três subunidades citoplasmáticas, p47phox, p67phox e p40phox, e uma proteína G regulatória (rac1 ou rac2) devem migrar para a membrana a fim de formarem o complexo enzimático ativo. Em condições basais, as oxidases vasculares produzem ânion superóxido de maneira lenta e contínua de tal forma que essa ERO funciona como molécula sinalizadora influenciando fatores de transcrição

nuclear e outras vias de sinalização redox-sensíveis. O aumento na produção de ânion superóxido pela NAD(P)H oxidase contribui para as alterações funcionais e morfológicas observadas na hipertensão (TOUYZ et al., 2004).

De fato, Callera e colaboradores observaram que em células vasculares de ratos espontaneamente hipertensos (*spontaneously hypertensive rat*, SHR) a geração de ERO pela NAD(P)H oxidase e a fosforilação de MAPKs induzida pela aldosterona está aumentada (CALLERA et al., 2005). Esse resultado está associado à maior ativação de vias pró-fibróticas, sugerindo assim que aldosterona tem um importante papel nas alterações vasculares observadas em animais hipertensos.

Estudos clínicos indicam aumento no risco de eventos cardiovasculares em pacientes com hiperaldosteronismo. Níveis plasmáticos elevados de aldosterona são associados à hipertrofia do ventrículo esquerdo (ROSSI et al., 1997), prolongamento no intervalo PQ do eletrocardiograma (ROSSI et al., 1997), maior rigidez dos vasos sanguíneos (STRAUCH et al., 2006), fibrose tecidual (REMUZZI et al., 2008) e remodelamento de artérias de resistência (ENDEMANN et al., 2004). O hiperaldosteronismo também é associado a alterações eletrolíticas como hipocalcemia, hipernatremia e hipomagnesemia (AHOKAS et al., 2005; RUNYAN et al., 2005).

As alterações nas concentrações plasmáticas de Na^+ e K^+ podem ser explicadas pelos efeitos clássicos da aldosterona sobre o rim. No entanto, a causa da menor concentração plasmática de Mg^{2+} e de sua maior excreção na urina ainda são desconhecidas. Diversas evidências indicam que a hipomagnesemia contribui para os efeitos deletérios observados na hipertensão. A importância desse evento na progressão das patologias associadas à maior concentração plasmática de aldosterona pode ser exemplificada pelo fato de os danos no sistema cardiovascular presentes nessa situação serem revertidos não só pelo tratamento com os bloqueadores de RM, espironolactona e eplerenona, mas também pela administração de Mg^{2+} . (BO et al., 2008; TOUYZ et al., 2002; TOUYZ et al., 1999)

O ion Mg^{2+} possui propriedades antioxidantes e antiinflamatórias que podem atenuar os efeitos deletérios do estresse oxidativo e da inflamação

vascular presentes em diversas doenças cardiovasculares (TOUYZ et al., 2003b; TOUYZ et al., 2002; WEGLICKI et al., 1996; WEGLICKI et al., 1992). Estudos com animais alimentados com dieta deficiente em Mg^{2+} indicam que eles apresentam maior geração de ERO via NAD(P)H oxidase, disfunção endotelial, remodelamento vascular, maior ativação de vias de sinalização e expressão de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-6 (IL-6) e o TNF- α (MARTIN et al., 2008; TOUYZ et al., 2002; WEGLICKI et al., 1996; WEGLICKI et al., 1994). A importância do Mg^{2+} nesses processos pode ser ilustrado pelo fato da suplementação de Mg^{2+} na dieta desses animais prevenir não apenas os efeitos citados anteriormente mas também o aumento da pressão arterial em animais hipertensos (TOUYZ et al., 2002).

Até o presente momento não está claro qual o efeito da ativação dos canais TRPM7 em células vasculares e seu papel nas alterações morfológicas e funcionais presentes na hipertensão. Estudos clínicos indicam que o hiperaldosteronismo está associado não somente ao aumento na pressão arterial, fibrose tecidual e inflamação vascular, mas também à hipomagnesemia. Os mecanismos celulares da depleção de Mg^{2+} e seu impacto sobre a função vascular e danos em órgãos alvo ainda são desconhecidos. O fato do canal TRPM7 apresentar um domínio de quinase em sua estrutura sugere que essa proteína participa não apenas do controle da $[Mg^{2+}]_i$, mas também de cascatas de sinalização pela ativação de seus substratos anexina-1, calpaína e cadeia pesada da miosina II. Com base nessas observações, nossa hipótese de trabalho é que a menor $[Mg^{2+}]_i$ decorrente da atividade reduzida dos canais TRPM7 e/ou TRPM6 contribui para alterações na função de células vasculares. Isso está associado à maior ativação de cascatas de sinalização pró-fibróticas e pró-inflamatórias e ao estresse oxidativo mediados pela aldosterona. Num contexto fisiológico, a deficiência na homeostase do Mg^{2+} está associada ao aumento de pressão arterial e efeitos deletérios nos rins e coração em um modelo de hipertensão induzido pela aldosterona.

2 OBJETIVOS

Investigar os mecanismos de ação da aldosterona e a participação dos canais TRPM7 em células vasculares provenientes de animais com deficiência genética na homeostase de Mg^{2+} , denominados MgL, e seus respectivos controles, denominados MgH. Paralelamente, realizar caracterização *in vivo* dos efeitos da aldosterona sobre esse modelo de hipomagnesemia.

Dentre os objetivos específicos foram avaliados os seguintes parâmetros.

A. Estudo *in vitro*

1. Avaliar o efeito da aldosterona sobre a ativação dos canais TRPM7.
2. Avaliar o efeito do TRPM7 sobre a atividade da NAD(P)H oxidase induzida pela aldosterona.
3. Avaliar o efeito do TRPM7 sobre a fosforilação de proteínas de cascata de sinalização induzida pela aldosterona.
4. Avaliar o efeito do TRPM7 sobre a expressão protéica de marcadores pró-inflamatórios induzida pela aldosterona.

B. Estudo *in vivo*

5. Avaliar o efeito do tratamento com aldosterona sobre a pressão arterial e a função renal em um modelo animal de hipomagnesemia.
6. Avaliar o efeito do tratamento com aldosterona sobre o estresse oxidativo sistêmico em animais com deficiência genética na homeostase de Mg^{2+} .
7. Avaliar o efeito do tratamento com aldosterona sobre a expressão protéica de moléculas responsáveis pelo transporte de Mg^{2+} .

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Hipertensão induzida por aldosterona

3.1.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos machos MgH e MgL, com 12 semanas, e massa corpórea entre 25 e 30 g, provenientes do Biotério Central da Universidade de Ottawa. Os animais foram mantidos em temperatura controlada, ciclos claro/escuro, 60% de umidade e alimentados com ração padrão e água *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados neste trabalho estão de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Ottawa.

3.1.2 Modelo MgH e MgL

O modelo genético de deficiência na homeostase do Mg^{2+} foi gerado pela seleção bidirecional de híbridos obtidos pelo cruzamento de 4 diferentes linhagens (HENROTTE 1988). Camundongos C57/Bl6, DBA/2, C3H/Eb e AKR foram acasalados aleatoriamente. Na segunda geração desse acasalamento as concentrações citosólicas de Mg^{2+} nas hemáceas foram medidas e os camundongos com baixos níveis desse eletrólito foram separados dos com níveis normais. Os animais foram acasalados dentro de cada um desses subgrupos. A diferença entre a concentração de Mg^{2+} nas hemácias nos descendentes do grupo com níveis normais e baixos aumentou com o passar das gerações. Essa diferença mostrou-se estabilizada a partir da décima quarta geração. A linhagem com baixos de Mg^{2+} foi denominada MgL (*low magnesium*). Os animais do segundo subgrupo foram denominados MgH (*high magnesium*), embora apresentem níveis normais de Mg^{2+} . Essa foi a denominação original desses animais e a mesma sempre foi utilizada nos estudos publicados desde então (HENROTTE et al., 1988).

3.1.3 Grupos experimentais

Foram utilizados os seguintes grupos experimentais:

MgH + Veículo → Camundongos MgH que receberam injeções subcutâneas diárias de óleo mineral por 3 semanas.

MgH + Aldosterona (Aldo) → Camundongos MgH que receberam injeções subcutâneas diárias de aldosterona (350 µg/kg/dia) por 3 semanas.

MgL + Veículo → Camundongos MgL que receberam injeções subcutâneas diárias de óleo mineral por 3 semanas.

MgL + Aldosterona (Aldo) → Camundongos MgL que receberam injeções subcutâneas diárias de aldosterona (350 µg/kg/dia) por 3 semanas.

3.1.4 Indução de hipertensão arterial

Camundongos MgH e MgL com 12 semanas de idade foram pesados e tiveram a pressão arterial caudal aferida. Durante 3 semanas os animais receberam injeções subcutâneas de aldosterona (350 µg/kg/dia) diluída em 0,1 mL de óleo mineral. A dose foi ajustada a cada 2 dias de acordo com o ganho de massa corpórea de cada animal. Os animais do grupo Veículo também receberam injeções subcutâneas diárias de 0,1 mL de óleo mineral. A confirmação da eficácia da indução da hipertensão arterial foi detectada pelo aumento da pressão arterial caudal após 4 dias de tratamento.

3.1.5 Medida da pressão arterial

A pressão arterial caudal dos grupos experimentais foi determinada por método indireto, pela pletismografia de cauda. Essa medida foi realizada diariamente durante as 3 semanas de tratamento. Cinco dias antes da primeira medida da pressão arterial caudal os camundongos foram submetidos a um período de adaptação que envolvia sua imobilização em

câmaras de contenção sobre a chapa aquecida a 37 °C por 10 minutos. Este procedimento foi realizado uma vez ao dia por 5 dias.

Após o período de adaptação foram determinados os níveis pressóricos dos animais. Os camundongos foram imobilizados em câmaras de contenção sobre uma chapa aquecida a 37 °C. Um oclisor e um sensor foram ajustados a porção proximal da cauda do camundongo e acoplados a um esfigmomanômetro elétrico conectado a um sistema de transdução (BP-2000, Visitech Systems). O valor final da pressão arterial caudal representa a média de no mínimo 10 medidas consecutivas.

3.1.6 Determinação da massa corpórea

Para avaliarmos se o tratamento com aldosterona (350 µg/kg/dia) ou óleo mineral induziu alterações na massa corpórea dos animais e a fim de corrigirmos a dose de aldosterona administrada a cada animal, os mesmos foram pesados diariamente cinco dias antes e durante todo o período de tratamento.

3.1.7 Estudo da hipertrofia cardíaca e renal induzida pela aldosterona

3.1.7.1 Morfologia cardíaca e renal

Ao final do protocolo experimental os animais foram anestesiados com isofluorano, o coração e o rim removidos e lavados com solução tampão fosfato salina (PBS) contendo NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM), Na₂HPO₄ (4,3 mM) e KH₂PO₄ (1,47 mM). Os tecidos adjacentes foram retirados e o excesso de PBS retirado com auxílio de papel de filtro. Somente então os órgãos foram pesados.

A hipertrofia cardíaca e renal foi avaliada pela massa dos órgãos (massa úmida). Os resultados foram expressos pela relação entre a massa do coração ou rim e a massa corpórea do animal (mg/g).

3.1.7.2 Estudo histológico

Após a determinação da massa do coração e do rim, os mesmos foram cortados e imersos em solução de metacarn (composição em %: etanol 60; clorofórmio 30; ácido acético glacial 10) por 24 horas. As peças foram incluídas em parafina e em cada peça realizou-se cortes de 5 µm de espessura.

Os cortes foram montados em lâmina de vidro, corados pelo método de Picrosirius e examinados por microscopia óptica convencional em microscópio Zeiss Axio Image A1 (Carl Zeiss, Alemanha). A deposição de colágeno, correspondente a área corada positivamente em vermelho intenso, foi analisada sob aumento de 20 vezes.

3.1.8 Estudo da função renal

3.1.8.1 Amostras de urina

Amostras de urina isolada foram coletadas dos animais no início e ao final do tratamento e armazenadas em freezer a -80 °C para posterior análise.

3.1.8.2 Excreção de albumina na urina

Microalbuminúria foi detectada por ensaio imuno-absorvente ligado à enzima (ELISA) pelo *kit* comercial *Albuwell* (Exocell, Philadelphia, PA, EUA).

3.1.8.2 Excreção de creatinina na urina

A excreção da creatinina na urina foi realizada por método colorimétrico pelo *kit* comercial *The Creatinine Companion* (Exocell, Philadelphia, PA, EUA).

3.1.9 Determinação de eletrólitos plasmáticos e urinários

3.1.9.1 Coleta de amostras de sangue

Amostras de sangue foram colhidas da veia safena no início e por punção cardíaca ao final do tratamento. O sangue foi colocado em tubos heparinizados e centrifugados a 1500 rpm, durante 10 minutos a 4 °C. O plasma foi armazenado a -80 °C até a sua utilização.

3.1.9.2 Determinação das concentrações de Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺

Concentrações de Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺ e Cl⁻ em amostras de sangue e urina foram determinadas por analisador semi-automático Synchron CX Clinical Systems (Beckman Coulter, CA, EUA).

3.1.10 Estudo dos efeitos do tratamento com aldosterona sobre a expressão protéica de transportadores de Mg²⁺ e MAPKs nos rins e coração de camundongos MgH e MgL

3.1.10.1 Extrato total

Os camundongos foram anestesiados com isoflurano e os rins e coração removidos, dissecados, pesados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C. O tecido ainda congelado foi pulverizado em almagamador TP-103 COE CaoMixer (GC America Inc., Alsip, IL, EUA) e homogeneizado em tampão contendo Tris (50mM), NP40 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1%, ortovanadato de sódio (Na₃VO₄) (2 mM), fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) (1 mM), leupeptina (1 ug/mL), aprotinina (1 ug/mL) e pepstatina (1 ug/mL) em pH 7,4.

Os extratos foram centrifugados a 15000 g por 10 minutos a 4°C para a remoção de material insolúvel. Após a centrifugação a concentração protéica

foi quantificada utilizando o método de Lowry (BioRad, CA, EUA). As amostras foram tratadas com tampão de Laemmli contendo β -mercaptoetanol e aquecidas a 100 °C por 5 minutos.

3.1.10.2. Imunoblot

Trinta μ g de proteína total foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) por 1,5 horas a 100V em aparelho para mini-gel (Mini Protean III, Bio-Rad, CA, EUA). A seguir as proteínas foram eletricamente transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, CA, USA) a 100V por 1 hora e 40 minutos. A eficácia da transferência foi verificada pela coloração vermelho de Ponceau. As membranas foram incubadas em tampão tris salina (TBS-T) contendo Tris (10 mM), NaCl (150 mM), Tween 20 (0.02%) e leite desnatado (5%) por 1 hora para reduzir a ligação inespecífica dos anticorpos às proteínas na membrana. Após o bloqueio as membranas foram incubadas com anticorpo primário (Tabela 1) por 12 horas a 4 °C.

A seguir as membranas foram incubadas com anticorpo secundário ligado a peroxidase (Jackson Immuno Research Laboratories Inc, PA, EUA) por 1,5 horas. Os sinais foram revelados pela exposição das membranas a solução de quimioluminescência (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, IL, EUA). As mesmas foram então expostas por intervalos de tempo variados a um filme de Raios-X. Depois de reveladas, as bandas foram submetidas à análise densitométrica óptica utilizando o programa Scion Image (ScionCorp, EUA). Os resultados foram normalizados pela expressão do GAPDH ou pela forma não fosforilada da proteína.

3.1.11 Determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Um dos métodos para quantificação dos produtos da peroxidação lipídica é o método de análise da formação de substâncias plasmáticas que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este método consiste na análise dos

produtos finais da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeídos e demais aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagirem com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), formam bases de Schiff. Tais complexos são coloridos e sua concentração pode ser determinada espectrofotometricamente a 535nm.

As amostras para este ensaio foram preparadas adicionando: 100 µL de amostras de plasma, 100 µL de água deionizada, 12 µL de solução 2% de hidroxitolueno butilado (BHT, preparado em etanol) e 400 µL de solução 25 mmol/L de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 15% de ácido tricloroacético (TCA) preparado ácido clorídrico 0,25 mol/L.

As amostras foram aquecidas a 100 °C por 15 minutos e em seguida centrifugadas a 3000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e a absorbância lida a 535 nm em placa de 96 poços com espectrofotômetro ELX-808 (BioTek, VT, EUA). O cálculo da concentração de TBARS foi feito por meio de uma curva padrão de bis-malonaldeído (MDA) e representada como nmol/mL de plasma.

