

**Efeitos do tratamento combinado com alisquireno
e L-arginina sobre a reatividade vascular em anéis
de aorta de ratos com hipertensão renovascular**

Cintia Helena Santuzzi

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas
Fisiologia Cardiovascular

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

Vitória, Novembro de 2014

Efeitos do tratamento combinado com alisquireno e L-arginina sobre a reatividade vascular em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular

Cintia Helena Santuzzi

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

Aprovada em / / por:

Prof^a Dr^a Glaucia Rodrigue Abreu – Orientadora, UFES

Prof^a Dr^a

Prof Dr^a

Prof

Coordenador do PPGCF: Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Novembro de 2014

Santuzzi, Cintia Helena 1981

Efeitos do tratamento combinado com alisquireno e L-arginina sobre a reatividade vascular em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular [Vitória] 2014

160p., 29,7cm (UFES, Ciências Fisiológicas, 2014)

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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Glaucia Rodrigues Abreu

1. Hipertensão Renovascular 2. Disfunção Endotelial 3. Alisquireno 4. L-Arginina 5. Sistema Renina-Angiotensina 6. Stress Oxigênio.

Aos que eu mais amo, àqueles a quem eu devo tudo o que eu sou e tudo o que eu acredito. Meus pais (Antonio e Neia), irmã (Livia) e ao meu companheiro (Erickson).

"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê."

Arthur Schopenhauer

AGRADECIMENTOS

A Deus por providenciar todas minhas necessidades e iluminar meu o caminho.

À Prof^a. Dr^a. Glaucia, pela confiança e oportunidade de conhecer o mundo da pesquisa e por compartilhar comigo seu extenso conhecimento. Professora, obrigada!!

À Prof^a. Dr^a. Sonia pela amizade, convívio, disponibilidade em ensinar e principalmente, por ter-me dado este projeto.

Ao Amigo Whashington pela amizade, confiança e incentivo em muitos momentos, você faz parte dessa conquista, Obrigada!!

Aos professores do PPGCF pelos conhecimentos compartilhados.

Aos amigos de Laboratório: Patrick, Walkiria, Erick, Vinicius, Paulo, Mariana, Fabrício e Simoni e é claro, minha amiga Irma dupla inseparável Renata.

Ao Vinicius e Paulo, alunos de iniciação científica, pelo comprometimento, responsabilidade e generosidade, muito obrigada!

Ao meu pai Antonio e minha mãe Neia que são minha referência de vida. Obrigada por abdicarem de seus sonhos em função de minhas necessidades. Amo vocês!

À minha irmã Lívia e minha prima irmã Graziela. Obrigada pelo amor, paciência, presença e pelos muitos momentos de alegria. É maravilhoso tê-los em minha vida!

Ao Erickson, que suporta minha ausência e se alegra com minhas conquistas com um indescritível amor gratuito e espontâneo. Obrigada!

SUMÁRIO

| | | |
|---|-----------|----------|
| RESUMO..... | 30 | |
| ABSTRACT..... | 32 | |
| 1. | | I |
| INTRODUÇÃO..... | 33 | |
| 1.1. | | H |
| HIPERTENSÃO ARTERIAL..... | 33 | |
| 1.2. | | H |
| HIPERTENSÃO EXPERIMENTAL..... | 36 | |
| 1.2.1 | | F |
| Modelos da Hipertensão de Goldblatt dois rins um clip. | 39 | |
| 1.3. | | F |
| FACTORES SISTÊMICOS ENVOLVIDOS NA HIPERTENSÃO DE | | |
| GOLDBLATT..... | 41 | |
| 1.3.1 | | M |
| Endotélio Liso Vascular..... | 43 | |
| 1.3.2 | | E |
| Endotélio Vascular..... | 43 | |
| 1.3.3 | | F |
| Factores relaxantes Derivados do Endotélio..... | 44 | |
| 1.3.3.1 Óxido Nítrico..... | 44 | |
| 1.3.3.2 Prostaciclina..... | 48 | |
| 1.3.3.3 | | F |
| Factores Hiperpolarizantes Derivados do | | |
| Endotélio..... | 49 | |
| 1.3.4 | | F |
| Factores Contráteis Derivados do Endotélio..... | 51 | |
| 1.3.4.1 Prostaglandinas Vasoconstrictoras..... | 51 | |
| 1.3.4.2 Endotelina..... | 53 | |
| 1.3.4.3 Sistema Renina Angiotensina Aldosterona..... | 54 | |
| 1.3.4.4 | | E |
| espécies Reativas de Oxigênio..... | 58 | |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1.4 | STRATÉGIAS TERAPÊUTICAS NA HIPERTENSÃO RENOVASCULAR..... | 63 |
| | 1.4.1 Inibidores do Sistema Renina Angiotensina | |
| | Aldosterona..... | 64 |
| | 1.4.1.2 Inibidor Direto da Renina – Alisquireno..... | 67 |
| | 1.4.1.3 Associação do Alisquireno com Diuréticos..... | 70 |
| | 1.4.2 L-arginina Como Terapia Anti Hipertensiva..... | 73 |
| 1.5 | JUSTIFICATIVA..... | 74 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 76 |
| 2.2 | OBJETIVO GERAL..... | 76 |
| 2.3 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 76 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 77 |
| | 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS..... | 77 |
| | 3.1.1 Modelo experimental..... | 77 |
| | 3.1.2 Modelo de Hipertensão Renovascular (Hipertensão 2R1C de Goldblat)..... | 78 |
| | 3.2 ANÁLISE DA MEDIDA INDIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA..... | 79 |
| | 3.3 METODOLOGIA EMPREGADA PARA OBTENÇÃO DOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA TORÁCICA..... | 80 |
| | 3.3.1 Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio (KCl)..... | 82 |
| | 3.3.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio..... | 82 |
| | 3.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS..... | 83 |
| | 3.4.1 Efeitos dos tratamentos com Alisquireno e L-arginina sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina nos anéis isolados de aorta de ratos com hipertensão renovascu..... | 83 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4.2 Efeitos dos tratamentos com Alisquireno e L-arginina sobre a modulação do endotélio na resposta vasoconstritora à fenilefrina de ratos com hipertensão renovascular..... | 84 |
| 3.4.3 Efeitos dos tratamentos com Alisquireno e L-arginina na resposta de relaxamento dependente do endotélio de ratos com hipertensão renovascular..... | 84 |
| 3.4.4 Efeitos dos tratamentos com Alisquireno e L-arginina na resposta de relaxamento independente do endotélio de ratos com hipertensão renovascular..... | 84 |
| 3.4.5 Investigação dos fatores endoteliais envolvidos no tratamento com Alisquireno e L-arginina sobre a resposta à fenilefrina na aorta de ratos com hipertensão renovascular.. | 85 |
| 3.4.5.1 Influência do tratamento com Alisquireno e L-arginina de ratos com hipertensão renovascular na via do óxido nítrico..... | 86 |
| 3.4.5.2 Envolvimento da Angiotensina II local sobre o tratamento com alisquireno e L-arginina de ratos com hipertensão renovascular sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica..... | 86 |
| 3.4.5.3 Envolvimento de radicais livres no tratamento com Alisquireno e L-arginina de ratos com hipertensão renovascular sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica..... | 86 |
| 3.5 ESTUDOS DA EXPRESSÃO PROTÉICA..... | 87 |
| 3.5.1 Western Blot para detecção da eNOS, iNOS, recepto AT₁ e AT₂, SOD-2 e gp91phox em aorta de ratos..... | 87 |
| 3.5.2 Preparação dos tecidos e quantificação de proteínas..... | 87 |
| 3.5.3 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)..... | 88 |
| 3.5.4 Transferência das proteínas..... | 89 |
| 3.5.5 Incubação dos anticorpos..... | 89 |
| 3.6 EXPRESSÕES DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 90 |

| | |
|--|------------|
| 4 RESULTADOS..... | 92 |
| 4.1 EFEITOS DOS TRATAMENTOS COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS) DE RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR..... | 92 |
| 4.2 RESPOSTAS VASCULARES AO CLORETO DE POTÁSSIO (KCl) EM ARTÉRIA AORTA..... | 93 |
| 4.3 EFEITOS DOS TRATAMENTOS COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR..... | 95 |
| 4.4 MODULAÇÃO ENDOTELIAL DO TRATAMENTO COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR..... | 96 |
| 4.5 EFEITO DO TRATAMENTO COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO DE AORTA DE RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR..... | 100 |
| 4.6 EFEITO DO TRATAMENTO COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE O RELAXAMENTO INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO DE AORTA DE RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR..... | 101 |
| 4.7 EFEITO DOS FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO TRATAMENTO COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR..... | 102 |
| 4.7.1 Participação da via do óxido nítrico no tratamento com alisquireno e L-arginina sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica de ratos com hipertensão renovascular.... | 103 |
| 4.7.1.1 Expressão Proteica da isoforma endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) da síntese do óxido nítrico em aorta de ratos com hipertensão renovascular..... | 105 |
| 4.7.2 Participação da Angiotensina II local no tratamento com alisquireno e L-arginina sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica de ratos com hipertensão renovascular.... | 107 |

| | |
|--|------------|
| 4.7.2.1 Efeito do tratamento com alisquireno e L-arginina sobre a enzima conversora da angiotensina (ECA) de ratos com hipertensão renovascular..... | 107 |
| 4.7.2.2 Efeito do tratamento com alisquireno e L-arginina sobre o receptor da Angiotensina II do subtipo AT ₁ em ratos com hipertensão renovascular..... | 110 |
| 4.7.2.2.1 <u>Expressão Protéica do receptor da Angiotensina II do subtipo AT₁ em aorta de ratos com hipertensão renovascular.....</u> | 112 |
| 4.7.2.2.2 <u>Expressão Protéica do receptor da Angiotensina II do subtipo AT₂ em aorta de ratos com hipertensão renovascular.....</u> | 113 |
| 4.7.3 Participação das espécies reativas de oxigênio (EROs) no tratamento com alisquireno e L-arginina sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica de ratos com hipertensão renovascular..... | 114 |
| 4.7.3.1 Influência da administração de apocinina, um inibidor da NADPH oxidase no tratamento com alisquireno e L-arginina sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica de ratos com hipertensão renovascular..... | 115 |
| 4.7.3.2 Influência da administração da superóxido dismutase (SOD), um “varredor” do ânion superóxido (O ₂ ⁻) no tratamento com alisquireno e L-arginina sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica de ratos com hipertensão renovascular..... | 117 |
| 4.7.3.2.1 <u>Expressão Protéica da Superóxido Dismutase Mitocondrial – Mn SOD2 em aorta de ratos com hipertensão renovascular.....</u> | 120 |
| 4.7.3.2.2 <u>Expressão Protéica da subunidade gp91phox da NADPH oxidase em aorta de ratos com hipertensão renovascular.....</u> | 121 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 123 |

| | |
|---|------------|
| 5.1 EFEITO DOS TRATAMENTOS COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA DE RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR..... | 125 |
| 5.2 EFEITO DOS TRATAMENTOS COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR À FENILEFRINA NA AORTA..... | 127 |
| 5.3 EFEITO DOS TRATAMENTOS COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE E INDEPENDENTE DO ENDÓTELIO..... | 128 |
| 5.4 FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO EFEITO DOS TRATAMENTOS COM ALISQUIRENO E L-ARGININA DE RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA..... | 130 |
| 5.4.1 Efeito dos Tratamentos com Alisquireno e L-arginina de Ratos com Hipertensão Renovascular na Via do Óxido Nítrico.... | 130 |
| 5.4.2 Participação da Angiotensina II local sobre o efeito dos Tratamentos com Alisquireno e L-arginina de Ratos com Hipertensão Renovascular..... | 132 |
| 5.4.3 Efeito dos Tratamentos com Alisquireno e L-arginina de Ratos com Hipertensão Renovascular na via dos radicais livres..... | 135 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 138 |
| 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 140 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos dos Bloqueadores do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) e agentes anti-hipertensivos comuns sobre os componentes do SRAA72

Tabela 2: Valores de resposta contrátil ao Cloreto de Potássio (KCl) em anéis isolados de aorta, com endotélio de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: Sham (Sham E+), dois rins um clipe (2R1C E+), tratado com alisquireno (ALSK E+), tratado com L-arginina (L-arg E+) e tratado com Alisquireno + L-arginina (ALSK+L-arg E+).....94

Tabela 3: Valores de resposta contrátil ao Cloreto de Potássio (KCl) em anéis isolados de aorta desnudos de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: Sham (Sham E⁻), dois rins um clipe (2R1C E⁻), tratado com alisquireno (ALSK E⁻), tratado com L-arginina (L-arg E⁻) e tratado com Alisquireno + L-arginina (ALSK+L-arg E⁻).....94

Tabela 4: Valores de resposta máxima (R_{máx}, g) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração - resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas intactos de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: Sham (Sham E+), dois rins um clipe (2R1C E+), tratado com alisquireno (ALSK E+), tratado com L-arginina (L-arg E+) e tratado com Alisquireno + L-arginina (ALSK+L-arg E+).....95

Tabela 5: Valores de resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, g) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração- resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas sem endotélio de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: Sham (Sham E^-), dois rins um clipe (2R1C E^-), tratado com alisquireno (ALSK E^-), tratado com L-arginina (L-arg E^-) e tratado com Alisquireno + L-arginina (ALSK+L-arg E^-).....96

Tabela 6: Valores de resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração- resposta à fenilefrina em anéis (intactos e desnudos) de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos diferentes grupos estudados.....98

Tabela 7: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) induzidas pela acetilcolina em anéis isolados de aorta intactos de animais de ratos com hipertensão renovascular dos diferentes grupos estudados. A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pr-contração com à fenilefrina.....100

Tabela 8: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) induzidas pelo nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis isolados de aorta intactos de animais de ratos com hipertensão renovascular dos diferentes grupos estudados. A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pr-contração com à fenilefrina.....101

Tabela 9: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos diferentes grupos estudados, na presena e na ausência de L-NAME.....104

Tabela 10: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos diferentes grupos estudados, na presena e na ausência de Enalapril.....108

Tabela 11: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos diferentes grupos estudados, na presença e na ausência de Losartan.....110

Tabela 12: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: Sham, 2R1C, ALSK, L-arg e ALSK+L-arg, na presença e na ausência de Apocinina.....116

Tabela 13: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: Sham, 2R1C, ALSK, L-arg e ALSK+L-arg, na presença e na ausência de Apocinina. Contração.....118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modulação do sistema renina Ang aldosterona frente à oclusão do fluxo sanguíneo renal, modelo experimental de hipertensão de Goldblatt dois rim um clipe (2R1C). Modulação no rim clipado e no rim contra lateral não clipado. A estimulação da liberação de Angiotensina II estimula fatores intrarrenais distintos além de apresentar modulação sistêmica culminando na elevação da pressão arterial.....39

Figura 2: Efeitos NO endotelial. A estimulação de receptores endoteliais e o estresse de cisalhamento estimulam a produção do NO, o qual age na própria célula endotelial ou em células adjacentes, como as células musculares lisas, leucócitos e plaquetas encontrados na corrente sanguínea, resultando em numerosos efeitos envolvidos na homeostase vascular.....45

Figura 3: Fatores vasodilatadores produzidos pelo endotélio vascular. São três as principais vias endoteliais que geram a vasodilatação: a via da prostaciclina (PGI₂), a via de produção do óxido nítrico (NO) pela enzima eNOS, e a via do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Dependendo do tipo de vaso, todas estas vias podem ser ativadas após a estimulação de receptores das células endoteliais em cuja via de sinalização ocorra o aumento da concentração intracelular do Ca²⁺. Dentre os agonistas pode-se citar a acetilcolina (ACh), substância P (SP), bradicinina (BK), e adenosina trifosfato (ATP). Após a liberação pelas células endoteliais, estes mediadores exercem suas ações nas células musculares lisas, através da produção dos segundo mensageiros AMPc ou GMPc, ou ainda através da hiperpolarização.....51

Figura 4: Representação esquemática da cascata do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA). Ang I: angiotensina I; Ang II: angiotensina II; Ang (1-7): angiotensina (1-7); ACE: enzima conversora de angiotensina; ACE2: enzima

conversora de angiotensina 2; AT₁: Receptor de Ang II do tipo 1; AT₂: Receptor de Ang II do tipo 2; Mas: Receptor da Ang (1-7).....56

Figura 5: Fontes de Espécie Reativa de Oxigênio (ERO). São várias as vias de formação de EROs, sendo a principal via a mitocôndria por meio do processo de respiração celular, outra via importante de formação de EROs é a NADPH oxidase. A Xantina oxidase (XO) está presente no plasma e células endoteliais, mas não nas células do músculo liso vascular e a XO gera o ânion superóxido por meio da catalização da xantina e hipoxantina em ácido úrico. A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima derivada de leucócitos que catalisa a formação de numerosas EROs. Dentre os metabolismos dos aminoácidos (AA) podemos citar as lipoxigenases (12/15LO), que apresentam-se como outra fonte importante de formação de EROs na parede vascular. A NOS e suas isoformas também podem atuar como fonte de EROs. Na ausência, ou em baixas concentrações de seu substrato L-arginina ou do co-fator BH₄ a NOS pode sofrer um desacoplamento, promovendo a formação de O₂⁻60

Figura 6: Organograma do protocolo Experimental.....78

Figura 7: Procedimento de clipagem da artéria renal. (A) Anestesia com Ketamine e Xylazine intraperitoneal (B) Laparotomia com exposição do pedúnculo renal (C) Separação da artéria renal esquerda (D) Inserção do clipe de prata, ajustável ao peso do animal e pré-calibrado com um grau de constrição equivalente ao diâmetro interno de 0,2 mm.....79

Figura 8: (A) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo; (B) Após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm.....80

Figura 9: Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “*in vitro*”. Sistema de aquisição de dados *Biopac Systems*.....81

Figura 10: Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0.9 a 1,3 g); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contracção com fenilefrina (Fe) 10^{-6} M; J) Platô da contração induzida pela Fe; L) Adição de acetilcolina (ACh) 10^{-5} M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical.....83

Figura 11: Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE (10^{-10} a 3×10^{-4} M).....85

Figura 12: Análise dos valores de pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) medidos por meio de da pletismografia de cauda em ratos dos grupos Sham, 2R1C, ALSK, L-arg e ALSK+L-arg, no tempo 0 (antes da cirurgia), 7 dias após a cirurgia e 28 dias após o procedimento. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA (uma vias), * $p < 0,05$ vs Sham, + $p < 0,05$ vs ALSK+L-arg.....93

Figura 13: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar nos grupos Sham (Sham E^+), dois rins um clipe (2R1C E^+), tratados com alisquireno (ALSK E^+), tratados com L-arginina (L-arg E^+) e tratados com alisquireno + L-arginina (ALSK+L-arg E^+). O número de animais está demonstrado entre

parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; ANOVA (duas vias) seguido de Tukey. * p<0,05 vs Sham; # p<0,05 vs ALSK; ‡ p<0,05 vs. L-arg; + p<0,05 vs. ALSK+L-arg.....96

Figura 14: Efeito da remoção do endotélio (E⁻) na curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos Sham (Sham E⁻), dois rins um clipe (2R1C E⁻), tratado com alisquireno (ALSK E⁻), tratado com L-arginina (L-arg E⁻) e tratado com Alisquireno + L-arginina (ALSK+L-arg E⁻). O número de animais está demonstrado entre parênteses.....97

Figura 15: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (A) Sham (Sham E⁺) e após a retirada do endotélio (Sham E⁻); (B) dois rins um clipe (2K1C E⁺) e após a retirada do endotélio (2K1C E⁻); (C) tratado com alisquireno (ALSK E⁺) e após a retirada do endotélio (ALSK E⁻); (D) tratado com L-arginina (L-arg E⁺) e após a retirada do endotélio (L-arg E⁻); (E) tratado com alisquireno associado a L-arginina (ALSK+L-arg E⁺) e após a retirada do endotélio (ALSK+L-arg E⁻); (F) Diferença percentual da área abaixo da curva em vasos com endotélio intacto e desnudo entre os grupos. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; ANOVA (uma e duas vias) seguido de Tukey. *p<0,05 Sham E⁺ vs Sham E⁻; § p<0,05 2R1C E⁺ vs 2R1C E⁻; #p<0,05 ALSK E⁺ vs ALSK E⁻; ‡ p<0,05 L-arg E⁺ vs L-arg E⁻ e + p<0,05 ALSK + L-arg E⁺ vs ALSK + L-arg E⁻99

Figura 16: Curvas concentração-resposta à acetilcolina para a avaliação do relaxamento dependente do endotélio em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos Sham (Sham), dois rins um clipe (2R1C), tratado com alisquireno (ALSK), tratado com L-arginina (L-arg) e tratado com alisquireno + L-arginina (ALSK+L-arg). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contração

com fenilefrina. ANOVA (duas vias) seguido por Tukey. § $p < 0,05$ vs. 2K1C ; # $p < 0,05$ vs. ALSK; ‡ $p < 0,05$ vs. L-arg.....101

Figura 17: Curvas concentração-resposta ao NPS para a avaliação do relaxamento independente do endotélio em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos Sham (Sham), dois rins um clipe (2R1C), tratado com alisquireno (ALSK), tratado com L-arginina (L-arg) e tratado com alisquireno + L-arginina (ALSK+L-arg). Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. Teste t não-pareado. $p > 0,05$102

Figura 18: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (A) Sham (ShamE⁺) e após a incubação com L-NAME (Sham L-NAME); (B) 2R1C (2R1C E⁺) e após a incubação com L-NAME (2R1C L-NAME); (C) Alisquireno (ALSK E⁺) e após a incubação com L-NAME (ALSK L-NAME); (D) L-arginina (L-arg E⁺) e após a incubação com L-NAME (L-arg L-NAME); (E) Alisquireno + L-arginina (ALSK + L-arg E⁺) e após a incubação com L-NAME (ALSK + L-arg L-NAME); (F) Diferença percentual da área abaixo da curva entre os grupos estudados. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; ANOVA (uma e duas vias) seguido de Tukey.. * $p < 0,05$ para Sham E⁺ vs Sham L-NAME; § $p < 0,05$ 2R1C E⁺ vs 2R1C L-NAME; # $p < 0,05$ ALSK E⁺ vs ALSK L-NAME; ‡ $p < 0,05$ L-arg E⁺ vs L-arg L-NAME e + $p < 0,05$ ALSK + L-arg E⁺ vs ALSK + L-arg L-NAME e % dAUC 2R1C vs ALSK+L-arg.....105

Figura 19: Resultados da expressão protéica da isoforma endotelial (A) e induzível (B) da sintase do óxido nítrico (eNOS e iNOS respectivamente), por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos com hipertensão renovascular dos grupos Sham (Sham), dois rins um clipe (2R1C), tratado com alisquireno (ALSK), tratado com L-arginina (L-arg) e tratado com alisquireno + L-

arginina (ALSK+L-arg). Na parte superior da figura estão as bandas de Western Blot representativas da expressão da eNOS e da β -actina. Os resultados (média \pm EPM) estão expressos como relação entre a densidade das bandas da eNOS e da β -actina. ANOVA (uma via) seguido de Tukey: $p > 0,05$106

Figura 20: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (A) Sham (Sham E⁺) e após a incubação com Enalapril (Sham Enalapril); (B) 2R1C (2R1C E⁺) e após a incubação com Enalapril (2R1C Enalapril); (C) Alisquireno (ALSK E⁺) e após a incubação com Enalapril (ALSK Enalapril); (D) L-arginina (L-arg E⁺) e após a incubação com Enalapril (L-arg Enalapril); (E) Alisquireno + L-arginina (ALSK + L-arg E⁺) e após a incubação com Enalapril (ALSK + L-arg Enalapril); (F) Diferença percentual da área abaixo da curva entre os grupos estudados. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; ANOVA (uma e duas vias) seguido de Tukey.. * $p < 0,05$ para Sham E⁺ vs Sham Enalapril; § $p < 0,05$ 2R1C E⁺ vs 2R1C Enalapril; # $p < 0,05$ ALSK E⁺ vs ALSK Enalapril; ‡ $p < 0,05$ L-arg E⁺ vs L-arg Enalapril e + $p < 0,05$ ALSK + L-arg E⁺ vs ALSK + L-arg Enalapril e % dAUC 2R1C vs ALSK.....109

Figura 21: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (A) Sham (Sham E⁺) e após a incubação com Losartan (Sham Losartan); (B) 2R1C (2R1C E⁺) e após a incubação com Losartan (2R1C Losartan); (C) Alisquireno (ALSK E⁺) e após a incubação com Losartan (ALSK Losartan); (D) L-arginina (L-arg E⁺) e após a incubação com Losartan (L-arg Losartan); (E) Alisquireno + L-arginina (ALSK + L-arg E⁺) e após a incubação com Losartan (ALSK + L-arg Losartan); (F) Diferença percentual da área abaixo da curva entre os grupos estudados. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; ANOVA (uma e duas vias) seguido de Tukey.. * $p < 0,05$ para Sham E⁺ vs Sham Losartan; § $p < 0,05$ 2R1C E⁺ vs 2R1C Losartan; # $p < 0,05$ ALSK E⁺ vs ALSK Losartan; ‡ $p < 0,05$ L-arg E⁺ vs L-

arg Losartan e + p<0,05 ALSK + L-arg E⁺ vs ALSK + L-arg Losartan.....112

Figura 22: Resultados da expressão protéica do receptor da Angiotensina II do subtipo AT₁, por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Sham (n=5), 2R1C (n=5), ALSK (n=8), L-arg (n=5) e ALSK+L-arg (n=6). Na parte superior da figura estão as bandas de Western Blot representativas da expressão do receptor AT₁ e da β- actina. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como relação entre a densidade das bandas do receptor AT₁ e da β actina. ANOVA (uma via seguida por Fisher) *p<0,05 2R1C vs Sham; #p<0,05 2R1C vs ALSK e +p<0,05 2R1C vs ALSK+L-arg.....113

Figura 23: Resultados da expressão protéica do receptor da Angiotensina II do subtipo AT₂, por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Sham (n=6), 2R1C (n=6), ALSK (n=6), L-arg (n=6) e ALSK+L-arg (n=6). Na parte superior da figura estão as bandas de Western Blot representativas da expressão do receptor AT₂ e da β actina. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como relação entre a densidade das bandas do receptor AT₂ e da β actina. ANOVA (uma via seguido por Fisher): *p<0,05 ALSK+L-arg vs Sham; ‡p<0,05 ALSK+L-arg vs L-arg.....114