3.2. Efeitos da aldosterona em células endoteliais e de músculo liso vascular

3.2.1 Isolamento das células de músculo liso vascular

Cinco camundongos MgH ou MgL foram anestesiados com isoflurano e os leitos mesentéricos isolados, lavados com PBS e mantidos em meio de cultura F-12 (pH 7,2) contendo gentamicina (10 µg/L), Hepes (4,76 g/L), penicilina/estreptomicina (100UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de gentamicina), L-glutamina (0,292 g/L) e bicarbonato de sódio (1,176 g/L). O tecido adiposo foi removido mecanicamente e os leitos mesentéricos incubados em 12,5 mL de solução enzimática composta por F-12 a 37 °C contendo 25 mg de albumina de soro bovino (BSA, tipo IV), 25 mg de colagenase, 1,5 mg de elastase e 4,5 mg de inibidor de tripsina. A digestão enzimática foi realizada sob agitação constante a 37 °C durante 30 minutos.

A dispersão das células foi realizada delicadamente por repetidas aspirações com seringa e agulha (20G). A suspensão obtida foi centrifugada durante 5 minutos a 1200 rpm e ressuspendida em 10 mL de meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 10% de soro bovino fetal (FBS) (Wisent, QC, Canada). As células foram então distribuídas em frascos de cultura celular e mantidas em estufa com atmosfera de CO₂ 5% a 37 °C por 24 horas para sedimentação e aderência. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas até as células atingirem confluência de 90 a 100%, sendo então desprendidas da superfície do frasco utilizando solução de tripsina-EDTA (1x). Esse processo caracteriza uma passagem. Para a realização dos experimentos foram utilizadas células nas passagens 4-7 em confluência de 90-100% com 6 a 8 dias de cultivo. A viabilidade das células em suspensão foi testada com azul de tripam (5 mg/mL) preparado em solução salina. Para o cultivo, foram utilizadas suspensões de células com viabilidade acima de 90%.

3.2.2 Isolamento das células endoteliais

Células endoteliais de aorta foram isoladas, como descrito previamente (SUH et al., 1999). Cinco camundongos MgH ou MgL foram anestesiados com isoflurano e as aortas isoladas, lavadas com PBS e mantidas em meio de cultura F-12 (pH 7,2) contendo gentamicina (10 µg/L), Hepes (4,76 g/L), penicilina/estreptomicina (100UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de gentamicina), L-glutamina (0,292 g/L) e bicarbonato de sódio (1,176 g/L). O tecido conectivo foi cuidadosamente removido para evitar danos às células endoteliais. O vaso foi aberto longitudinalmente e cortado em secções de 2 a 3 mm de comprimento. Os explantes de aorta foram colocados em placa de 6 poços previamente coberta com Matrigel (BD Biosciences, NJ, EUA) com a face luminal voltada para baixo. A cada poço foi adicionado uma pequena quantidade de meio de seleção para células endoteliais (DMEM CE) para a adesão dos explantes de aorta ao substrato. Esse meio é constituído de DMEM (Gibco, NY, EUA), FBS (10%), fator de crescimento para células

endoteliais (0,3 mg/L) (BD Biosciences, MA, EUA), heparina (10 U/mL) (Organon Teknik, ON, Canada), penicilina/estreptomicina (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de gentamicina) (Gibco, NY, EUA), L-glutamina (1x, Gibco, NY, EUA) e aminoácidos essenciais (1x, GIBCO, NY, EUA). Adição do fator de crescimento para células endoteliais promove o crescimento deste tipo celular enquanto a heparina possui propriedades anti-proliferativas.

Após 4 ou 5 dias os explantes de aorta foram retirados da Matrigel e as células que migraram permaneceram em crescimento por 5 dias ou até atingirem a confluência de 90 a 100%. As células endoteliais foram recuperadas da Matrigel com dispase (Becton Dickison, MA, EUA) por 1 minuto e então ressuspensas em DMEM CE e distribuídas em frascos (150 cm³) de cultura. Para a realização dos experimentos foram utilizadas células nas passagens 4-7 em confluência de 90-100% com 6 a 8 dias de cultivo. A natureza das células isoladas foi verificada pela presença do fator de Von Willebrand.

3.2.3 Estímulo de CE e de MLV

Antes dos protocolos experimentais as células foram mantidas por 16 horas em DMEM ou DMEM CE em ausência de FBS (estimulação curta) ou na concentração de 0,5% (estimulação longa). Esse procedimento foi adotado para tornarem as células quiescentes. As CE e de MLV foram estimuladas com aldosterona (10^{-7} mol/L) nos tempos de 1, 5, 10, 15, 30 e 60 minutos para a análise das cascatas de sinalização e 2, 4, 8, 16 e 24 horas para a expressão de marcadores pró-inflamatórios. Para os experimentos com a inibição farmacológica dos canais TRPM7 as células foram previamente incubadas com 2-aminoetoxidifenil borato (2-APB, 10^{-5} mol/L) por 2 horas. As concentrações foram determinadas após a realização de experimentos preliminares e correspondem ao efeito máximo obtido.

3.2.4 Extração de proteínas

Após as estimulações, o meio de cultura foi descartado e as células lavadas três vezes com PBS gelado. O tampão de lise celular foi composto de pirofosfato de sódio (50 mM), NaF (50 mM), NaCl (5 mM), EDTA (5 mM), EGTA (5 mM), Hepes (10 mM), Triton 100 (0,5%), Na_3VO_4 (2 mM), PMSF (1 mM), leupeptina (1 ug/mL), aprotinina (1 ug/mL) e pepstatina (1 ug/mL). 100 μL desse tampão foram adicionados as placas de Petri e as células foram extraídas mecanicamente. Em seguida as amostras foram sonicadas três vezes por três segundos e incubadas em gelo por 30 minutos. Após esse período, o lisado celular foi centrifugado a 15000 g, a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C. A concentração protéica das amostras foi determinada pelo método de Lowry (Bio-Rad, EUA).

3.2.5 Isolamento de frações de citosol e membrana

Para o isolamento de frações de citosol e membrana, as células foram estimuladas por 1, 5 e 30 minutos e lisadas em tampão contendo Tris (50 mM), EDTA (2 mM), PMSF (1 mM), Na_3VO_4 (2 mM), leupeptina (1 ug/mL), aprotinina (1 ug/mL) e pepstatina (1 ug/mL). Centrifugação prévia de 500 g por 10 minutos a 4 °C foi realizada para a remoção do núcleo. As amostras foram então submetidas a 100.000 g por 1 hora em ultracentrífuga Optima MAX (Beckman Coulter, CA, EUA). A fração de citosol corresponde ao sobrenadante enquanto o sedimento é a fração de membrana. Foi utilizado tampão contendo Tris (50 mM), EDTA (2mM), NaCl (300 mM), Triton 100 (1%), SDS (0,1%), PMSF (1mM), Na_3VO_4 (2mM), leupeptina (1 ug/mL), aprotinina (1 ug/mL) e pepstatina (1 ug/mL) para a ressuspensão da fração de membrana.

3.2.6 Imunoblot

Utilizando a técnica de imunoblot foi analisada a expressão protéica e a fosforilação de algumas quinases das cascatas de sinalização ativadas pela aldosterona. Os equipamentos e soluções são semelhantes aos utilizados no item 3.9.2. Os anticorpos primários e secundários estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1: Lista de anticorpos primários e seus respectivos anticorpos secundários

Anticorpo primário (diluição)	Anticorpo secundário (diluição)	Companhia
TRPM7 (1:4000)	Coelho (1:10000)	Gentilmente cedido pelo Dr. Thomas Gudermann
TRPM6 (1:1000)	Coelho (1:5000)	Abcam, MA, EUA
Anexina-1 (1:1000)	Coelho (1:2000)	Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA
Calpaína (1:1000)	Coelho (1:2000)	Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA
VCAM-1 (1:1000)	Coelho (1:2000)	Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA
GAPDH (1:4000)	Camundongo (1:40000)	Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA
Paracelina-1 (1:500)	Cabra (1:2000)	Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA
ERK 1/2 (1:2000)	Coelho (1:2000)	Cell Signaling, MA, EUA
fosfo ERK 1/2 Thr ²⁰² /Tyr ²⁰⁴ (1:2000)	Coelho (1:2000)	Cell Signaling, MA, EUA
p38MAPK (1:1000)	Coelho (1:2000)	Cell Signaling, MA, EUA
Fosfo p38MAPK Thr ¹⁸⁰ /Tyr ¹⁸² (1:1000)	Coelho (1:2000)	Cell Signaling, MA, EUA
Fosfo c-Src Tyr ⁵²⁷ (1:1000)	Coelho (1:2000)	Cell Signaling, MA, EUA
c-Src (1:1000)	Camundongo (1:2000)	Upstate, MA, EUA
Cox-2 (1:1000)	Coelho (1:2000)	Cayman, MI, EUA
p47phox (1:500)	Coelho (1:2000)	Gentilmente cedido pelo Dr Mark Quinn

3.2.7 Estudo do influxo de Mg^{2+} induzido pela aldosterona

Para este experimento foram utilizadas células em confluência intermediária (70%) aderidas a lamínulas de vidro. Para o início do carregamento, DMEM foi substituído por solução de Hanks contendo NaCl (137 mM), $NaHCO_3$ (4,2 mM), Na_2HPO_4 (3 mM), KCl (5,4 mM), KH_2PO_4 (0,4 mM), $CaCl_2$ (1,3 mM), $MgCl_2$ (0,5 mM), $MgSO_4$ (0,8 mM), glicose (5,5 mM) e Hepes (5 mM) em pH 7,4. A sonda fluorescente utilizada foi o Mag Fura-2 acetoximetil éster (AM) (Invitrogen, OR, EUA) em solução estoque 1 mM diluída em 0,01% de ácido plurônico F-127 em DMSO. A adição do acetoximetil éster à molécula do Fura permite que a sonda fluorescente atravessasse a membrana celular. Uma vez dentro das células esse grupamento é clivado por esterases intracelulares, gerando o Mag-Fura-2, um indicador de Mg^{2+} pentacarboxilado. Este procedimento associado à utilização do ácido plurônico favorece a incorporação da molécula do Mag Fura-2 AM. As células foram incubadas com solução de Hanks aquecida contendo 2 μ M de Mag-Fura durante 10 min em estufa com atmosfera de CO_2 5%, a 37 °C.

Após o período de carregamento, a lamínula foi montada em câmara aquecida a 37 °C. As células foram lavadas durante 5 min por perfusão contínua de solução de Hanks aquecida em fluxo de 1 mL/min, para total desesterificação do Mag Fura-2 AM incorporado e para eliminação do Mag Fura-2 AM não incorporado.

A câmara contendo as células foi acoplada a um microscópio invertido, equipado para epifluorescência. Nos protocolos experimentais para a medida da $[Mg^{2+}]_i$ a aldosterona (10^{-7} mol/L) diluída em solução de Hanks foi infundida com bomba peristáltica em fluxo de 1,5 mL/min.

As células foram excitadas com luz proveniente de uma lâmpada de Xenônio (75 Watts), em comprimentos de onda alternados em 340 e 380 nm, por um conjunto de filtros inseridos em um dispositivo controlado por computador. A fluorescência emitida pelas células foi detectada por um fotomultiplicador após a passagem por um espelho dicróico para comprimento de onda de 510 nm. Os sinais de emissão foram captados,

armazenados e processados em computador. Para cada protocolo experimental 6 a 8 células foram isoladas na janela do fotomultiplicador. Os resultados foram expressos como a razão da fluorescência obtida em ambas as excitações (340/380 nm).

3.2.8 Avaliação da atividade da NADPH oxidase pelo método de quimioluminescência da lucigenina

A atividade da NADPH oxidase foi determinada pelo aumento da quimiluminescência da lucigenina. A reação de luminescência entre ânion superóxido e a lucigenina (5 μ M) foi detectada por luminômetro Orion II Microplate Detector (Berthold Detection Systems GmbH, Alemanha) durante a incubação do lisado de células estimuladas com aldosterona na presença de NADPH. Os extratos celulares foram preparados em tampão fosfato contendo KH_2PO_4 (50 mM), EGTA (1mM), sacarose (150 mM) em pH 7,4. Os valores foram obtidos a partir da subtração do valor basal (obtido pela medida do lisado celular, tampão fosfato mais lucigenina) pelo valor obtido após a adição de NADPH. Foram realizados 30 ciclos de leitura durante 3 minutos. Cinco μ L de cada amostra foram separados e o conteúdo protéico analisado pelo método de Lowry. Os resultados foram normalizados pela concentração protéica de cada amostra e expressos como percentual de aumento relativo em relação ao veículo.

3.3 Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados obtidos na pressão arterial caudal foi utilizado o teste One-way ANOVA para dados repetidos, seguido do teste de Kramer-Tukey para comparação entre os grupos. Para as demais análises foram utilizados os testes One-Way ANOVA e Kramer-Tukey ou teste T-student quando apropriado. Em todos os resultados apresentados adotou-se 5% como limite de significancia estatística ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos da estimulação com aldosterona sobre células vasculares de camundongos Mgh E Mgl

4.1.1 Influxo de Mg^{2+} induzido pela aldosterona em CE e CMLV

A sonda fluorescente Mag FURA-2 AM foi utilizada para determinação do influxo de Mg^{2+} como índice da ativação dos canais TRPM7 mediada pela aldosterona.

A medida da razão dos comprimentos de onda de excitação da sonda Mag FURA-2 AM indicou que a aldosterona (10^{-7} mol/L) promoveu o aumento da $[Mg^{2+}]_i$ em CMLV (Figura 3). Esse resultado foi observado tanto nas células provenientes de camundongos Mgh como Mgl. No entanto, em células vasculares provenientes dos camundongos com baixos níveis de Mg^{2+} esse efeito estava reduzido.

O aumento na $[Mg^{2+}]_i$ induzido pela aldosterona provavelmente é mediado por mecanismos dependentes dos canais TRPM7. Isso porque o pré-tratamento das células com o inibidor desses canais, 2-aminoetoxidifenil borato (2-APB, 10^{-5} mol/L), inibe o influxo de Mg^{2+} induzido pela aldosterona em CMLV (Figura 4).

Resultados similares foram observados em CE, onde o influxo de Mg^{2+} induzido pela aldosterona está reduzido em células provenientes de camundongos Mgl (Figura 3) e esse efeito foi inibido pelo 2-APB (Figura 5).

Figura 3: Efeito da aldosterona sobre o influxo de Mg^{2+} em CE e CMLV de camundongos MgH e MgL. A) Imagens representativas do influxo de Mg^{2+} induzido pela aldosterona (Aldo) em CE e CMLV. B) Gráfico de barras representando valores da média $\pm$ EPM da razão 340/380 nm em CMLV. C) Gráfico de barras representando valores da média $\pm$ EPM da razão 340/380 nm em CE. * $P < 0,01$ comparado com os valores basais, # $P < 0,05$ comparados com células provenientes de camundongos MgH estimuladas com aldosterona ($n=7$ por grupo).

Figura 4: Efeito da inibição dos canais TRPM7 pelo 2-APB sobre o influxo de Mg^{2+} induzido pela aldosterona em CMLV. A) Imagens representativas do influxo de Mg^{2+} induzido pela aldosterona em CMLV de camundongos MgH e de MgL. B) Gráfico de barras representando valores da média $\pm$ EPM da razão 340/380 nm em CMLV de camundongos MgH. C) Gráfico de barras representando valores da média $\pm$ EPM da razão 340/380 nm em CMLV de camundongos MgL. * $P < 0,01$ comparado com os valores basais, # $P < 0,05$ comparado com células provenientes de camundongos MgH estimuladas com aldosterona ($n=7$ por grupo).

Figura 5: Efeito da inibição dos canais TRPM7 pelo 2-APB sobre o influxo de Mg^{2+} induzido pela aldosterona em CE. A) Imagens representativas do influxo de Mg^{2+} induzido pela aldosterona em CE de camundongos MgH e de MgL. B) Gráfico de barras representando valores da média $\pm$ EPM da razão 340/380 nm em CE de camundongos MgH. C) Gráfico de barras representando valores da média $\pm$ EPM da razão 340/380 nm em CE de camundongos MgL. * $P < 0,01$ comparado com os valores basais, # $P < 0,05$ comparado com células provenientes de camundongos MgH estimuladas com aldosterona ($n=7$ por grupo).

4.1.2 Translocação da anexina-1 e calpaína do citosol para a membrana induzida pela aldosterona

Anexina-1 e calpaína são substratos do domínio quinase do TRPM7 presentes no citosol na forma inativa. A ativação dessas proteínas é

associada a translocação das mesmas para a membrana celular. Dessa maneira, a translocação da anexina-1 e calpaína de frações citosólicas para a membrana foi utilizada como índice de sua ativação mediada pelo TRPM7. Os resultados foram representados como razão da expressão protéica dessas moléculas em fração de membrana sobre a expressão em fração de citosol. O aumento desse valor caracteriza o processo de translocação.

Aldosterona (10^{-7} mol/L) induziu aumento no conteúdo protéico da anexina-1 em frações de membrana em CMLV (Figura 6). Esse aumento foi rápido, com efeito máximo logo após 5 minutos de estímulo e significativamente maior em células provenientes dos camundongos MgH em comparação aos MgL.