Figura 24: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (A) Sham (Sham E⁺) e após a incubação com apocinina (Sham apocinina); (B) 2R1C (2R1C E⁺) e após a incubação com apocinina (2R1C apocinina); (C) Alisquireno (ALSK E⁺) e após a incubação com apocinina (ALSK apocinina); (D) L-arginina (L-arg E⁺) e após a incubação com apocinina (L-arg apocinina); (E) Alisquireno + L-arginina (ALSK + L-arg E⁺) e após a incubação com apocinina (ALSK + L-arg apocinina); (F) Diferença percentual da área abaixo da curva entre os grupos estudados. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; ANOVA

(uma e duas vias) seguido de Tukey.. * $p < 0,05$ para Sham E⁺ vs Sham apocinina; § $p < 0,05$ 2R1C E⁺ vs 2R1C apocinina; # $p < 0,05$ ALSK E⁺ vs ALSK apocinina; ‡ $p < 0,05$ L-arg E⁺ vs L-arg apocinina e + $p < 0,05$ ALSK + L-arg E⁺ vs ALSK + L-arg apocinina. % dAUC 2R1C vs ALSK+L-arg.....117

Figura 25: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (A) Sham (Sham E⁺) e após a incubação com SOD (Sham SOD); (B) 2R1C (2R1C E⁺) e após a incubação com SOD (2R1C SOD); (C) Alisquireno (ALSK E⁺) e após a incubação com SOD (ALSK SOD); (D) L-arginina (L-arg E⁺) e após a incubação com SOD (L-arg SOD); (E) Alisquireno + L-arginina (ALSK + L-arg E⁺) e após a incubação com SOD (ALSK + L-arg SOD); (F) Diferença percentual da área abaixo da curva entre os grupos estudados. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; ANOVA (uma e duas vias) seguido de Tukey.. * $p < 0,05$ para Sham E⁺ vs Sham SOD; § $p < 0,05$ 2R1C E⁺ vs 2R1C SOD; # $p < 0,05$ ALSK E⁺ vs ALSK SOD; ‡ $p < 0,05$ L-arg E⁺ vs L-arg SOD e + $p < 0,05$ ALSK + L-arg E⁺ vs ALSK + L-arg SOD. % dAUC 2R1C vs ALSK.....119

Figura 26: Resultados da expressão protéica da Superóxido Dismutase Mitocondrial – Mn SOD2, por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Sham (n=5), 2R1C (n=6), ALSK (n=8), L-arg (n=9) e ALSK+L-arg (n=7). Na parte superior da figura estão as bandas de Western Blot representativas da expressão de Mn SOD2 e da β actina. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como relação entre a densidade das bandas de Mn SOD2 e da β actina. ANOVA (uma via seguido por Fisher).....120

Figura 27: Resultados da expressão protéica da subunidade gp91phox, NOX2, por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Sham (n=4), 2R1C (n=4), ALSK (n=6), L-arg (n=4) e ALSK+L-arg (n=4). Na parte superior da figura estão as bandas de Western Blot representativas da

expressão do receptor gp91phox e da β actina. Os resultados (média \pm EPM) estão expressos como relação entre a densidade das bandas do receptor gp91phox e da β actina. ANOVA (uma via seguido por Fisher): * $p < 0,05$ 2R1C e ALSK vs Sham; + $p < 0,05$ 2R1C e ALSK vs ALSK+L-arg.....122

Figura 28: Diagrama esquemático mostrando os mecanismos propostos para a disfunção endotelial em anéis de aorta torácica de ratos com hipertensão renovascular e a normalização dos efeitos pelo tratamento com alisquireno + L-arginina. \rightarrow inibição da via \rightarrow estimulação da via.....139

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

- 1,4,5 – inositol trifosfato (IP₃)
- 3,5 – monofosfato cíclico de guanosina (GMPc)
- 5'-trifosfato de adenosina (ATP)
- Acetilcolina (ACh)
- Ácido hipocloroso (HOCl[·])
- Ácido δ-amino levulínico (ALAD)
- Ácido δ-amino levulínico desidratase (ALAD)
- Adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)
- Adenosina difosfato (ADP)
- Adenosina trifosfato (ATP)
- Alisquireno (ALSK)
- Angiotensina (1-7) (Ang (1-7))
- Angiotensina I (Ang I)
- Angiotensina II (Ang II)
- Ânion superóxido (O₂⁻)
- Apocinina (Apo)
- Áreas abaixo da curva (AUC)
- Atividade da Renina Plasmática (ARP)
- Bloqueadores dos Receptores da Angiotensina (BRA)
- Bomba de Ca⁺² sensível ao ATP (Ca⁺² ATPase)
- Bomba de Ca⁺² sensível ao ATP (Ca⁺² ATPase)

Bomba de sódio potássio sensível ao ATP (NKA)

Bradicinina (BK)

Bradicinina do tipo 2 (BK2)

Canais para K^+ de larga condutância ativados por alterações de Ca^{+2} intracelular
(BK_{Ca})

Canais para K^+ retificador (K_{ir})

Canais para K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP})

Canais para K^+ voltagem dependentes (K_v)

Ciclooxigenase (COX)

Cloreto de potássio (KCl)

Cloreto de Potássio (KCl)

Débito cardíaco (DC)

Diacilglicerol (DAG)

Diferenças das áreas abaixo das curvas (dAUC)

Endotelina (ET)

Endotelina-1 (ET-1)

Endotelina-2 (ET-2)

Endotelina-3 (ET-3).

Endotélio íntegro (E^+)

Endotélio removido mecanicamente (E^-)

Enzima conversora da angiotensina do tipo II (ECA II)

Enzima conversora de angiotensina (ECA)

Enzima fosfolipase A_2 (PLA_2)

Erro padrão da média (EPM)

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP)

Fator crescimento tumoral (TGF- α)

Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)

Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)

Fenilefrina (FE)

Flavina adenina dinucleotídeo (FAD)

Flavina mononucleotídeo (FMN)

Glutadiona peroxidase (GPx)

Graus Celsius ($^{\circ}\text{C}$)

Hipertensão arterial sistêmica (HAS)

Hipertensão de Goldblatt tipo 2 rins, 1 clipe: 2R1C

Inibidor da NOS endógena- dimetilarginina assimétrica (ADMA)

Inibidor não-seletivo da NOS, o N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)

inibidores da enzima conversora de Ang (iECA)

Intra peritonal (*i.p*)

Isoforma da ciclooxigenase tipo 1 (COX-1)

Isoforma da ciclooxigenase tipo 2 (COX-2)

Isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS)

Isoforma induzível da sintase de óxido nítrico (iNOS)

Isoforma neuronal da sintase de óxido nítrico (nNOS)

L-arginina (L-arg)

Malondialdeído (MDA)

Mieloperoxidasas (MPO)

Mitogen-activated protein(MAPKs)

Músculo liso vascular (MLV)

Nitroprussiato de sódio (NPS)

Núcleo do trato solitário (NTS)

Óxido nítrico (NO)

Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Peróxido de nitrito (ONOO⁻)

Porcentagem (%)

Pressão arterial (PA)

Pressão arterial diastólica (PAD)

Pressão arterial sistólica (PAS)

Prostaciclina (PGI₂)

Prostaciclina F_{2α} (PG F_{2α})

Prostaglandina D₂ (PD₂)

Prostaglandina E₂ (PGE₂)

Prostaglandina G₂ (PGG₂)

Prostaglandina H₂ (PGH₂)

Proteína quinase A (PKA)

Proteína quinase dependente de AMPc (AMPK)

Proteína quinase G (PKG)

Proteína serina treonina (AKT)

Quinase II dependente da calmodulina (CaMK II)

Radical hidroxila (-OH)

Radical sulfidril (-SH)

Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR)

Ratos Normotensos (WKY)

Receptor de angiotensina do subtipo 1(AT₁)

Receptor de angiotensina do subtipo 2(AT₂)

Receptor de angiotensina do subtipo 3(AT₃)

Receptor de angiotensina do subtipo 4(AT₄)

Resistência vascular periférica (RVP)

Resposta máxima (R_{máx})

Retículo sarcoplasmático (RS)

Sensibilidade (pD₂)

Sintase da prostaglandina H (PGHS)

Sistema nervoso central (SNC)

Sistema nervoso periférico (SNP)

Sistema nervoso simpático (SNS)

Sistema renina angiotensina (SRA)

Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)

Substância P (SP),

Superóxido dismutase (SOD)

Superóxido dismutase cobre/zinco (Cu/Zn SOD; SOD1)

Superóxido dismutase extracelular (ECSOD; SOD3)

Superóxido dismutase mitocondrial (Mn SOD; SOD2)

Tetraetilamônio (TEA)

Tetrahidropterina (BH₄)

The Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES 2005-2006)

Treonina (Thr)

Trifosfato de guanosina (GTP).

Tromboxano (TXA₂)

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

RESUMO

A angiotensina II é a chave na patogênese da hipertensão renovascular e esta condição está associada à disfunção endotelial. Nós investigamos a participação dos tratamentos isolados de alisquireno, L-arginina e sua associação sobre a pressão arterial e reatividade vascular de anéis de aorta na hipertensão renovascular. A hipertensão renovascular foi induzida em ratos machos Wistar utilizando clip de prata que foi implantado cirurgicamente na artéria renal esquerda e os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais: Sham, 2-rins, 1-clip (hipertensão 2R1C), 2R1C tratado com alisquireno (ALSK), 2R1C tratado com L-arginina (L-arg) e 2R1C tratado com associação de alisquireno+L-arginina (ALSK+L-arg), os tratamentos foram iniciados 7 dias após clipagem e duraram por 4 semanas consecutivas. A pressão arterial foi monitorada ao longo do tratamento e ao final da quarta semana após a clipagem foi avaliada a reatividade vascular a fenilefrina na presença e ausência do endotélio e o relaxamento a acetilcolina nos anéis isolados de aorta. O tratamento com ALSK+L-arg reduziu a pressão artéria, a resposta contrátil a fenilefrina e melhorou o relaxamento a acetilcolina. A remoção mecânica do endotélio vascular e a presença de L-NAME no banho apresentaram respostas semelhantes, levando a um aumento da contratilidade a fenilefrina em todos os grupos estudados, entretanto a magnitude dessa resposta foi maior no grupo tratado com ALSK+L-arg. A incubação com enalapril reduziu a resposta à fenilefrina nos grupos 2R1C e ALSK, entretanto demonstrou menor magnitude dessa resposta no grupo ALSK, por outro lado, o bloqueio com Losartan reduziu a resposta contrátil a fenilefrina em todos os grupos estudados. Ao realizarmos o bloqueio com apocinina observamos uma diminuição da resposta contrátil nos grupos 2R1C, ALSK e ALSK+L-arg, entretanto a magnitude dessa resposta foi significativamente menor no grupo ALSK+L-arg. Adicionalmente, o uso da superóxido dismutase (SOD) no banho foi capaz de reduzir a resposta à fenilefrina no grupo 2R1C e no grupo ALSK demonstrando também menor magnitude dessa resposta no grupo tratado com alisquireno. Ao avaliarmos a expressão proteica podemos observar que a expressão

de eNOS aumentou nos grupos 2R1C e L-arg e que iNOS aumentou somente no grupo 2R1C comparado com os demais grupos estudados. Já a análise da expressão do receptor de AT₁ observamos um aumento desse receptor no grupo 2R1C comparado com Sham, ALSK e ALSK+L-arg, por outro lado, demonstramos um aumento do receptor AT₂ no grupo ALSK+L-arg comparado somente com os grupos Sham e L-arg. A expressão do Ms SOD2 apresentou-se elevada no grupo ALSK+L-arg comparado com 2R1C, ALSK e L-arg, adicionalmente, a expressão de gp91phox estava reduzida no grupo ALSK+L-arg comparado com 2R1C e ALSK. Portanto, nosso trabalho demonstra pela primeira vez que o tratamento com alisquireno associado a L-arginina foi efetivo em reduzir a PA e prevenir a disfunção endotelial em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular, além disso, apontamos que os mecanismos envolvidos nesses efeitos parecem estar relacionados com uma modulação local do SRAA e com uma redução do estresse oxidativo local mediado pelo sistema NAPH oxidase.

Palavras-chave: hipertensão renovascular, disfunção endotelial, alisquireno, L-arginina, sistema renina-angiotensina, stress oxigênio.

ABSTRACT

Angiotensin II is a key player in pathogenesis of renovascular hypertension and this condition is associated with endothelial dysfunction. We investigate aliskiren, L-arginine and association of treatments on blood pressure (BP) and vascular reactivity in aortic rings. Hypertension was induced in male Wistar rats by clipping the left renal artery and animals were divided: Sham, 2-kidney, 1-clip (2K1C) hypertension, 2K1C+aliskiren (ALSK), 2K1C+L-arginine (L-arg), and 2K1C+aliskiren and L-arginine (ALSK+L-arg) treatment for 4 weeks. Blood pressure was monitored and endothelium-dependent and independent vasoconstriction and relaxation were assessed in aortic rings. ALSK+L-arg decreased blood pressure, contractile response to phenylephrine and improved the acetylcholine relaxation. Endothelium removal and incubation with L-NAME increased the response to phenylephrine in all groups, but magnitude was higher in ALSK+L-arg group. Enalapril reduced phenylephrine response in 2K1C and ALSK groups and Losartan reduced contractile response in all of the groups. Apocynin reduced contractile response in 2K1C, ALSK and ALSK+L-arg groups and incubation with superoxide dismutase (SOD) reduced phenylephrine response in 2K1C and ALSK groups. eNOS expression increase in 2K1C and L-arg groups and iNOS increased only in 2K1C group compared with other groups. AT₁ expression increase in 2K1C compared to Sham, ALSK and ALSK+L-arg groups, AT₂ expression increase in ALSK+L-arg group compared to Sham and L-arg groups, Ms SOD2 increased in ALSK+L-arg group compared to 2R1C, ALSK and L-arg group, on the other hand, gp91phox decreased in ALSK+L-arg compared with 2K1C and ALSK. In conclusion, combined ALSK+L-arg was effective in reducing BP and preventing endothelial dysfunction in aortic rings of 2K1C hypertensive rats and the mechanisms responsible appear to be related to the modulation of local renin-angiotensin system, which is associated with the reduction in endothelial oxidative stress.

Key words: 2K1C hypertension, endothelial dysfunction, aliskiren, L-arginine, RAAS and oxidative stress.

1. INTRODUÇÃO

1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL

A elevação da pressão arterial (PA) representa um fator de risco independente, linear e contínuo para doença cardiovascular. A hipertensão arterial é um importante problema de saúde pública, pois apresenta custos médicos e socioeconômicos elevados, decorrentes principalmente das suas complicações, tais como: doença cerebrovascular, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, insuficiência renal crônica e doença vascular periférica (Macmahon, 1995; Pimenta & Oparil, 2010).

A hipertensão arterial afeta 30% da população mundial, sendo que 95% dos casos são caracterizadas como hipertensão primária, na qual não se encontra uma causa específica. *The Third National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES 2005-2006) estima que 25% da população dos Estados Unidos com 20 anos ou mais apresentam pré-hipertensão e que 73,6 milhões de americanos são hipertensos (Pimenta & Oparil, 2010).

Segundo a VI Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, no Brasil, em 2007, 29,4% dos óbitos foram decorrentes de doenças cardiovasculares. A principal causa de morte em todas as regiões do nosso país é o acidente vascular cerebral, cujo fator de risco principal é a hipertensão arterial.

No Brasil, indivíduos com valores menores que 120 mmHg de pressão arterial sistólica (PAS), e 80 mmHg de pressão arterial diastólica (PAD) são considerados normotensos. Indivíduos com valores entre 130-139 mmHg de PAS e 85-90mmHg de PAD são classificados como pré-hipertensos e valores acima destes últimos descritos indicam hipertensão arterial (VI Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial).

A hipertensão primária é uma entidade clínica multifatorial. Dentre os fatores que contribuem para sua gênese e/ou manutenção estão incluídos: os fatores intrínsecos e extrínsecos. Entre os fatores intrínsecos, incluem-se alterações funcionais do sistema-renina-angiotensina, aumento da atividade simpática,

resistência à insulina, hereditariedade (Harrap, 1994); modificações dos parâmetros hemodinâmicos (alterações no débito cardíaco e na resistência vascular periférica) (Folkow, 1982); e raça (Freis, 1973). Quanto aos fatores extrínsecos pode-se citar: obesidade, sedentarismo, consumo de álcool, tabagismo e aumento do consumo de sal (Bakris & Mesah, 2002).

Em contrapartida, Hipertensão Arterial Secundária apresenta causa identificável passível ou não de correção. Sua prevalência, em torno de 3% a 10%, depende da experiência de quem investiga e dos recursos diagnósticos disponíveis. Segundo a VI Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial deve-se investigar a possibilidade de hipertensão arterial secundária quando se tem suspeita diagnóstica de: Apnéia obstrutiva do sono, Hipertensão resistente ao tratamento ou Hipertensão com hipotassemia ou Hipertensão com tumor abdominal (Hiperaldosteronismo primário), Aldosteronismo, Doença renal parenquimatosa, Doença renovascular, Catecolaminas em excesso (Uso de simpaticomiméticos, peri-operatório, estresse agudo, taquicardia), Coactação da aorta, Síndrome de Cushing, Efeito adverso de medicamento/substância, Efeitos de estilos de vida (Ingestão elevada de sal, abuso de álcool, obesidade), Feocromocitoma, Hipotireoidismo, Hiperparatireoidismo, Hipertireoidismo e Acromegalia.

A Hipertensão Renovascular é considerada a segunda causa de hipertensão secundária precedida pelas doenças renais. Sua prevalência é estimada em 2% da população de hipertensos, entretanto, tem-se observado uma prevalência diferenciada quando se considera a faixa etária e o perfil clínico dos pacientes, sendo baixa a prevalência em hipertensos leves não-complicados e elevada em hipertensos severos, refratários ou acelerados e em pacientes mais idosos (Praxedes, 2002).

Doença renovascular pode ser definida como aquelas situações clínicas consequentes a obstruções totais ou parciais de uma ou das duas artérias renais. Hipertensão renovascular e insuficiência renal crônica por nefropatia isquêmica são as manifestações mais importantes. Proteinúria, hiper-reninismo e risco aumentado da doença cardiovascular são associações frequentes. No Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), 67% das

obstruções das artérias renais foram de origem arterosclerótica, 19% de displasias fibromusculares e 14% de arterite primária da aorta. Causas raras foram lesões traumáticas, luéticas e malformações congênitas.

Outras séries mostram números um pouco diferentes, com aterosclerose entre 80 e 90%, displasias fibromusculares entre 10 e 20% e arterites mais raras. Arterites têm sido relatadas com maior incidência no Brasil e em países do sudeste asiático do que na Europa e na América do Norte.

A hipertensão renovascular possui fisiopatologia intimamente relacionada ao sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), o qual é um mecanismo fisiológico bem conhecido de controle da pressão arterial (Navar *et al.*, 1998). O rim produz uma enzima chamada renina, que atua sobre um substrato produzido no fígado chamado angiotensinogênio, produzindo Angiotensina I (Ang I), que tem leve efeito hipertensor. Ang I é convertida em Angiotensina II (Ang II) por ação das enzimas de conversão produzidas em vários órgãos, principalmente rins e pulmões (Kokubu *et al.*, 1979). Ang II eleva a pressão arterial por dois mecanismos: é um potente vasoconstritor e estimula as camadas corticais das suprarrenais a produzirem aldosterona. Aldosterona aumenta excreção de K⁺, retenção de Na⁺, aumento de volemia e, como consequência, aumento da pressão arterial (Bader, 2010). Esse mecanismo regulatório funciona ininterruptamente: quando há queda da pressão de perfusão do rim (posição ortostática, desidratação e hemorragias), aumenta a produção de renina, e quando há aumento da pressão de perfusão do rim (decúbito horizontal, hipervolemia e excesso de ingestão da Na⁺), diminui a produção de renina (Kokubu *et al.*, 1979; Bader, 2010).

Células do aparelho justaglomerular, que são locais onde a renina é produzida, são sensíveis às tendências de variação da pressão arterial. Barorreceptores espalhados pelo corpo e concentrados no seio carotídeo contribuem de maneira primordial para essa tarefa. Havendo estenose da artéria renal, há queda do fluxo plasmático renal e aumento da produção de renina, mas agora não de modo fisiológico, mas patológico. Não basta simplesmente haver estenose da artéria renal para que haja hipertensão renovascular (Thomaz *et al.*, 2010; Garovic *et al.*, 2005). Estudos experimentais mostram que estenoses menores que 50% da luz não

comprometem o fluxo sanguíneo ao rim, nem a pressão de perfusão, e não há elevação de pressão arterial. Estenoses entre 50 e 70% da luz ainda mantém o fluxo sanguíneo no rim em níveis normais e diminuem a pressão de perfusão, mas não causam aumento da pressão arterial. É provável que o mecanismo fisiológico da regulação ainda consiga funcionar até esses níveis. A partir de 70% da oclusão de luz arterial, existe queda do fluxo sanguíneo e de pressão de perfusão e aumento da pressão arterial, que são mais evidentes quanto maior for o grau da estenose (Lupu *et al.*, 1972; Fazan *et al.*, 2001).

A fisiopatologia é diferente se houver comprometimento de apenas um dos rins, e com o outro normal; daquele em que há comprometimento dos dois rins ou de rim único, isto é, não há rim normal. Quando apenas um rim é isquêmico, a hipertensão gerada pelo SRAA chega ao rim normal, que normalmente reage diminuindo a produção da sua renina e excretando sódio e o sistema se equilibra da maneira descrita. Se não houver rim normal (rim único ou estenose bilateral) há retenção de sódio e aumento da volemia, que por si diminui a produção de renina, e o sistema equilibra-se de maneira diferente (Liard *et al.*, 1973; Guan *et al.*, 1992).

Além da hipertensão arterial grave, de difícil tratamento e todas as suas conhecidas consequências, estenoses induzem atrofia isquêmica do rim e insuficiência renal. Em pacientes com insuficiência renal crônica terminal, nefropatia isquêmica é encontrada em 16% dos que tem mais de 50 anos, e; até 43% dos pacientes com mais de 60 anos de idade. É possível que muitos deles, se tivessem suas doenças diagnosticadas e tratadas, não evoluíssem à fase terminal ou provavelmente aconteceria de maneira mais lenta (Lucon *et al.*, 1996).

1.2 HIPERTENSÃO EXPERIMENTAL

A hipertensão arterial pode ser estudada através de vários modelos experimentais. Entre os mais investigados estão o modelo genético, representado pelos ratos espontaneamente hipertensos (SHR), o modelo de hipertensão mineralocorticóide, cepa de ratos sensíveis à ingestão de sódio (Dahl), entre os modelos de hipertensão neurogênica podemos citar aqueles que envolvem a lesão

do núcleo do trato solitário (NTS), e o da deafferentação sino-aórtica, associada, ou não, à desnervação das aferências cardiopulmonares. Entre as hipertensões renais podemos citar: a renovascular que decorre da oclusão parcial da artéria renal (hipertensão renovascular Goldblatt); a renopriva, como o próprio nome indica; a perinefrítica que decorre da indução de fibrose renal pelo envolvimento do rim com um abrasivo contido por um tecido; e liberação do pedículo renal após algumas horas de oclusão total. O modelo de constrição (parcial ou total) da aorta abdominal examina os fatores mecânicos e neuro-humorais na elevação da pressão arterial. Um modelo descrito mais recentemente é o do bloqueio da formação de óxido nítrico (NO) com o L-NAME.

Em 1934, Goldblatt *et al.* mostraram uma elevação substancial da pressão arterial de cães, cujo suprimento sanguíneo aos rins era reduzido por meio de cliques de prata colocados na artéria renal. Desde então, muitos modelos experimentais de hipertensão, baseados na redução do fluxo sanguíneo renal, têm sido desenvolvidos em várias espécies animais, recebendo o nome genérico de hipertensão de Goldblatt

Goldblatt e colaboradores (1934) demonstraram que em cães, a constrição parcial de uma artéria renal, com o rim contra-lateral íntegro, resulta em um aumento transitório da pressão arterial, que retorna aos níveis de normalidade em poucas semanas. Entretanto, reduções muito intensas no fluxo renal unilateral (maior que 70%) podem levar a estados hipertensivos mais prolongados, sendo a severidade da hipertensão proporcional ao grau de obstrução da artéria renal (Lupu *et al.*, 1972). Quando o rim contra-lateral ao da obstrução é removido, ou quando ambas as artérias renais são parcialmente obstruídas, a pressão arterial se eleva de maneira acentuada e permanente. Em geral, o aumento da pressão arterial se inicia poucos minutos após a redução do fluxo renal, atingindo um platô em 2 a 3 semanas.

Os ratos parecem desenvolver hipertensão renovascular mais facilmente que cães. A constrição de apenas uma artéria renal resulta em hipertensão, independentemente da presença ou ausência do rim contralateral (Fazan *et al.*, 2001). A hipertensão produzida pela constrição de uma artéria renal, com o rim contralateral íntegro (hipertensão de Goldblatt tipo 2 rins, 1 clipe: 2R1C), parece ter

uma patogenia diferente da hipertensão produzida pela constrição de uma artéria renal associada à remoção do rim contralateral (hipertensão de Goldblatt tipo 1 rim, 1 clipe: 1R1C).

No rato com hipertensão de Goldblatt 2R1C, a atividade de renina plasmática um mês após a constrição da artéria renal está aumentada (embora a renina plasmática, nesse modelo de hipertensão, tenha uma ampla faixa de distribuição, podendo ser normal em alguns ratos). Entretanto, a atividade da renina plasmática na hipertensão de Goldblatt 1R1C é completamente normal quando comparada a um rato controle com os 2 rins intactos, e reduzida em relação a um rato uninefrectomizado com a artéria renal contralateral não ocluída (Carretero *et al*; 1974). Em síntese, ratos com hipertensão de Goldblatt 2R1C têm maior atividade de renina plasmática do que ratos hipertensos 1R1C.

A hipertensão observada nos animais experimentais de nosso estudo foi induzida por intermédio do estímulo de mecanismos hormonais, com aumento circulante de Ang II, e para tal foi utilizado o modelo de Hipertensão de Goldblatt 2R-1C, uma vez que o mesmo é um modelo experimental, que em muitos aspectos se a assemelha hipertensão renovascular em humanos (Figura 1) (Cervenka *et al*; 2003; Navar *et al.*, 1998).