Aldosterona também aumentou a expressão de calpaína, outro substrato conhecido do TRPM7, em frações de membrana de CMLV, de maneira semelhante ao observado para a anexina-1, (Figura 7). Novamente, esse efeito foi maior em células vasculares provenientes de camundongos MgH quando comparados as células de animais MgL. Esse efeito é rápido, com resposta máxima em 1 minuto e transitório, retornando a valores basais após 5 minutos.

O aumento na expressão da anexina-1 e calpaína em frações de membrana induzido pela aldosterona é mediado por mecanismos dependentes da ativação dos canais TRPM7. O pré-tratamento de CMLV com 2-APB (10^{-6} mol/L) inibiu a translocação da anexina-1 (Figura 8) e da calpaína (Figura 9) induzida pela aldosterona em células vasculares provenientes de camundongos MgH. A inibição dos canais TRPM7 com 2-APB não alterou a translocação da anexina-1 e calpaína em CMLV provenientes de camundongos MgL, onde nós já havíamos observado que a atividade do canal TRPM7 estava reduzida.

Resultados semelhantes para os efeitos da aldosterona e o papel do TRPM7 na translocação da anexina-1 em CMLV (Figuras 6 e 8) foram observados em CE.

Em CE a translocação da calpaína induzida pela aldosterona (Figuras 7, 9), ao contrário do observado para CMLV, permaneceu aumentada mesmo após 30 minutos de estímulo.

Figura 6: Efeito da aldosterona (10^{-7} mol/L) sobre a expressão protéica da anexina-1 em frações de citosol e membrana de CE (A) e CMLV (B). Paineis superiores: Imagens representativas da expressão protéica da anexina-1 em frações de citosol e membrana. Paineis inferiores: Gráfico de barras representando os valores da média $\pm$ EPM da razão membrana/citosol da expressão protéica de anexina-1 em relação ao estímulo das células com veículo (100%) ($n=5$ a 7 por grupo). * $P<0,05$ comparado com células estimuladas com veículo, # $P<0,05$ comparado com células provenientes de camundongos MgH estimuladas com aldosterona.

Figura 7: Efeito da aldosterona (10^{-7} mol/L) sobre a expressão protéica da calpaína em frações de citosol e membrana de CE (A) e CMLV (B). Painei superior: Imagens representativas da expressão protéica da calpaína em frações de citosol e membrana. Painei inferior: Gráfico de barras representando os valores da média $\pm$ EPM da razão membrana/citosol da expressão protéica de calpaína em relação ao estímulo das células com veículo (100%). * $P < 0,05$ comparado com células estimuladas com veículo, # $P < 0,05$ comparado com células provenientes de camundongos MgH estimuladas com aldosterona (n=5 a 7 por grupo).

Figura 8: Efeito da inibição dos canais TRPM7 com 2-APB sobre a expressão protéica da anexina-1 induzida pela aldosterona (10^{-7} mol/L) em fração de citosol e membrana de CE (A, B) e CMLV (C, D) de camundongos MgH e MgL. Paineis superiores: Imagens representativas da expressão protéica da anexina-1 em fração de citosol e membrana. Paineis inferiores: Gráfico de barras representando os valores da média $\pm$ EPM da razão membrana/citosol da expressão protéica de anexina-1 em relação ao estímulo das células com veículo (100%). * $P < 0,05$ comparado com células estimuladas com veículo, # $P < 0,05$ comparado com células provenientes de camundongos MgH estimuladas com aldosterona na ausência de 2-APB (n=5 a 7 por grupo).

Figura 9: Efeito da inibição dos canais TRPM7 com 2-APB sobre a expressão protéica da calpaína induzida pela aldosterona (10^{-7} mol/L) em frações de citosol e membrana de CE (A, B) e CMLV (C, D) de camundongos MgH e MgL. Painel superior: Imagens representativas da expressão protéica da calpaína em frações de citosol e membrana. Painel inferior: Gráfico de barras representando os valores da média $\pm$ EPM da razão membrana/citosol da expressão protéica de anexina-1 em relação ao estímulo das células com veículo (100%). * $P < 0,05$ comparado com células estimuladas com veículo, # $P < 0,05$ comparado com células provenientes de camundongos MgH estimuladas com aldosterona na ausência de 2-APB (n=5 a 7 por grupo).

4.1.3 Expressão protéica dos canais TRPM6 e TRPM7 em CE e CMLV

Nós questionamos se a redução dos efeitos mediados pelo TRPM7 em células vasculares provenientes de camundongos MgL não poderia ser decorrente de diferenças na expressão protéica desse canal.

Em CMLV não estimuladas provenientes de camundongos MgH e MgL a expressão protéica do canal TRPM7 (Figura 10) e TRPM6 (Figura 11) é similar. Nós também observamos que estimulação de CMLV (Figura 12) com aldosterona (10^{-7} mol/L) aumenta a expressão protéica do canal TRPM7 em células provenientes dos animais MgH, mas não MgL. Esse efeito é obtido dentro de 2 horas e esses valores permanecem aumentados após 24 horas de estímulo. Aldosterona não modula a expressão do TRPM6 em CMLV de camundongos MgH ou MgL (Figura 13).

Em CE os valores basais e a modulação da expressão protéica do TRPM7 e TRPM6 pela aldosterona foram semelhantes ao observado em CMLV (Figuras 10, 11, 12, 13).

Figura 10: Expressão protéica do canal TRPM7 em CE (A) e CMLV (B), não estimuladas, provenientes de camundongos MgH e MgL. Painel superior: Imagens representativas da expressão protéica do canal TRPM7. Painel inferior: Gráfico de barras representando valores da média $\pm$ EPM da quantificação da expressão protéica do TRPM7 em relação a expressão protéica do GAPDH (n=9 por grupo).

Figura 11: Expressão protéica do canal TRPM6 em CE (A) e CMLV (B), não estimuladas, provenientes de camundongos MgH e MgL. Painel superior: Imagens representativas da expressão protéica do canal TRPM6. Painel inferior: Gráfico de barras representando valores da média $\pm$ EPM da quantificação da expressão protéica do TRPM6 em relação a expressão protéica do GAPDH (n=9 por grupo).

Figura 12: Efeito da aldosterona sobre a expressão protéica do TRPM7 em CE (A) e CMLV (B) de camundongos MgH e MgL. Paineis superiores: Imagens representativas da expressão protéica do TRPM7 em células estimuladas com aldosterona (10^{-7} mol/L). Paineis inferiores: Gráfico de linhas referente a quantificação da expressão protéica do TRPM7 em relação a expressão protéica do GAPDH e em relação ao veículo (100%). Símbolos representam média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ comparados com células provenientes de camundongos MgH estimuladas com aldosterona (n=5 a 7 por grupo).

Figura 13: Efeito da aldosterona sobre a expressão protéica do TRPM6 em CE (A) e CMLV (B) de camundongos MgH e MgL. Paineis superiores: Imagens representativas da expressão protéica do TRPM6 em células estimuladas com aldosterona (10^{-7} mol/L). Painel inferior: Gráfico de linhas referente a quantificação da expressão protéica do TRPM6 em relação a expressão protéica do GAPDH e em relação ao veículo (100%). Símbolos representam média $\pm$ EPM (n=5 a 7 por grupo).

4.1.4 Efeito da aldosterona sobre a atividade da NAD(P)H oxidase

4.1.4.1 Translocação da p47phox do citosol para a membrana

A enzima NAD(P)H oxidase é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio em células vasculares. Para que esse complexo se torne ativo é necessária a translocação de subunidades citosólicas como a p47phox para

a membrana. Dessa maneira, a translocação dessa proteína pode ser usada como índice da ativação dessa enzima.

Nós observamos que aldosterona (10^{-7} mol/L) aumenta a expressão protéica da p47phox em frações de membrana de CMLV, e que esse aumento é significativamente maior nas células provenientes dos camundongos MgL quando comparadas aos camundongos MgH (Figura 14). Esse resultado é rápido com efeito máximo obtido após 1 minuto de estimulação.

Aldosterona, de maneira semelhante ao observado nas CMLV, induziu aumento na expressão da p47phox em frações de membrana de CE (Figura 14).

Figura 14: Efeito da aldosterona (10^{-7} mol/L) sobre a expressão protéica da p47phox em frações de citosol e membrana de CE (A) e CMLV (B) de camundongos MgH e MgL. Painel superior: Imagens representativas da expressão protéica da p47phox em frações de citosol e membrana. Painel inferior: Gráfico de barras representando os valores da média $\pm$ EPM da razão membrana/citosol da expressão protéica de p47phox em relação ao estímulo das células com veículo (100%). * $P < 0,05$ comparado com células estimuladas com veículo, # $P < 0,05$ comparados com células provenientes de camundongos MgH estimuladas com aldosterona (n=6 a 8 por grupo).

4.1.4.2 Atividade da NAD(P)H oxidase induzida pela aldosterona

Nós também avaliamos a atividade da enzima NAD(P)H oxidase, através do ensaio de quimioluminescência da lucigenina como um índice da geração de ERO.

Aldosterona (10^{-7} mol/L) induziu rápida ativação da NAD(P)H oxidase com resultados máximos observados após 1 minuto nas CMLV. Nós também observamos que esse efeito foi maior nas células provenientes de camundongos MgL quando comparado àquele em CMLV de camundongos MgH (Figura 15B).

A ativação da NAD(P)H oxidase mediada pela aldosterona em CE também foi maior em células provenientes de camundongos MgL. No entanto, o pico da resposta ocorreu após 5 minutos de estímulo (Figura 15A).

Figura 15: Efeito da aldosterona (10^{-7} mol/L) sobre a atividade da NAD(P)H oxidase em CE (A) e CMLV (B) de camundongos MgH e MgL. Medida da atividade da NAD(P)H oxidase em CE e CMLV por método de quimioluminescência da lucigenina. O gráfico de linhas é referente a média $\pm$ EPM da quantificação da atividade da NAD(P)H oxidase em células estimuladas com aldosterona em relação à atividade basal (100%). * $P < 0,05$ comparado com células provenientes de camundongos MgH estimuladas com aldosterona ($n=6$ a 8 por grupo).

4.1.5 Efeito da aldosterona sobre a fosforilação da c-Src

Espécies reativas de oxigênio podem ativar diversas proteínas de cascatas de sinalização como a tirosina quinase c-Src.

A fosforilação da c-Src induzida pela aldosterona (10^{-7} mol/L) foi maior em CMLV provenientes de camundongos MgL. Esse efeito foi rápido, com pico de resposta máxima após 10 minutos de estímulo, e transitório, retornando a valores basais após 60 minutos (Figura 16B).

Aldosterona induziu resultados semelhantes nas CE. No entanto, o efeito máximo foi observado logo após 1 minuto de estímulo, e os níveis de fosforilação da c-Src permaneceram elevados mesmo após 60 minutos (Figura 16A).

Figura 16: Fosforilação da c-Src induzida pela aldosterona em CE (A) e CMLV (B) provenientes de camundongos MgH e MgL. Paineis superiores: Imagens representativas da fosforilação da c-Src induzida pela aldosterona (10^{-7} mol/L). Painel inferior: Gráfico de linhas referente a média $\pm$ EPM da quantificação da razão entre a forma fosforilada e a forma total da c-Src em relação a estimulação das células com veículo (100%). * $P < 0,05$ comparado com células provenientes de camundongos MgH estimuladas com aldosterona ($n=6$ a 8 por grupo).

4.1.6 Efeito da aldosterona sobre a fosforilação de MAPKs (ERK1/2 e p38MAPK)

MAPKs são reguladores importantes da função celular. Diversos mecanismos podem ativar essa via como a geração de ERO ou a tirosina quinase c-Src.

Aldosterona induziu a fosforilação da ERK1/2 em CMLV. Esse efeito foi maior em células provenientes de camundongos MgL (Figura 17B). Essa resposta foi rápida, atingindo valores máximos em 10 minutos, e transitória, voltando a níveis basais após 30 minutos de estímulo.

A fosforilação da p38MAPK induzida pela aldosterona foi maior em CMLV provenientes de camundongos MgL quando comparada a MgH. Essa fosforilação foi rápida, com valor máximo alcançado após 5 minutos (Figura 18B). No entanto, esse efeito retornou a níveis próximos do basal após 10 minutos de estímulo.

Os efeitos induzidos pela aldosterona sobre a fosforilação da ERK 1/2 (Figura 17A) foram semelhantes nas CE.

A fosforilação da p38MAPK foi rápida nas CE, assim como em CMLV. No entanto, a fosforilação só retornou a valores próximos do basal após 30 minutos de estímulo (Figura 18A)

Figura 17: Fosforilação da ERK1/2 induzida pela aldosterona em CE (A) e CMLV (B) provenientes de camundongos MgH e MgL. Painel superior: Imagens representativas da fosforilação da ERK1/2 induzida pela aldosterona (10^{-7} mol/L). Painel inferior: Gráfico de linhas referente a média $\pm$ EPM da quantificação da razão entre a forma fosforilada e a forma total da ERK1/2 em relação a estimulação das células com veículo (100%). * $P < 0,05$ comparado com células provenientes de camundongos MgH estimuladas com aldosterona (n=6 a 8 por grupo).

Figura 18: Fosforilação da p38MAPK induzida pela aldosterona em CE (A) e CMLV (B) provenientes de camundongos MgH e MgL. Paineis superiores: Imagens representativas da fosforilação da p38MAPK induzida pela aldosterona (10^{-7} mol/L). Painel inferior: Gráfico de linhas referente a média $\pm$ EPM da quantificação da razão entre a forma fosforilada e a forma total da p38MAPK em relação a estimulação das células com veículo (100%). * $P < 0,05$ comparado com células provenientes de camundongos MgH estimuladas com aldosterona ($n = 6$ a 8 por grupo).

4.1.7 Efeito da aldosterona sobre a expressão de marcadores pró-inflamatórios (Cox-2 e VCAM-1)

Os efeitos pró-inflamatórios induzidos pela aldosterona estão associados a suas ações deletérias no sistema cardiovascular. Essa resposta está associada a maior expressão de marcadores característicos do processo de inflamação e pode ser mediada pela geração de espécies reativas de oxigênio e ativação de cascatas de sinalização como a das MAPKs.

Aldosterona (10^{-7} mol/L) induziu a expressão protéica da molécula de adesão de célula vascular-1 (VCAM-1) em CMLV. Esse efeito foi maior em células provenientes de camundongos MgL em comparação àquele em

CMLV de camundongos MgH. Essa resposta foi observada a partir de 8 horas e permaneceu aumentada após 24 horas de estímulo (Figura 19B).

A expressão protéica da enzima ciclooxigenase-2 (Cox-2) também foi aumentada pela aldosterona em CMLV. Nós observamos maior efeito em células provenientes de camundongos MgL comparados a MgH em 2 horas de estímulo. No entanto, após 8 horas houve diminuição desse valor (Figura 20B).

A expressão protéica da VCAM-1 induzida pela aldosterona também foi maior em CE provenientes de camundongos MgL comparada a MgH. Esse evento foi observado em 2 horas e permaneceu aumentado após 24 horas de estímulo (Figura 19A). A indução da expressão protéica da Cox-2 em CE foi semelhante àquela observada para CMLV (Figura 20A).

Figura 19: Efeito da aldosterona sobre a expressão protéica da VCAM-1 em CE (A) e CMLV (B) provenientes de camundongos MgH e MgL. Painel superior: Imagens representativas da expressão protéica da VCAM-1 induzida pela aldosterona (10^{-7} mol/L). Painel inferior: Gráfico de linhas referente a quantificação da expressão protéica da VCAM-1 normalizada pela expressão protéica do GAPDH e em relação a células estimuladas com veículo (100%). Símbolos representam média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ comparado com células provenientes de camundongos MgH estimuladas com aldosterona.

Figura 20: Efeito da aldosterona sobre a expressão protéica da Cox-2 em CE (A) e CMLV (B) provenientes de camundongos MgH e MgL. Painel superior: Imagens representativas da expressão protéica da Cox-2 induzida pela aldosterona (10^{-7} mol/L). Painel inferior: Gráfico de linhas referente a quantificação da expressão protéica da Cox-2 normalizada pela expressão protéica do GAPDH e em relação a células estimuladas com veículo (100%). Símbolos representam média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ comparado com células provenientes de camundongos MgH estimuladas com aldosterona.

4.2 Efeitos da inibição do Trpm7 sobre os efeitos mediados pela aldosterona em células vasculares provenientes de camundongos MgH e MgL

Nós questionamos se a ativação dos canais TRPM7 contribui para os efeitos induzidos pela aldosterona em células vasculares.

4.2.1 Efeito da inibição do TRPM7 sobre a fosforilação da c-Src

A inibição dos canais TRPM7 com o 2-APB (10^{-5} mol/L) aumentou a fosforilação da c-Src induzida pela aldosterona em CMLV provenientes dos animais MgH. 2-APB não alterou a fosforilação da c-Src induzida pela aldosterona nas células dos animais MgL, onde nós havíamos observado que a atividade do TRPM7 estava diminuída (Figura 21).