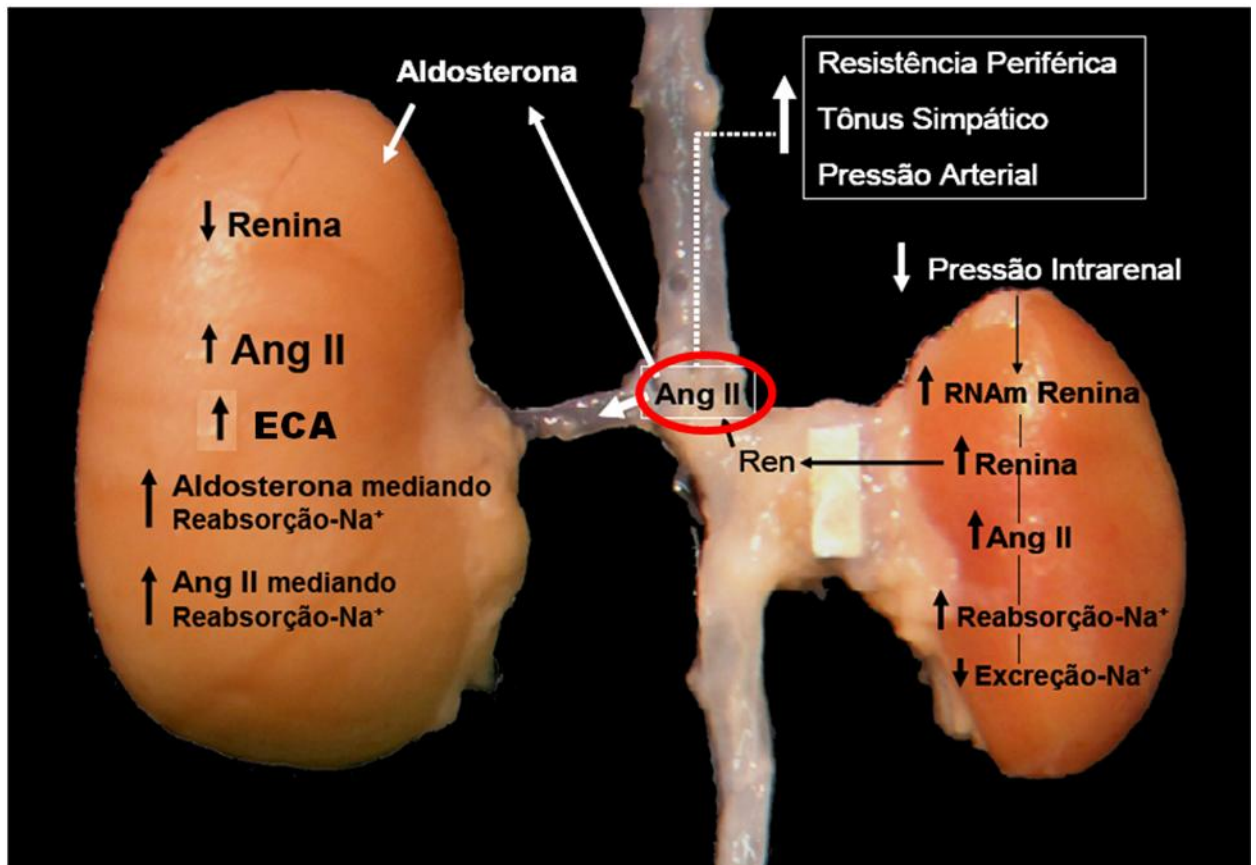


Figura 1: Modulação do sistema renina Ang aldosterona frente à oclusão do fluxo sanguíneo renal, modelo experimental de hipertensão de Goldblatt dois rim um clipe (2R1C). Modulação no rim clipado e no rim contra lateral não clipado. A estimulação da liberação de Angiotensina II estimula fatores intrarrenais distintos além de apresentar modulação sistêmica culminando na elevação da pressão arterial. (modificado de Navar *et al.*, 1998)

1.2.1 Fases da Hipertensão de Goldblatt dois rim um clipe (2R1C)

Os estudos em animais, utilizando os modelos 2R1C e 1R1C estabeleceram três fases no desenvolvimento e manutenção da hipertensão em animais experimentais, apesar de ser impossível delinear essas fases na hipertensão renovascular humana, a elucidação das diferentes fases permitiu uma melhor compreensão dos papéis desempenhados pelos sistemas envolvidos na gênese e manutenção dessa hipertensão, tais como o SRAA, o sistema nervoso simpático (SNS) e suas interações mútuas (Martinez-Maldonado, 1991).

A primeira fase da hipertensão Goldblatt é visto por cerca de 4 semanas após a clipagem e é marcado por aumento imediato da pressão arterial associada a um

aumento da atividade da renina plasmática (ARP), níveis elevados da Ang II circulante e aumento da expressão de receptores para Ang II (AT_1). Durante esta fase, a remoção do clipe ou o tratamento com inibidores da enzima conversora de Ang (iECA) dentro de 7 a 10 dias promove uma imediata redução da pressão sanguínea. Esta fase é essencialmente mediada pela ativação SRAA, bem como retenção de sal e água e expansão de volume. No entanto, evidências indicam um papel do SNS nessa fase (Faber & Brody, 1983). Dessa forma, atualmente sabe-se que embora o SRAA desempenhe um papel principal na fase inicial da hipertensão de Goldblatt, existem evidências substanciais do papel do SNS nessa fase atuando de forma local e sistêmica (Tsuda RT AL., 1989; Pradhan & Rossi 2013).

A segunda fase da hipertensão Goldblatt 2R1C ocorre entre cinco a oito semanas após clipagem e a pressão sanguínea permanece estável a níveis hipertensivos ou pode continuar a aumentar, associado a esse fato observa-se retenção de sal, expansão do volume e *downregulation* do SRAA, os altos níveis de atividade da renina plasmática começam a declinar e a sensibilidade dos vasos a Ang II está aumentada. A remoção do clipe ou o tratamento com inibidores da ECA pode reduzir a pressão sanguínea para o normal durante esta fase, mas é necessário um tempo mais longo para atingir esta pressão arterial normal (Martinez-Maldonado, 1991).

Embora esta fase não tenha sido bem estudada, como a fase inicial, existem evidências que apoiam o papel de Ang II como um mediador importante que promove à retenção de sal e expansão do volume. Entre os vários mecanismos pelos quais Ang II faz isso, é aumentando a liberação de noradrenalina a partir das glândulas supra-renais e terminações nervosas (Cogan, 1986). A Ang II também pode exercer um efeito local através da estimulação do nervo eferente renal o qual também aumenta a reabsorção de sódio. (DiBona, 1978).

A Fase III de hipertensão Goldblatt ocorre nove semanas ou mais após clipagem. Esta fase caracteriza-se por uma queda na ARP e nos níveis plasmáticos de Ang II com elevação persistente da pressão arterial. Embora a remoção do clip ou tratamentos com inibidores da ECA em doses iguais àqueles na Fase I e II, não normalizem a pressão arterial, as doses mais elevadas de inibidores da ECA, bem como outros medicamentos anti-hipertensivos são capazes de reduzir ou até

normalizar a pressão sanguínea. Nesta fase, as concentrações de Ang II vascular local ou intra-renal pode desempenhar um papel no controlo da neurotransmissão simpática (Naftilan *et al.*, 1989). Webb *et al.*, (1984) demonstrou um aumento na concentração de Ang II no efluente venoso do rim clipado, sugerindo que apesar da queda na atividade do SRAA sistêmico, a atividade da Ang intra-renal permanece elevada no rim clipado. Esta ativação localizada do SRAA pode ser responsável pela manutenção da vasoconstrição e aumento do tônus simpático (Pfeffer *et al.*, 1982), além disso, essa também pode ser a explicação pelo fato de que durante as fases tardias da hipertensão de Goldblatt a pressão arterial continua a responder à inibidores da ECA, apesar de uma ARP sistêmica normal.

1.3 FATORES SISTÊMICOS ENVOLVIDOS NA MANUTENÇÃO DA HIPERTENSÃO DE GOLDBLATT DOIS RIM UM CLIPE (2R1C)

Apesar de a hipertensão renovascular ser desencadeada por uma disfunção do SRAA, sabe-se que a pressão arterial (PA) está intimamente relacionada com o débito cardíaco (DC) e com a resistência vascular periférica (RVP), ou seja, $PA = DC \times RVP$. Assim, fatores capazes de modificar o DC e a RVP, alteram a PA (Folkow, 1982).

A RVP depende de fatores neurais, humorais, estruturais e funcionais do sistema cardiovascular. Dentre as alterações funcionais que podem aumentar a resistência vascular, incluem-se o aumento de cálcio intracelular, que promove aumento da reatividade do músculo liso vascular aos agentes vasoconstrictores (agonistas α_1 adrenérgicos, fenilefrina e noradrenalina) (Horowitz *et al.*, 1996). Além destes é possível citar, o aumento da atividade simpática, aumento da sensibilidade as proteínas contráteis, aumento da permeabilidade ao íon Ca^{+2} , modificações na atividade da bomba de Ca^{+2} sensível ao ATP (Ca^{+2} ATPase) na membrana plasmática e no retículo sarcoplasmático, e na atividade da bomba de sódio potássio sensível ao ATP (NKA) (Folkow, 1982; Bohr & Webb, 1984; Marín, 1993).

Na hipertensão Renovascular, vários são os mecanismos envolvidos na fisiopatologia e manutenção da hipertensão, sabe-se que fatores neurais e humorais

estão alterados nesse tipo de hipertensão (Fazan *et al.*, 2001). Dentre os mecanismos neurais, tem sido observado um desequilíbrio entre os sistemas simpático e parassimpático, com maior estimulação simpática e menor atividade parassimpática (Han *et al.*, 2011) Sun *et al.*, (2012) demonstrou que o reflexo aferente simpático cardíaco está aumentado em ratos com hipertensão renovascular, o que levaria a um aumento da atividade simpática com consequente manutenção da patogênese da hipertensão e progressão da lesão de órgãos alvos, adicionalmente, demonstrou que Angiotensina (1-7) (Ang (1-7)) e Ang II, no núcleo paraventricular, participam da ativação simpática nesse modelo de hipertensão e que a Ang (1-7) elevada potencializa os efeitos da Ang II no núcleo paraventricular. Outro mecanismo neural que participa da fisiopatologia do modelo 2R1C, e que já está bem demonstrado, é a sensibilidade barorreflexa que está diminuída nesse modelo (Tsyrlin *et al.*, 2013).

O músculo liso e o endotélio vascular também participam da regulação da PA. O primeiro através do tônus vascular e o segundo, através da liberação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstrictoras, que regulam este tônus vascular e o crescimento do músculo liso. Acredita-se que a hipertensão arterial seja acompanhada por mudanças na função das células endoteliais, além disso é bastante conhecida a ação da Ang II no endotélio e músculo liso vascular. Sendo assim, a disfunção endotelial parece contribuir para manutenção do aumento de resistência vascular, favorecendo o processo hipertensivo (Cannon III, 1998; Triggle *et al.*, 2003; Kolluru *et al.*, 2010). Portadores de hipertensão renovascular costumam apresentar uma menor produção ou biodisponibilidade de NO, o que colabora para promover uma maior vasoconstrição nestes sujeitos (Higashi *et al.*, 2002).

1.3.1 Músculo Liso Vascular

O tônus do músculo liso vascular é um fator determinante de resistência vascular. A regulação deste é realizada pelos fatores derivados do endotélio, pressão sanguínea, inervação e por estímulos hormonais. Para deflagrar a sua contração, as células musculares lisas vasculares requerem um aumento na concentração de Ca^{+2} citoplasmático. Este aumento pode resultar tanto do influxo do

Ca^{+2} através de canais específicos da membrana citoplasmática, quanto de liberação dos estoques intracelulares, como o retículo sarcoplasmático. Deste modo, a oferta do Ca^{+2} à maquinaria contrátil será aumentada (Lincoln *et al.*, 2001).

Nas últimas décadas estudos vem demonstrando que o SRAA altera o músculo liso vascular e o endotélio vascular. Estas alterações parecem ser decorrentes da redução da biodisponibilidade de NO e a produção de radicais livres, além disso, Estudos recentes tem ampliado nosso conhecimento sobre eventos celulares mediados pela Ang II, sugerindo que seu papel biológico é tão amplo que vai do intracelular ao tecido ou ao sistema (Taubman, 2003; Phillips & Schmidt-Ott, 1999; Dzau & Pratt, 1986). Portanto, para compreender os efeitos da hipertensão renovascular no sistema cardiovascular é essencial o conhecimento do endotélio e das vias que participam do controle do tônus vascular.

1.3.2 Endotélio Vascular

Em 1977, Moncada e colaboradores publicaram a primeira indicação de que o endotélio possuía fundamental importância no controle do tônus vascular, através da produção de substâncias vasoativas. Em 1980, Furchgott e Zawadzki demonstraram em preparação experimental de aorta de coelhos, o papel que as células endoteliais desempenham no relaxamento vascular em resposta a efetores, como a acetilcolina. Postulou-se assim a existência de um fator de relaxamento vascular derivado do endotélio. Em 1987, outro grupo de pesquisadores, liderados por Palmer, demonstrou que o fator de relaxamento derivado do endotélio era o óxido nítrico (NO).

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

As células endoteliais sintetizam e liberam fatores que regulam a angiogênese, as respostas inflamatórias e o tônus vascular. É responsável também pela manutenção do balanço entre a promoção e a inibição da proliferação e migração das células do músculo liso vascular, além de prevenir a agregação plaquetária e a trombose (Félètou & Vanhoutte, 2009).

Os principais fatores relaxantes do endotélio são: NO, fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Furchgott & Zawadzki, 1980) e a prostaciclina (Moncada *et al.*, 1977). Dentre os fatores contráteis, os principais são: a Ang II (Skeegs, 1954), endotelina-1 (ET-1), ânion superóxido (Rubany & Vanhoutte, 1986) e derivados da via do ácido araquidônico, o tromboxano (TXA₂) e as prostaciclina H₂ e F_{2α} (PGH₂ e PG F_{2α}) (Frolich & Fortermann, 1989). O equilíbrio na produção desses mediadores é importante para regulação do tônus vascular.

1.3.3 Fatores Relaxantes derivados do Endotélio

1.3.3.1 Óxido Nítrico

Furchgott e Zawadzki, em 1980, mostraram que o endotélio liberava um fator vasodilatador capaz de modular o tônus vascular, o qual denominou de fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF). Em 1987, Palmer e colaboradores demonstraram que o EDRF era o NO. O NO é um radical livre inorgânico altamente reativo, em estado gasoso, o que o permite difundir facilmente pelas membranas celulares promovendo vasodilatação. Dentre os componentes vasodilatadores do endotélio, o NO é um dos mais importantes participantes, sendo um componente fundamental na manutenção da homeostase dos vasos, incluindo a modulação do tônus vascular através do seu potente efeito vasodilatador. Este radical livre está envolvido na regulação do crescimento celular, além de possuir ação inibitória sobre a adesão e agregação plaquetária (Moncada *et al.*, 1991; Cannon III, 1998) (Figura 2).

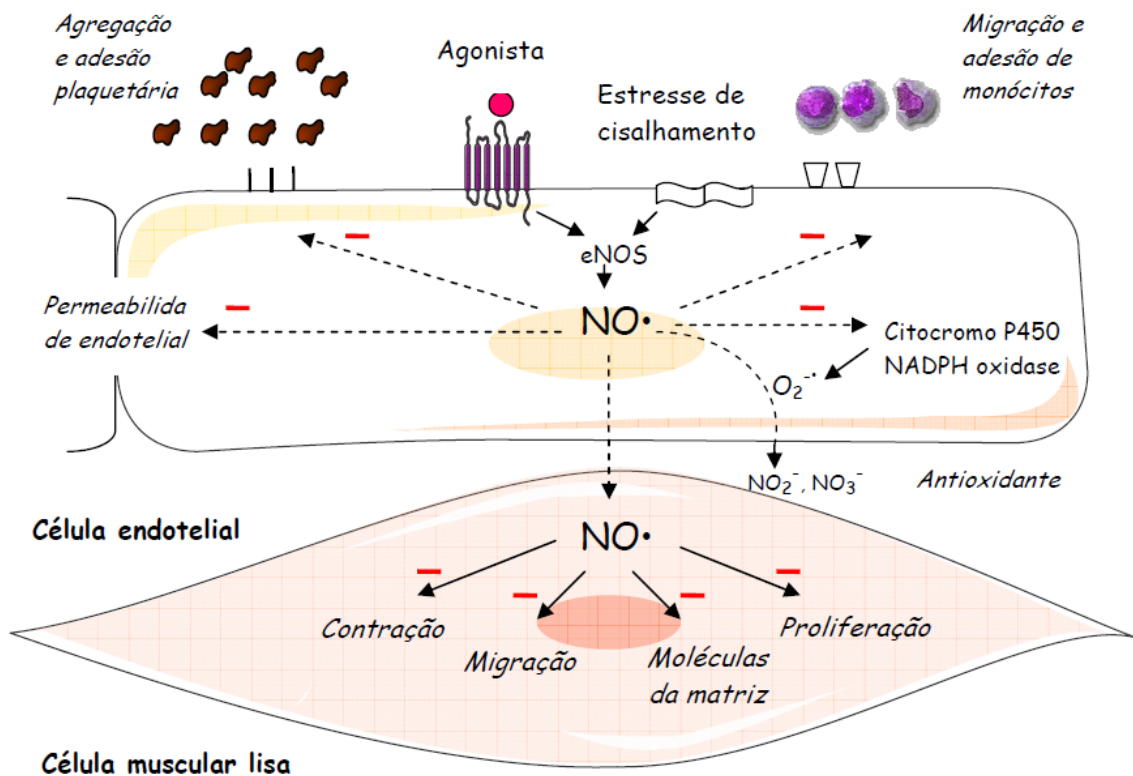


Figura 2: Efeitos NO endotelial. A estimulação de receptores endoteliais e o estresse de cisalhamento estimulam a produção do NO, o qual age na própria célula endotelial ou em células adjacentes, como as células musculares lisas, leucócitos e plaquetas encontrados na corrente sanguínea, resultando em numerosos efeitos envolvidos na homeostase vascular. (modificado de Rattmann, 2009).

O NO é produzido nas células endoteliais a partir da oxidação do aminoácido L-arginina, que é transformado então em NO e L-citrulina por ação das enzimas óxido nítrico sintases (NOS) (Palmer *et al.*, 1987; Moncada *et al.*, 1991; Triggle *et al.*, 2003; Michel & Vanhoutte., 2010). Para gerar NO é necessária a presença de L-arginina, oxigênio, NAD(P)H (adenina dinucleotídeo fosfato), agrupamento heme e tetrahydropterina (BH₄) (Andrew & Mayer, 1999). A produção de NO é estimulada pelas catecolaminas, serotonina, bradicinina, histamina, adenosina difosfato (ADP), substância P, agregação plaquetária, Ang II e forças mecânicas como o estresse de cisalhamento (Palmer *et al.*, 1987; Moncada *et al.*, 1991; Andrew & Mayer, 1999).

Existem três diferentes isoformas de NOS que podem ser divididas em duas classes funcionais. Uma classe é a constitutiva e inclui a isoforma endotelial (eNOS),

e uma neuronal encontrada no sistema nervoso central e periférico (nNOS). Estas são duas isoformas constitutivas dependentes do complexo Ca^{+2} /calmodulina, produzindo NO em episódios curtos e em baixas concentrações para finalidades fisiológicas (Andrew & Mayer, 1999).

A isoforma endotelial de NOS (eNOS) é a principal fonte de NO nos vasos. Encontra-se na forma de dímero, e é constituída por dois monômeros idênticos de 134kDa. Localiza-se no complexo de Golgi, membrana plasmática, e nas cavéolas plasmalemais (Fleming & Busse, 1999). A eNOS é somente ativada na sua forma dimerizada. A dimerização da eNOS é dada através do agrupamento heme. A formação deste dímero torna possível sua ligação com a tetrahydrobiopterina (BH_4), o que proporciona a sua estabilidade (Forstermann *et al.*, 1994; Andrew & Mayer, 1999; McCabe *et al.*, 2000). Dentre os mecanismos que regulam a atividade da eNOS, podemos destacar mudanças no nível de Ca^{+2} intracelular, associação do complexo Ca^{+2} / calmodulina e mudanças intracelulares do pH (Fleming & Busse., 1999).

A outra classe de NOS é formada pela isoforma induzível (iNOS), um dímero composto por dois monômeros de 130 kDa. Esta isoforma é regulada em nível transcriptional e a sua ativação é independente da interação Ca^{+2} /calmodulina. Quando sintetizada, na presença L-arginina e NADPH, a iNOS irá gerar NO por todo o tempo durante o qual a enzima permanecer ativada e em altas concentrações para garantir as atividades antimicrobiana, citostática e imunoregulatória (Forstermann *et al.*, 1994; Andrew & Mayer, 1999). Em situações fisiológicas, a expressão da iNOS não tem grande impacto sobre o sistema cardiovascular. Entretanto, o aumento de sua expressão pode ser induzida em resposta a citocinas e outros mediadores inflamatórios (Alvaréz *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2010).

O NO, produzido pelas células endoteliais se difunde rapidamente para as células musculares lisas onde ativa a enzima guanilato ciclase solúvel. Quando ativada, esta enzima promove a formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) a partir do trifosfato de guanosina (GTP). O aumento da concentração de GMPc leva à ativação da proteína quinase G (PKG), que atua por diversos

mecanismos, promovendo o relaxamento da musculatura lisa vascular (Moncada *et al.*, 1991., Cannon III., 1998).

A PKG ativa canais para K^+ dependentes de Ca^{+2} , inibindo assim a entrada de Ca^{+2} do conteúdo extracelular pelos canais de cálcio dependentes de voltagem, hiperpolarizando a membrana. Esta proteína quinase pode atuar também no retículo sarcoplasmático (SERCA) estimulando a recaptação do Ca^{+2} , na fosforilação da cadeia leve da miosina, tornando-a menos sensível aos íons Ca^{+2} e no trocador Na^+/Ca^{+2} (estimulando a saída de Ca^{+2}) (Lincoln *et al.*, 2001). O NO promove ainda a ativação direta de canais de K^+ , levando a hiperpolarização da célula muscular lisa (Bolontina *et al.*, 1994; Félétou & Vanhoutte, 1999, 2009; Triggle *et al.*, 2003). Todos estes mecanismos contribuem para a diminuição da Ca^{+2} intracelular, e conseqüentemente no relaxamento do músculo liso vascular (Moncada *et al.*, 1991., Cannon III, 1998; Lincoln *et al.*, 2001; Triggle *et al.*, 2003).

Os efeitos mediados pelo NO dependem da expressão da NOS, da biodisponibilidade de fatores que regulam a atividade da NOS e das espécies reativas de oxigênio. Existem vários co-fatores que afetam a síntese do NO, dentre eles a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida – NAD(P)H), BH_4 , flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e inibidor da NOS endógena- dimetilarginina assimétrica (ADMA) (Palmer *et al.*, 1987; Moncada *et al.*, 1991).

A redução da biodisponibilidade de NO é considerado como um dos mais importantes fatores associados com doença vascular (Stroes *et al.*, 1998; Kerr *et al.*, 1999; Frostermann & Munzel, 2006). Um dos principais mecanismos envolvidos na redução na biodisponibilidade de NO, é o aumento dos níveis de ânion superóxido. Nesta situação, o NO reage com o ânion superóxido, formando o peróxinitrito ($ONOO^-$). Esta reação é mais rápida do que a interação do NO com SOD, contribuindo com a formação de um agente oxidante e na diminuição da biodisponibilidade de NO (Stroes *et al.*, 1998; Frostermann & Munzel, 2006; Takaya *et al.*, 2007).

Estudos prévios demonstram que dentre outras funções do SRAA uma ação importante refere-se ao seu envolvimento na modulação da biodisponibilidade do

óxido nítrico devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Fennell *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 1998).

1.3.3.2 Prostaciclina

Moncada *et al.* (1977) identificaram a prostaciclina (PGI_2), o principal metabólito do ácido araquidônico produzido pela ciclooxigenase em células endoteliais (Félétou & Vanhoutte, 2006, 2010). Assim, o ácido araquidônico sob ação da COX é convertido a prostaglandina G_2 (PGG_2) e sequencialmente em prostaglandina H_2 (PGH_2). Este metabólito é um potente vasodilatador, inibidor de agregação plaquetária, adesão de leucócitos e proliferação do músculo liso vascular (Kawabe *et al.*, 2010). A PGH_2 através de ações da enzima prostaciclina sintase será convertida em PGI_2 (Antman *et al.*, 2005).

A atividade PGI_2 depende dos receptores específicos acoplados a proteína G no músculo liso vascular. Assim, o acoplamento da PGI_2 com seu receptor preferencial, o receptor de prostaciclina (IR), ativará a adenilato ciclase, e conseqüentemente, o AMPc (monofosfato cíclico de adenosina) (Félétou & Vanhoutte, 2006, 2009). Esta interação também pode estimular a proteína quinase dependente de AMPc (AMPK), no músculo liso vascular. Essa proteína quinase pode atuar abrindo canais para K^+ sensíveis ao ATP, hiperpolarizando as células do músculo liso vascular e estimulando a saída de Ca^{+2} do citosol, diminuindo a oferta deste íon à maquinaria contrátil. Estes fatos contribuem para relaxamento vascular (Davidge, 2001; Kawabe *et al.*, 2010).

A PGI_2 apresenta efeito protetor no processo aterogênico limitando a ativação plaquetária, adesão de leucócitos no endotélio e no músculo liso vascular (Kawabe *et al.*, 2010). A diminuição da síntese PGI_2 induziu hipertensão e esclerose arterial em modelos experimentais (Radomski *et al.*, 1987; Félétou & Vanhoutte, 2009).

1.3.3.3 Fator Hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)

O endotélio controla o tônus vascular não somente pela liberação de NO e prostaciclina, mas também por outra via causando hiperpolarização das células do músculo liso vascular através de fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio

(EDHFs) (Félétou & Vanhoutte, 1999). A hiperpolarização de células do músculo liso vascular foi demonstrada por Bolton *et al.* (1984) através de um agonista muscarínico. Posteriormente, este fenômeno foi confirmado em vasos de diferentes espécies (Félétou & Vanhoutte, 1985; 1988). A contribuição de EDHF para a vasodilatação dependente do endotélio é maior nos vasos sanguíneos de resistência do que nos vasos de condutância (Urakami-Harasawa *et al.*, 1997).

A natureza química deste fator endotelial ainda suscita várias interrogações. A vasodilatação induzida por este composto ocorre com participação ativa dos canais de potássio presentes nas células do músculo liso vascular. Em geral, as respostas mediadas pelos EDHFs envolvem o aumento de Ca^{+2} intracelular, que ao ser liberado, induz vasodilatação por meio da abertura de canais para potássio ativados por Ca^{+2} . Assim, a hiperpolarização endotelial é transmitida para o músculo liso vascular através do acoplamento elétrico direto das junções comunicantes (*gap junctions*) ou pela ativação da NKA do músculo liso vascular (Félétou & Vanhoutte, 2006, 2009).