Efeitos similares foram observados em CE após a inibição dos canais TRPM7 com 2-APB (Figura 21).

4.2.2 Efeito da inibicao do TRPM7 sobre a fosforilcao de MAPKs (ERK1/2, p38MAPK) induzida pela aldosterona

Assim como observado para a c-Src, a fosforilação das MAPKs ERK1/2 (Figura 22) e p38MAPK (Figura 23) induzida pela aldosterona foi aumentada pelo pré- tratamento das células com 2-APB. Esse efeito foi observado apenas em CMLV provenientes dos animais MgH, sem qualquer efeito subsequente sobre as células provenientes dos camundogos com baixos níveis de Mg^{2+} .

Os efeitos do 2-APB sobre a fosforilação da ERK1/2 (Figura 22) e p38MAPK (Figura 23) induzida pela aldosterona em CE foram similares àqueles observados em CMLV.

Figura 23: Efeito da inibição dos canais TRPM7 com 2-APB sobre a fosforilação da p38MAPK induzida pela aldosterona em CE (A, B) e CMLV (C, D) de camundongos MgH e MgL. Painel superior: Imagens representativas da fosforilação da p38MAPK induzida pela aldosterona (10^{-7} mol/L). Painel inferior: Gráfico de barras representando valores da média $\pm$ EPM da quantificação da fosforilação da p38MAPK normalizada pela expressão protéica total da p38MAPK e em relação a células estimuladas com veículo (100%). * $P < 0,05$ comparado com células estimuladas com veículo, # $P < 0,05$ comparados com células provenientes de camundongos MgH estimuladas com aldosterona na ausência de 2-APB (n=6 a 8 por grupo).

4.2.3 Efeito da inibição do TRPM7 sobre a expressão de marcadores pró-inflamatórios (VCAM-1, Cox-2)

A inibição farmacológica do TRPM7 com 2-APB aumentou a expressão protéica dos marcadores pró-inflamatórios VCAM-1 (Figura 24) e Cox-2 (Figura 25) induzida pela aldosterona em CMLV provenientes de camundongos MgH. Contudo, o pré-tratamento de CMLV provenientes de animais MgL com 2-APB não alterou a expressão protéica da VCAM-1 ou Cox-2 mediada pela aldosterona.

Os efeitos do 2-APB sobre expressão protéica da VCAM-1 (Figura 24) e Cox-2 (Figura 25) induzida pela aldosterona em CE foram similares àqueles observados em CMLV.

Figura 24: Efeito da inibição dos canais TRPM7 com 2-APB sobre a expressão protéica da VCAM-1 induzida pela aldosterona em CE (A, B) e CMLV (C, D) de camundongos MgH e MgL. Paineis superiores: Imagens representativas da expressão protéica da VCAM-1 induzida pela aldosterona (10^{-7} mol/L). Paineis inferiores: Gráfico de barras representando a média $\pm$ EPM da quantificação da expressão protéica da VCAM-1 normalizada pela expressão protéica do GAPDH e em relação a células estimuladas com veículo (100%). * $P < 0,05$ comparado com células estimuladas com veículo, # $P < 0,05$ comparados com células provenientes de camundongos MgH estimuladas com aldosterona na ausência de 2-APB (n=6 a 8 por grupo).

Figura 25: Efeito da inibição dos canais TRPM7 com 2-APB sobre a expressão protéica da Cox-2 induzida pela aldosterona em CE (A, B) e CMLV (C, D) de camundongos MgH (A, C) e MgL (B, D). Paineis superiores: Imagens representativas da expressão protéica da Cox-2 induzida pela aldosterona (10^{-7} mol/L). Paineis inferiores: Gráfico de barras representando a média $\pm$ EPM da quantificação da expressão protéica da Cox-2 normalizada pela expressão protéica do GAPDH e em relação a células estimuladas com veículo (100%). * $P < 0,05$ comparado com células estimuladas com veículo, # $P < 0,05$ comparados com células provenientes de camundongos MgH estimuladas com aldosterona na ausência de 2-APB (n=6 a 8 por grupo).

4.2.4 Efeito da inibição do TRPM7 sobre a translocacao da p47phox do citosol para a membrana

A inibição dos canais TRPM7 com 2-APB não aumentou a expressão protéica da p47phox induzida pela aldosterona em frações de membrana de CMLV provenientes de camundongos MgH (Figura 26). Também não foram observadas alterações nos efeitos da aldosterona sobre a translocação dessa proteína em células provenientes de camundongos MgL.

O 2-APB também não alterou a translocação da p47phox induzida pela aldosterona em CE provenientes de camundongos MgH ou MgL (Figura 26).

Figura 26: Efeito da inibição dos canais TRPM7 com 2-APB sobre a expressão protéica da p47phox em frações de citosol e membrana de CE (A, B) e CMLV (C, D) de camundongos MgH (A, C) e MgL (B, D). Painel superior: Imagens representativas da expressão protéica da p47phox em frações de citosol e membrana. Painel inferior: Gráfico de barras representando os valores da média $\pm$ EPM da razão membrana/citosol da expressão protéica de p47phox em relação a células estimuladas com veículo (100%). * $P < 0,05$ comparado com células estimuladas com veículo, # $P < 0,05$ comparados com células estimuladas com veículo na presença de 2-APB (n=6 a 8 por grupo).

4.2.5 Efeito da inibição do TRPM7 sobre a atividade da NAD(P)H oxidase

A atividade da NAD(P)H oxidase induzida pela aldosterona, avaliada pelo ensaio de quimioluminescência da lucigenina, também não foi alterada

pela inibição dos canais TRPM7 com 2-APB. Esse resultado foi observado em CMLV provenientes de animais MgH e MgL (Figura 27).

Resultados similares foram observados em CE provenientes de camundongos MgH e MgL (Figura 27).

Figura 27: Efeito da inibição dos canais TRPM7 com 2-APB sobre a atividade da NAD(P)H oxidase induzida pela aldosterona (10^{-7} mol/L) em CE (A, B) e CMLV (C, D) de camundongos MgH (A, C) e MgL (B, D). O gráfico de barras representa valores da média $\pm$ EPM da quantificação da atividade da NAD(P)H oxidase avaliada pelo método de quimioluminescência da lucigenina em células estimuladas com aldosterona na presença ou ausência de 2-APB em relação à atividade basal (100%). * $P < 0,05$ comparado com células estimuladas com veículo, # $P < 0,05$ comparados com células estimuladas veículo na presença de 2-APB (n=6 a 8 por grupo).

4.3 Efeitos do tratamento com aldosterona em camundongos Mgh E Mgl

4.3.1 Efeito do tratamento com aldosterona sobre a pressão arterial caudal

Camundongos MgL apresentaram níveis basais de pressão arterial caudal elevados em comparação aos camundongos MgH. (Tabela 2).

A infusão subcutânea de aldosterona (350 µg/kg/dia) aumentou a pressão arterial caudal em camundongos MgH e MgL a partir do 4º dia de tratamento (Figura 28). Ao final de 3 semanas a pressão arterial caudal foi significativamente maior nos animais infundidos com aldosterona, em relação aos valores iniciais, tanto no grupo MgH ($129,2 \pm 4,3$, n=9 versus $104,6 \pm 1,2$, n=8) como MgL ($132,1 \pm 2,3$, n=6 versus $109,5 \pm 1,1$, n=6). No entanto, não houve diferença entre os valores de pressão arterial dos animais MgH e MgL tratados com aldosterona. O tratamento com veículo (óleo mineral) não alterou os níveis pressóricos nos camundongos MgH e MgL, como demonstrado na Tabela 2.

Figura 28: Evolução temporal da pressão arterial caudal. Efeito do tratamento com aldosterona (350µg/kg/dia) por 3 semanas sobre a pressão arterial caudal (mmHg) de camundongos MgH e MgL. Símbolos representam os valores da média ± EPM da pressão arterial caudal. *P<0,05 comparado com camundongos MgH tratados com veículo, **P<0,05 comparado com camundongos MgL tratados com óleo mineral. (n) representa o número de animais por grupo.

4.3.2 Avaliação da massa corpórea dos camundongos MgH e MgL

As massas corpóreas dos camundongos MgL antes e ao final do tratamento, bem como o ganho de massa corporea após a administração de aldosterona (350 µg/kg/dia) foram semelhantes ao observado para os animais MgH, como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2: Efeitos do tratamento com aldosterona sobre a pressão arterial caudal e a massa corpórea de camundongos MgH e MgL.

	Pressão arterial caudal (mmHg)		Massa corpórea (g)	
	Dia 0	Dia 21	Dia 0	Dia 21
MgH + Veículo	104,7±1,2 (8)	104,6±1,2 (8)	29,1±0,6 (8)	36,3±1,1 (8)
MgH + Aldosterona	106,8±1,7 (9)	129,2±4,3* (9)	28,9±1,0 (9)	37,1±1,0 (9)
MgL + Veículo	114,0±2,0 [#] (6)	109,5±1,1 (6)	28,6±0,8 (6)	34,3±1,4 (6)
MgL + Aldosterona	112,2±2,7 [#] (6)	132,1±2,3** (6)	28,2±1,2 (6)	33,6±1,1 (6)

Pressão arterial caudal e massa corpórea em camundongos MgH e MgL, antes e após o tratamento com aldosterona por 3 semanas. Resultados representam média ± EPM. *P<0,05 comparado com camundongos MgH tratados com veículo, **P<0,05 comparado com camundongos MgL tratados com veículo. [#]P<0,05 comparado com camundongos MgH antes do início do tratamento. (n) número de animais por grupo.

4.3.3 Concentrações plasmáticas e urinárias de Mg²⁺, K⁺, Na⁺ Ca²⁺ e Cl⁻

Os efeitos do tratamento com aldosterona (350 µg/kg/dia) sobre as concentrações plasmáticas e urinárias de Mg²⁺, K⁺, Na⁺ Ca²⁺ e Cl⁻ estão representados nas figuras 29 e 30, respectivamente.

Assim como esperado, nos observamos menor concentração plasmática de Mg²⁺ nos camundongos MgL, em relação aos MgH. O tratamento com aldosterona (350 µg/kg/dia) diminuiu esse valor tanto nos animais MgH como nos MgL. Nós também observamos que no início do

tratamento a concentração plasmática de K^+ estava diminuída nos camundongos MgL quando comparada àquela dos animais MgH. O tratamento com aldosterona reduziu a concentração plasmática de K^+ tanto nos camundongos MgH como nos MgL. Não encontramos diferenças entre as concentrações plasmáticas basais de Na^+ , Ca^{2+} e Cl^- nos camundongos MgH e MgL e o tratamento com aldosterona não alterou a concentração plasmáticas desses eletrólitos (figura 29).

No início do tratamento camundongos MgL apresentaram maior excreção de Mg^{2+} na urina em comparação aos MgH. O tratamento com aldosterona (350 $\mu g/kg/dia$) aumentou a excreção desse eletrólito tanto em camundongos MgH como MgL. Não foram observadas diferenças na excreção urinária de K^+ no início do tratamento entre camundongos MgH e MgL. No entanto, a aldosterona aumentou a excreção desse eletrólito tanto nos animais MgH e MgL. Não foram observadas diferenças significativas na excreção de Na^+ e Cl^- antes e após o tratamento com aldosterona em camundongos MgH e MgL (Figura 30).

Figura 29: Concentração plasmática de Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} e Cl^- em camundongos MgH e MgL antes e após o tratamento com aldosterona. Barras representam os valores da média $\pm$ EPM da concentração plasmática ($n= 6$ a 9). * $P<0,05$ comparado com camundongos MgH, # $P<0,05$ comparado com camundongos MgH tratados com veículo, ** $P<0,01$ comparado com camundongos MgL tratados com veículo.

Figura 30: Concentração urinária de Mg^{2+} , K^+ , Na^+ e Cl^- em camundongos MgH e MgL antes e após o tratamento com aldosterona. Barras representam o valor da média $\pm$ EPM da concentração urinária ($n= 6$ a 9). * $P<0,05$ comparado com MgH, # $P<0,05$ comparado com camundongos MgH tratados com veículo, ** $P<0,05$ comparado com camundongos MgL tratados com veículo.

4.3.4 Efeito do tratamento com aldosterona sobre a massa do coração e do rim

As razões massa do coração/massa corpórea e massa do rim/massa corpórea dos camundongos MgH e MgL foi utilizada como índice de hipertrofia desses órgãos induzida pela aldosterona.

O tratamento com aldosterona (350 µg/kg/dia) promoveu o aumento da razão entre a massa do coração e a massa corpórea tanto nos camundongos MgH como nos animais MgL (Figura 31A). Efeitos similares foram encontrados nos rins desses animais (Figura 31B).

Figura 31: Índice de hipertrofia cardíaca e renal induzida pela aldosterona em camundongos MgH e MgL. Relação massa do coração/ massa corpórea e massa do rim/ massa corpórea de camundongos MgH e MgL tratados com aldosterona (Aldo, 350µg/kg/dia) ou veículo por 3 semanas. Barras representam o valor da média $\pm$ EPM da relação entre a massa do coração ou rim e a massa corpórea (n= 6 a 9). *P<0,05 comparado com camundongos MgH tratados com veículo, #P<0,01 comparado com camundongos MgL tratados com veículo.

4.3.5 Análise de cortes histológicos de coração e rim de animais tratados com aldosterona

A coloração de Picrosirius resultou em preparados histológicos representativos nos quais foi possível distinguir a deposição de colágeno no meio extracelular.

A análise de cortes histológicos de 6 animais de cada grupo indicou que o tratamento com aldosterona (350 µg/kg/dia) induziu depósito de colágeno perivascular e na região intersticial no coração (Figura 32) e rim (Figura 33) de camundongos MgH e MgL. Nós também observamos que os animais MgL tratados com veículo apresentaram maior deposição de colágeno em relação aos camundongos MgH tratados da mesma maneira.

Figura 32: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do coração de animais tratados com aldosterona (350µg/kg/dia) ou veículo durante 3 semanas. Estão representados nos painéis superiores cortes histológicos do coração de camundongos MgH tratados com veículo (A) e aldosterona (B). Nos painéis inferiores estão representados cortes histológicos de camundongos MgL tratados com veículo (C) e aldosterona (D). Os preparados foram corados com Picrosirius e as imagens foram obtidas em microscópio de luz sob aumento de 100x.

Figura 33: Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do rim de animais tratados com aldosterona (350µg/kg/dia) ou veículo durante 3 semanas. Estão representados nos painéis superiores cortes histológicos do rim de camundongos MgH tratados com veículo (A) e aldosterona (B). Nos painéis inferiores estão representados cortes histológicos de camundongos MgL tratados com veículo (C) e aldosterona (D). Os preparados foram corados com Picrosirius e as imagens foram obtidas em microscópio de luz sob aumento de 100x.

4.3.6 Efeitos do tratamento com aldosterona sobre a microalbuminúria

A microalbuminúria é o primeiro sinal de deterioração da função renal. O tratamento com aldosterona (350 µg/kg/dia) aumentou a excreção de albumina na urina, tanto nos camundongos MgH como nos MgL. No entanto,

nós observamos que esse efeito foi mais pronunciado nos animais MgL. Observamos ainda que animais MgL tratados com veículo apresentaram tendência para aumento de microalbuminúria quando comparados aos MgH (Figura 34).

Figura 34: Efeitos do tratamento com aldosterona sobre a excreção de albumina na urina. Microalbuminúria em camundongos MgH e MgL após o tratamento com aldosterona (Aldo, 350µg/kg/dia) ou veículo por 3 semanas. Barras representam os valores da média $\pm$ EPM da relação entre a microalbuminúria e a excreção de creatinina na urina (n= 6 a 9). *P<0,05 comparado com animais MgH tratados com veículo, #P<0,05 comparado com camundongos MgL tratados com veículo.

4.3.7 Estudo da expressão de transportadores de Mg^{2+} no coração e rins

Nós questionamos se os efeitos induzidos pela aldosterona estavam associados a alterações na expressão protéica de moléculas que transportam o Mg^{2+} .

Em camundongos MgH e MgL foi observada modulação diferenciada da expressão protéica do TRPM7 no tecido cardíaco e renal. A expressão protéica de TRPM7 está diminuída no tecido cardíaco de animais MgL tratados com óleo mineral em relação aos animais MgH (figura 35A). O

tratamento com aldosterona (350µg/kg/dia) reduziu a expressão protéica do TRPM7 no coração de animais MgH. A expressão cardíaca de TRPM7 não foi alterada pelo tratamento com aldosterona nos animais MgL.

Nos rins a expressão protéica de TRPM7 estava aumentada em camundongos MgL tratados com óleo mineral quando comparada a camundongos MgH (figura 35B). Nesse tecido o tratamento com aldosterona não modificou a expressão desse canal.

Não foi observada expressão protéica de TRPM6 no coração de camundongos MgH e MgL.

Nos rins de animais tratados com óleo mineral, a expressão protéica de TRPM6 foi menor em animais MgL quando comparada àquela em rins de animais com níveis normais de Mg^{2+} (figura 36A) . O tratamento com aldosterona aumentou a expressão protéica renal do TRPM6 nos camundongos MgH, mas não nos MgL.

Não foram observadas alterações na expressão protéica de paracelina-1 nos rins de camundongos MgH e MgL tratados com óleo mineral ou aldosterona (figura 36B).

Figura 35: Efeito do tratamento com aldosterona (350 $\mu\text{g/kg/dia}$) sobre a expressão protéica do TRPM7 no coração (A) e rins (B) de camundongos MgH e MgL. Painel superior: Imagens representativas da expressão protéica do TRPM7 e GAPDH. Painel inferior: Gráfico de barras representando os valores da média $\pm$ EPM da quantificação da expressão protéica do TRPM7 em relação a expressão protéica do GAPDH (n=6 por grupo). * $P < 0,05$ comparado a camundongos MgH tratados com veículo, # $P < 0,05$ comparado a camundongos MgH tratados com veículo.

Figura 36: Efeito do tratamento com aldosterona (350µg/kg/dia) sobre a expressão protéica do TRPM6 (A) e paracelina-1 em rins de camundongos MgH e MgL. Painel superior: Imagens representativas da expressão do TRPM6, paracelina-1 e GAPDH. Painel inferior: Gráfico de barras representando os valores da média $\pm$ EPM da quantificação da expressão protéica do TRPM6 e paracelina-1 em relação a expressão protéica do GAPDH (n=6 por grupo). *P<0,05 comparado com camundongos MgH tratados com veículo, #P<0,05 comparado com camundongos MgH tratados com veículo.

4.3.8 Estudo do estresse oxidativo induzido pela aldosterona

O estresse oxidativo sistêmico foi avaliado pela determinação dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma.

Em animais tratados com óleo mineral não há diferença na concentração de TBARS no plasma entre os animais com níveis baixos e normais de Mg^{2+} . O tratamento com aldosterona (350 µg/kg/dia) aumentou as concentrações plasmáticas de TBARS em camundongos MgL mas não em camundongos MgH (Figura 37).

Figura 37: Efeito do tratamento com aldosterona (350 μ g/kg/dia) sobre a concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma. Gráfico de barras representando os valores da média $\pm$ EPM da concentração de TBARS plasmáticos (n=6 a 9 por grupo). *P<0,05 comparado com camundongos MgL tratados com veículo, #P<0,05 comparado com camundongos MgH tratados com aldosterona.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, nós demonstramos redução na atividade do principal responsável pelo transporte de Mg^{2+} o canal TRPM7, em células vaculares provenientes de camundongos com deficiência genética de Mg^{2+} (MgL). Esse efeito foi acompanhado pela maior ativação de cascatas de sinalização pró-inflamatórias e fibrogênicas em resposta a aldosterona. Em células vasculares isoladas de animais controle (MgH) a resposta a esse mineralocorticoide após a inibição farmacológica do TRPM7 foi semelhante ao observado nas culturas provenientes de camundongos MgL. Esse resultado ressalta a importância desse canal no controle de processos mediados pela aldosterona.

Aldosterona é um mineralocorticoide produzido na glândula adrenal. Por meio de reações enzimáticas seriadas o colesterol é convertido em pregnenolona, progesterona, deoxicorticosterona, corticosterona e finalmente aldosterona. A síntese de aldosterona é regulada por diversos fatores como a Ang II e a concentração plasmática de K^+ . O alvo clássico da aldosterona são os rins onde por mecanismos genômicos esse hormônio mineralocorticoide induz aumento na atividade e expressão protéica de moléculas responsáveis pelo transporte de Na^+ e K^+ (FULLER et al., 2005). O resultado final da ativação de receptores para mineralocorticóides pela aldosterona nas células do túbulo contorcido distal é a reabsorção de Na^+ , acompanhada pela excreção de K^+ . Esse efeito contribui para o balanço eletrolítico desses íons e o controle de fluidos corpóreos e pressão arterial.

A função vascular depende principalmente da interação entre dois componentes de sua estrutura, as células endoteliais e as de músculo liso vascular. O endotélio vascular regula a síntese, secreção e metabolismo de agentes responsáveis pela vasodilatação, vasoconstrição, adesão de leucócitos, agregação plaquetária e crescimento celular. As CMLV são responsáveis não apenas pela reatividade vascular, mas também por processos envolvidos em seu crescimento, hipertrofia e migração contribuindo desta maneira para o remodelamento vascular presente em diversas patologias. Por isso, a caracterização de eventos mediados por agentes vasoativos nesses dois tipos

celulares é essencial para a compreensão das alterações que ocorrem na vasculatura durante a hipertensão.

Diversos fatores estão implicados na patogênese da hipertensão como o sistema renina-angiotensina-aldosterona e alterações nas concentrações de íons como o Mg^{2+} (SCHIFFRIN et al., 2004a; AVIV et al., 2002; RESNICK et al., 1983; RESNICK et al., 1997).

Magnésio é o segundo cátion intracelular em concentração e é também cofator para mais de 300 reações enzimáticas (RUBIN et al., 2007; GRUBBS et al., 1987; ALTURA et al., 1985). A $[Mg^{2+}]_i$ é controlada principalmente por mecanismos que regulam seu influxo e efluxo. Sistemas que estão associados ao transporte de magnésio na membrana celular incluem os trocadores Na^+/Mg^{2+} e Mg^{2+}/Ca^{2+} e os recém identificados TRPM6 e TRPM7 (ROMANI et al., 2007; SCHLINGMANN et al., 2007; SCHMITZ et al., 2007; SCHMITZ et al., 2004; MONTEILH-ZOLLER et al., 2003).

TRPM6 e TRPM7 são expressos em células de músculo liso vascular de humanos, ratos e camundongos (TOUYZ et al., 2006). O uso da técnica de RNA interferente identificou o TRPM7, e não TRPM6, como o principal modulador da homeostase de Mg^{2+} em células vasculares (REF TOUYZ). No presente estudo, nós demonstramos que o influxo de Mg^{2+} induzido pela aldosterona envolve mecanismos dependentes da ativação de canais TRPM7. Esse efeito estava reduzido em CE e CMLV provenientes de camundongos MgL e é parcialmente abolido pelo tratamento com 2-APB. A limitação no uso do 2-APB consiste no fato de altas concentrações (10^{-3} mol/L) utilizadas em estudos eletrofisiológicos para inibir o influxo de Mg^{2+} comprometer a viabilidade celular. Também deve ser considerado a potencial inespecificidade desse composto em altas concentrações. No entanto, estudos publicados anteriormente indicam que o transporte de Mg^{2+} mediado por esses canais é efetivamente bloqueado pelo 2-APB (HAMAGUCHI et al., 2008; YOGI et al., 2008). De forma a averiguarmos melhor o papel dos canais TRPM7 sobre o influxo de Mg^{2+} em células vasculares futuramente utilizaremos outras ferramentas de inibição desse canal como pelo uso da técnica de RNA interferente.

Uma possível causa para o menor influxo de Mg^{2+} mediado pela aldosterona via TRPM7 seria a menor densidade de canais na membrana. Foi demonstrado que redução na expressão gênica do TRPM7 está associada à diminuição da $[Mg^{2+}]_i$ e menor influxo desse íon mediado pela Ang II (HE et al., 2005). Em nosso estudo, em condições basais, não foram encontradas diferenças na expressão protéica do TRPM7 e TRPM6 em células provenientes de camundongos MgH e MgL. Aldosterona aumentou expressão protéica do TRPM7 em CE e CMLV de camundongos MgH mas não MgL. Podemos sugerir desta maneira que mecanismos pós translacionais estejam envolvidos no menor influxo de Mg^{2+} induzido pelo mineralocorticoide. Considerando que o Mg^{2+} possui efeitos anti-proliferativos e antioxidantes na vasculatura (HE et al., 2005; MAZUR et al., 2007), é possível que o aumento na expressão protéica do TRPM7 seja um mecanismo contra-regulatório das ações deletérias da aldosterona. No entanto, os motivos pelos quais esse mineralocorticoide não modula a expressão protéica do TRPM7 em células provenientes de camundongos MgL ainda são desconhecidos.

A estrutura primária do TRPM7 é notável em função desse canal apresentar na região transmembrânica um poro permeável a íons divalentes e em sua terminação carboxílica, outro domínio semelhante a proteínas quinase denominadas α -quinases (SCHMITZ et al., 2004; CLAPHAM et al., 2003; RYAZANOV et al., 1999). Os mecanismos regulatórios do TRPM7 ainda não foram completamente elucidados. A $[Mg^{2+}]_i$ modula a função do TRPM7 e o influxo desse íon é independente da atividade da α -quinase (MATSUSHITA et al., 2005, SCHMITZ et al., 2003). Estudos realizados com a imunoprecipitação do TRPM7 indicam que o aumento na concentração de Mg^{2+} livre é capaz de ativar o domínio α -quinase (MATSUSHITA et al., 2005; RYAZANOVA et al., 2004; SCHMITZ et al., 2003). Essa observação tem grande relevância quando consideramos a proximidade entre o domínio quinase e o poro condutor de Mg^{2+} no TRPM7. Curiosamente, pouco se sabe sobre o domínio quinase do TRPM6. Foi descrita a interação dos canais TRPM6 e TRPM7 induzindo a fosforilação do TRPM7, alterando sua sensibilidade a $[Mg^{2+}]_i$ e modulando o transporte de Mg^{2+} . No entanto, a ação contrária não ocorre, ou seja, a α -quinase do TRPM7 não é capaz de fosforilar o TRPM6 indicando assim que essas proteínas possuem substratos

específicos apesar de sua alta homologia (SCHMITZ et al., 2005). Até o presente momento não são conhecidos outros alvos para a α -quinase do TRPM6.

Três substratos para a α -quinase do TRPM7 foram identificados, a anexina-1, cadeia pesada da miosina II e a calpaína. A α -quinase do TRPM7 fosforila e ativa anexina-1 (DOROVKOV et al., 2004). Anexina-1 pertence à família de proteínas que se ligam a Ca^{2+} e fosfolípídeos e estão presente em diversos tecidos (RAYNAL et al., 1994). Em condições basais a anexina-1 está localizada predominantemente no citosol. Estímulos como o TNF- α ou agonistas de receptores acoplados a proteína G induzem sua mobilização para frações de membrana. Esse processo está associado à ativação de cascatas de sinalização, replicação de DNA, proliferação e apoptose (MOSS et al., 1995). No entanto, o significado funcional da ativação da anexina-1 pelo TRPM7 ainda é desconhecido.

A ativação do TRPM7 afeta também a contratilidade do citoesqueleto pela interação do domínio α -quinase com a miosina II. A fosforilação da cadeia pesada da miosina II pelo TRPM7 promove a adesão e migração celular em resposta à bradicinina (CLARK et al., 2006). A regulação dos complexos de adesão por esse canal envolve ainda a ativação da calpaína.

A calpaína é uma protease citosólica ativada por Ca^{2+} amplamente expressa em diversos tecidos. A ativação dessa molécula está associada a sua translocação para membrana e a proteólise de diversos substratos. Dentre eles estão proteínas do citoesqueleto, fosfatases, e quinases como a PKC e a c-Src (SUZUKI et al., 2004). Dessa maneira, a regulação da atividade da calpaína pelo TRPM7 modula processos como o rearranjo do citoesqueleto e a migração celular, entre outros (SATO et al., 2001; DU et al., 1995).

Nós observamos que a translocação do citosol para a membrana da anexina-1 e calpaína induzida pela aldosterona está reduzida em células vasculares provenientes de camundongos MgL. Na cultura celular de camundongos MgH, a translocação dessas proteínas após o tratamento com 2-APB é semelhante ao observado em células vasculares de camundongos MgL. Esse resultado indica que a deficiência genética na homeostase do Mg^{2+} está associada não apenas à redução no influxo de Mg^{2+} no poro iônico do TRPM7, mas também à menor atividade da α -quinase. Anexina-1 e calpaína regulam

diversos processos celulares e vias de sinalização. A ativação dessas proteínas mediadas pelo TRPM7 pode modular processos envolvidos na função vascular ou relacionados ao remodelamento de vasos e lesão de órgãos-alvo. Com base nessas observações, decidimos investigar a participação desse canal sobre a ativação de cascatas de sinalização pró-inflamatórias e fibrogênicas mediados pela aldosterona.

Diversos estudos demonstram que aldosterona exerce efeitos por meio de uma via não genômica. Essa via envolve respostas rápidas, mediadas por mensageiros secundários como Ca^{2+} , formação de 1,4,5 inositol trifosfato e diacilglicerol, PKC, c-Src, MAPKs e a enzima NAD(P)H oxidase (CALLERA et al., 2005; ARIMA et al., 2004; PARK et al., 2004).

A NAD(P)H oxidase é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio no sistema cardiovascular. Em células vasculares o ânion superóxido gerado por essa enzima regula processos como crescimento e diferenciação celular, a produção e degradação da matriz extracelular, biodisponibilidade de NO, abertura de canais iônicos e a ativação de proteínas quinase (GRIENDLING et al., 2000). Estudos indicam que aldosterona induz estresse oxidativo não apenas pela produção de espécies reativas de oxigênio, mas também pela redução das defesas antioxidantes da célula (IGLARZ et al., 2004). Nós observamos através de dois métodos distintos que a atividade da NAD(P)H oxidase induzida pela aldosterona está aumentada em células provenientes de camundongos MgL. A inibição dos canais TRPM7 com o 2-APB não alterou a atividade dessa enzima ou a translocação da p47phox do citosol para a membrana em células provenientes de camundongos MgH e MgL. Embora baixos níveis de Mg^{2+} estejam associados ao estresse oxidativo em células vasculares (WOLF et al., 2008), os exatos mecanismos do aumento da geração de espécies reativas de oxigênio nessas situações ainda permanecem obscuros. Além disso, em células neuronais, o peróxido de hidrogênio aumenta a condutância de cátions pelo TRPM7 (AARTS et al., 2003), sugerindo assim que a atividade desse canal pode ser também modulada pelo estresse oxidativo. Esses resultados indicam a existência de uma complexa interação entre menores níveis de Mg^{2+} e a geração de espécies reativas de oxigênio. Estudos adicionais serão necessários para determinarmos a

exata função do TRPM7 e seu domínio α -quinase sobre a atividade da NAD(P)H oxidase em células vasculares.

Os efeitos deletérios da aldosterona na vasculatura envolvem a ativação da c-Src (CALLERA et al., 2005). As Src quinases são uma família de enzimas responsáveis pela transferência de grupamentos fosfato para resíduos de tirosina, não caracterizadas como receptores de membrana. O protótipo destas quinases, a c-Src, é significativamente expresso em CMLV (EGUCHI et al., 1998). Essa quinase desempenha função importante na ativação de intermediários para mobilização de Ca^{2+} , PKC e inositol trifosfato. Além disso, a c-Src está associada à ativação de outras cascatas de sinalização como as MAPKs e o EGFR (EGUCHI et al., 1998). Em nosso estudo a redução na atividade dos canais TRPM7 foi associada à maior fosforilação da c-Src induzida pela aldosterona. Atividade dessa quinase em resposta a Ang II ou aldosterona também está alterada em células provenientes de ratos SHR (CALLERA et al., 2005). Nesse modelo de hipertensão, CMLV apresentam menor $[\text{Mg}^{2+}]_i$, associada à menor expressão do TRPM7 (TOUYZ et al., 2006). Esses estudos sugerem relação entre a fosforilação da c-Src, atividade do TRPM7 e a $[\text{Mg}^{2+}]_i$ de maneira semelhante ao observado no modelo de hipomagnesemia MgL.

MAPKs fazem parte da cascata de sinalização que controlam processos como apoptose, diferenciação e proliferação celular, bem como expressão de proteínas envolvidas na adesão de leucócitos (TOUYZ et al., 2003). Essas proteínas quinase são ativadas por estímulos como fatores de crescimento, neurotransmissores, hormônios, agonistas de receptores acoplados a proteína G e a c-Src (CALLERA et al., 2005; EGUCHI et al., 1998). Novamente, a menor atividade do TRPM7 em células provenientes de camundongos MgL ou a inibição desses canais com 2-APB foi associado a maior fosforilação da ERK1/2 e p38MAPK induzida pela aldosterona.