Os canais para K^{+} expressos no endotélio e músculo liso vascular contribuem para a manutenção do potencial de membrana, através do efluxo de K^{+} , resultando em hiperpolarização da membrana. Esse efeito é seguido do fechamento de canais para Ca^{2+} voltagem dependente e, desta forma, da redução da entrada de Ca^{2+} e conseqüente vasodilatação. Desse modo, a inibição desses canais para K^{+} levam à despolarização da membrana e à vasoconstrição. Quatro subtipos de canais para K^{+} foram identificados e são os responsáveis por executar esta função: os canais para K^{+} voltagem dependentes (K_v); os canais para K^{+} retificador (K_{ir}); os canais para K^{+} sensíveis ao ATP (K_{ATP}) e os canais para K^{+} ativados por alterações de Ca^{+2} intracelular, que podem ser subdivididos em: canais para K^{+} de larga condutância ativados por alterações de Ca^{+2} intracelular (BK_{Ca}); os canais para K^{+} de intermediária condutância ativados por alterações de Ca^{+2} intracelular (IK_{Ca}); os canais para K^{+} de baixa condutância ativados por alterações de Ca^{+2} intracelular (SK_{Ca}); (Nelson & Quayle, 1995; Ledoux *et al.*, 2006; Félétou & Vanhoutte, 2006, 2009).

Outras substâncias hiperpolarizantes derivadas do endotélio, além do NO e da PGI₂ foram identificadas e atuam através do estímulo destes canais: metabólitos da via do ácido araquidônico-lipogêneses; produtos da via do ácido araquidônico-citocromo P450 (ácidos epoxieicosatrienóicos, EETs), peptídeo natriurético tipo C, H₂O₂ (Félétou & Vanhoutte, 2006, 2010) e outros mediadores gasosos (CO, H₂S) (Félétou & Vanhoutte, 2010).

Os fatores responsáveis pela hiperpolarização atribuída ao EDHFs são secretados após a ativação dos receptores agonistas como a acetilcolina (ACh), a substância P(SP), a bradicinina (BK) e o ATP (Figura 3). Além disso, a força de cisalhamento, exercida pelo sangue sobre o endotélio vascular, é capaz de induzir uma vasodilatação pelo aumento da secreção do NO, do EDHF e da prostaciclina. Estas respostas mediadas pelos EDHFs podem ser alteradas em diversas condições patológicas, como na hipertensão arterial, aterosclerose e diabetes mellitus (Triggle *et al.*, 2003; Félétou & Vanhoutte, 2010).

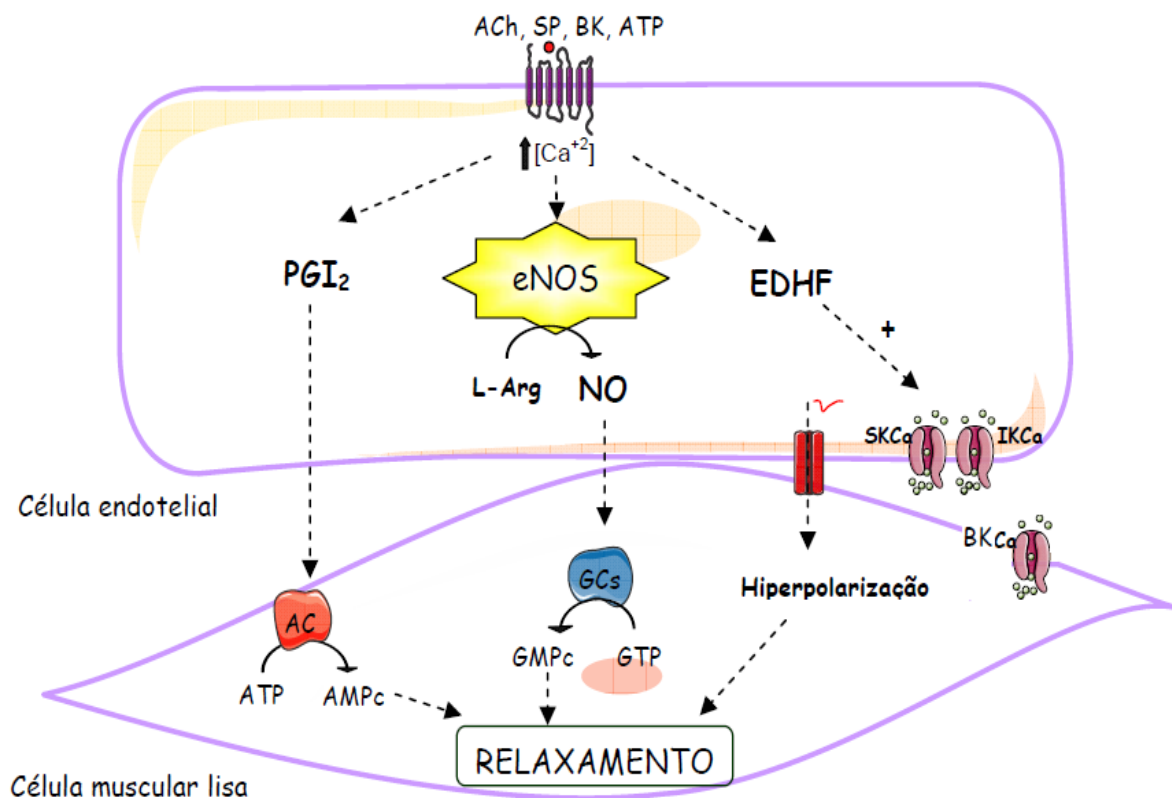


Figura 3: Fatores vasodilatadores produzidos pelo endotélio vascular. São três as principais vias endoteliais que geram a vasodilatação: a via da prostaciclina (PGI₂), a via de produção do óxido nítrico (NO) pela enzima eNOS, e a via do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Dependendo do tipo de vaso, todas estas vias podem ser ativadas após a estimulação de receptores das células endoteliais em cuja via de sinalização ocorra o aumento da concentração intracelular do Ca²⁺. Dentre os agonistas pode-se citar a acetilcolina (ACh), substância P (SP), bradicinina (BK), e adenosina trifosfato (ATP). Após a liberação pelas células endoteliais, estes mediadores exercem suas ações nas células musculares lisas, através da produção dos segundo mensageiros AMPc ou GMPc, ou ainda através da hiperpolarização. (modificado de Rattmann, 2009).

1.3.4. Fatores contráteis derivado do endotélio

1.3.4.1 Prostaglandinas vasoconstrictoras

As prostaglandinas (PGs) são também denominadas de eicosanóides por serem derivados de ácidos graxos insaturados de 20 carbonos. Estas substâncias são importantes moduladores do tônus vascular tanto em condições fisiológicas como patológicas (Frolich & Fortermann, 1989). A produção destes eicosanóides é regulada pela disponibilidade do ácido araquidônico e pela atividade da sintase da prostaglandina H (PGHS) (Davdge, 2001).

O ácido araquidônico é formado por fosfolipídeos da membrana através da ação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂). Uma vez liberado, o ácido araquidônico pode ser metabolizado pela ciclooxigenase (COX) e, posteriormente convertido em PGH₂ pelas sintase prostaglandinas H (PGHS). A PGH₂ é a precursora das demais prostaglandinas e possui atividade direta sobre o músculo liso vascular, promovendo vasoconstrição. Por ação de sintases específicas, PGH₂ é convertida em prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina I₂(PGI₂), prostaglandina D₂ (PD₂), prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), tromboxano (TXA₂). As PGF_{2α} e TXA₂ são substâncias vasoconstrictoras enquanto as demais são vasodilatadoras (Mardini & FitzGerald, 2001).

Nos anos 90, duas isoformas da ciclooxigenase (COX) foram identificadas, a do tipo 1 (COX-1) e do tipo 2 (COX-2). A COX-1 é a isoforma constitutiva, expressa em vários tecidos e está relacionada com as funções fisiológicas. A COX-2 é a isoforma induzida pelas citocinas, fatores mitogênicos e por estímulos pró-

inflamatórios em vários tipos de células. A expressão da COX-2 está relacionada com processos inflamatórios e ao estresse de cisalhamento (*shear stress*) (Antman *et al.*, 2005).

O TXA₂ é o maior produto vasoconstritor derivado da ciclooxygenase. A PGF_{2α} e o TXA₂ estimulam a atividade contrátil do músculo liso vascular através do acoplamento com receptores específicos. Esta interação levará ao aumento de cálcio intracelular e à maior sensibilidade às proteínas contráteis. As demais prostaciclina, ao se acoplarem com seus receptores específicos, estimulam a adenilato ciclase, promovendo aumento do AMPc e o relaxamento do músculo liso vascular (Luscher *et al.*, 1992; Davdge, 2001).

A participação da COX é importante na manutenção do tônus vascular. Entretanto, um desequilíbrio na formação destes prostanóides pode contribuir na fisiopatologia de várias doenças que cursam com processo inflamatório, como a hipertensão arterial, arteriosclerose e diabetes Mellitus (Davdge, 2001). Alvaréz *et al.* (2005) demonstraram aumento da expressão da COX-2 em modelos experimentais de hipertensão. Recentemente, Tian *et al.* (2012) demonstraram que o stress oxidativo serve como um iniciador do aumento da atividade de COX-2, e que a COX-2 derivados de PGF_{2α} desempenha um papel importante na mediação de disfunção endotelial observada na hipertensão renovascular 2R1C.

1.3.4.2 Endotelina

Em 1988, um potente peptídeo derivado das células endoteliais foi descoberto. A este peptídeo denominou-se endotelina (ET) (Yanagisawa *et al.*, 1988). Além das células endoteliais, as musculares lisas, fibroblastos, cardiomiócitos, macrófagos e leucócitos também produzem endotelina (ET). Três isoformas de endotelina foram identificadas: endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2), e endotelina-3 (ET-3). Essas três isoformas apresentam 21 aminoácidos, mas diferem em dois e cinco resíduos (Luscher *et al.*, 1992; Watts., 2010). A ET-1 é a principal isoforma encontrada no endotélio e no sistema cardiovascular. Cada isoforma de ET exerce seu efeito após unir-se ao seu receptor específico. Foram denominados três tipos de receptores: ET_A, ET_B, ET_C e, através de ensaios

farmacológicos, estes receptores foram divididos em subtipos: ET_{A1}, ET_{A2}, ET_{B1}, ET_{B2} (Watts, 2010).

O receptor ET_A tem maior afinidade com a ET-1 e são expressos principalmente em células musculares lisas, provendo vasoconstrição através da ativação da fosfolipase C, da proteína quinase (PKC) e do aumento da Ca⁺² intracelular, pelos canais de Ca⁺² dependentes de voltagem. O subtipo ET_B tem afinidade para as três subunidades de ET e é expresso principalmente em células endoteliais. Este subtipo de receptor promove vasodilatação através da ativação da fosfolipase A₂ e da guanilato ciclase que estimulam a liberação de NO (Luscher *et al.*, 1992).

Por sua potente ação vasoconstritora, acredita-se que a ET-1 está associada com a fisiopatologia de múltiplas doenças como a hipertensão arterial, insuficiência cardíaca e insuficiência renal (Luscher *et al.*, 1992; Watts, 2010).

1.3.4.3 Sistema Renina Angiotensina Aldosterona - SRAA

O SRAA foi descrito, em 1898, pelo fisiologista finlandês Robert Tigerstedt e seu aluno Per Gunnar Bergman, através da descoberta de um extrato (renina) do córtex renal de ratos, que aumentava a pressão sanguínea. Posteriormente, Goldblatt (1934) induziu a hipertensão em cachorros por constrição da artéria renal. Entre 1939 e 1940, Braun Menendez e Page descobriram a angiotensina. Somente em 1954, Skeggs purificou a angiotensina e mostrou a existência de duas formas, a Ang I e II. Dois diferentes tipos de sistemas renina-angiotensina foram identificados: o circulante, descrito desde a descoberta da renina, e o local, descrito mais recentemente e que parece desempenhar papel importante na homeostase circulatória. Ainda hoje os conhecimentos de fisiologia e biologia molecular sobre este sistema continuam crescendo, todavia muitos estudos são necessários para compreender as funções do SRAA circulante e local principalmente nos acometimentos cardiovasculares e renais (Hall, 2003).

A interação entre os diferentes componentes do SRAA determina sua atividade e influencia a regulação da pressão arterial, balanço renal de sódio e risco cardiovascular (Crackower *et al.*, 2002; Lacolly *et al.*, 2009).

Dentre os componentes do SRAA circulante, a Ang II merece destaque. A cascata de produção deste octapeptídeo é de forma cíclica, e advém de reações ocorridas inicialmente na circulação renal e depois na circulação sistêmica. Esta via de ativação se inicia com a liberação de renina pelas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais quando estimuladas por uma redução da pressão arterial ou desequilíbrio hidro-eletrolítico. Assim, a pré-pró-renina, um peptídeo não ativo, se transforma em pró-renina. Posteriormente, a pró-renina, através da proteólise celular transforma-se em renina. Esta, ao ser liberada, irá atuar sobre o angiotensinogênio, que será clivado, gerando a Ang I. Esta, por sua vez, sofrerá ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) no pulmão, originando a Ang II (Crackower *et al.*, 2002; Touyz & Schiffrin, 2000).

A ECA foi primeiramente descrita por Skeggs e colaboradores em 1956. Esta enzima existe no plasma, como um hormônio circulante, no interstício e intracelular. Ela se expressa em diversos tecidos como o endotélio vascular, o endotélio dos túbulos proximais renais, coração, pulmão, rim, adrenal, e órgãos reprodutivos. Seu papel é promover a clivagem dipeptídica carboxi-terminal de alguns peptídios atuando assim, na regulação do tônus vascular pela conversão do peptídeo inativo Ang I em Ang II (vasoconstrictor), além de inativar a bradicinina (vasodilatadora) e a substância P (Touyz & Schiffrin, 2000).

Recentemente outra enzima participante deste sistema foi identificada, a enzima conversora da Ang II (ECA II) que cliva tanto a Ang I como a angioensina II em um metabólito denominado Ang 1-7, este último com propriedades vasodilatadoras. Deste modo, tanto a ECA I quanto a ECA II são importantes na regulação dos níveis de Angiotensina (Figura 4) (Crackower *et al.*, 2002).

A Ang II exerce efeitos locais, como nos vasos sanguíneos, rins, coração e sistema endócrino. Esta enzima realiza ainda importante papel na regulação da pressão sanguínea (Griedling *et al.*, 1996; Crackower *et al.*, 2002; Lacolly *et al.*, 2009). Soma-se ao potente efeito vasoconstrictor da Ang II, o estímulo para a liberação de catecolaminas das terminações nervosas, a secreção de aldosterona, redução da natriurese e diurese (Yamazaki *et al.*, 1996).

Os efeitos da Ang II sobre o organismo são mediados por receptores específicos da membrana, principalmente com receptor de Angiotensina do subtipo 1 (AT₁) e o receptor de Angiotensina do subtipo 2 (AT₂). (Figura 4) Os receptores AT₁ estão presentes em células lisas musculares e adventícias do vaso. Assim, essa enzima exerce efeito predominante no tônus vascular via interação com o receptor AT₁ (Griendling *et al.*, 1996 Rajagopalan *et al.*,1996). Os receptores AT₂ são expressos durante o desenvolvimento fetal, entretanto, esta expressão é amplamente diminuída após o nascimento, sendo restrita a poucos órgãos como o cérebro, adrenal, coração, endotélio vascular, rins e ovários. No coração, o receptor AT₂ está presente em artérias coronárias e no miocárdio ventricular. Estudos recentes demonstraram aumento da expressão do receptor AT₂ em condições patológicas, como injúria vascular, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca e insuficiência renal. O mecanismo de ação deste receptor está relacionado à liberação de NO promovendo relaxamento do músculo liso vascular (Griendling *et al.*, 1996; Steckelings *et al.*, 2005). Estudos em ratos com hipertensão renovascular (2R1C) sugerem que a produção de NO vascular esta aumentada, nesses animais, por aumento da fosforilação da eNOS através da ativação dos receptores AT₂ (Hiyoshi *et al.*, 2005). Outros subtipos de receptores como AT₃ e AT₄ estão presentes em nosso organismo, todavia, seus mecanismos de ações e existência ainda não foram completamente esclarecidos (Griendling *et al.*, 1996; Wright *et al.*, 2008).

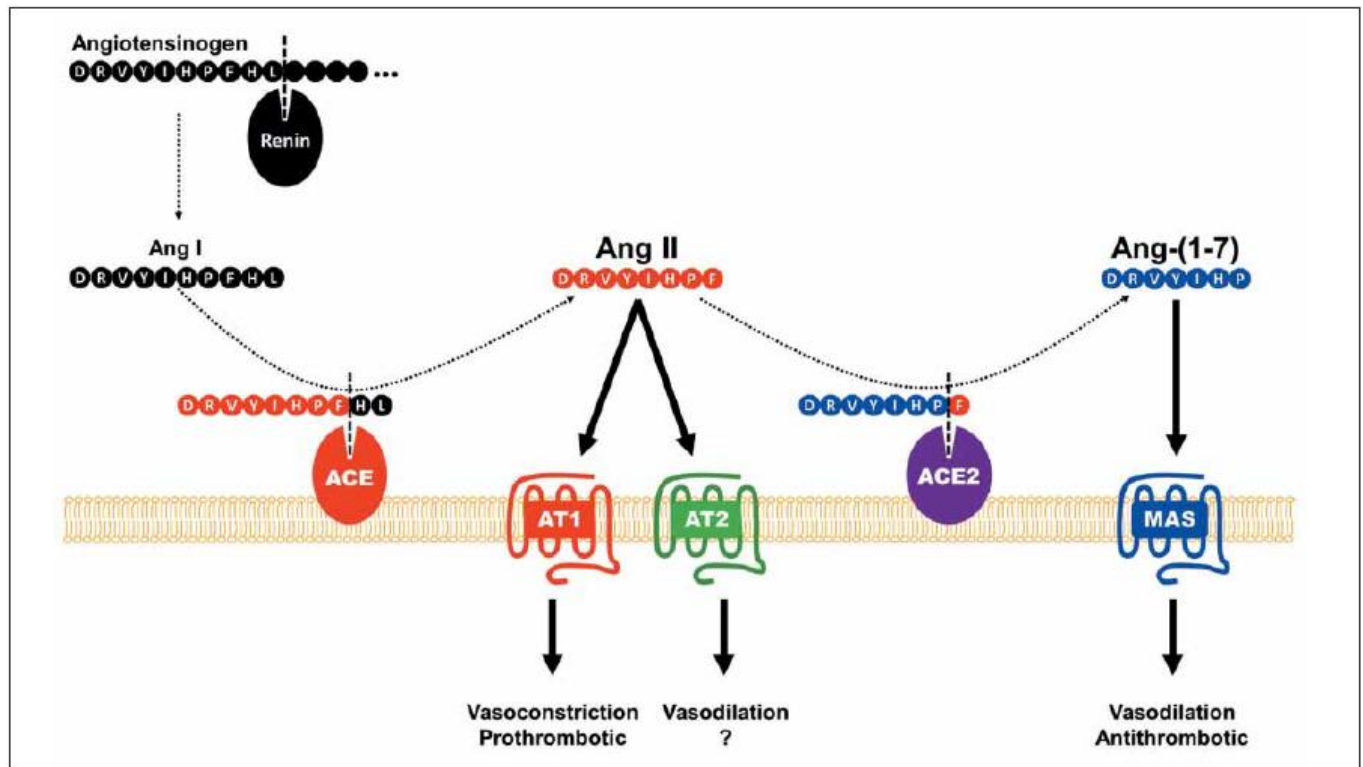


Figura 4: Representação esquemática da cascata do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Ang I: angiotensina I; Ang II: angiotensina II; Ang (1-7): angiotensina (1-7); ACE: enzima conversora de angiotensina; ACE2: enzima conversora de angiotensina 2; AT₁: Receptor de Ang II do tipo 1; AT₂: Receptor de Ang II do tipo 2; Mas: Receptor da Ang (1-7). (Fraga-Silva *et al.*, 2012).

A união entre da Ang II com o receptor AT₁ ativa vias mediadas por proteínas G, tirosinas-quinases, e tirosina não quinases. A via mediada pela proteína G ativa as fosfolipases C (PLC), A₂ (PLA₂), D (PLD) e as lipogenases. A ativação da fosfolipase C (PLC), forma o diacilglicerol (DAG) e o trifosfato de inositol (IP₃). A DAG ativa a PKC que fosforila a bomba de Na⁺/K⁺, o trocador Na⁺/H⁺, Na⁺/Ca⁺ aumentando a concentração de Na⁺ e Ca²⁺ intracelular promovendo vasoconstrição. Por sua vez, o IP₃ eleva a concentração de Ca²⁺ intracelular culminando em contração do músculo liso vascular (Griendling *et al.*, 1996; Touyz & Schiffrin, 2000; Garrido & Griendling, 2009).

A ativação da PLA₂ leva a produção dos prostanóides derivados da via da COX, que participam do controle do tônus através de estímulos vasodilatadores (PGI₂ e PGE₂) e vasoconstritores (TXA₂) (Griendling *et al.*, 1996; Touyz & Schiffrin, 2000; Beltrán *et al.*, 2009). A Ang II ativa também a PLD, promovendo a hidrólise da

fosfatidilcolina em colina e ácido fosfatídico que é convertido em DAG, este estimula e PKC sustentando a contração do músculo liso (Touyz & Schiffrin, 2000). Quando a via das lipooxigenases é ativada ocorre formação de leucotrienos, que estão associados a respostas inflamatórias. Estas características mostram a importância da Ang II na manutenção da integridade estrutural e funcional da parede dos vasos e o papel que ela exerce em doenças cardiovasculares associadas com a contração do músculo liso vascular, como a hipertensão (Touyz & Schiffrin, 2000; Garrido & Griendling, 2009).

A estimulação da Ang II ao receptor AT_1 causa ainda fosforilação da tirosina-quinase. Esta irá ativar a PKC e as MAPKs (Mitogen-activated protein), influenciando o crescimento e remodelamento vascular (Touyz & Schiffrin, 2000; Beltrán *et al.*, 2009; Garrido & Griendling, 2009), regulando assim o crescimento celular, apoptose, deposição da matriz extracelular (Griendling *et al.*, 1996; Rajagopalan *et al.*, 1996 ; Hannken *et al.*, 1998; Garrido & Griendling, 2009).

Recentemente, um novo modelo sinalizador para Ang II tem sido bem descrito, e este, pode ter importantes implicações para os seus efeitos fisiológicos e fisiopatológicos. Estudo prévio demonstrou que a Ang II aumentou a liberação de ânion superóxido (O_2^-) pelo estímulo da atividade da enzima NADPH oxidase em cultura de células musculares lisas de ratos (Griendling *et al.*, 2000). Este aumento é maior em células de ratos espontaneamente hipertensos do que em normotensos (Cruzado *et al.*, 2005). Outros pesquisadores demonstraram que diferentes modelos experimentais de hipertensão, como a hipertensão induzida pela Ang II, estão associados com o aumento de O_2^- em ratos Sprague Dawley (Rajagopalan *et al.*, 1996), além disso, estudos têm demonstrado que a Ang II desempenha um papel crucial no desenvolvimento de stress oxidativo em ratos com hipertensão renovascular (Ceron *et al.*, 2010). Adicionalmente, estudos apontam que um dos mecanismos pelos quais a Ang II desempenhe um papel nas doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão, pode ser através de sua capacidade em ativar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Campagnaro *et al.*, 2012, 2013).

1.3.4.4 Espécies reativas de Oxigênio (EROS).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são metabólitos do oxigênio que podem tanto retirar elétrons, doar elétrons ou reagir com outras moléculas. Estas partículas, formadas por elétrons livres ou não pareados, possuem uma instabilidade elétrica muito grande, e assim, apresentam grande capacidade reativa. A fim de captar um elétron para sua estabilização, é capaz de reagir com qualquer composto, seja este uma molécula, célula ou tecido. Por esta característica, é denominado de substância oxidante (Griendling & Ushio-Fukai, 2000; Harrison & Gongora, 2009).

A principal fonte geradora de EROs são as mitocôndrias, assim, a formação destes metabólitos pelo organismo em condições fisiológicas é inevitável, visto que o processo de respiração celular ocorre nesta organela (Cai & Harrison, 2000). Ademais, as EROs, não desencadeiam somente consequências tóxicas do metabolismo celular, mas também são participantes essenciais na sinalização e na regulação celular. Estes metabólitos do oxigênio participam de vias de sinalização intracelular, mudanças de transcrição gênica e síntese de proteínas (Touyz & Schiffrin, 2000). Em condições fisiológicas a produção de EROs e sua eliminação estão sujeitas a um balanço na parede vascular. Todavia, o aumento da atividade de enzimas oxidantes e a diminuição da atividade de enzimas antioxidantes levam ao estresse oxidativo (Griendling, *et al.*, 2000, 2003).

Um dos mais importantes radicais para a biologia vascular é o ânion superóxido (O_2^-), o qual é formado pela redução univalente do oxigênio (Taniyama & Griendling, 2003; Touyz & Schiffrin, 2004; Harrison & Gongora, 2009). Apesar do O_2^- poder diretamente promover alterações na função vascular, ele também é fundamental na produção de outras espécies reativas, como quando ocorre sua reação com o NO, a qual leva à produção de substâncias citotóxicas como o peroxinitrito ($ONOO^-$) e radicais hidroxila (OH^*) (Miller *et al.*, 1998; Beal, 2002; Griendling & FitzGerald, 2003; Taniyama & Griendling, 2003; Cai, 2005). Destas reações pode ocorrer a perda da capacidade vasodilatadora do NO, levando a um predomínio da resposta vasoconstritora dependente do endotélio (Kawashima & Yokoyama, 2004).

A dismutação do O_2^- pela superóxido dismutase (SOD), produz o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é convertido enzimaticamente em H_2O pela catalase e glutadiona peroxidase (GPx) (McIntyre, *et al.*, 1999; Griendling & FitzGerald, 2003, Taniyama & Griendling, 2003). O H_2O_2 pode atuar como segundo mensageiro, mediando respostas que levam o crescimento do músculo liso vascular, migração celular, apoptose e respostas inflamatórias (Griendling & FitzGerald, 2003; Cai, 2005; Harrison & Gongora, 2009). O H_2O_2 pode ser também metabolizado pelas mieloperoxidases e formar o ácido hipocloroso ($HOCl$) ou reagir com metais de transição formando o OH^\cdot . Dentre as EROs, o O_2^- , $ONOO^-$ e OH^\cdot são os mais instáveis e reativos, enquanto H_2O_2 é a mais estável (Taniyama & Griendling, 2003).

A formação das EROs é mediada por algumas enzimas vasculares que incluem a NADPH oxidase, xantina oxidase, mieloperoxidase, eNOS, isoenzimas da citocromo P450, lipooxigenase, ciclooxigenase, heme oxigenase e glicose oxidase (Cai & Harrison, 2000). (Figura 5) A principal fonte de EROs no endotélio parece ser a NADPH oxidase. Estas enzimas utilizam o NADH ou NADPH como substratos (Cai *et al.*, 2005; Hamilton *et al.*, 2002; Garrido & Griendling, 2009).