Em vasos sanguíneos, coração e rim, aldosterona está associada ao processo fibrótico, inflamatório e ao remodelamento vascular. Os mecanismos envolvidos nesses efeitos incluem ativação de MAPKs, estresse oxidativo e expressão de marcadores pró-inflamatórios como a Cox-2, osteopontina, inibidor de ativação do plasminogênio-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*, PAI-1) e

moléculas de adesão como a VCAM-1 e ICAM-1 (REMUZZI et al., 2008; FUNDER et al., 2004; IGLARZ et al., 2004; BLASI et al., 2003). Em nosso estudo a expressão protéica da Cox-2 e VCAM-1 induzida pela aldosterona estava aumentada em células provenientes de camundongos MgL. Isso foi associado à menor atividade do TRPM7 uma vez que sua inibição com o 2-APB aumentou a expressão protéica desses marcadores. Esse resultado está correlacionado à maior ativação da ERK1/2 e p38MAPK, que havíamos observado anteriormente. Deve ser ainda considerada a importância de outras vias pró-inflamatórias como a do fator nuclear *kappa* B (NF-kB, *nuclear factor kappa-B*). Esse fator está implicado na expressão gênica de citocinas e proteínas envolvidas na resposta inflamatória, imunológica e na proliferação celular (BARNES et al., 1997). A ativação do NF-kB é mediada por diversos mecanismos incluindo a via das MAPKs e pela geração de espécies reativas de oxigênio (PUEYO et al., 2000; LEE et al., 1997). Dessa maneira, uma perspectiva de nosso estudo seria o estudo da ativação do NF-kB pelo TRPM7 e a importância desse processo sobre os efeitos induzidos pela aldosterona.

Nossos estudos em cultura de célula demonstraram redução na atividade do canal TRPM7 em células vasculares provenientes de camundongos MgL. Este efeito foi associado a aumento da ativação de vias de sinalização e expressão de marcadores pró-inflamatórios mediados pela aldosterona. Alterações na função vascular apresentam grande impacto sobre a estrutura e atividade de diversos órgãos e desempenham papel importante em patologias como a hipertensão. A fim de caracterizarmos *in vivo* a relação entre a deficiência de Mg^{2+} e os efeitos da aldosterona nós realizamos a infusão subcutânea desse mineralocorticoide em camundongos MgH e MgL.

Camundongos MgL apresentam menores níveis de Mg^{2+} não apenas nas hemácias, mas também no plasma, rim e ossos (HENROTTE et al., 1997). Isso é associado à maior perda desse eletrólito na urina (FEILLET-COUDRAY et al., 2004). Os estoques, retenção e quantidade de magnésio intercambiável nos ossos também está reduzida (FEILLET-COUDRAY et al., 2004). Camundongos MgL são mais vulneráveis ao estresse, apresentam maior temperatura retal, e possuem maiores níveis de catecolaminas no cérebro e urina (HENROTTE et al., 1997).

Não há diferença na expectativa de vida desses animais, no entanto, a reprodução em camundongos MgL é viável por um período maior de tempo, embora não haja diferença no tamanho da prole (MOTTA et al., 1998).

Estudos realizados em vasos isolados indicam que não há diferença na resposta a agentes vasoconstritores como a fenilefrina entre camundongos MgH e MgL. No entanto, os animais com baixos níveis de Mg^{2+} apresentam menor relaxamento dependente do endotélio, associado à menor expressão protéica da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (PARAVICINI et al., 2008). Nós observamos que camundongos MgL apresentaram níveis elevados de pressão arterial basal. É possível que a redução na geração de óxido nítrico pelas células endoteliais seja responsável por esse resultado. De fato, menor biodisponibilidade de NO está associado ao aumento de pressão arterial em diversos modelos de hipertensão. No entanto, a relação entre a expressão protéica da eNOS, geração de NO e níveis baixos de Mg^{2+} ainda precisa ser esclarecida.

O tratamento crônico com aldosterona reduz o relaxamento mediado pelo endotélio vascular em aortas de ratos normotensos e hipertensos. Este efeito está associado à menor biodisponibilidade de NO e maior produção de derivados do ácido araquidônico mediado pela enzima Cox-2 (BLANCO-RIVERO et al., 2005). Em CMLV aldosterona induz vasoconstrição via ativação da PLC, PKC e mobilização de Ca^{2+} (TOUYZ et al., 2003a). Estes efeitos podem contribuir para o aumento de pressão arterial que nós observamos em camundongos MgH e MgL após a infusão de aldosterona.

Além da hipertensão, maiores níveis plasmáticos de aldosterona também estão associados à hipertrofia do ventrículo esquerdo, danos na função renal, processo fibrótico e remodelamento de artérias de resistência (REMUZZI et al., 2008; ENDEMANN et al., 2004; ROSSI et al., 1997). Dados clínicos e provenientes de modelos experimentais de hipertensão indicam que o uso do antagonista de receptores para mineralocorticóides, eplerenona, reverte os efeitos deletérios da aldosterona por mecanismo independente da redução na pressão arterial (STOWASSER et al., 2005; TAKEDA et al., 2000). Em nosso estudo, a infusão de mineralocorticóide foi associada à hipertrofia cardíaca e renal, e maior depósito de colágeno nesses órgãos. Nós também observamos que aldosterona

induziu deterioração da função renal, indicada pela maior microalbuminúria após a infusão desse mineralocorticoide. Foi interessante notar a tendência de aumento nesses parâmetros em camundongos MgL tratados com óleo mineral. Esse resultado indica que a deficiência na homeostase do Mg^{2+} induz alterações na estrutura e função de órgãos como rim e coração.

Nós observamos que a expressão protéica do TRPM7 está reduzida no tecido cardíaco de camundongos MgL em condições basais. Não foi possível determinar a presença do TRPM6 nesse tecido. Esses dados confirmam observações anteriores indicando que enquanto o TRPM7 é encontrado em diversos tecidos, enquanto seu homólogo TRPM6 está presente em locais específicos do intestino e rim. Nossos achados reforçam ainda a noção que o TRPM7 é um importante regulador do transporte de Mg^{2+} em outros tecidos que não o intestinal e renal. A infusão de aldosterona reduziu a expressão protéica desse canal no coração de animais MgH. Dessa maneira, é possível que o menor transporte de Mg^{2+} mediado pelo TRPM7 esteja envolvido nos efeitos deletérios da aldosterona sobre o tecido cardíaco.

A homeostase de Mg^{2+} depende do equilíbrio entre seu transporte no intestino, rim e o armazenamento ósseo. Embora a deficiência desse íon também seja resultado do consumo insuficiente na dieta ou da menor absorção intestinal, maior perda de Mg^{2+} na urina é a principal causa de hipomagnesemia. O aumento na excreção urinária pode ser induzido pelo uso de diuréticos, antibióticos e outras drogas. Essa condição está presente em síndromes genéticas associadas à maior magnesúria e patologias como a diabetes e doenças cardiovasculares.

A reabsorção da maior parte do Mg^{2+} filtrado nos rins é feita no ramo ascendente da alça de Henle de maneira paracelular via paracelina-1 (SIMON et al., 1999). Embora apenas 15% da recaptção desse íon ocorra no túbulo contorcido distal, essa região determina a concentração final de Mg^{2+} na urina uma vez que sua reabsorção não ocorre após esse segmento (QUAMME et al., 1997). Esse processo é feito de maneira ativa, por mecanismo transcelular dependente de canais de receptores transientes de potencial da melastatina. Análise imunohistoquímica demonstra que o TRPM6 está localizado principalmente na membrana luminal das células do túbulo contorcido distal,

sugerindo que esse canal desempenha um papel importante na reabsorção ativa do Mg^{2+} (VOETS et al., 2004). De fato, mutações relacionadas à perda de função do TRPM6 estão presentes em doenças hereditárias associadas à maior magnesúria (SCHLINGMANN et al., 2002). Embora o TRPM7 também esteja presente no rim, seu papel na reabsorção renal de Mg^{2+} ainda é desconhecido.

Em nosso estudo camundongos MgL apresentaram maior perda de Mg^{2+} na urina em condições basais. Também foi observado que a infusão de aldosterona aumenta a excreção renal desse íon tanto em animais MgH como MgL. Magnesúria pode ser decorrente do menor transporte passivo (mecanismo paracelulares) ou ativo (mecanismos transcelulares) de Mg^{2+} no rim. A expressão protéica da paracelina-1 foi semelhante em animais MgH e MgL e o tratamento com aldosterona não alterou esse perfil. Esse resultado indica que não há alteração no processo passivo de recaptção de Mg^{2+} em nosso modelo.

De maneira semelhante ao observado por Rondón e colaboradores a expressão protéica basal do canal TRPM6 está diminuída em rins de animais com baixos níveis de Mg^{2+} em comparação aos animais com níveis normais. O tratamento com aldosterona aumentou a expressão protéica desse canal em camundongos MgH mas não MgL. Estudos demonstram que redução na concentração plasmática de Mg^{2+} induz aumento do transporte transepitelial desse íon. De fato, camundongos alimentados com dieta deficiente em Mg^{2+} apresentam maior expressão gênica do TRPM6 no rim, indicando assim a existência do controle transcricional e translacional de transportadores desse íon em situações de hipomagnesemia (RONDÓN et al., 2008, GROENESTEGE et al., 2006). Também observamos que a expressão protéica do TRPM7 estava aumentada em rins de animais com baixos níveis de Mg^{2+} e que o tratamento com aldosterona não altera esse resultado.

Em nosso estudo, a análise bioquímica indicou que a concentração plasmática de Mg^{2+} está reduzida em camundongos com MgL. Esse resultado está de acordo com estudos anteriores e com a caracterização desse modelo, indicando menores níveis de Mg^{2+} não apenas em hemácias, mas também no plasma (FEILLET-COUDRAY et al., 2004). A hipomagnesemia em camundongos com deficiência na homeostase do Mg^{2+} pode ser decorrente da menor expressão

protéica de TRPM6 nos rins desses animais. Também observamos que a infusão de aldosterona diminui a concentração plasmática de Mg^{2+} tanto em animais MgL com nos MgH.

De maneira geral, nossos resultados ressaltam a importância do canal de receptores transientes de potencial da melastatina no controle renal da homeostase do Mg^{2+} . Também está clara a existência de mecanismos regulatórios da expressão protéica dos canais TRPM6 e TRPM7 mediados pela aldosterona no modelo de hipomagnesemia MgL e MgH. A maior expressão protéica do TRPM6 em rins após o tratamento com esse mineralocorticoide observado em animais MgH sugere um mecanismo compensatório da redução da concentração plasmática de Mg^{2+} induzida pela aldosterona. O motivo pelo qual a infusão de aldosterona não alterou os níveis de TRPM6 nos rins de camundongos MgL ainda é desconhecido. Também pouco podemos especular sobre o significado da maior expressão protéica do TRPM7 em rins de camundongos MgL em função da falta de conhecimento sobre seu papel na reabsorção renal de Mg^{2+} .

Além do distúrbio na homeostase do Mg^{2+} , observamos também que em condições basais os camundongos MgL apresentaram hipocalcemia. Esse resultado é consistente com estudos anteriores, não apenas nesse modelo, demonstrando que a deficiência de Mg^{2+} está associada às alterações na concentração plasmática e urinária de K^+ (SCHLINGMANN et al., 2004). A infusão de aldosterona, assim como esperado, aumentou a excreção de K^+ na urina e reduziu a concentração plasmática desse íon em camundongos MgH e MgL. Estudos sugerem que a menor concentração plasmática de K^+ seja responsável pelos efeitos da aldosterona no sistema cardiovascular. Diuréticos que induzem a perda desse eletrólito aumentam o risco de acidentes cardiovasculares em pacientes hipertensos (SISCOVICK et al., 1994). No entanto, foi demonstrado que os efeitos deletérios induzidos pela aldosterona no coração não estão associados às alterações na homeostase do K^+ (MARTINEZ et al., 2002). Além disso, fibrose associada à maior atividade do PAI-1 é reduzida pela espironolactona de maneira independente da concentração plasmática de K^+ . Dessa maneira embora não seja possível excluir os efeitos da hipocalcemia, estudos em modelos animais e

humanos indicam que os efeitos deletérios da aldosterona sobre o sistema cardiovascular são independentes da alteração na concentração plasmática de K^+ .

Íons Mg^{2+} estão envolvidos em processos fisiológicos e bioquímicos que regulam a função do sistema cardiovascular. De fato, estudos demonstram a existência da relação invertida entre a ingestão de Mg^{2+} e o aumento na pressão arterial (TOUYZ et al., 1999). Essa correlação aparenta ser importante, sobretudo em casos de pacientes hipertensos com alta concentração plasmática de aldosterona. Processos como a contração, dilatação, crescimento, expressão de marcadores pró-inflamatórios, produção de agentes vasoativos e síntese protéica e de ácidos nucleicos podem ser modulados não apenas pelo Mg^{2+} mas também pela aldosterona (MAZUR et al., 2007).

Estudos indicam a participação do estresse oxidativo nos efeitos deletérios da aldosterona sobre o sistema cardiovascular (NISHIYAMA et al., 2004; PARK et al., 2004; IGLARZ et al., 2004). Esse mineralocorticoide aumenta a atividade da NAD(P)H oxidase e a geração de espécies reativas de oxigênio em modelos experimentais de hipertensão. Nesses estudos, o tratamento com o inibidor da NAD(P)H oxidase apocinina previne o aumento na pressão arterial e hipertrofia cardiovascular (PARK et al., 2004). No presente trabalho, nós demonstramos que aldosterona aumenta o estresse oxidativo sistêmico em camundongos MgL mas não MgH. Experimentos adicionais serão necessários para confirmar o aumento da atividade da NAD(P)H oxidase e geração de espécies reativas de oxigênio no tecido cardíaco e renal. No entanto, esse achado nos permite especular que os efeitos deletérios induzidos pela aldosterona podem ser mediados pelo estresse oxidativo.

Em resumo, descrevemos que:

- Células vasculares de camundongos MgL apresentaram menor influxo de Mg^{2+} induzido pela aldosterona.
- Esse resultado foi associado à menor ativação dos canais TRPM7.
- A menor atividade do TRPM7 está associada à maior ativação de cascatas de sinalização e expressão protéica de marcadores pró-inflamatórios.
- Estudos *in vivo* indicaram que aldosterona induz aumento de pressão arterial em camundongos MgH e MgL.

- As alterações na homeostase do Mg^{2+} foram associadas a diferenças na expressão protéica do TRPM7 e TRPM6.
- Os efeitos deletérios no tecido renal e cardíaco mediados pela aldosterona estão relacionados a menores níveis de Mg^{2+} .
- Os mecanismos envolvidos nesse processo podem envolver a geração de espécies reativas de oxigênio.

6 CONCLUSÕES

Com os resultados aqui apresentados nós podemos concluir que os canais TRPM7 participam da regulação de vias pró-inflamatórias e fibrogênicas induzidas pela aldosterona em células endoteliais e de músculo liso vascular.

É possível concluir também que a redução nos níveis de Mg^{2+} contribuem para os efeitos deletérios em órgãos alvo e estresse oxidativo mediados pela aldosterona em um modelo genético de hipomagnesemia.

Esses resultados fornecem uma nova compreensão de como aldosterona modula a função de células vasculares e ressaltam a importância do Mg^{2+} e seus transportadores em mecanismos celulares e na hipertensão induzida por esse mineralocorticoide.

Do ponto de vista clínico, nossas observações têm grande relevância e podem servir de base para novas formas de tratamento em casos de pacientes com hiperaldosteronismo, caracterizados não apenas pelo aumento na pressão arterial, mas também por hipomagnesemia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AARTS, M.; IIHARA, K.; WEI, W.L.; XIONG, Z.G.; ARUNDINE, M.; CERWINSKI, W.; MACDONALD, J.F.; TYMIANSKI, M. A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. **Cell.**, v.115, n.7, p.863-77, 2003.

AHOKAS, R.A.; SUN, Y.; BHATTACHARYA, S.K.; GERLING, I.C.; WEBER, K.T. Aldosteronism and a proinflammatory vascular phenotype: role of Mg^{2+} , Ca^{2+} , and H_2O_2 in peripheral blood mononuclear cells. **Circulation**, v.111, n.1, p.51-57, 2005.

ALTURA, B.M.; ALTURA, B.T. New perspectives on the role of magnesium in the pathophysiology of the cardiovascular system. II. Experimental aspects. **Magnesium.**, v.4, n.5-6, p.:245-271, 1985.

ANDERSON, GF.; CHU, E. Expanding priorities-confronting chronic disease in countries with low income. **N Engl J Med.**, v.356, n.3, p.209-211, 2007.

ARIMA, S.; KOHAGURA, K.; XU, H.L.; SUGAWARA, A.; URUNO, A.; SATOH, F.; TAKEUCHI, K.; ITO, S. Endothelium-derived nitric oxide modulates vascular action of aldosterone in renal arteriole. **Hypertension**, v.43, n.2, p.352-357, 2004.

AVIV, A. Salt consumption, reactive oxygen species and cardiovascular ageing: a hypothetical link. **J Hypertens.**, v.20, n.4, p.555-559, 2002.