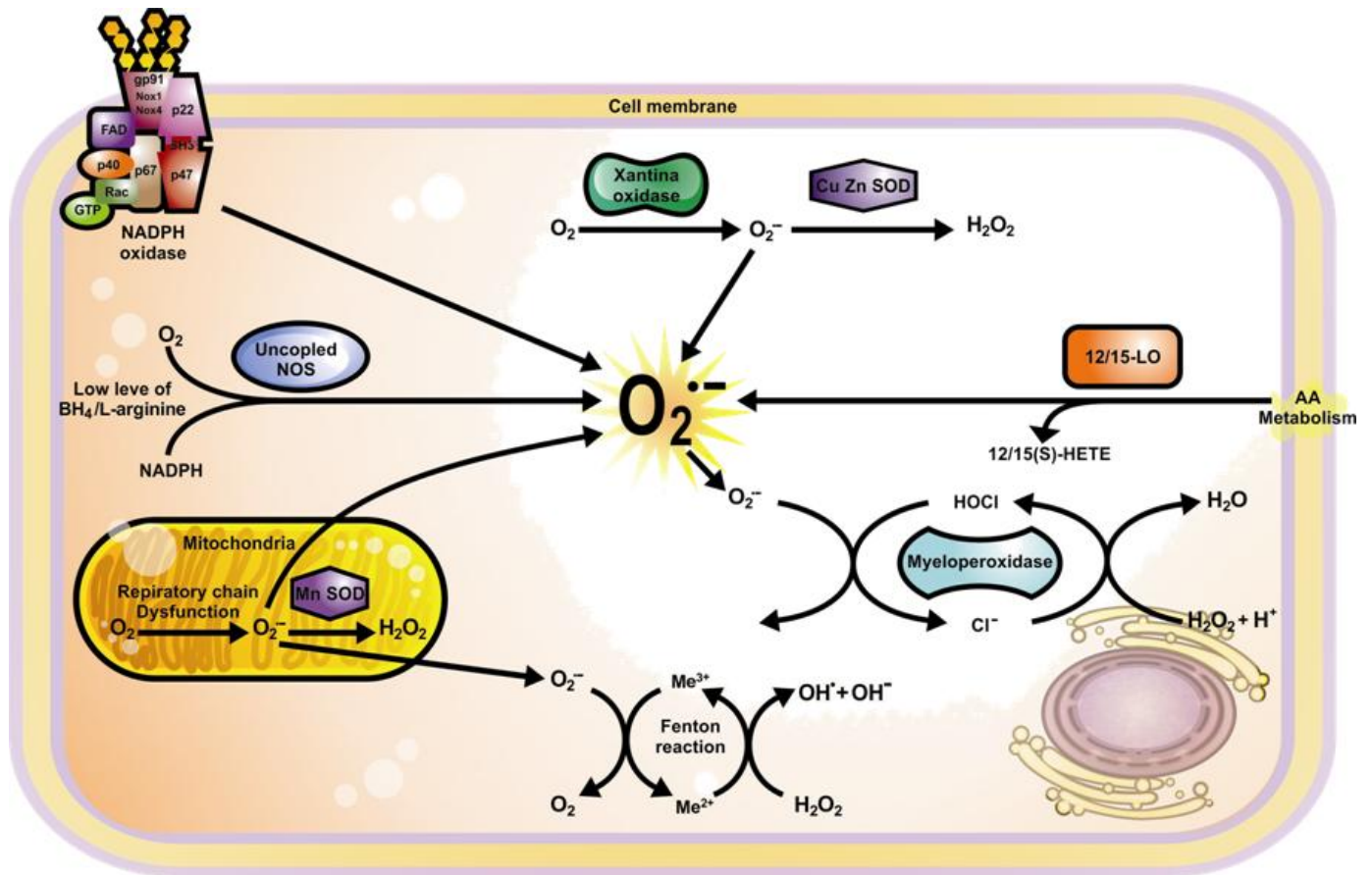


Figura 5: Fontes de Espécie Reativa de Oxigênio (ERO). São várias as vias de formação de EROs, sendo a principal via a mitocôndria por meio do processo de respiração celular, outra via importante de formação de EROs é a NADPH oxidase. A Xantina oxidase (XO) está presente no plasma e células endoteliais, mas não nas células do músculo liso vascular e a XO gera o ânion superóxido por meio da catalização da xantina e hipoxantina em ácido úrico. A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima derivada de leucócitos que catalisa a formação de numerosas EROs. Dentre os metabolismos dos aminoácidos (AA) podemos citar as lipoxigenases (12/15LO), que apresentam-se como outra fonte importante de formação de EROs na parede vascular. A NOS e suas isoformas também podem atuar como fonte de EROs. Na ausência, ou em baixas concentrações de seu substrato L-arginina ou do co-fator BH_4 a NOS pode sofrer um desacoplamento, promovendo a formação de O_2^- . (modificado de Madamanchi *et al*, 2005.).

A NADPH oxidase é composta por uma membrana integrada, o citocromo b558, o qual é composto de duas subunidades, uma maior denominada gp91phox e outra menor p22phox, além das subunidades citosólicas regulatórias p67phox, p40phox, p47phox e da proteína de baixo peso molecular rac-1 (Griendling, *et al.*, 2000; Hamilton *et al.*, 2002). A subunidade p22phox é descrita como um componente crítico para a geração vascular de ânions superóxido (McIntyre *et al.*, 1999). Subunidades homólogas da gp91phox foram descritas, e estas fazem parte

da família da NOX da NADPH oxidase, que é composta de pela NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX 5, DUOX1 e DUOX2. Estas enzimas têm a capacidade de transportar elétrons através da membrana plasmática e gerar ânions superóxidos. A NOX 4 é mais expressa em células endoteliais (Koh *et al.*, 2009).

As EROs derivadas da NOX, têm sido implicadas em uma variedade de doenças vasculares, incluindo a hipertensão. Estes radicais livres derivados da NOX podem ser produzidos em resposta a Ang II (Cai, 2005; Koh *et al.*, 2009). As subunidades da NADPH oxidases estão expressas em várias células, como as endoteliais, do músculo liso vascular, neutrófilos e fibroblastos. A subunidade gp91phox é mais expressada em fagócitos, enquanto as outras subunidades são expressas em vários tecidos e estão relacionadas com crescimento celular (Griendling & Ushio-Fukai, 2000).

A atividade vascular da NADPH oxidase é regulada pelas citocinas, hormônios e forças mecânicas. Além disso, Ang II, trombina, fator agregação plaquetária, fator crescimento tumoral (TGF- α) e os metabólitos do ácido araquidônico estão relacionadas com aumento da atividade desta enzima e conseqüentemente com a produção de radicais livres (Cai *et al.*, 2000; Griendling *et al.*, 2000). Estudos demonstram que Ang II estimula a produção de radicais livres através da enzima NADPH do citocromo P-450 oxireductase (Rajagopalan *et al.*, 1996; Griendling & Ushio-Fukai, 1994; McIntyre *et al.*, 1999).

Soma-se a formação de EROs a Xantina oxidase, que utiliza a xantina, hipoxantina ou NADH na geração de radicais livres. Em células endoteliais, a atividade e expressão da xantina oxidase são aumentadas pelo interferon γ (Cai *et al.*, 2000). A NOS e suas isoformas também podem atuar como fonte de EROs. Na ausência, ou em baixas concentrações de seu substrato L-arginina ou do co-fator BH₄ a NOS pode sofrer um desacoplamento, promovendo a formação de O₂⁻ (McIntyre *et al.*, 1999; Kawashima & Yokoyama, 2003; Taniyama & Griendling, 2003) (Figura 5). Outra fonte de EROs são as mieloperoxidases (MPO), que além de produzir radicais livres, utilizam o NO em suas reações, diminuindo a biodisponibilidade do mesmo e produzindo espécies reativas de nitrogênio (ERN) (Taniyama & Griendling, 2003).

Dentre principais enzimas antioxidantes vasculares podemos citar: a catalase, a glutathiona peroxidase (GPX), a tioredoxina redutase e as SODs. A glutathiona peroxidase e a catalase são as enzimas envolvidas na degradação do peróxido de hidrogênio. A catalase transforma a H_2O_2 em H_2O e O_2 . Já a glutathiona peroxidase transforma o H_2O_2 em água (Griendling & Ushio-Fukai, 2000). Outra enzima antioxidante é a família das SODs. Esta família cataliza a reação do $O_2^{\cdot-}$ com um elétron e dois prótons formando o H_2O_2 . Três isoformas da SOD foram identificadas, a SOD cobre/zinco (Cu/Zn SOD; SOD1), SOD mitocondrial (Mn SOD; SOD2) e a SOD extracelular (ECSOD; SOD3). Em suma, a redução da atividade das enzimas antioxidantes resulta em aumento da formação de EROs, levando à ações danosas aos vasos (Touyz & Schinffrin, 2004).

Muitas funções do endotélio e do músculo liso vascular são afetadas pelas EROs. No endotélio vascular os radicais livres podem causar diminuição da biodisponibilidade de NO, apoptose, aumento adesão de monócitos e angiogênese. Enquanto no MLV, os radicais livres podem promover crescimento celular, migração de mediadores inflamatórios, desorganização da matriz extracelular e aumento do tônus muscular (Taniyama & Griendling, 2003). Todas estas características contribuem para injúria vascular, disfunção endotelial e conseqüentemente para a fisiopatologia da hipertensão arterial (Griendling & Ushio-Fukai, 1994; Kerr *et al.*, 1999; Cruzado *et al.*, 2005; Touyz & Schinffrin, 2004; 2008). Alguns estudos demonstram que a hipertensão renovascular aumenta a produção de radicais livres principalmente devido a ação da Ang II vascular. Nos vasos, a ativação dos receptores AT_1 promove aterogênese e induz estresse oxidativo (Goodfriend *et al.*, 1996). De fato, a Ang II em células vasculares endoteliais humanas provoca a formação de espécies reativas de oxigênio como o $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , via ativação da NADH/NADPH oxidases. Como consequência aparecem hiperplasia e hipertrofia da célula muscular lisa (Zhang *et al.*, 1999). A atividade das oxidases vasculares é aumentada de modo substancial pela Ang II que, via NADH e NADPH, aumenta a produção de $O_2^{\cdot-}$ em cultura de células musculares lisas (Rajagoplan *et al.*, 1996) bem como em células endoteliais (Lang *et al.*, 2000). Importantes achados *in vivo* confirmam as observações feitas *in vitro*, mostrando que a

infusão de Angiotensina resulta em hipertensão acompanhada de disfunção endotelial e aumento da produção vascular de O_2^- (Rajagoplan *et al.*, 1996).

É bem conhecido que o desequilíbrio na produção dos fatores vasodilatadores e vasoconstrictores derivados do endotélio promovem alterações na função endotelial e aumentam o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. O termo disfunção endotelial refere-se à redução da produção e/ou biodisponibilidade de substâncias vasodilatadoras, em especial do NO ou o aumento de substâncias vasoconstritoras (Cannon III, 1998; Triggle, 2003). Portanto, um dos fatores que desencadeia esse desequilíbrio na hipertensão renovascular é o aumento do stress oxidativo via redução da biodisponibilidade do NO endotelial.

1.4 ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS NA HIPERTENSÃO RENOVASCULAR

Segundo a VI diretriz brasileira de hipertensão arterial os objetivos principais do tratamento da hipertensão arterial renovascular são a cura ou a melhora da hipertensão arterial e/ou a melhora ou a preservação da função renal. O tratamento da hipertensão arterial renovascular pode ser clínico, cirúrgico ou por meio de revascularização percutânea com ou sem a colocação de próteses endovasculares (*stents*). Em relação ao tratamento clínico, os inibidores da ECA, os bloqueadores dos canais de cálcio e os betabloqueadores são medicamentos efetivos para o tratamento da hipertensão arterial associada à estenose unilateral de artéria renal. Os bloqueadores dos receptores AT_1 também são efetivos para o tratamento da hipertensão arterial associada à estenose de artéria renal. As medicações também estão sendo investigadas quanto à sua capacidade de aumentar a disponibilidade de NO e diminuir o estresse oxidativo.

Nesse contexto, muitos estudos têm relatado as ações de fármacos que atuam no SRAA no modelo de hipertensão 2R1C, dentre as estratégias terapêuticas encontradas podemos citar o uso isolado de inibidores do SRAA, combinação dos inibidores dos SRAA com diuréticos, combinação dos inibidores do SRAA com bloqueadores dos canais de Ca^{++} e até o duplo bloqueio do SRAA.

1.4.1 Inibidores Do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA)

Embora o SRAA desempenhe um importante papel na fisiologia humana, e apesar da Ang II, o peptídeo efetor do SRAA, ser essencial para o controle da homeostase do sistema cardiovascular (incluindo, entre outros, balanço de sódio e água, controle da pressão arterial e crescimento celular), a ativação excessiva do SRAA é marcadamente associada ao estabelecimento e progressão de doenças cardiovasculares. Na verdade, a excessiva ativação do SRAA, como visto na hipertensão renovascular, tem sido implicada na progressão de toda a evolução da doença cardiovascular, desde as fases iniciais (hipertensão e diabetes) intermediárias (hipertrofia ventricular esquerda e microalbuminúria) e estágios finais (doença coronariana, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca e doença renal). Portanto, o excesso de produção de Ang II é responsável, pelo menos em parte, pelo estabelecimento e desenvolvimento de hipertensão e lesão renal (Escobar *et al.*, 2012). Por esses motivos e devido evidências clínicas, as quais confirmam que a utilização de inibidores da ECA (iECA), bloqueadores dos receptores da Angiotensina (BRA) e, nos últimos anos, o Alisquireno – o primeiro inibidor oral direto da renina são medicamentos de escolha no tratamento clínico da hipertensão renovascular.

Os inibidores da ECA pertencem a uma categoria de drogas com uso crescente em uma variedade de doenças, incluindo hipertensão, insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio, nefropatia diabética e outras formas de nefropatia (Cheung, 2002). Além de converter Ang I em Ang II, a ECA também inativa as cininas (Gavras & Corcoran, 1994); portanto os inibidores da ECA aumentam os níveis de bradicinina, o que contribui para seu efeito anti-hipertensivo. Além de reduzir a pressão arterial, os inibidores da ECA promovem regressão da hipertrofia ventricular (Dahlof *et al.*, 1992), melhoram a disfunção endotelial (Mancini *et al.*, 1996), diminuem a morbi-mortalidade associada à insuficiência cardíaca (CONSENSUS, 1987), reduzem a mortalidade e melhoram a função cardíaca pós-infarto (Pfeffer *et al.*, 1992) e reduzem a progressão da nefropatia diabética (Lewis *et al.*, 1993) e de outras nefropatias (Maschio *et al.*, 1996). Estes marcantes sucessos dos inibidores da ECA estimularam a busca por drogas alternativas para o bloqueio do SRAA, como o desenvolvimento dos

antagonistas de receptores AT₁ da Ang II. O receptor AT₁ parece ser o mediador dos efeitos fisiológicos da Ang II no sistema circulatório, supunha-se que estas drogas bloqueariam os efeitos cardiovasculares da Ang II de forma mais completa, específica e durável quando comparados aos inibidores da ECA. Além disso, a incidência de efeitos deveria ser menor em função da especificidade do bloqueio. Com o uso clínico dos bloqueadores de AT₁, sua farmacologia tornou-se melhor conhecida. Estas drogas bloqueiam o AT₁, mas não o AT₂. Ao mesmo tempo, os níveis de Ang II aumentam, podendo ocorrer estimulação exagerada dos receptores AT₂. Evidências preliminares sugerem que a estimulação do AT₂ pode contribuir para o efeito vasodilatador do medicamento (Horiuchi *et al.*, 1999). No entanto, achados mais recentes apontam para efeitos pró-inflamatórios, fibróticos e proliferativos da estimulação do AT₂ (Wolf *et al.*, 1997).

Atualmente um grande número de bloqueadores AT₁ está aprovado para uso clínico; no entanto, devem ser usados com reserva. Embora os inibidores da ECA e os antagonistas AT₁ bloqueiem o mesmo sistema, evidências experimentais sugerem que seus mecanismos de ação diferem em vários aspectos, como aumento dos níveis de bradicinina e Ang 1-7 com inibidores da ECA e ativação do receptor AT₂ com bloqueadores AT₁ (Cheung, 2002). (Tabela 1)

Achados clínicos recentes sugerem que o uso combinado destas duas classes de medicamentos oferece efeitos aditivos na redução da pressão arterial, da proteinúria na nefropatia e na melhora do prognóstico na insuficiência cardíaca. No entanto, alguns estudos mostram resultados desfavoráveis. (Stergiou & Skeva, 2004).

Sendo assim, os BRA, tanto os inibidores da ECA como os bloqueadores de AT₁ são considerados como terapia de primeira linha de escolha no tratamento da hipertensão que coexiste com dano renal, como no caso da hipertensão renovascular, devido à proteção renal superior ao efeito de redução da pressão arterial. Corroborando esses dados, diretrizes atuais destacam a eficácia dos inibidores da ECA e dos bloqueadores de AT₁ em pacientes com estenose da artéria renal unilateral (Tendera *et al.*, 2011). Ambos medicamentos podem retardar a progressão do declínio da função renal e, especialmente em pacientes com alto risco cardiovascular, reduzindo o risco de eventos cardiovasculares. No entanto, deve ser

lembrado que tanto os inibidores da ECA quanto os bloqueadores de AT₁ podem acelerar o dano ao rim da artéria estenosada.

Por outro lado, uma hiperatividade simpática, incluindo o aumento dos níveis plasmáticos de noradrenalina, foi visto em pacientes com estenose da artéria renal (Johansson *et al.*, 1999), provavelmente, esse fato, contribui para o aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares nestes pacientes (Johansson *et al.*, 1999). Pequenos estudos recentes sugerem que os beta-bloqueadores podem retardar a progressão da estenose ou ajudar na melhoria da taxa de filtração glomerular após procedimento cirúrgico (revascularização) (Cianci *et al.*, 2011).

Escobar *et al* (2012) em sua publicação avaliou as evidências disponíveis sobre a melhor abordagem terapêutica para otimizar a proteção renovascular na população hipertensa, objetivando efetivamente reduzir ou pelo menos retardar o estabelecimento e progressão da doença renal na população hipertensa, em seus resultados, portanto, a inibição do SRAA confirmou ter um papel fundamental na prevenção de danos renais, entretanto, como a maioria dos pacientes com hipertensão vai precisar de pelo menos dois agentes anti-hipertensivos para normalização da pressão arterial, o uso de inibidores do SRAA é uma parte obrigatória da terapia anti-hipertensiva.

A questão é qual agente anti-hipertensivo é a melhor escolha para a combinação com bloqueadores do SRAA deve ser considerada. Muitos estudos têm demonstrado que os diuréticos e bloqueadores dos canais de cálcio são a melhor escolha, no entanto, mais estudos são necessários para esclarecer os subgrupos de pacientes que se beneficiarão mais de uma combinação com um diurético ou de uma combinação com um bloqueador dos canais de cálcio. Até à data, os inibidores do SRAA recomendadas neste contexto são os inibidores da ECA e os BRA. O alisquireno, inibidor direto da renina, tem mostrado resultados promissores.

Dessa forma, Vários medicamentos desta família foram introduzidos desde que o captopril foi lançado, incluindo enalapril, lisinopril, ramipril e outros. Enquanto eles são agentes anti-hipertensivos eficazes, eles podem, em alguns casos, levar à deterioração da função renal, especialmente em pacientes com estenose da artéria renal bilateral ou estenose de rim único, portanto, novas pesquisas são necessárias

a fim de compreender melhor a ação isolada ou até associada dessas classes de medicamentos anti-hipertensivos objetivando não somente o controle da pressão arterial, mas assim como a proteção de órgãos alvos (coração, rim, vasos), além de determinar uma terapêutica que minimizem os efeitos colaterais.

1.4.1.2 Inibidor Direto da Renina – Alisquireno

O alisquireno é a mais recente novidade no mercado de agentes anti-hipertensivos que atua por inibição do SRAA, sua ação intervém no início da biossíntese da Ang II através da inibição direta da protease renina, inibindo, assim, a clivagem de Ang I, a partir do angiotensinogênio. Isto resulta, em contraste com a inibição da ECA, numa inibição completa do SRAA que resulta no declínio dos níveis de Ang II. O fato de a renina ser o primeiro da etapa da cascata enzimática do SRAA e ter notavelmente alta especificidade por apenas um substrato, o angiotensinogênio, o desenvolvimento e a introdução de alisquireno, em 2007, era esperado para ser um grande avanço no controle da pressão arterial. Em contraste com a renina, a ECA tem muitos substratos peptídicos, incluindo a bradicinina, como visto anteriormente. Assim, uma taxa mais baixa de efeitos colaterais foi esperada com a inibição direta da renina (Friedrich & Schmieder, 2013).

Atualmente, sabe-se que a sua biodisponibilidade após administração por via oral é de 2,6%, com uma concentração plasmática máxima atingida dentro de 1-3 horas após dose oral única (Vaidyanathan *et al.*, 2008). Concentração plasmática no estado de equilíbrio é atingida após 7-8 dias de administração diária. A concentração plasmática está linearmente relacionada com a dose no intervalo de 40-640 mg/dia. A sua meia vida no plasma é de 23-40 horas, permitindo assim dosagem diária única (Azizi *et al.*, 2006). A maioria (90,9%) do alisquireno é excretado pela via fecal / biliar em indivíduos saudáveis após uma única dose de 300 mg, enquanto que 0,6% da droga é eliminada pela urina (Waldmeir *et al.*, 2007). Nenhuma modificação da dose deve ser feita na presença de doença renal ou hepática. O alisquireno não é metabolizado pelo citocromo P450, e, portanto, tem poucas interações com outros fármacos metabolizados por esta enzima.

O mecanismo de ação fisiológico do alisquireno na redução da pressão arterial ocorre, principalmente, pela redução dos níveis de Ang II. Um estudo realizado em voluntários saudáveis normotensos, mostrou que o alisquireno diminui a atividade da renina plasmática de maneira dose dependente após uma única dose oral de 40-600 mg / dia e que a Ang I e II diminuem de maneira similar, enquanto que a concentração plasmática de renina aumenta (Tabela 1) (Nussberges *et al.*, 2002). Em outro pequeno estudo com 12 voluntários saudáveis levemente sódio-depletados, doses orais únicas de 300 mg de alisquireno reduziu a atividade de renina plasmática, bem como os níveis de Ang I e II no sangue por 48 horas, e reduziu a excreção urinária de aldosterona. Adicionalmente, esta redução foi mais forte e mais durável do que doses de 160 mg de valsartan (BRA), no entanto, alisquireno também induziu um maior aumento da concentração de renina no plasma do que o valsartan (Azizi *et al.*, 2004). O aumento da concentração plasmática de renina ocorre numa extensão maior com o uso do alisquireno do que com o uso de outros inibidores da ECA ou BRA, e isso pode ser um problema importante, visto que a pro-renina e renina parece estimular o receptor de (pró) renina e induzir fibrose, apoptose e hipertrofia de órgãos em animais experimentais. No entanto, o significado clínico deste achado ainda não está claro. (Danser, 2009).

Além disso, A atividade da renina plasmática permanece reduzida por até um mês após interromper o uso do alisquireno, sugerindo que a ação do alisquireno pode persistir durante muito mais tempo do que a meia-vida da droga. Curiosamente, este efeito está associado com menor nível pressórico após interromper o uso da droga (Andersen *et al.*, 2009). Associado a redução da pressão arterial observada com o uso do alisquireo, estudos experimentais em ratos vêm mostrando que a administração do alisquireno reduz proteinúria, reverte hipertrofia cardíaca e reduz a infiltração de macrófagos no coração e rim de forma significativa. Estes resultados experimentais apontam para um efeito protetor a órgãos alvos com o uso do alisquireno (Pilz *et al.*, 2005).

Adicionalmente, vários estudos clínicos analisaram a capacidade do alisquireno, administrada uma vez por dia, de reduzir a pressão arterial, em comparação com ramipril (inibidor da ECA), (Duprez *et al.*, 2008) o losartan

(antagonista de AT₁) , (Stanton *et al.*, 2003) o irbesartan (antagonista de AT₁) (Gradman *et al.*, 2005) e hidroclorotiazida (diurético) (Schmieder *et al.*, 2009). Nestes estudos com pacientes diagnosticados com hipertensão essencial de ligeira a moderada, o alisquireno foi capaz de diminuir a pressão arterial de maneira semelhante ou até mais eficaz que os medicamentos comparados, com um perfil de segurança semelhante aos BRA.

Da mesma forma a terapia combinada de alisquireno com hidroclorotiazida (diurético), amlodipina (bloqueador de canais de Ca⁺⁺) e valsartan (BRA) mostrou ser mais efetivo na redução da PA, demonstrando que a associação de terapias parece ter um efeito potencializador da droga em contra partida a monoterapia. Todavia, estudos da ação do alisquireno em modelos de hipertensão dependente de Ang II, como é o caso da hipertensão 2R1C, os quais normalmente cursam com hipertensão severa, ainda são pouco explorados.

Recentemente, Martins-Oliveira (2013) demonstrou em seu estudo, no qual comparou o efeito do losartan com o alisquireno sobre o remodelamento vascular no modelo de hipertensão 2K1C, que embora losartan e alisquireno apresentem efeitos anti-hipertensivos similar, entretanto, somente o losartan foi capaz de prevenir a ativação dos mecanismos pro fibróticos vasculares, sugerindo que o alisquireno não potencialize os efeitos observados com o losartan, adicionalmente, Ohsawa M (2013), demonstrou que o alisquireno foi eficaz na redução da deterioração renal, melhora do remodelamento cardíaco patológico e diminuição da aldosterona de pacientes hipertensos com doença renal crônica com albuminúria. Corroborando esses achados, uma recente revisão mostrou que a análise de estudos clínicos e pré-clínicos utilizando alisquireno mostrou efeitos renoprotetores e prevenção de danos ao miocárdio em pacientes hipertensos com doença renal (Jadhav *et al.*, 2012). Todavia, são necessários mais estudos para compreender os efeitos dessa droga com mais detalhes, além disso, poucos estudos foram realizados com o uso do alisquireno na hipertensão renovascular, tornando relevante estudos experimentais na hipertensão renovascular a fim de avaliar a segurança e eficácia dessa droga.

1.4.1.3 Associação do Alisquireno com Diuréticos

A hidroclorotiazida é o diurético mais comumente prescritos como terapia anti-hipertensiva nos Estados Unidos, essa droga, protótipo dos diuréticos tiazídicos, é indicada, em baixas doses orais, como primeira escolha no tratamento de hipertensão arterial sistêmica. É usado como adjuvante no tratamento de insuficiência cardíaca crônica controlada, tendo a vantagem de efeito diurético moderado e possibilidade de uma administração diária. Pode também ser empregada em hipercalcúria e em diabetes não insulino dependente (diabetes tipo II).(FTN, 2010). Para tanto, as doses mais comumente prescritos de hidroclorotiazida são 12,5 e 25 mg. A biodisponibilidade do uso oral de hidroclorotiazida é elevada, variando entre 50% e 80% e atinge a sua concentração sanguínea máxima depois de 1,0 - 2,5 horas, com uma meia-vida de 6-19 horas. A hidroclorotiazida não é metabolizada, e 95% é excretado na urina (Ernst & Moser, 2009).

O mecanismo de ação da hidroclorotiazida ocorre através da ativação do SRAA principalmente através da depleção de sódio e de água, levando ao aumento da concentração plasmática da renina e da atividade da renina plasmática, e, portanto, a produção de Ang II. (Villamil *et al.*, 2007). O aumento da concentração de renina plasmática e da atividade da renina plasmática é ainda mais potencializado quando a hidroclorotiazida é combinado com um inibidor da ECA ou BRA. No entanto, o uso do alisquireno, quando combinado com hidroclorotiazida 25 mg / dia num estudo de pacientes hipertensos obesos (Jordan *et al.*, 2007), essa combinação foi capaz de suprimir a atividade da renina no plasma. Curiosamente, o alisquireno também diminui a atividade da renina no plasma, quando combinada com outros agentes conhecidos para aumentar a atividade da renina no plasma, incluindo inibidores da ECA e BRA (Tabela 1) (Azizi ET AL., 2004).

É conhecido que o uso de hidroclorotiazida em altas doses apresenta muitos efeitos adversos, incluindo o desequilíbrio de eletrólitos (hipocalemia, hiponatremia), resistência à insulina, e hiperuricemia, entretanto, para o uso eficaz da hidroclorotiazida como monoterapia anti-hipertensiva é necessário doses elevadas, tornando-o inadequado como monoterapia (Messerli *et al.*, 2008). Por outro lado, ao

utilizarmos terapias combinadas o uso da hidroclorotiazida tem mostrados resultados positivos na redução da PA com baixas doses (Savvatis *et al.*, 2010).

No Brasil, o uso da hidroclorotiazida 25mg e losartana 50mg compõem o elenco de medicamentos gratuitos para hipertensão, do Programa Farmácia Popular do Brasil e Programa "Saúde Não Tem Preço" (MS, 2012), essa escolha esta pautada no fato de não encontrar citações de interação farmacológica entre os diuréticos tiazídicos (hidroclorotiazida) e os BRA (losartan), para controle da hipertensão arterial (Aronson & Dukes, 2006). De acordo com FTN (2010), a hidroclorotiazida deve ser usada com precaução nos casos de: Uso de altas doses do fármaco ou em insuficiência renal (monitorar nível sérico dos eletrólitos), Diabetes insulino dependente (diabetes tipo I), porfiria, hipotensão, lúpus eritematoso sistêmico, gota, hiperaldosteronismo, síndrome nefrótica, Insuficiência renal,- Idosos (usar a menor dose efetiva, especialmente nos que apresentam alterações eletrocardiográficas) e Lactação.

Vários estudos investigaram a utilização de alisquireno e hidroclorotiazida isoladamente e em combinação para o tratamento de hipertensão. Villamil *et al* (2007) investigaram os efeitos de alisquireno e hidroclorotiazida em 2776 pacientes com hipertensão leve e moderada com pressão arterial diastólica de 95-109 mmHg. O alisquireno foi utilizado como monoterapia nas doses de 75, 150 e 300 mg uma vez por dia , hidroclorotiazida nas doses de 6.25, 12.5 e 25 mg , e a sua combinação incluídas todas as doses possíveis. O estudo foi um ensaio controlado, placebo, duplo-cego, randomizado e com duração de oito semanas. Ambos os fármacos reduziu significativamente a PA em comparação com o placebo, e curiosamente, foi observado redução similar da PA em doses comparáveis de aliscireno e hidroclorotiazida. A Combinação dos fármacos foi eficaz na redução tanto da pressão sanguínea diastólica quanto da sistólica. As taxas de resposta também foram maiores com a combinação do aliscireno – hidroclorotiazida. As taxas de aumento da atividade da renina plasmática e hipocalemia observados com a monoterapia hidroclorotiazida foram revertidos pela adição de alisquireno, enquanto

o risco de hipocalcemia nos grupos de associação foi apenas ligeiramente maior do que com o placebo. (Tabela 1)

Tabela 1: Efeitos dos Bloqueadores do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) e agentes anti-hipertensivos comuns sobre os componentes do SRAA (Modificado de Savvatis K *et al.*, 2010).

| Agentes | CRP | ARP | Angiotensinogênio | Ang I | Ang II | Ang 1-7 | Aldosterona |
|--------------------------------------|-----|-----|-------------------|-------|--------|---------|-------------|
| β-Bloqueador | ↓ | ↓ | — | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| Bloqueador Canal de Ca ⁺⁺ | ↑ | ↑ | ↓ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| Diuréticos | ↑ | ↑ | ↓ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| ECAi | ↑ | ↑ | ↓ | ↑ | ↓ | ↑ | ↓ |
| BRA | ↑ | ↑ | ↓ | ↑ | ↑ | ↑ | ↓ |
| Alisquireno | ↑↑ | ↓ | — | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| Alisquireno + HCTZ | ↑↑↑ | ↓ | — | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |

Abreviações: Ang1-7: Angiotensina 1-7, Ang I: Angiotensina I, Ang II: Angiotensina II, ARP:Atividade da Renina Plasmática, BRA: Bloqueadores do Receptor de Angiotensina, CRP: Concentração de Renina Plasmática, ECAi: Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina, HCTZ: Hidroclorotiazida.

1.4.2 L-arginina como Terapia Anti-Hipertensiva

Em adição ao uso de terapias anti-hipertensivas que visam à inibição do SRAA em modelos de hipertensão renovascular vem sendo observado estudos que apontam como promissor o uso de substâncias que potencializam a biodisponibilidade de NO, como uma estratégia vasodilatadora, e até o uso de medicamentos que combatem radicais livres, como as terapias anti-oxidantes.

Sabe-se que a disfunção endotelial leva a uma diminuição da biodisponibilidade do NO (Rajapakse & Mattison, 2009; Anggard, 1994) e que esse é um fator de prognóstico desfavorável em doentes com hipertensão arterial, este fato foi revelado por Perticone *et al*, (2001) os quais mostraram que o risco de acidente cardiovascular foi quatro vezes maior em pacientes que sofrem de disfunção endotelial que aqueles com a função endotelial intacta. Adicionalmente, é conhecido que os elementos mais essenciais que influenciam a diminuição da biodisponibilidade de NO são o inibidor da NOS endógeno - ADMA (dimetilarginina assimétrica) e aumento da produção de O_2^- (Kojda & Harrison, 1999; Cooke, 2000).

Segundo Loscalzo (2004) dentre os mecanismos potenciais pelos quais a L-arginina melhora a função do endotélio estão o aumento dos transportes e o nível intercelular da arginina, o antagonismo competitivo para ADMA, função antioxidante, estimulação da libertação de histamina dos mastócitos, diminuição da atividade da noradrenalina, aumento da secreção de insulina e alterações no pH intercelular, sendo assim, justifica-se o uso da suplementação oral de L-arginina em pacientes com hipertensão arterial.

Estudos prévios em nosso laboratório mostrou que o tratamento precoce com L-arginina previne a hipertensão 2R1C (Abreu *et al.*, 1999). Adicionalmente, Deng *et al*, (1995) demonstraram que a infusão de L-arginina em ratos, causa vasodilatação renal e natriurese, além do aumento resistência do fluxo glomerular, acompanhado por aumento na excreção de nitrito e nitrato, L-citrulina e GMPc. Outros estudos demonstraram que a L-arginina é capaz de aumentar a produção de NO na circulação renal (Ackermann *et al.*, 1998).

Corroborando esses achados, estudos apontam para o tratamento com L-arginina como promissor não somente na redução da hipertensão arterial, mas, sobretudo, na proteção de órgãos-alvo. Gouvea *et al.*, (2002,2004) demonstraram que os animais que receberam L-arginina tiveram uma redução nos níveis hipertensores da ordem de 25 % após sete dias de tratamento. Além do efeito sistêmico sobre a pressão arterial, a L-arginina promoveu diurese e natriurese nos hipertensos tratados, reverteu a hipertrofia cardíaca, aumentou a massa do rim clipado e reduziu significativamente a atividade da ECA no plasma, coração e rim cuja artéria renal recebeu o clipe.

Recentemente, Das S. *et al.* (2014), demonstraram que a administração exógena de L-arginina, reduz a hipertensão mediada pela Ang II em ratos e que a L-arginina atenua a contração vascular mediada pela Ang II, em anéis de aorta, por meio de mecanismos endoteliais dependente de NO.

Portanto, vários mecanismos poderiam justificar as ações do tratamento com L-arginina, um deles seria o aumento na formação de NO vascular e no rim, assim, o aumento na formação de NO pode ser um componente importante na reversão da hipertensão renovascular 2R1C por facilitar a reperfusão renal, cardíaca e promover vasodilatação sistêmica. Por outro lado, a ação diurética observada com a terapia de L-arginina pode também ser um fator determinante na eficácia dessa droga como terapia anti-hipertensiva.

1.5 JUSTIFICATIVA

De acordo com o exposto até o presente momento, a hipertensão renovascular possui fisiopatologia conhecida e bem determinada, além disso, dentre várias estratégias terapêuticas aplicadas no controle desse modelo de hipertensão o mais empregado é o tratamento farmacológico, sendo que os medicamentos mais utilizados e mais efetivos são os bloqueadores do SRAA, ademais, atualmente, alguns estudos apontam como promissor os medicamentos que controlam o stress oxidativo e aumentam biodisponibilidade de óxido nítrico. Assim, o presente estudo testou a hipótese, se o tratamento isolado ou associado de um inibidor de renina

(alisquireno) e a ingestão oral de L-arginina podem prevenir a disfunção endotelial promovida pela hipertensão renovascular.

Ademais, analisar as vias pelo qual ocorrem essas melhoras e se essa nova estratégia farmacológica pode contribuir para que esse se justifique como uma importante alternativa terapêutica contra as alterações cardiovasculares que são geradas nesse modelo de hipertensão. Levando em consideração que apesar desse modelo de hipertensão ser de baixa prevalência ele caracteriza-se como uma hipertensão severa e de difícil controle, além de apresentar prevalência diferenciada na população idosa. Portanto, sabendo que a expectativa de vida hoje é maior, estudos nessa direção visam colaborar para que essa população envelheça com qualidade de vida.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Elucidar os efeitos e mecanismos envolvidos nos tratamentos isolados e associados do alisquireno e L-arginina sobre a pressão arterial, reatividade vascular e a expressão de proteínas envolvidas nessa modulação em segmentos isolados de aorta torácica em ratos com hipertensão renovascular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar o efeito do tratamento isolado e associado da L-arginina e do alisquireno sobre a pressão arterial sistólica de ratos acordados com hipertensão renovascular;
- b) Avaliar a reatividade vascular e a sensibilidade à fenilefrina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio no tratamento com alisquireno e L-arginina sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica de ratos com hipertensão renovascular;
- c) Estudar a participação da via do óxido nítrico, da Angiotensina II local, e das espécies reativas ao oxigênio no tratamento com alisquireno e L-arginina sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica de ratos com hipertensão renovascular;
- d) Verificar a expressão proteica das isoformas endotelial e induzível de óxido nítrico sintase, dos receptores AT₁ e AT₂, de uma enzima do sistema anti-oxidante, Mn SOD2 e da subunidade da NADP(H) oxidase, gp91phox, NOX2 nos grupos experimentais de ratos com hipertensão renovascular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos pesando entre 160 e 180 g, cedidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Tais animais foram mantidos em gaiolas sob condições de controle de temperatura e um ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e à ração.

O uso e cuidado desses animais experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1991). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA – UFES 004/2010).

3.1.1 Modelo experimental

Os ratos foram divididos de forma aleatória em cinco grupos experimentais (n = 7 por grupo), foram estudados: controle normotenso (Sham), Hipertensão dois- rins um-clipe (2K1C), dois- rins um- clipe tratados com alisquireno (ALSK), dois- rins um- clipe tratado com L-arginina (L-arg) e dois- rins um- clipe tratado com a associação de alisquireno + L-arginina (ALSK + L-arg). Todos os tratamentos foram iniciados após sete dias de estabilização do procedimento cirúrgico para produção da hipertensão renovascular (hipertensão 2K1C de Goldblat) e todos os tratamentos tiveram a duração de vinte e um dias consecutivos, totalizando 28 dias de hipertensão renovascular.

Os animais do grupo Sham foram submetidos a todos os procedimentos cirúrgicos, entretanto, não foi implantado clipe de prata na artéria renal. Os animais tratados com alisquireno (Novartis, Italy) receberam diariamente, via *gavage*, 0.3 mL

de alisquireno diluído em água na dose de 50 mg/Kg/dia durante vinte e um dias. O tratamento com L-arginina (Sigma, St. Louis, MO) foi realizado também via *gavage* com 0.1 mL de L-arginina diluída em água diariamente na dose de 10 mg/Kg/dia por vinte e um dias consecutivos. Já o grupo ALSK + L-arg recebeu, via *gavage*, 0.3 mL de alisquireno (50 mg/kg/dia) e 0.1 mL de L-arginina (10 mg/kg/dia) também por vinte e um dias consecutivos.

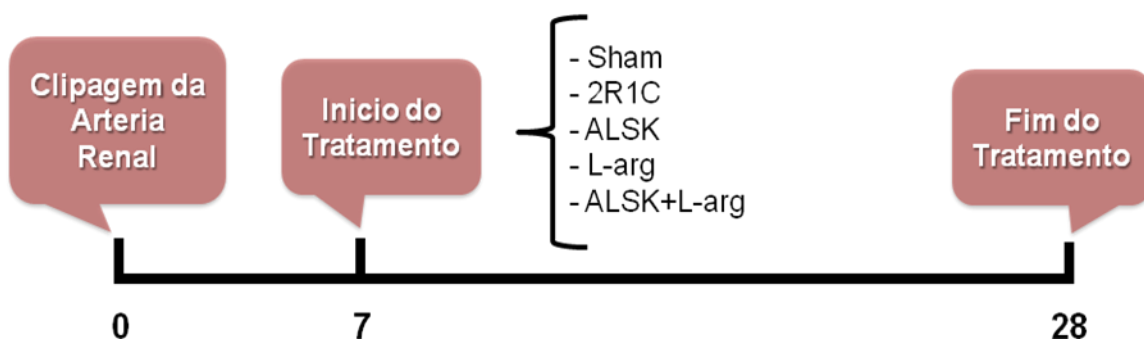


Figura 6: Organograma do protocolo Experimental

3.1.2 Modelo de Hipertensão Renovascular (Hipertensão 2R1C de Goldblat)

Após anestesia combinada com Ketamine (75mg/kg IP) e Xylazine (10mg/kg IP), foi realizada tricotomia, com posterior assepsia com álcool à 70% na região mediana do flanco esquerdo do animal, seguida por uma incisão com exposição do pedúnculo renal. A artéria renal foi isolada da veia renal e posteriormente colocado um clipe de prata na artéria renal esquerda, ajustável ao peso do animal e pré-calibrado com um grau de constrição equivalente ao diâmetro interno de 0,2 mm (Figura 7). Após o procedimento, a incisão foi suturada e o animal foi acondicionado em gaiolas individuais e mantido no biotério da instituição sob observação constante durante 07 dias. Um procedimento simulado, que envolveu toda a cirurgia com exceção da colocação do clipe de prata foi realizada no grupo Sham.



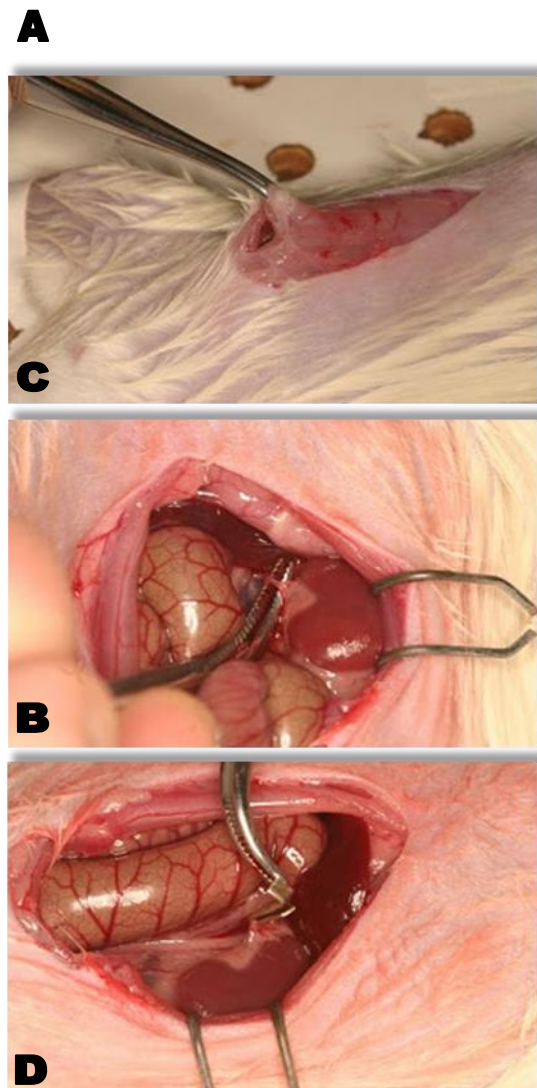


Figura 7: Procedimento de clipagem da artéria renal. (A) Anestesia com Ketamine e Xylazine intraperitoneal (B) Laparotomia com exposição do pedúnculo renal (C) Separação da artéria renal esquerda (D) Inserção do clipe de prata, ajustável ao peso do animal e pré-calibrado com um grau de constrição equivalente ao diâmetro interno de 0,2 mm. (Autoria própria).

3. 2 ANÁLISE DA MEDIDA INDIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

A medida indireta da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada de acordo com Buñag (1973) e modificada segundo Grizzo *et al.* (2008). As medidas foram realizadas nos animais de todos os grupos estudados, no tempo zero (antes do

procedimento cirúrgico para produção da hipertensão renovascular), após sete dias do procedimento cirúrgico e após 21 dias de tratamento (28 de pós operatório), através de um pletismógrafo de cauda (IITC Life Science– 23924 Victory Blvd, Woodland Hills, CA). Os animais foram previamente climatizados, durante três dias antes da mensuração, para adaptarem-se ao pletismógrafo, e desta forma, prevenir alterações pressóricas devido ao estresse do animal frente ao procedimento. A média de três medidas foi utilizada.

3.3. METODOLOGIA EMPREGADA PARA OBTENÇÃO DOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA TORÁCICA

Os animais foram anestesiados com Tiopental sódico (Amental[®]) na dose de 50 mg/kg intraperitoneal e, em seguida, eutanaziados e exanguinados. A aorta torácica descendente foi cuidadosamente removida e imersa rapidamente em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-modificado, composta por (em mM): NaCl 127; KCl 4,7; CaCl₂.2H₂O 2,5; MgSO₄.7H₂O 1,2; KH₂PO₄ 1,17; NaHCO₃ 24; Glicose 11; EDTA 0,01, aerada com mistura carbogênica contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂. Esta solução foi mantida com pH 7,4.

Após a retirada do tecido conectivo e adiposo, a aorta torácica foi dividida em seis segmentos cilíndricos de aproximadamente 3,0 a 4 mm de comprimento (Figura 8).

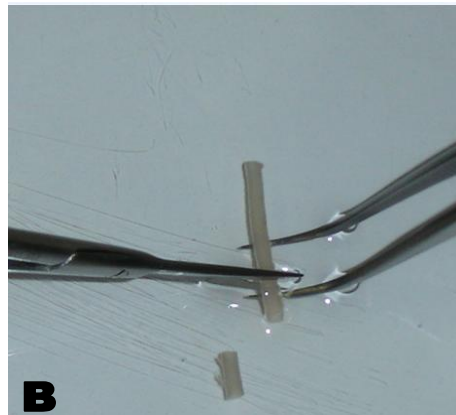


Figura 8: (A) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo; (B) Após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm (Angeli, 2009).

Cada anel vascular foi colocado em cubas contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit aquecida a $36 \pm 0,5$ °C, continuamente gaseificada com mistura carbogênica, mantendo o pH estável em 7,4. Dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulos, foram passados através do lúmen dos segmentos de forma que fiquem paralelos na luz do vaso. Um fio foi fixado à parede do banho e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Assim, qualquer alteração do diâmetro do vaso era captada pelo transdutor de força (TSD 125) conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; Santa Bárbara, CA- USA) e este a um computador (Figura 9).

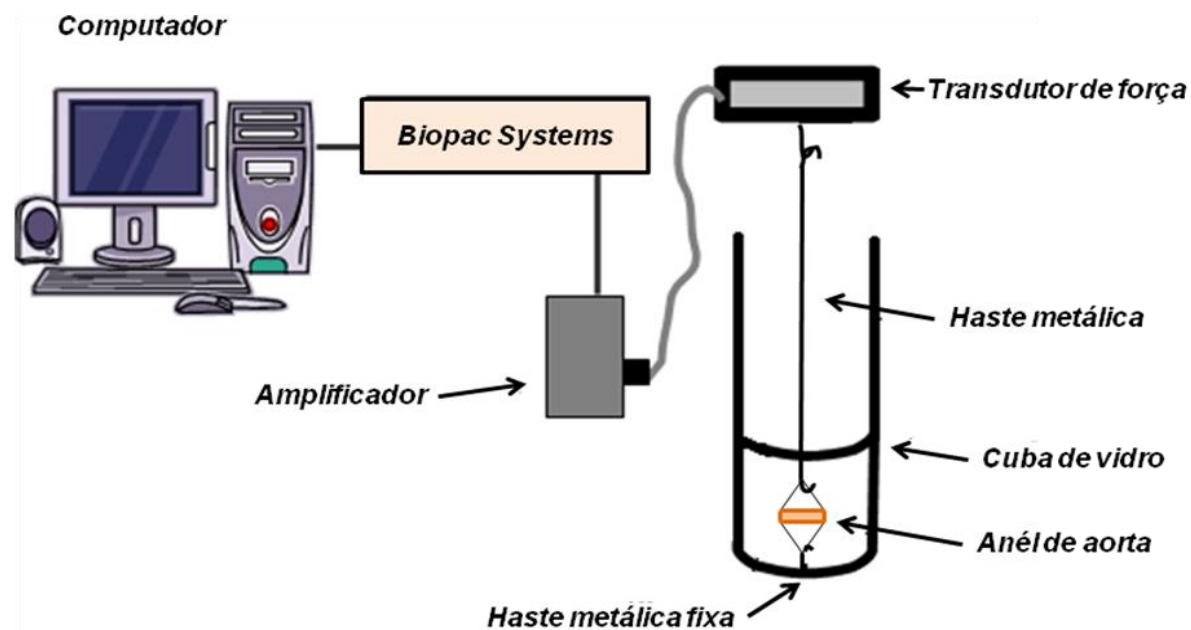


Figura 9: Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular "in vitro". Sistema de aquisição de dados *Biopac Systems*.

Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 1 grama, reajustada, quando necessário, durante 45 minutos de estabilização.

3.3.1 Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio (KCl)

Após o período de 45 minutos de estabilização, foi administrado ao banho KCl 75 mM para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização. Após atingirem uma variação de um grama de força a partir do valor basal, estes anéis eram lavados aproximadamente três vezes com solução de Krebs-Henseleit até retornar a tensão de repouso (Figura 10 B, C). Assim, os anéis que não obtiveram tal contração foram descartados. Após 30 minutos de estabilização (Figura 10 D), uma nova dose de KCl (75 mM) era adicionada ao banho para a aquisição de uma contração máxima do músculo liso vascular, aferida no período de aproximadamente 30 minutos, tempo necessário para atingir um platô no registro da contração (Figura 10 E, F). Após este platô, os anéis foram novamente lavados três vezes para atingir o valor basal (1.0 grama) e, depois de 30 minutos (Figura 10 G, H), esses anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

3.3.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina. Para tal, os anéis de aorta foram pré-contraídos com fenilefrina 10^{-6} M. Uma vez atingido o platô, uma dose única de acetilcolina (10^{-5} M) foi aplicada (Figura 10 I, J, L). Somente para o grupo Sham foi determinado que os anéis que relaxaram menos que 80% do platô seriam descartados. Os anéis sem endotélio relaxaram no máximo 10% ou até contraíram, já para os animais dos demais grupos não foi determinado nenhum valor de referencia uma vez que não se

conhecia o padrão de resposta vascular na hipertensão renovascular e nem nos tratamentos proposto no presente estudo.

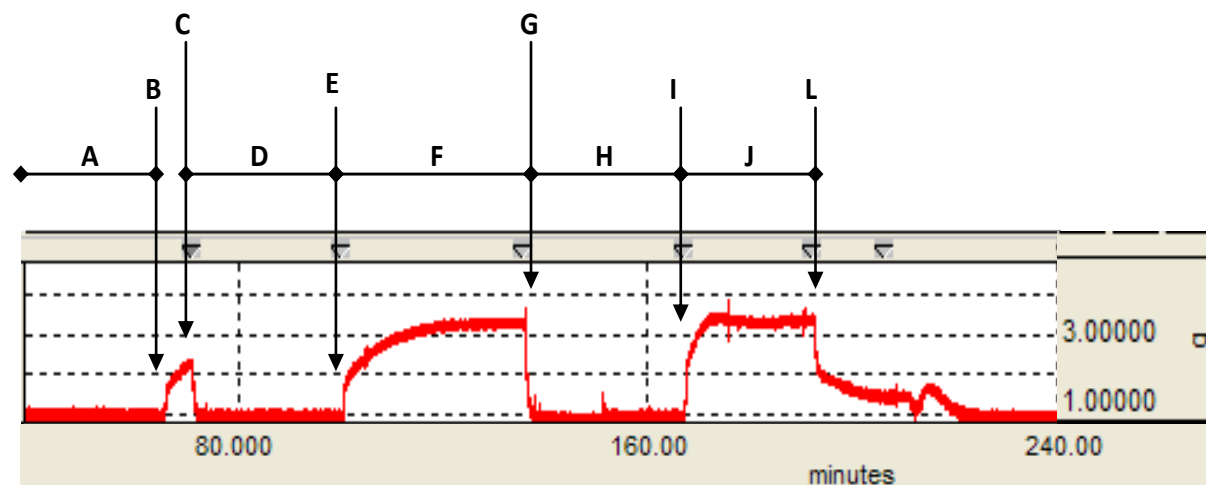


Figura 10: Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0,9 a 1,3 g); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contracção com fenilefrina (Fe) 10^{-6} M; J) Platô da contração induzida pela Fe; L) Adição de acetilcolina (ACh) 10^{-5} M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical.