BARNES, P.J.; KARIN, M. Nuclear factor- κ B. A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N Engl J Med.**, v.336, n.15, p.1066-1071, 1997.

BLANCO-RIVERO, J.; CACHOFEIRO, V.; LAHERA, V.; ARAS-LOPEZ, R.; MARQUEZ-RODAS, I.; SALAICES, M.; XAVIER, F.E.; FERRER, M.; BALFAGON, G. Participation of prostacyclin in endothelial dysfunction induced by aldosterone in normotensive and hypertensive rats. **Hypertension.**, v.46, n.1, p.107-112, 2005.

BLASI, E.R.; ROCHA, R.; RUDOLPH, A.E.; BLOMME, E.A.G.; POLLY, M.L.; MCMAHON, E.G. Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. **Kidney Int.**, v.63, n.5, p.1791-1800, 2003.

BO, S.; PISU, E. Role of dietary magnesium in cardiovascular disease prevention, insulin sensitivity and diabetes. **Curr. Opin. Lipidol.**, v.19, n.1, p.50-6, 2008.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação de documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CALLERA, G.E.; MONTEZANO, A.C; YOGI, A.; TOSTES, R.C.; HE, Y.; SCHIFFRIN, E.L.; TOUYZ, R.M. c-Src-dependent nongenomic signaling responses to aldosterone are increased in vascular myocytes from spontaneously hypertensive rats. **Hypertension.**, v.46, n.4, p.1032-8, 2005.

CHUBANOV, V.; GUDERMANN, T.; SCHLINGMANN, K.P. Essential role for TRPM6 in epithelial magnesium transport and body magnesium homeostasis. **Pflugers Arch.**, v.451, n.1, p.228-234, 2005a.

CHUBANOV, V.; MEDEROS, Y.; SCHNITZLER, M.; WARING, J.; PLANK, A.; GUDERMANN, T. Emerging roles of TRPM6/TRPM7 channel kinase signal transduction complexes. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**; v.371, n.4, p.334-341, 2005b.

CLAPHAM, D.E.; MONTELL, C.; SCHULTZ, G.; JULIUS, D. International Union of Pharmacology. International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. **Pharmacol. Rev.**, v.55, n.4, p.591-596, 2003.

CLARK, K.; LANGESLAG, M.; VAN LEEUWEN, B.; RAN, L.; RYAZANOV, A.G.; FIGDOR, C.G.; MOOLENAAR, W.H.; JALINK, K.; VAN LEEUWEN, F.N. TRPM7, a novel regulator of actomyosin contractility and cell adhesion. **EMBO J.**, v.25, n.2, p.290-301, 2006.

COLE, D.E.C.; QUAMME, G.A. Inherited disorders of renal magnesium handling. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v.11, n.10, p.1937-1947, 2000.

CROXTALL, J.D., FLOWER, R.J. Lipocortin 1 mediates dexamethasone-induced growth arrest of the A549 lung adenocarcinoma cell line. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.89, n.8, p.3571–3575, 1992.

CROXTALL, J.D.; CHOUDHURY, Q.; FLOWER, R.J. Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signaling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. **Br. J. Pharmacol.**, v.130, n.2, p.289–298, 2000.

DAVIDSON, J.; FLOWER, R.J.; MILTON, A.S.; PEERS, S.H.; ROTONDO, D. Antipyretic actions of human recombinant lipocortin-1. **Br. J. Pharmacol.**, v.102, n.1, p.7–9, 1991.

DOROVKOV, M.V.; RYAZANOV, A.G. Phosphorylation of annexin I by TRPM7 channel-kinase. **J. Biol. Chem.**, v.279, n.49, p.50643-50646, 2004.

DU, X.; SAIDO, T.C.; TSUBUKI, S.; INDIG, F.E.; WILLIAMS, M.J.; GINSBERG, M.H. Calpain cleavage of the cytoplasmic domain of the integrin beta 3 subunit. **J. Biol. Chem.**, v.270, n.44, p.26146-26151, 1995.

DUNCAN, L.M.; DEEDS, J.; HUNTER, J.; SHAO, J.; HOLMGREN, L.M.; WOOLF, E.A.; TEPPER, R.I.; SHYJAN, A.W. Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. **Cancer Res.**, v.58, n.7, p.1515-1520, 1998.

EARLEY, S.; WALDRON, B.J.; BRAYDEN, J.E. Critical role for transient receptor potential channel TRPM4 in myogenic constriction of cerebral arteries. **Circ. Res.**, v.95, n.9, p.922-929, 2004.

EBEL, H.; GUNTHER, T. $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ antiport in erythrocytes of spontaneously hypertensive rats: role of Mg^{2+} in the pathogenesis of hypertension. **Magnes Res.**, v.18, n.3, p.175-185, 2005.

EGUCHI, S.; NUMAGUCHI, K.; IWASAKI, H.; MATSUMOTO, T.; YAMAKAWA, T.; UTSUNOMIYA, H.; MOTLEY, E.D.; KAWAKATSU, H.; OWADA, K.M.; HIRATA, Y.; MARUMO, F.; INAGAMI, T. Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. **J. Biol. Chem.**, v.273, n.15, p.8890-6, 1998.

ELIN, R.J. Magnesium; the fifth but forgotten electrolyte. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.102, p.616-622, 1994.

ENDEMANN, D.H.; TOUYZ, R.M.; IGLARZ, M.; SAVOIA, C.; SCHIFFRIN, E.L. Eplerenone prevents salt-induced vascular remodeling and cardiac fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v.43, n.6, p.1252-7, 2004.

FEILLET-COUDRAY, C.; COUDRAY, C.; WOLF, F.I.; HENROTTE, J.G.; RAYSSIGUIER, Y.; MAZUR, A. Magnesium metabolism in mice selected for high and low erythrocyte magnesium levels. **Metabolism**, v.53, n.5, p.660-5, 2004.

FEILLET-COUDRAY, C.; TRZECIAKIEWICZ, A.; COUDRAY, C.; RAMBEAU, M.; CHANSON, A.; RAYSSIGUIER, Y.; OPOLSKI, A.; WOLF, F.I.; MAZUR, A. Erythrocyte magnesium fluxes in mice with nutritionally and genetically low magnesium status. **Eur. J. Nutr.**, v.45, n.3, p.171-177, 2006.

FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; LORENZETTI, B.B.; MICHELIN, M.A.; PERRETTI, M.; FLOWER, R.J.; POOLE, S. Role of lipocortin-1 in the anti-hyperalgesic actions of dexamethasone. **Br. J. Pharmacol.**, v.121, n.5, p.883-888, 1997.

FONFRIA, E.; MURDOCK, P.R.; CUSDIN, F.S.; BENHAM, C.D.; KELSELL, R.E.; MCNULTY, S. Tissue distribution profiles of the human TRPM cation channel family. **J. Recept. Signal Transduct Res.**, v.26, n.3, p.159-178, 2006.

FULLER, P.J.; YOUNG, M.J. Mechanisms of mineralocorticoid action. **Hypertension**, v.46, n.6, p.1227-35, 2005.

- FUNDER, J.W. Aldosterone, mineralocorticoid receptors and vascular inflammation. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.217, n.1, p.263–269, 2004.
- GABRIEL, T.E.; GUNZEL, D. Quantification of Mg^{2+} extrusion and cytosolic Mg^{2+} -buffering in *Xenopus* oocytes. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.458, n.1, p.3-15, 2007.
- GOLL, D.E.; THOMPSON, V.F.; LI, H.; WEI, W. CONG, J. The calpain system. **Physiol. Rev.**, v.83, n.3, p.731–801, 2003.
- GRIENDLING, K.K.; SORESCU, D.; LASSEGUE, B.; USHIO-FUKAI, M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.20, n.10, p.2175– 83, 2000.
- GROENESTEGE, W.M.; HOENDEROP, J.G.; VAN DEN HEUVEL, L.; KNOERS, N.; BINDELS, R.J. The epithelial Mg^{2+} channel transient receptor potential melastatin 6 is regulated by dietary Mg^{2+} content and estrogens. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v.17, n.4, p.1035–1043, 2006.
- GRUBBS, R.D.; MAGUIRE, M.E. Magnesium as a regulatory cation: criteria and evaluation. **Magnesium**, v.6, n.3, p.113-127, 1987.
- GUNTHER, T. Na^+/Mg^{2+} antiport in non-erythrocyte vertebrate cells. **Magnes Res.**, v.20, n.2, p.89-99, 2007.
- GUNTHER, T.; VORMANN, J.; HOLLRIEGL, V. Isoproterenol-induced Mg^{2+} uptake in liver. **FEBS Lett.**, v.307, n.3, p.333-336, 1992.
- HAMAGUCHI, Y.; MATSUBARA, T.; AMANO, T.; UETANI, T.; ASANO, H.; IWAMOTO, T.; FURUKAWA, K.; MUROHARA, T.; NAKAYAMA, S. Na^+ -independent Mg^{2+} transport sensitive to 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) in vascular smooth muscle cells: involvement of TRPM-like channels. **J. Cell. Mol. Med.**, v.12, n.3, p.962-74, 2008.
- HARA, Y.; WAKAMORI, M.; ISHII, M.; MAENO, E.; NISHIDA, M.; YOSHIDA, T.; YAMADA, H.; SHIMIZU, S.; MORI, E.; KUDOH, J.; SHIMIZU, N.; KUROSE, H.; OKADA, Y.; IMOTO, K.; MORI, Y. LTRPC2 Ca^{2+} -permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. **Mol. Cell.**, v.9, n.1, p.163-173, 2002.
- HE, T.; YAO, G.; SAVOIA, C.; TOUYZ, R.M. Transient receptor potential melastatin 7 ion channels regulate magnesium homeostasis in vascular smooth muscle cells: Role of angiotensin II. **Circ. Res.**, v.96, p.207-215, 2005.
- HENROTTE, J.G.; FRANCK, G.; SANTARROMANA, M. Selections of two lines of mice for high and low blood cell magnesium concentrations, called MGH (high) and MGL (low). **Mouse News Lett.**, v.81, p.84-85, 1988.

HENROTTE, J.G.; FRANCK, G.; SANTARROMANA, M.; FRANCÈS, H.; MOUTON, D.; MOTTA, R. Mice selected for low and high blood magnesium levels: a new model for stress studies. **Physiol. Behav.**, v.61, n.5, p.653-8, 1997.

HSU, Y.J.; HOENDEROP, J.G.; BINDELS, R.J. TRP channels in kidney disease. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1772, n.8, p.928-36, 2007.

Iglarz, M.; Touyz, R.M.; Viel, E.C.; Amiri, F.; Schiffrin, E.L. Involvement of oxidative stress in the profibrotic action of aldosterone. Interaction with the rennin-angiotensin system. **Am. J. Hypertens.**, v.17, n.6, p.597-603, 2004.

INGBER D.E. Mechanobiology and diseases of mechanotransduction. **Ann. Med.**, v.35, n.8, p.564-577, 2003.

INNERARITY, S. Hypomagnesemia in acute and chronic illness. **Crit. Care Nurs. Q.**, v.23, n.2, p.1-19, 2000.

JAFFE, I.Z.; MENDELSON, M.E. Angiotensin II and aldosterone regulate gene transcription via functional mineralocorticoid receptors in human coronary artery smooth muscle cells, **Circ. Res.**, v.96, n.6, p.643-650, 2005.

JUTTNER, R.; EBEL, H. Characterization of Mg^{2+} transport in brush border membrane vesicles of rabbit ileum studied with mag-fura-2. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1370, n.1, p.51-63, 1998.

KAYNE, L.H.; LEE, D.B.N. Intestinal magnesium absorption. **Miner. Electrolyte Metab.**, v.19, p.210-217, 1993.

KOLISEK, M.; ZSURKA, G.; SAMAJ, J.; WEGHUBER, J.; SCHWEYEN, R.J.; SCHWEIGEL, M. Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic Mg^{2+} influx system in mitochondria. **EMBO J.**, v.22, n.6, p.1235-1244, 2003.

KRAFT, R.; HARTENECK, C. The mammalian melastatin-related transient receptor potential cation channels: an overview. **Pflugers Arch.**, v.451, n.1, p.204-211, 2005.

KRUG, A.W.; GROSSMANN, C.; SCHUSTER, C.; FREUDINGER, R.; MILDENBERGER, S.; GOVINDAN, M.V.; GEKLE, M. Aldosterone stimulates epidermal growth factor receptor expression. **J. Biol. Chem.**, v.278, n.44, p.43060-43066, 2003.

LA, M.; D'AMICO, M.; BANDIERA, S.; DI FILIPPO, C.; OLIANI, S.M.; GAVINS, F.N.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. Annexin 1 peptides protect against experimental myocardial ischemiareperfusion: analysis of their mechanism of action. **FASEB J.** v.15, n.12, p.2247-2256, 2001.

LEE, F.S.; HAGLER, J.; CHEN, Z.J.; MANIATIS, T. Activation of the IkappaB alpha kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. **Cell**, v.88, n.2, p.213-222, 1997.

LIU, S.L.; SCHMUCK, S.; CHORAZCYZEWSKI, J.Z.; GROS, R.; FELDMAN, R.D. Aldosterone regulates vascular reactivity: short-term effects mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent nitric oxide synthase activation, **Circulation**, v.108, n.19, p.2400-2406, 2003.

MARTIN, H.; URING-LAMBERT, B.; ADRIAN, M.; LAHLOU, A.; BONET, A.; DEMOUGEOT, C.; DEVAUX, S.; LAURANT, P.; RICHERT, L.; BERTHELOT, A. Effects of long-term dietary intake of magnesium on oxidative stress, apoptosis and ageing in rat liver. **Magnes Res.** v.21, n.2, p.124-30, 2008.

MARTINEZ, D.V.; ROCHA, R.; MATSUMURA, M.; OESTREICHER, E.; OCHOA-MAYA, M.; ROUBSANTHISUK, W.; WILLIAMS, G.H.; ADLER, G.K. Cardiac damage prevention by eplerenone: comparison with low sodium diet or potassium loading. **Hypertension**, v.39, n1, p.614-618, 2002.

MARTINI, L.A. Magnesium supplementation and bone turnover. **Nutr Rev.**, v.57, p.227-229, 1999.

MATSUSHITA, M.; KOZAK, J.A.; SHIMIZU, Y.; MCLACHLIN, D.T.; YAMAGUCHI, H.; WEI, F.Y.; TOMIZAWA, K.; MATSUI, H.; CHAIT, B.T.; CAHALAN, M.D.; NAIRN, A.C. Channel function is dissociated from the intrinsic kinase activity and autophosphorylation of TRPM7/CHAK1. **J. Biol. Chem.**, v.280, n.21, p.20793-20803, 2005.

MAZUR, A.; MAIER, J.A.; ROCK, E.; GUEUX, E.; NOWACKI, W.; RAYSSIGUIER, Y. Magnesium and the inflammatory response: potential physiopathological implications. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.458, n.1, p.48-56, 2007.

MICHEA, L.; DELPIANO, A.M.; HITSCHFELD, C.; LOBOS, L.; LAVANDERO, S.; MARUSIC, E.T. Eplerenone blocks nongenomic effects of aldosterone on the Na⁺/H⁺ exchanger, intracellular Ca²⁺ levels, and vasoconstriction in mesenteric resistance vessels. **Endocrinology**, v.146, n.3, p.973-980, 2005.

MONTEILH-ZOLLER, M.K.; HERMOSURA, M.C.; NADLER, M.J.; SCHARENBERG, A.M.; PENNER, R.; FLEIG, A. TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. **J. Gen. Physiol.**, v.121, n.1, p.49-60, 2003.

MONTELL, C. An exciting release on TRPM7. **Neuron**, v.52, n.3, p.395-397, 2006.

MOSS S. Ion channels. Annexins taken to task. **Nature**, v.378, n. 6556, p.446-447, 1995.

MOTTA, R.; LOUIS, J.P.; FRANK, G.; HENROTTE, J.G. Unexpected association between reproductive longevity and blood magnesium levels in a new model of selected mouse strains. **Growth Dev. Aging**, v.62, n.1, p.37-45, 1998.

MUBAGWA, K.; GWANYANYA, A.; ZAKHAROV, S.; MACIANSKIENE, R. Regulation of cation channels in cardiac and smooth muscle cells by intracellular magnesium. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.458, n.1, p.73-89, 2007.

MURAKAMI, N.; CHAUHAN, V.P.; ELZINGA, M. Two nonmuscle isoforms expressed in rabbit brains: filament forming properties, the effects of phosphorylation by protein kinase C and casein kinase II, and location of the phosphorylation sites. **Biochemistry**, v.37, n.7, p.1989–2003, 1998.

MURPHY, E. Mysteries of magnesium homeostasis. **Circ. Res.**, v.86, p. 245-248, 2000.