3.4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.4.1 Efeitos dos tratamentos com Alisquireno e L-arginina sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina nos anéis isolados de aorta de ratos com hipertensão renovascular

Após a avaliação da integridade funcional do endotélio, a solução nutritora do banho foi trocada três vezes para que a tensão basal fosse restabelecida. Após 30 minutos de estabilização e mais 30 minutos de incubação com fármacos, era

realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M) de maneira cumulativa nos dois grupos estudados.

3.4.2 Efeitos dos tratamentos com Alisquireno e L-arginina sobre a modulação do endotélio na resposta vasoconstritora à fenilefrina de ratos com hipertensão renovascular

Com a finalidade de avaliar a capacidade do endotélio em modular a resposta constritora à fenilefrina, foram utilizados nos protocolos experimentais anéis de aorta com endotélio íntegro (E^+) e sem endotélio (E^-). As células endoteliais foram removidas mecanicamente através do uso de fios metálicos. Estes foram inseridos na luz do vaso e friccionados à sua íntima, ocasionando lesão do endotélio. A ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina 10^{-5} M induzir o relaxamento, após a pré-contracção com fenilefrina. A preparação foi lavada e, após 30 minutos de retorno à tensão basal, foram realizadas curvas concentrações-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M).

3.4.3 Efeitos dos tratamentos com Alisquireno e L-arginina na resposta de relaxamento dependente do endotélio de ratos com hipertensão renovascular

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina (ACh). Para tal, os anéis de aorta com endotélio foram pré-contráidos com fenilefrina 10^{-6} M. Uma vez obtido o platô, foram realizadas as curvas concentração-resposta, cumulativas à acetilcolina (10^{-11} a $3 \cdot 10^{-4}$ M).

3.4.4 Efeitos dos tratamentos com Alisquireno e L-arginina na resposta de relaxamento independente do endotélio de ratos com hipertensão renovascular

A avaliação da vasodilatação não mediada pelo endotélio foi analisada através do relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS). Assim como para acetilcolina, os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina 10^{-6} M e, a seguir, foram realizadas curvas concentração-resposta a esse agonista em concentrações de 10^{-11} a $3 \cdot 10^{-4}$ M.

3.4.5 Investigação dos fatores endoteliais envolvidos no tratamento com Alisquireno e L-arginina sobre a resposta à fenilefrina na aorta de ratos com hipertensão renovascular

Todos os protocolos de reatividade vascular, a partir deste momento, foram realizados da mesma forma. Após o teste do endotélio e dos 30 minutos de estabilização da preparação, o fármaco a ser estudado era incubado por trinta minutos, e, logo após, realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M) (Figura 11).

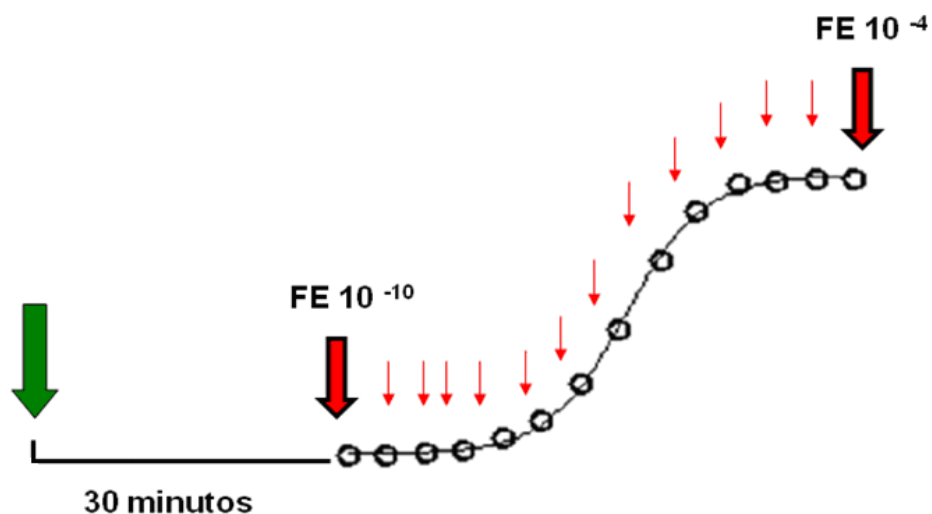


Figura 11: Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE (10^{-10} a 3×10^{-4} M) (Angeli, 2009).

3.4.5.1 Influência do tratamento com Alisquireno e L-arginina de ratos com hipertensão renovascular na via do óxido nítrico

Com a finalidade de estudar a participação do óxido nítrico (NO) na resposta contrátil à fenilefrina, os anéis de aorta foram incubados com um inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o N^G -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 μ M).

3.4.5.2 Envolvimento da Angiotensina II local sobre o tratamento com alisquireno e L-arginina de ratos com hipertensão renovascular sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica

Buscando averiguar a participação da via da angiotensina II local sobre o tratamento com alisquireno e L-arginina de ratos com hipertensão renovascular na reatividade vascular à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M), foi utilizado o enalapril (10 μ M), um inibidor da enzima conversora da angiotensina (ECA).

Em seguida, mediante outro protocolo, foi avaliada a participação da ativação dos receptores AT_1 pela angiotensina II através do bloqueio farmacológico destes receptores com o losartan (10 μ M).

3.4.5.3 Envolvimento de radicais livres no tratamento com Alisquireno e L-arginina de ratos com hipertensão renovascular sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica

Para verificar o envolvimento de EROs sobre o tratamento com Alisquireno e L-arginina de ratos com hipertensão renovascular na resposta contrátil à fenilefrina foram utilizados: a apocinina (Apo, 100 μM), um inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase, ou seja, inibe uma das principais enzimas formadoras de radicais livres e a superóxido dismutase (SOD, 150 U ml^{-1}), é um importante anti-oxidante fisiológico que converte ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

3.5 ESTUDOS DA EXPRESSÃO PROTÉICA

3.5.1 Western Blot para detecção da eNOS, iNOS, receptor AT_1 e AT_2 , SOD-2 e gp91phox em aorta de ratos

A técnica de Western Blot foi utilizada para determinar a influência do tratamento com alisquireno e L-arginina de ratos com hipertensão renovascular sobre a expressão proteica da isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS), isoforma induzível de óxido nítrico (iNOS), dos receptores AT_1 e AT_2 , assim como na enzima, superóxido dismutase 2 (Mn SOD2) e a subunidade da NADPH oxidase, gp91phox, NOX2, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Sham, 2R1C, 2R1C tratado com alisquireno, 2R1C tratado com L-arginina e 2R1C tratado com a associação de alisquireno e L-arginina. A expressão proteica de todas as proteínas foi realizada em condições basais.

3.5.2 Preparação dos tecidos e quantificação de proteínas

As amostras foram preparadas utilizando segmentos de aorta torácica de todos os grupos. Os anéis da aorta foram mantidas a -80°C até o momento da extração proteica, que foi realizada em 200 μL de tampão de lise (10mM Tris – HCl pH 7,4, 1mM NaVO_3 , 1% SDS, 0,5mM DTT, 5 mM EDTA, 1mM PMSF), ao qual se adicionou 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ coquetel inibidor de proteases. A homogeneização foi realizada com auxílio de sonicador ultra-sônico, sendo seguida de centrifugação a 6000 rpm,

4°C por 15 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos, aliquotados e armazenados a -80 °C. Este extrato total foi utilizado para avaliação da expressão de eNOS, iNOS, receptores AT₁ e AT₂, SOD-2 e NADPH oxidase (gp91phox).

A determinação do conteúdo de proteína total, nos anéis de aorta foi feita utilizando-se o método de Lowry (Lowry, 1951). Preparou-se o reagente A (48:1:1 – carbonato de sódio 3% com 0,1 M de NaOH, tartarato de sódio/potássio 4% e sulfato de cobre 2%, respectivamente) e o reagente B (reagente de Folin-fenol Ciocalteu – 1:3 em água). A solução padrão foi obtida a partir de diluições de albumina bovina (BSA) em água destilada com concentração estoque final de 1mg/mL. Essa solução foi diluída para a obtenção da curva padrão, em que as diluições continham de 5 a 80 µg de proteína. Alíquotas dos sobrenadantes dos homogenatos dos tecidos (5 µL) foram utilizadas para as dosagens. Todos os tubos de ensaio foram completados para um volume final de 250 µL, sendo posteriormente adicionados 2,5 mL da solução A. Após 10 minutos, se adicionou 0,25 mL da solução B. A absorbância foi medida a 660 nm depois de 10 minutos. Todas as dosagens foram feitas em duplicata.

Posteriormente, foi calculado o volume necessário para uma carga de 50 µg de proteína, sendo este volume de amostra misturada, em partes iguais, com tampão de homogeneização. Alíquotas do homogeneizados foram diluídas em solução de Laemmli 2X (0,5 mM de uréia, 0,17 mM de SDS, 39 µM de ditiodiol, 0,01 M de Tris e azul de bromofenol 0,5%). As amostras depois de preparadas eram aquecidas a 95°C durante 4 minutos.

3.5.3 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)

As amostras foram carregadas em géis de SDS-poliacrilamida 7,5% e 10% para eNOS, iNOS, receptor AT₁ e AT₂, SOD-2 e NADPH oxidase (gp91phox) (1,5 M Tris Hcl pH: 8,8, acrilamida 40%, glicerol 100%, SDS 10%, APS 10% e Temed) previamente imersos em um tampão para eletroforese (25mM de Tris HCl, 190 mM de glicina e 0,1% de SDS). Antes da sua aplicação no gel as amostras foram aquecidas a 100 °C durante 5 min. A eletroforese foi conduzida com o tampão (25

mM de tris-HCl pH 8,3, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS), a 80 volts por aproximadamente 2 horas e 30 minutos (PowerPac™ HC, BioRad, Singapura). Os procedimentos relativos a eletroforese foram realizados segundo o sistema descrito por Laemmli (1970).

3.5.4 Transferência das proteínas

Depois de separadas, as proteínas das amostras para avaliar a expressão da eNOS, iNOS foram transferidas para uma membrana de PVDF utilizando um sistema de transferência (Biorad, Trans-Blot SD), com tampão de transferência constituído de 25 mM de tris-HCl pH 8,3, 192 mM de glicina e 20% (v/v) de metanol, por 55 minutos a 10 volts. A transferência das proteínas para análise do receptor de AT₁ e AT₂, Mn SOD2 e gp91phox foi realizada em cuba molhada (Biorad), por 2:00 hs, 60 volts a 4°C.

3.5.5 Incubação dos anticorpos

Após a transferência, as membranas de PVDF foram incubadas por 2:30 horas em uma solução constituída de leite em pó desnatado (5%) em tampão TBS-tween 0,1% (20 mM de tris-HCl pH 7,4 e 150 mM de NaCl), à temperatura ambiente sob agitação leve, para evitar ligações inespecíficas com reativos não imunológicos. Em seguida, As membranas foram incubadas por 4 horas a temperatura ambiente, sob agitação, em TBS-T adicionado mais os seguintes anticorpos primários: eNOS (1:2500, BD Transduction Laboratories, Lexington, UK), iNOS (1:2000, BD Transduction Laboratories, Lexington, UK), AT₁ (1:1000, Millipore, Billerica, MA, EUA), AT₂ (1:500, Millipore, Billerica, MA, EUA), gp91phox (1:2000, BD Biosciences), Mn SOD 2 (1: 1000, Santa Cruz Biotechnology, California, EUA) e para β -actina (1:1500, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Após este período, as membranas foram lavadas em tampão TBS-tween 0,1%, sob agitação leve em temperatura ambiente e incubadas com o anticorpo secundário (IgG, anti-mouse conjugado para fosfatase alcalina - 1:3000, Abcam Inc. e IgG, anti-Rabbit conjugado para fosfatase

alcalina – 1:7000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) por 1:30 hora, à temperatura ambiente, sob agitação suave, seguida de lavagem com tampão TBS-tween 0,1%, e posteriormente com tampão TBS.

A detecção da ligação proteína-anticorpo foi realizada utilizando-se o Kit comercial NBT/BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate nitroblue tetrazolium (NBT)/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) – Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. As membranas tiveram suas imagens digitalizadas e tratadas utilizando o programa ImageJ (*domínio público*). Em cada ensaio experimental fez-se a normalização em relação ao controle (β -actina), com vista a diminuir os possíveis erros associados às variações nas concentrações das proteínas. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

3.6 EXPRESSÕES DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os valores de N significam o número de animais utilizados em cada grupo experimental.

As respostas contráteis ao KCl e à fenilefrina foram expressadas como tensão desenvolvida pelo anel de aorta, em gramas de contração. As respostas de relaxamento dependente e independente do endotélio, evocadas pela acetilcolina e nitroprussiato de sódio, respectivamente, foram expressas em porcentagem de relaxamento em relação à pré-contração obtida pela fenilefrina.

Para a determinação dos valores de resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e pD_2 ($-\log EC_{50}$, que corresponde ao valor da concentração de fenilefrina que produz 50% da resposta máxima), em resposta aos diferentes agonistas utilizados, foi realizada uma análise de regressão não-linear, obtida através da análise das curvas concentração-resposta utilizando-se Graph Prism Software (San Diego, CA, USA).

Com a finalidade de comparar a magnitude de efeito dos fármacos sobre a resposta contrátil à fenilefrina dos grupos estudados, alguns resultados foram expressos como diferenças das áreas abaixo das curvas (dAUC) de concentração-

resposta à fenilefrina. A dAUC foi calculada para cada curva concentração-resposta e a diferença está expressa como porcentagem da diferença da AUC (dAUC%) da curva controle correspondente. Para análise estatística dos resultados foi realizada teste *t* de *Student* não-pareado, análise de variância (ANOVA), de duas vias para medidas repetidas ou completamente randomizada. Quando ANOVA apresentava significância estatística era realizado o *pos-hoc* de Tukey utilizando-se Graph Prism Software (San Diego, CA, USA). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$.

Os resultados da expressão protéica da eNOS, iNOs, receptor AT₁ e AT₂, SOD e GP91PHOX estão expressos como relação entre a densidade óptica para estas proteínas em relação a β -actina. As medias foram analisadas através da análise de variância (ANOVA) de uma via. Quando ANOVA apresentava significância estatística era realizado o *pos-hoc* de Fisher utilizando-se Graph Prism Software (San Diego, CA, USA). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1. EFEITOS DOS TRATAMENTOS COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS) DE RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR.

Em todos os grupos experimentais a PAS foi avaliada no tempo 0 (antes de realizar a implantação do clipe na artéria renal), sete dias após o procedimento cirúrgico para produção da hipertensão renovascular a pressão foi novamente aferida a fim de determinar o sucesso do procedimento, nesse momentos os animais que apresentavam PAS menor que 160 mmHg eram excluídos e os animais que apresentavam valores iguais ou superior a 160 mmHg eram randomizados para iniciar o tratamento com os fármacos avaliados nesse estudo, exceto para o grupo Sham. Vinte e oito dias após o procedimento cirúrgico a PAS foi novamente aferida para determinar a ação dos fármacos sobre a hipertensão renovascular. No tempo 0, os animais apresentavam valores pressóricos semelhantes (Sham: 112.2 ± 1.01 mmHg, n = 7; 2K1C: 120.4 ± 2.11 mmHg, n = 7; ALSK: 124.6 ± 1.20 mmHg, n = 8; L-arg: 115.6 ± 3.3 mmHg, n=8 and ALSK+L-arg: 118.8 ± 2.70 mmHg, n=8; $p > 0,05$). No sétimo dia após a cirurgia de implantação do clipe todos os grupos experimentais, exceto o grupo Sham, demonstraram elevação da PAS (2K1C: 204 ± 12.7 mmHg, n = 7; ALSK: 217.8 ± 10.2 mmHg, n = 7; L-arg: 197.5 ± 8.9 mmHg, n = 8; ALSK+L-arg: 197.1 ± 6.08 mmHg, n = 8 vs. Sham: 119.2 ± 2.51 , $p < 0,05$) Ao final do tratamento somente o grupo tratado com alisquireno associado a L-arginina foi capaz de reduzir a PAS comparado aos grupos 2R1C e ALSK (2R1C: 204 ± 12.7 mmHg, n=6, ALSK: 202.4 ± 17.7 mmHg, n=7 vs ALSK+L-arg: 138.4 ± 4.37 mmHg, n = 8) e os grupos 2R1C, ALSK e L-arg mantiveram a PAS elevada comparada ao grupo Sham (2R1C: 204 ± 12.7 mmHg, n=6, ALSK: 202.4 ± 17.7 mmHg, n=7, L-arg: 175.6 ± 9.14 mmHg, n=7 vs Sham: 114.4 ± 5.2 mmHg, n=7) ANOVA (uma via), * $p < 0,05$ vs Sham, + $p < 0,05$ vs ALSK+L-arg) (Figura 12).

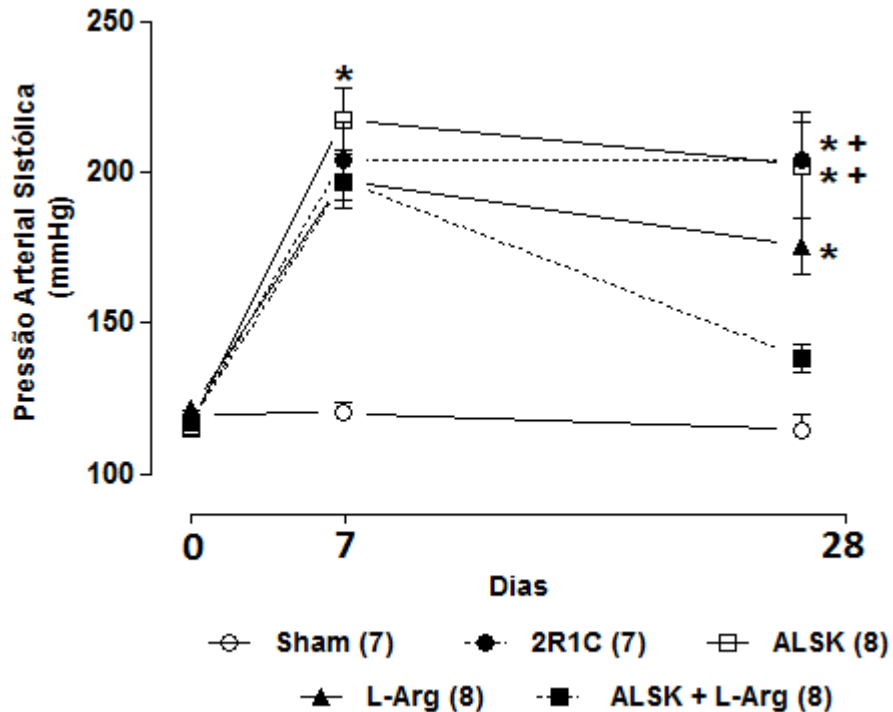


Figura 12: Análise dos valores de pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) medidos por meio de da pletismografia de cauda em ratos dos grupos Sham, 2R1C, ALSK, L-arg e ALSK+L-arg, no tempo 0 (antes da cirurgia), 7 dias após a cirurgia e 28 dias após o procedimento. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA (uma vias), * $p < 0,05$ vs Sham, + $p < 0,05$ vs ALSK+L-arg.

4.2 RESPOSTAS VASCULARES AO CLORETO DE POTÁSSIO (KCl) EM ARTÉRIA AORTA

A exposição dos segmentos arteriais ao KCl (75 mM) promoveu resposta contrátil com magnitude semelhante em todos os grupos experimentais. A retirada mecânica do endotélio não mudou de forma significativa a resposta contrátil ao KCl, e assim como nos segmentos com endotélio íntegro a resposta ao KCl nos anéis sem endotélio foi semelhante entre os grupos experimentais.

O número de animais mostrados nas tabelas 2 e 3 representam o n total dos animais utilizados em todos os protocolos experimentais submetidos à resposta contrátil ao cloreto de Potássio (KCl).

Tabela 1: Valores de resposta contrátil ao Cloreto de Potássio (KCl) em anéis isolados de aorta, com endotélio de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: Sham (Sham E+), dois rins um clipe (2R1C E+), tratado com alisquireno (ALSK E+), tratado com L-argiina (L-arg E+) e tratado com Alisquireno + L-arginina (ALSK+L-arg E+)

| Contração (g) KCl (75 mM) | |
|----------------------------|---------------------|
| Sham E+ | 2,83 ± 0,06 (n= 34) |
| 2R1C E+ | 2,84 ± 0,11 (n= 41) |
| ALSK E+ | 2,70 ± 0,07 (n= 57) |
| L-arg E+ | 2,52 ± 0,05 (n= 48) |
| ALSK + L-arg E+ | 2,45 ± 0,07 (n= 49) |

Valores expressos em média e EPM; ANOVA (uma via). p >0,05.

Tabela 2: Valores de resposta contrátil ao Cloreto de Potássio (KCl) em anéis isolados de aorta desnudos de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: Sham (Sham E⁻), dois rins um clipe (2R1C E⁻), tratado com alisquireno (ALSK E⁻), tratado com L-arginina (L-arg E⁻) e tratado com Alisquireno + L-arginina (ALSK+L-arg E⁻)

| Contração (g) KCl (75 mM) | |
|----------------------------|---------------------|
| Sham E- | 2,88 ± 0,11 (n= 7) |
| 2R1C E- | 2,87 ± 0,32 (n= 7) |
| ALSK E- | 2,38 ± 0,18 (n= 10) |
| L-arg E- | 2,75 ± 0,32 (n= 8) |
| ALSK + L-arg E- | 2,42 ± 0,21 (n= 9) |

Valores expressos em média e EPM; ANOVA (uma via). p >0,05.

4.3 EFEITOS DOS TRATAMENTOS COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR.

A fenilefrina (agonista α_1 adrenérgico) promoveu resposta vasoconstritora concentração-dependente nos anéis de aorta de animais dos grupos estudados (Figura 13). A avaliação das concentrações entre os diferentes grupos demonstrou que o grupo 2R1C apresentou uma hipercontratilidade comparado aos demais grupos (Sham, ALSK, L-arg e ALSK+L-arg). No entanto, a resposta máxima foi menor nos segmentos arteriais dos animais dos grupos Sham, L-arg e ALSK +L-arg comparados ao grupo 2K1C (Tabela 4). A avaliação da sensibilidade (pD_2) demonstrou um aumento significativo nos grupos L-arg e ALSK+L-arg comparados ao grupo Sham (Tabela 4). A resposta à fenilefrina foi expressa em porcentagem da contração máxima induzida pelo KCl.

Tabela 3: Valores de resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, g) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração - resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas intactos de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: Sham (Sham E+), dois rins um clipe (2R1C E+), tratado com alisquireno (ALSK E+), tratado com L-arginina (L-arg E+) e tratado com Alisquireno + L-arginina (ALSK+L-arg E+).

| | $R_{m\acute{a}x}$ (%) | pD_2 |
|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| Sham E ⁺ | 92,4 ± 4,4 | 6,77 ± 0,35 ^{††} |
| 2R1C E ⁺ | 148,1 ± 15,6 ^{*††} | 7,25 ± 0,14 |
| ALSK E ⁺ | 112,3 ± 7,4 | 7,74 ± 0,21 |
| L-arg E ⁺ | 106,6 ± 8,8 | 8,20 ± 0,24 |
| ALSK+L-arg E ⁺ | 84,3 ± 7,6 | 8,28 ± 0,37 |

Valores expressos em média \pm EPM; ANOVA (uma via, seguido por Tukey). * $p < 0,05$ vs Sham, # $p < 0,05$ vs ALSK, ‡ $p < 0,05$ vs L-arg e + $p < 0,05$ vs ALSK+L-arg; Rmáx: 2R1C E⁺ vs Sham E⁺, L-arg E⁺ e ALSK+L-arg E⁺, e ALSK E⁺ vs Sham E⁺ e ALSK+L-arg E⁺; pD₂: Sham E⁺ vs ALSK E⁺, L-arg E⁺ e ALSK+L-arg E⁺ e 2R1C E⁺ vs L-arg E⁺ e ALSK+L-arg E⁺.

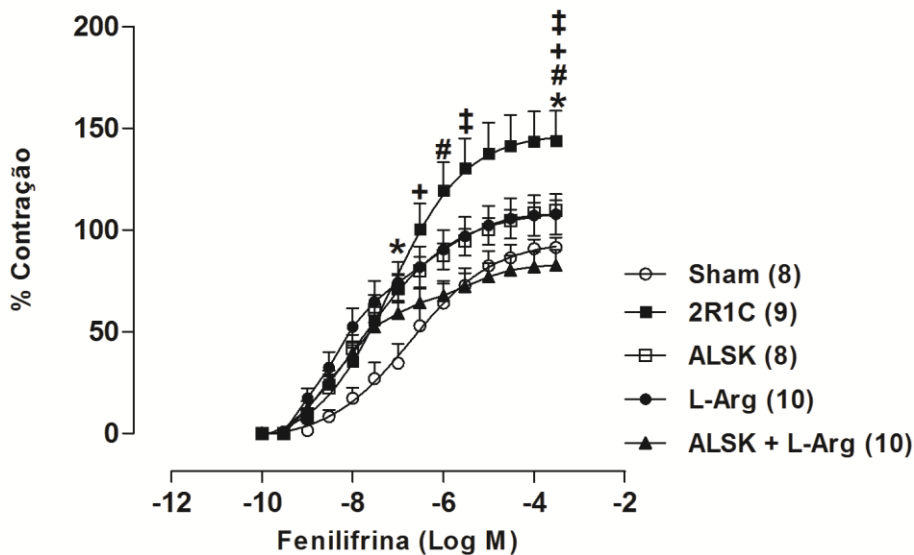


Figura 13: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar nos grupos Sham (Sham E⁺), dois rins um clipe (2R1C E⁺), tratados com alisquireno (ALSK E⁺), tratados com L-arginina (L-arg E⁺) e tratados com alisquireno + L-arginina (ALSK+L-arg E⁺). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; ANOVA (duas vias) seguido de Tukey. * $p < 0,05$ vs Sham; # $p < 0,05$ vs ALSK; ‡ $p < 0,05$ vs. L-arg; + $p < 0,05$ vs. ALSK+L-arg.

4.4 MODULAÇÃO ENDOTELIAL DO TRATAMENTO COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE A REATIVIDADE À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR.

A remoção mecânica do endotélio não alterou a resposta máxima e nem a sensibilidade entre os grupos estudados (Tabela 5). Por outro lado, a avaliação da curva concentração resposta a fenilefrina de anéis com o endotélio removido demonstrou uma aumento da resposta contrátil em todos os grupos estudados (Figura 14). A resposta à fenilefrina foi expressa em porcentagem da contração máxima induzida pelo KCl.