NISHIYAMA, A.; YAO, L.; NAGAI, Y.; MIYATA, K.; YOSHIZUMI, M.; KAGAMI, S.; KONDO, S.; KIYOMOTO, H.; SHOKOJI, T.; KIMURA, S.; KOHNO, M.; ABE, Y. Possible contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase to renal injury in aldosterone/ salt-induced hypertensive rats. **Hypertension**, v.43, n.4, p.841–848, 2004.

PARAVICINI, T.M.; YOGI, A.; MAZUR, A.; TOUYZ, R.M. Dysregulation of vascular TRPM7 and annexin-1 is associated with endothelial dysfunction in inherited hypomagnesemia. **Hypertension**, in press.

PARK, Y.M.; PARK, M.Y.; SUH, Y.L.; PARK, J.B. NAD(P)H oxidase inhibitor prevents blood pressure elevation and cardiovascular hypertrophy in aldosterone-infused rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.313, n.3, p.812-817, 2004.

PEDERSEN, S.F.; OWSIANIK, G.; NILIUS, B. TRP channels: an overview. **Cell. Calcium**, v.38, n.3-4, p.233-252, 2005.

PERRAUD, A.L.; KNOWLES, H.M.; SCHMITZ, C. Novel aspects of signaling and ionhomeostasis regulation in immunocytes. The TRPM ion channels and their potential role in modulating the immune response. **Mol. Immunol.**, v.41, n.6-7, p.657-673, 2004.

PERRETTI, M.; CROXTALL, J.D.; WHELLER, S.K.; GOULDING, N.J.; HANNON, R.; FLOWER, R.J. Mobilizing lipocortin 1 in adherent human leukocytes downregulates their transmigration. **Nat. Med.**, v.2, n.11, p.1259–1262, 1996.

PUEYO, M.E.; GONZALEZ, W.; NICOLETTI, A.; SAVOIE, F.; ARNAL, J.F.; MICHEL, J.B. 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, n.3, p.645-651, 2000.

- QUAMME, G.A. Renal magnesium handling: new insights in understanding old problems. **Kidney Int.**, v.52, n.5, p.1180–1195, 1997.
- RAYNAL, P.; POLLARD, H.B. Annexins: the problem of assessing the biological role for multi-functional calcium- and phospholipid-binding proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1197, n.1, p.63-93, 1994.
- REMUZZI, G.; CATTANEO, D.; PERICO, N. The aggravating mechanisms of aldosterone on kidney fibrosis. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v.19, n.8, p.1459-62, 2008.
- RESNICK, L.M.; BARDICEF, O.; ALTURA, B.T.; ALDERMAN, M.H.; ALTURA, B.M. Serum ionized magnesium: relation to blood pressure and racial factors. **Am. J. Hypert.**, v.10, p.1420-1424, 1997.
- RESNICK, L.M.; LARAGH, J.H.; SEALEY, J.E.; ALDERMAN, M.H. Divalent cations in essential hypertension. Relations between serum ionized calcium, magnesium, and plasma renin activity. **N. Engl. J. Med.**, v.309, n.15, p.888-891, 1983.
- ROGERSON, F.M.; FULLER, P.J. Mineralocorticoid action. **Steroids**, v.65, n.2, p.61–73, 2000.
- ROHACS, T.; NILIUS, B. Regulation of transient receptor potential (TRP) channels by phosphoinositides. **Pflugers Arch.**, v.455, n.1, p.157-168, 2007.
- ROMANI, A.M. Magnesium homeostasis in mammalian cells. **Front Biosci.**, v.12, p.308-331, 2007.
- RONDÓN, L.J.; GROENESTEGE, W.M.; RAYSSIGUIER, Y.; MAZUR, A. Relationship between low magnesium status and TRPM6 expression in the kidney and large intestine. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.294, n.6, p.R2001-7. 2008.
- ROSSI, G.P.; CESARI, M.; SACCHETTO, A. LVH in primary aldosteronism. **Hypertension**, v.30, n.5, p.1297-8, 1997.
- RUBIN, H. The logic of the Membrane, Magnesium, Mitosis (MMM) model for the regulation of animal cell proliferation. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.458, n.1, p.16-23, 2007.
- RUDE, R.K. Magnesium deficiency: a cause of heterogeneous disease in humans. **J. Bone Miner. Res.**, v.13, n.4, p.749-58, 1998.
- RUNNELS, L.W.; YUE, L.; CLAPHAM, D.E. The TRPM7 channel is inactivated by PIP(2) hydrolysis. **Nat. Cell Biol.**, v.4, n.5, p.329–336, 2002.
- RUNYAN, A.L.; SUN, Y.; BHATTACHARYA, S.K.; AHOKAS, R.A.; CHHOKAR, V.S.; GERLING, I.C.; WEBER, K.T. Responses in extracellular and intracellular calcium and magnesium in aldosteronism. **J. Lab. Clin. Med.**, v.146, n.2, p.76-84, 2005.

- RYAN, M.F. The role of magnesium in clinical biochemistry: an overview. **Ann. Clin. Biochem.**, v.28, n.1, p.19-26, 1991.
- RYAZANOV, A.G.; PAVUR, K.S.; DOROVKOV, M.V. Alpha-kinases: a new class of protein kinases with a novel catalytic domain. **Curr. Biol.**, v.9, n.2, p.R43–R45, 1999.
- RYAZANOVA, L.V.; DOROVKOV, M.V.; ANSARI, A.; RYAZANOV, A.G. Characterization of the protein kinase activity of TRPM7/ChaK1, a protein kinase fused to the transient receptor potential ion channel. **J. Biol. Chem.**, v.279, n.5, p.3708–3716, 2004
- SABATIER, M.; PONT, F.; ARNAUD, M.J.; TURNLUND, J.R. A compartmental model of magnesium metabolism in healthy men based on two stable isotope tracers. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.285, n.3, p.R656-R663, 2003.
- SAHNI, J.; NELSON, B.; SCHARENBERG, A.M. SLC41A2 encodes a plasma-membrane Mg^{2+} transporter. **Biochem. J.**, v.401, n.2, p.505-513, 2007.
- SATO, K.; KAWASHIMA, S. Calpain function in the modulation of signal transduction molecules. **Biol. Chem.**, v.382, n.5, p.743–751, 2001.
- SCHIFFRIN, E.L. Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. **Am. J. Hypertens.**, v.17, n.12 Pt 1, p.1192-1200, 2004b.
- SCHIFFRIN, E.L.; TOUYZ, R.M. From bedside to bench to bedside: role of reninangiotensin-aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.287, n.2, p.H435-446, 2004a.
- SCHLINGMANN, K.P.; KONRAD, M.; SEYBERTH, H.W. Genetics of hereditary disorders of magnesium homeostasis. **Pediatr. Nephrol.**, v.19, n.1, p.13-25, 2004.
- SCHLINGMANN, K.P.; WALDEGGER, S.; KONRAD, M.; CHUBANOV, V.; GUDERMANN, T. TRPM6 and TRPM7-Gatekeepers of human magnesium metabolism. **Biochim. Biophys Acta.**, v.1772, n.8, p.813-821, 2007.
- SCHLINGMANN, K.P.; WEBER, S.; PETERS, M.; NIEMANN-NEJSUM, L.; VITZTHUM, H.; KLINGEL, K.; KRATZ, M.; HADDAD, E.; RISTOFF, E.; DINOUR, D.; SYRROU, M.; NIELSEN, S.; SASSEN, M.; WALDEGGER, S.; SEYBERTH, H.W.; KONRAD, M. Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. **Nat. Genet.**, v.31, n.2, p.166-70, 2002.

SCHMITZ C, DEASON F, PERRAUD AL., Molecular components of vertebrate Mg^{2+} -homeostasis regulation. **Magnes Res.**, v.20, n.1, p.6-18, 2007.

SCHMITZ, C.; DOROVKOV, M.V.; ZHAO, X.; DAVENPORT, B.J.; RYAZANOV, A.G.; PERRAUD, A.L. The channel kinases TRPM6 and TRPM7 are functionally nonredundant. **J. Biol. Chem.**, v.280, n.45, p.37763-37771, 2005.

SCHMITZ, C.; PERRAUD, A.L.; FLEIG, A.; SCHARENBERG, A.M. Dual-function ion channel/protein kinases: novel components of vertebrate magnesium regulatory mechanisms. **Pediatr. Res.**, v.55, n.5, p.734-737, 2004.

SCHMITZ, C.; PERRAUD, A.L.; JOHNSON, C.O.; INABE, K.; SMITH, M.K.; PENNER, R.; KUROSAKI, T.; FLEIG, A.; SCHARENBERG, A.M. Regulation of vertebrate cellular Mg^{2+} homeostasis by TRPM7. **Cell**, v.114, n.2, p.191-200, 2003.

SCHWEIGEL, M.; MARTENS, H. Magnesium transport in the gastrointestinal tract. **Front. Biosci.**, v.5, p.D666-77, 2000.

SIMON, D.B.; LU, Y.; CHOATE, K.A.; VELAZQUEZ, H.; AL-SABBAN, E.; PRAGA, M.; CASARI, G.; BETTINELLI, A.; COLUSSI, G.; RODRIGUEZ-SORIANO, J.; MCCREDIE, D.; MILFORD, D.; SANJAD, S.; LIFTON, R.P. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg^{2+} reabsorption. **Science**, v.285, n.5424, p.103-6, 1999.

SISCOVICK, D.S.; RAGHUNATHAN, T.E.; PSATY, B.M.; KOEPESELL, T.D.; WICKLUND, K.G.; LIN, X.; COBB, L.; RAUTAHARJU, P.M.; COPASS, M.K.; WAGNER, E.H. Diuretic therapy for hypertension and the risk of primary cardiac arrest. **N. Engl. J. Med.**, v.330, n.26, p.1852-1857, 1994.

SKØTT, O.; UHRENHOLT, T.R.; SCHJERNING, J.; HANSEN, P.B.; RASMUSSEN, L.E.; JENSEN, B.L. Rapid actions of aldosterone in vascular health and disease-friend or foe? **Pharmacol. Ther.**, v.111, n.2, p.495-507, 2006.

STOCKAND, J.D.; MESZAROS, J.G. Aldosterone stimulates proliferation of cardiac fibroblasts by activating Ki-RasA and MAPK1/2 signaling, **Am. J. Physiol.**, v.284, n.1, p.H176-H184, 2003.

STORY, G.M. The Emerging Role of TRP Channels in Mechanisms of Temperature and Pain Sensation. **Curr Neuropharmacol.**, v.4, n.3, p.183-96, 2006.

STOWASSER, M.; SHARMAN, J.; LEANO, R.; GORDON, R.D.; WARD, G.; COWLEY, D.; MARWICK, T.H. Evidence for abnormal left ventricular structure and function in normotensive individuals with familial hyperaldosteronism Type I. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.90, n.9, p.5070- 5076, 2005.

STRAUCH, B.; PETRÁK, O.; WICHTERLE, D.; ZELINKA, T.; HOLAJ, R.; WIDIMSKÝ, J.JR. Increased arterial wall stiffness in primary aldosteronism in comparison with essential hypertension. **Am. J. Hypertens.**, v.19, n.9, p.909-14, 2006.

SU, L.T.; AGAPITO, M.A.; LI, M.; SIMONSON, W.T.; HUTTENLOCHER, A.; HABAS, R.; YUE, L.; RUNNELS, L.W. TRPM7 regulates cell adhesion by controlling the calcium-dependent protease calpain. **J. Biol. Chem.**, v.281, n.16, p.11260-11270, 2006.

SUH, S.H.; VENNEKENS, R.; MANOLOPOULOS, V.G.; FREICHEL, M.; SCHWEIG, U.; PRENEN, J.; FLOCKERZI, V.; DROOGMANS, G.; NILIUS, B. Characterisation of explanted endothelial cells from mouse aorta: electrophysiology and Ca^{2+} signalling. **Pflugers Arch.**, v.438, n.5, p.612-20, 1999.

SUZUKI, K.; HATA, S.; KAWABATA, Y.; SORIMACHI, H. Structure, activation, and biology of calpain. **Diabetes**, v.53, n.1, p.12–18, 2004.

SUZUKI, T.; OKUMURA-NOJI, K.; OGURA, A.; TANAKA, R.; NAKAMURA, K.; KUDO, Y. Calpain may produce a Ca^{2+} -independent form of kinase c in long term potentiation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.189, n.3, p.1515–20, 1992.

TAKEDA, Y.; MIYAMORI, I.; INABA, S.; FURUKAWA, K.; HATAKEYAMA, H.; YONEDA, T.; MABUCHI, H.; TAKEDA, R. Vascular aldosterone in genetically hypertensive rats, **Hypertension**, v.29, n.1, p.45–48, 1997.

TAKEDA, Y.; YONEDA, T.; DEMURA, M.; MIYAMORI, I.; MABUCHI, H. CARDIAC aldosterone production in genetically hypertensive rats. **Hypertension**, v.36, n.4, p.495–500, 2000.

TAKEZAWA, R.; SCHMITZ, C.; DEMEUSE, P.; SCHARENBERG, A.M.; PENNER, R.; FLEIG, A. Receptor-mediated regulation of the TRPM7 channel through its endogenous protein kinase domain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.101, n.16, p.6009-6014, 2004.

TOUYZ, R.M. Recent advances in intracellular signalling in hypertension. **Curr Opin. Nephrol. Hypertens.**, v.12, n.2, p.165–174, 2003 (a).

TOUYZ, R.M.; HE, Y.; MONTEZANO, A.C.; YAO, G.; CHUBANOV, V.; GUDERMANN, T.; CALLERA, G.E. Differential regulation of transient receptor potential melastatin 6 and 7 cation channels by ANG II in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.290, n.1, p.R73-78, 2006.

TOUYZ, R.M.; MILNE, F.J. Magnesium supplementation attenuates, but does not prevent, the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Am J. Hypert.**, v.12, n.8, p.757-765, 1999.

TOUYZ, R.M.; PU, Q.; HE, G.; CHEN, X.; YAO, G.; NEVES, M.F.; VIEL, E. Effects of low dietary magnesium intake on development of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: role of reactive oxygen species. **J. Hypertens.**, v.20, n.11, p.2221-32, 2002.

TOUYZ, R.M.; SCHIFFRIN, E.L. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. **Histochem. Cell. Biol.**, v.122, n.4, p.339-352, 2004.

TOUYZ, R.M.; YAO, G. Inhibitors of $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ exchange activity attenuate the development of hypertension in angiotensin II-induced hypertensive rats. **J. Hypertens.**, v.21, n.2, p.337-344, 2003 (a).

TOUYZ, R.M.; YAO, G. Modulation of vascular smooth muscle cell growth by magnesium-role of mitogen-activated protein kinases. **J. Cell. Physiol.**, v.197, n.3, p.326-335, 2003 (b).

VOETS, T.; NILIUS, B.; HOEFS, S.; VAN DER KEMP, A.W.; DROOGMANS, G.; BINDELS, R.J.; HOENDEROP, J.G. TRPM6 forms the Mg^{2+} influx channel involved in intestinal and renal Mg^{2+} absorption. **J. Biol. Chem.**, v.279, n.1, p.19-25, 2004.

VOGEL, V.; SHEETZ, M. Local force and geometry sensing regulate cell functions. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v.7, n.4, p.265-75, 2006.

WEGGLICKI, W.B.; MAK, I.T.; KRAMER, J.H.; DICKENS, B.F.; CASSIDY, M.M.; STAFFORD, R.E.; PHILIPS, T.M. Role of free radicals and substance P in magnesium deficiency. **Cardiovasc. Res.**, v.31, n.5, p.677-682, 1996.

WEGGLICKI, W.B.; MAK, I.T.; PHILLIPS, T.M. Blockade of cardiac inflammation in Mg^{2+} deficiency by substance P receptor inhibition. **Circ. Res.**, v.74, n.5, p.1009-13, 1994.

WEHLING, M.; KASMAYR, J.; THEISEN, K. Rapid effects of mineralocorticoids on sodium-proton exchanger: genomic or nongenomic pathway? **Am. J. Physiol.**, v.260, n.5, p.E719 –E726, 1991.

WOLF, F.I.; TRAPANI, V.; SIMONACCI, M.; FERRÉ, S.; MAIER, J.A. Magnesium deficiency and endothelial dysfunction: is oxidative stress involved? **Magnes Res.**, v.21, n.1, p.58-64, 2008.

YANG, Y.H.; MORAND, E.F.; GETTING, S.J.; PAUL-CLARK, M.; LIU, D.L.; YONA, S.; HANNON, R.; BUCKINGHAM, J.C.; PERRETTI, M.; FLOWER, R.J. Modulation of inflammation and response to dexamethasone by Annexin 1 in antigen-induced arthritis. **Arthritis Rheum.**, v.50, n.3, p.976-984, 2004.

YOGI, A.; CALLERA, G.E.; TOSTES, R.; TOUYZ, R.M. Bradykinin regulates calpain and pro-inflammatory signaling through TRPM7-sensitive pathways in vascular smooth muscle cells. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 2008, in press.