Tabela 4: Valores de resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, g) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração- resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas sem endotélio de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: Sham (Sham E⁻), dois rins um clipe (2R1C E⁻), tratado com alisquireno (ALSK E⁻), tratado com L-arginina (L-arg E⁻) e tratado com Alisquireno + L-arginina (ALSK+L-arg E⁻)

| | $R_{m\acute{a}x}$ (%) | pD_2 |
|-----------------------------|-----------------------|-------------|
| Sham E ⁻ | 130, 3 ± 3,66 | 7,93 ± 0,20 |
| 2R1C E ⁻ | 166,4 ± 7,59 | 8,90 ± 0,32 |
| ALSK E ⁻ | 136,7 ± 12,9 | 8,23 ± 0,20 |
| L-arg E ⁻ | 161,8 ± 10,5 | 8,60 ± 0,20 |
| ALSK + L-arg E ⁻ | 162,4 ± 13,9 | 8,13 ± 0,43 |

Valores expressos em média ± EPM; ANOVA (uma via seguido por Tukey).

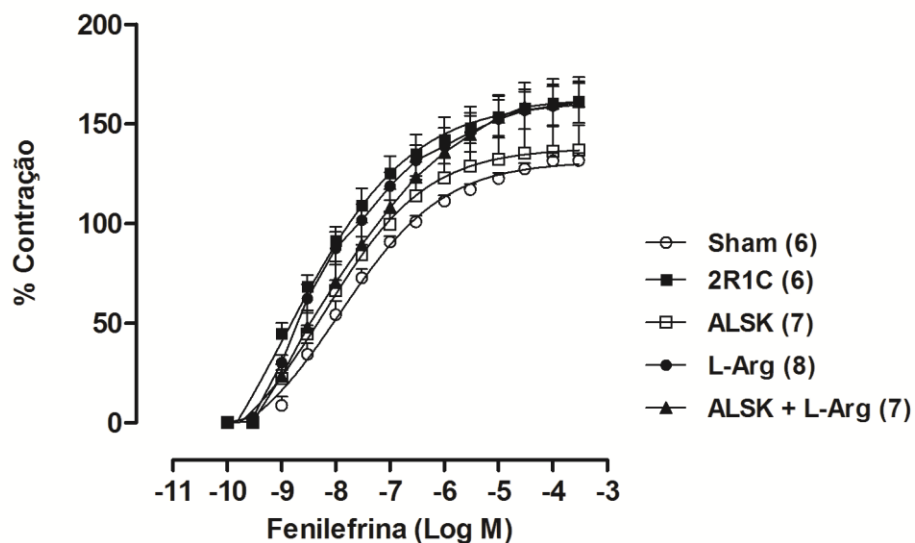


Figura 14: Efeito da remoção do endotélio (E⁻) na curva concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos Sham (Sham E⁻), dois rins um clipe (2R1C E⁻), tratado com alisquireno (ALSK E⁻), tratado com L-arginina (L-arg E⁻) e tratado com Alisquireno + L-arginina (ALSK+L-arg E⁻). O número de animais está demonstrado entre parênteses.

Adicionalmente, a avaliação da resposta máxima a remoção do endotélio (E-) quando comparado ao anel com o endotélio pérvio (E+) apresentou um aumento da R_{máx} nos grupos Sham, L-arg e ALSK +L-arg comparado a seus respectivos controles E+. Já a sensibilidade apresentou-se elevada, quando o endotélio foi removido, somente nos grupos Sham e 2R1C comparado com seus respectivos controles E+. (Tabela 6). Adicionalmente, a avaliação da curva concentração resposta a fenilefrina na condição controle (E+) e ao remover o endotélio nos anéis isolados de aorta dos grupos experimentais Sham (Figura 15 A), 2R1C (Figura 15 B), ALSK (Figura 15 C), L-arg (Figura 15 D) e ALSK + L-arg (Figura 15 E) desviou a curva para esquerda.

A análise da diferença percentual abaixo da curva (% dAUC) mostrou que a modulação endotelial na resposta contrátil à fenilefrina em ratos com hipertensão renovascular tratados com alisquireno e L-arginina é significativamente maior no grupo tratado com alisquireno associado a L-arginina quando comparado aos grupos 2R1C e tratado com alisquireno (ALSK) (%dAUC – ALSK+L-arg: 127,3 ± 38,3 vs 2R1C: 36,3 ± 11,5 e ALSK: 39,8 ± 9,5) (Figura 15 F).

Tabela 5: Valores de resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração- resposta à fenilefrina em anéis (intactos e desnudos) de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos diferentes grupos estudados.

| | R _{máx} (%) | pD ₂ |
|----------------------|----------------------|-----------------|
| Sham E ⁺ | 92,4 ± 4,4 | 6,77 ± 0,35 |
| Sham E ⁻ | 130,3 ± 3,6 † | 7,93 ± 0,20 † |
| 2R1C E ⁺ | 148,1 ± 15,6 | 7,25 ± 0,14 |
| 2R1C E ⁻ | 166,4 ± 7,59 | 8,90 ± 0,32 † |
| ALSK E ⁺ | 112,3 ± 7,4 | 7,74 ± 0,21 |
| ALSK E ⁻ | 136,7 ± 12,9 | 8,23 ± 0,20 |
| L-arg E ⁺ | 106,6 ± 8,8 | 8,20 ± 0,24 |

| | | |
|-----------------------------|----------------|-------------|
| L-arg E ⁻ | 161,8 ± 10,5 † | 8,60 ± 0,20 |
| ALSK + L-arg E ⁺ | 84,3 ± 7,6 | 8,28 ± 0,37 |
| ALSK+L-arg E ⁻ | 162,4 ± 13,9 + | 8,13 ± 0,43 |

Valores expressos em média ± EPM; Teste *t* não-pareado. † *p*<0,05; R_{máx} e pD₂: E⁻ vs E⁺.

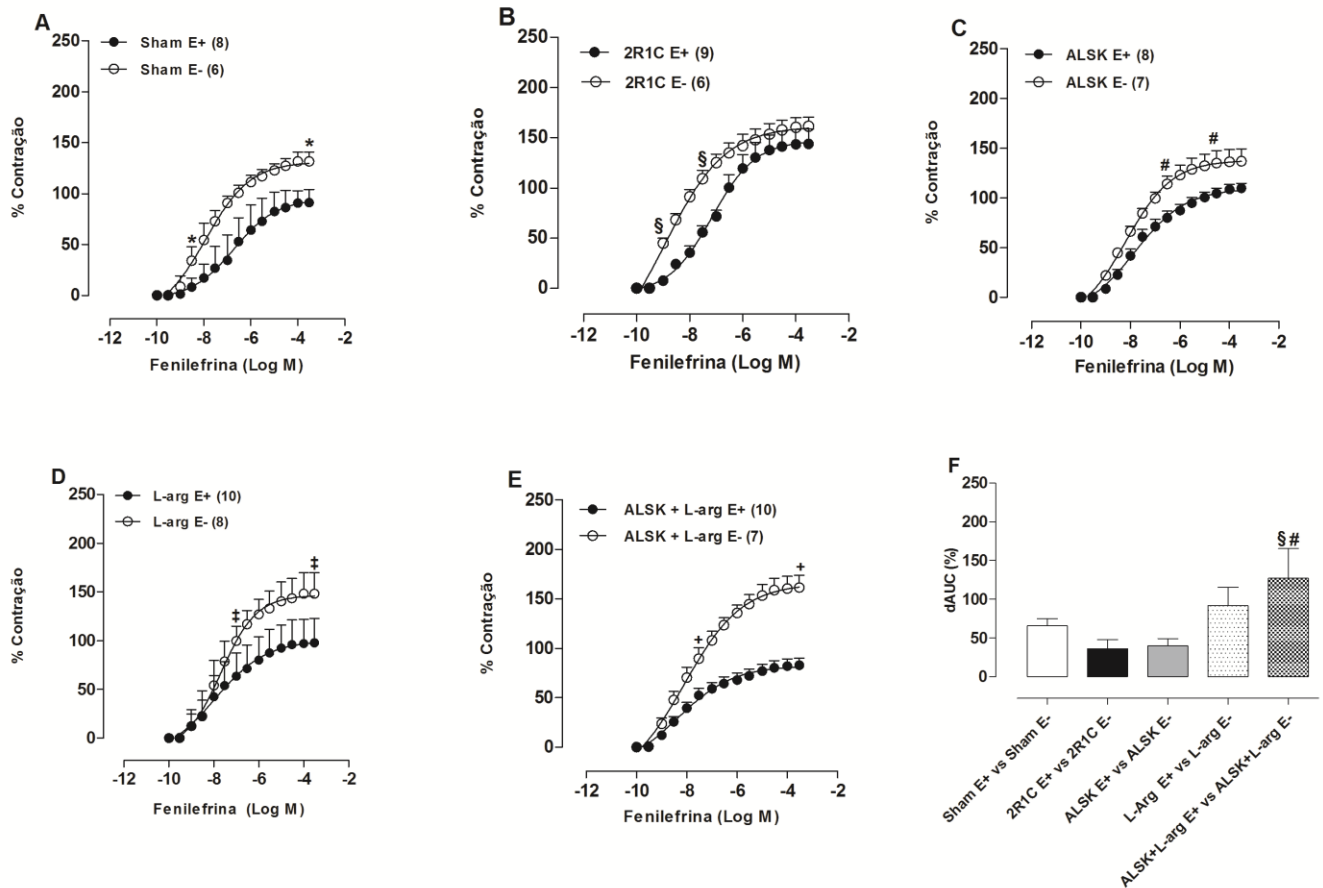


Figura 15: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (A) Sham (Sham E⁺) e após a retirada do endotélio (Sham E⁻); (B) dois rins um clipe (2K1C E⁺) e após a retirada do endotélio (2K1C E⁻); (C) tratado com alisquireno (ALSK E⁺) e após a retirada do endotélio (ALSK E⁻); (D) tratado com L-arginina (L-arg E⁺) e após a retirada do endotélio (L-arg E⁻); (E) tratado com alisquireno associado a L-arginina (ALSK+L-arg E⁺) e após a retirada do endotélio (ALSK+L-arg E⁻); (F) Diferença percentual da área abaixo da curva em vasos com endotélio intacto e desnudo entre os grupos. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; ANOVA (uma e duas vias) seguido de Tukey. **p*<0,05 Sham E⁺ vs Sham E⁻; § *p*<0,05 2R1C E⁺ vs 2R1C E⁻; #*p*<0,05 ALSK E⁺ vs ALSK E⁻; ‡ *p*<0,05 L-arg E⁺ vs L-arg E⁻ e + *p*<0,05 ALSK + L-arg E⁺ vs ALSK + L-arg E⁻.

4.5 EFEITO DO TRATAMENTO COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO DE AORTA DE RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR.

A avaliação da resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) foi significativamente menor nos segmentos arteriais dos animais do grupo 2R1C e ALSK comparado aos grupos Sham e ALSK+L-arg respectivamente (Tabela 7). Já a avaliação da sensibilidade (pD_2) demonstrou um aumento significativo no grupo ALSK+L-arg comparado ao grupo 2R1C (Tabela 7). Ao avaliarmos a curva concentração resposta a Ach, o relaxamento mediado pelo endotélio, como esperado, apresentou um relaxamento concentração resposta em todos os anéis isolados de aorta, entretanto, os grupos 2R1C, ALSK e L-arg apresentaram um prejuízo no relaxamento dependente do endotélio comparado ao grupo Sham (Figura 16).

Tabela 6: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) induzidas pela acetilcolina em anéis isolados de aorta intactos de animais de ratos com hipertensão renovascular dos diferentes grupos estudados. A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contracção com à fenilefrina.

| | $R_{m\acute{a}x}$ (%) | pD_2 |
|----------------|-----------------------|-------------|
| ACh Sham | 95,6 ± 2,2 | 7,7 ± 0,2 |
| ACh 2K1C | 79,7 ± 3,7 *+ | 6,7 ± 0,7 |
| ACh ALSK | 76,1 ± 7,7 *+ | 8,1 ± 0,9 |
| ACh L-arg | 90,8 ± 5,4 | 7,1 ± 0,3 |
| ACh ALSK+L-arg | 96,8 ± 4,8 | 8,2 ± 0,6 § |

Valores expressos em média ± EPM; ANOVA (uma via seguido por tukey). * $p < 0,05$ vs Sham, + $p < 0,05$ vs ALSK+L-arg, § $p < 0,05$ vs 2R1C. $R_{m\acute{a}x}$: ACh 2K1C vs ACh Sham e ACh ALSK+L-arg; ACh ALSK vs ACh Sham e ACh ALSK+L-arg; pD_2 : ACh ALSK+L-arg vs 2R1C.

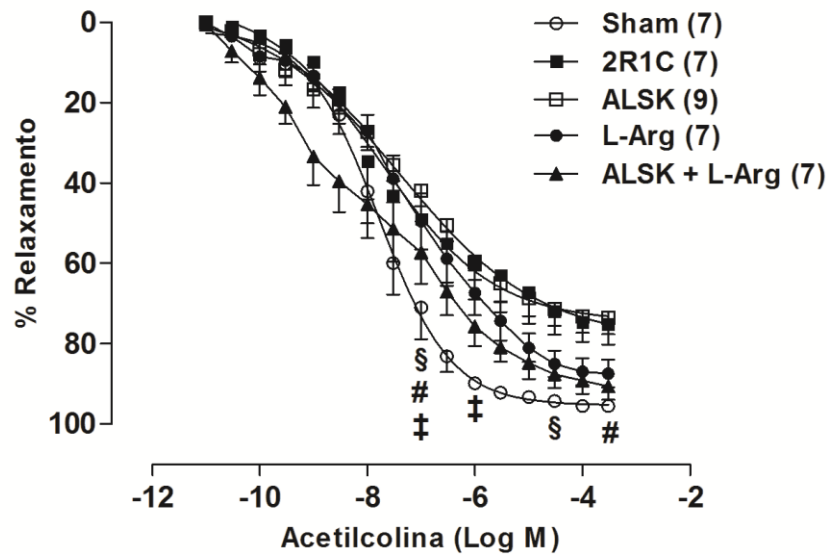


Figura 16: Curvas concentração-resposta à acetilcolina para a avaliação do relaxamento dependente do endotélio em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos Sham (Sham), dois rins um clipe (2R1C), tratado com alisquireno (ALSK), tratado com L-arginina (L-arg) e tratado com alisquireno + L-arginina (ALSK+L-arg). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. ANOVA (duas vias) seguido por Tukey. § $p < 0,05$ vs. 2K1C; # $p < 0,05$ vs. ALSK; ‡ $p < 0,05$ vs. L-arg.

4.6 EFEITO DO TRATAMENTO COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE O RELAXAMENTO INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO DE AORTA DE RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR.

O relaxamento independente do endotélio foi avaliado através do efeito induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS). A avaliação da resposta máxima ($R_{máx}$) não apresentou diferenças significativas entre os diferentes grupos estudados, já a avaliação da sensibilidade (pD_2) demonstrou uma redução significativa nos grupos L-arg e ALSK+L-arg comparado ao grupo Sham (Tabela 8). A análise da curva concentração resposta ao NPS não foi diferente nos grupos estudados (Figura 17).

Tabela 7: Resposta máxima ($R_{máx}$) e sensibilidade (pD_2) induzidas pelo nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis isolados de aorta intactos de animais de ratos com hipertensão renovascular dos diferentes grupos estudados. A resposta

máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contração com à fenilefrina.

| | R _{máx} (%) | pD ₂ |
|----------------|----------------------|-----------------|
| NPS Sham | 102,4 ± 3,03 | 9,01 ± 0,24 ‡ |
| NPS 2R1C | 94,6 ± 1,33 | 8,16 ± 0,31 |
| NPS ALSK | 99,8 ± 3,89 | 8,38 ± 0,26 |
| NPS L-arg | 104,3 ± 2,10 | 7,64 ± 0,28 |
| NPS ALSK+L-arg | 104,4 ± 2,52 | 7,87 ± 0,23 |

Valores expressos em média ± EPM; ANOVA (uma via seguido por Tukey). ‡ p<0,05 vs L-arg; + p<0,05 vs ALSK+L-arg.

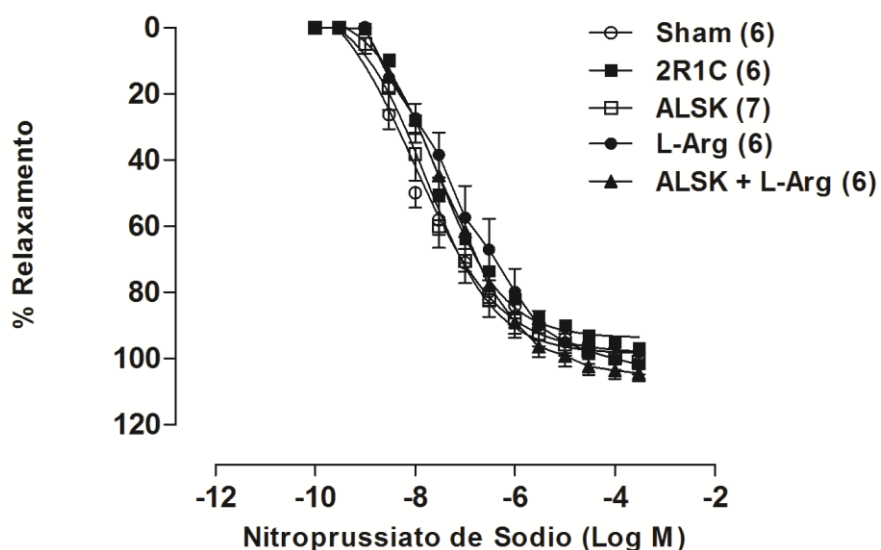


Figura 17: Curvas concentração-resposta ao NPS para a avaliação do relaxamento independente do endotélio em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos Sham (Sham), dois rins um clipe (2R1C), tratado com alisquireno (ALSK), tratado com L-arginina (L-arg) e tratado com alisquireno + L-arginina (ALSK+L-arg). Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contração com fenilefrina. Teste t não-pareado. p > 0,05.

4.7 EFEITO DOS FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO TRATAMENTO COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA NOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA DE RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR.

Os resultados apresentados anteriormente mostraram que os tratamentos com alisquireno, L-arginina ou sua associação foram capazes de diminuir a resposta constritora à fenilefrina e esta diminuição foi abolida após a lesão endotelial, demonstramos também que a associação do alisquireno + L-arginina foi capaz de restaurar o relaxamento à acetilcolina. Dessa forma, Demonstramos que a participação do endotélio vascular é importante na modulação da hipertensão renovascular e que também esta envolvida na resposta ao tratamento com Alisquireno associado a L-arginina. Assim, Procuramos avaliar se a os diferentes tratamentos de escolha alteram os efeitos endoteliais, através do aumento da biodisponibilidade de NO, em ratos com hipertensão renovascular. Para isso foi realizada curva contração resposta a fenilefrina na presença de L-NAME (inibidor inespecífico da síntese de NO).

4.7.1 Participação da via do óxido nítrico no tratamento com alisquireno e L-arginina sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica de ratos com hipertensão renovascular.

A resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) foi significativamente maior nos segmentos arteriais dos animais de todos os grupos estudados quando comparado ao controle (E+), exceto do grupo 2R1C (Tabela 9). A avaliação da sensibilidade (pD_2) demonstrou aumento nos grupos Sham e 2R1C quando comparados ao seus controles (E+) (Tabela 9). Adicionalmente, a análise da curva concentração resposta na condição controle (E+) após o bloqueio da via do NO com L-NAME ($100\mu M$) demonstrou um aumento da resposta vasoconstritora à fenilefrina nos anéis isolados de aorta de todos os grupos estudados (Figura 18 A - E).

Visando uma melhor comparação desses resultados, foi calculada a diferença percentual da área abaixo da curva (% dAUC) dos gráficos. Assim, foi possível observar que apesar de que no bloqueio com L-NAME, a resposta contrátil a fenilefrina foi potencializada em todos os grupos estudados, a magnitude dessa resposta, avaliada através da área abaixo da curva, foi maior no grupo tratado com a associação das drogas (alisquireno + L-arginina) quando comparado ao grupo 2R1C

(Figura 18 F). Assim, foi possível observar que o tratamento com alisquireno + L-arginina foi capaz de aumentar a biodisponibilidade de NO em anéis de aorta e ratos com hipertensão renovascular. (%dAUC ALSK+L-arg= 195,08 ± 51,7% vs 2R1C= 25,20 ± 10,56%, § p<0,05, ANOVA de uma via) (Figura 18 F).

Tabela 9: Resposta máxima (R_{máx}) e a sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos diferentes grupos estudados, na presença e na ausência de L-NAME.

| | R _{máx} (%) | pD ₂ |
|-----------------------------|----------------------|-----------------|
| Sham E ⁺ | 92,4 ± 4,4 | 6,77 ± 0,35 |
| Sham L-NAME | 133,6 ± 10,6 † | 7,94 ± 0,12 † |
| 2R1C E ⁺ | 148,1 ± 15,6 | 7,25 ± 0,14 |
| 2R1C L-NAME | 163,2 ± 8,78 | 7,94 ± 0,12 † |
| ALSK E ⁺ | 112,3 ± 7,4 | 7,74 ± 0,21 |
| ALSK L-NAME | 192,6 ± 37,1 † | 7,79 ± 0,33 |
| L-arg E ⁺ | 106,6 ± 8,8 | 8,20 ± 0,24 |
| L-arg L-NAME | 158,2 ± 9,15 † | 8,06 ± 0,26 |
| ALSK + L-arg E ⁺ | 84,3 ± 7,6 | 8,28 ± 0,37 |
| ALSK+L-arg L-NAME | 187,8 ± 19,5 † | 8,37 ± 0,15 |

Valores expressos em média ± EPM; Teste t não-pareado. † p<0,05; R_{máx} e pD₂: E⁺ vs L-NAME

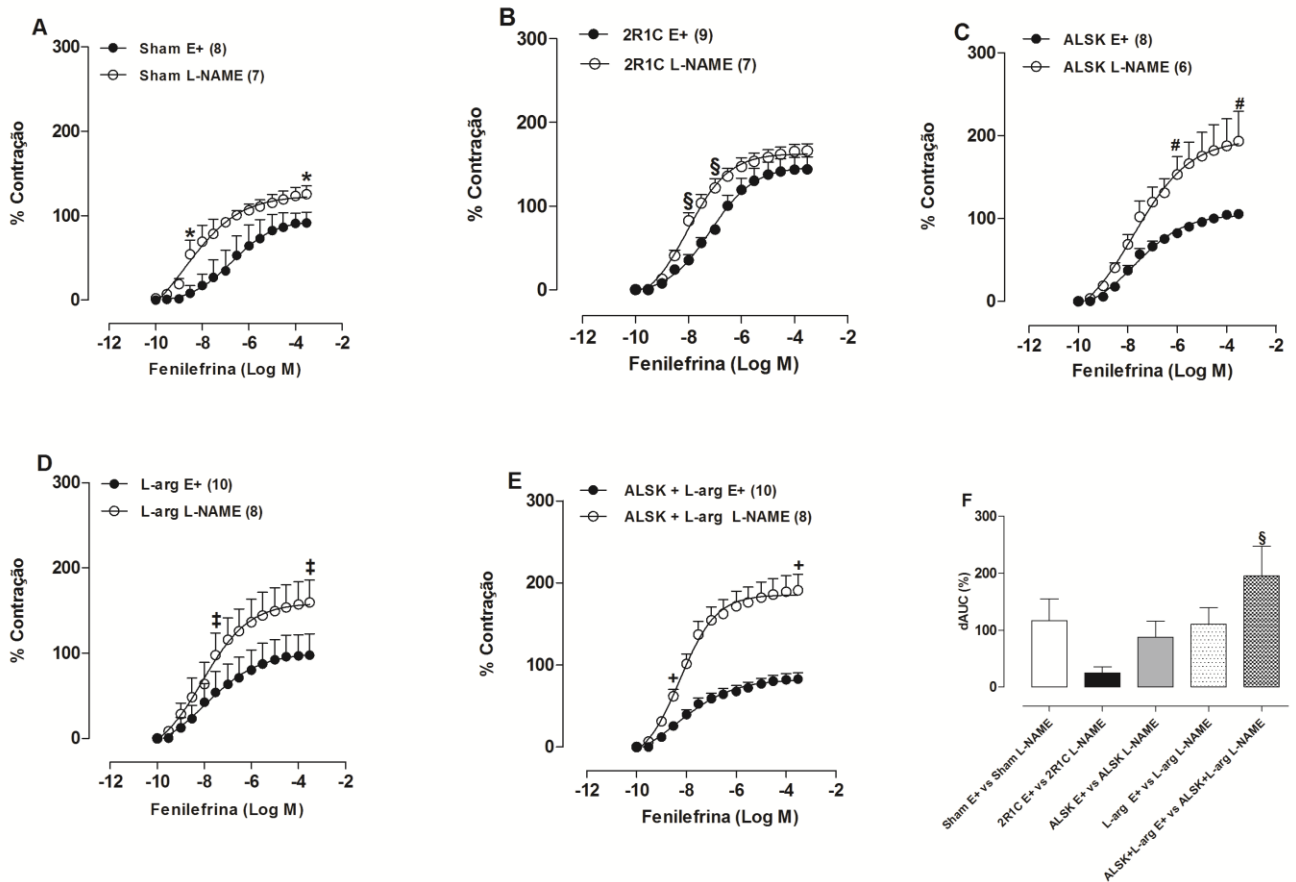


Figura 18: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (A) Sham (ShamE⁺) e após a incubação com L-NAME (Sham L-NAME); (B) 2R1C (2R1C E⁺) e após a incubação com L-NAME (2R1C L-NAME); (C) Alisquireno (ALSK E⁺) e após a incubação com L-NAME (ALSK L-NAME); (D) L-arginina (L-arg E⁺) e após a incubação com L-NAME (L-arg L-NAME); (E) Alisquireno + L-arginina (ALSK + L-arg E⁺) e após a incubação com L-NAME (ALSK + L-arg L-NAME); (F) Diferença percentual da área abaixo da curva entre os grupos estudados. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; ANOVA (uma e duas vias) seguido de Tukey.. *p < 0,05 para Sham E⁺ vs Sham L-NAME; § p < 0,05 2R1C E⁺ vs 2R1C L-NAME; #p < 0,05 ALSK E⁺ vs ALSK L-NAME; ‡ p < 0,05 L-arg E⁺ vs L-arg L-NAME e + p < 0,05 ALSK + L-arg E⁺ vs ALSK + L-arg L-NAME e % dAUC 2R1C vs ALSK+L-arg.

4.7.1.1 Expressão Proteica da isoforma endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) da síntese do óxido nítrico em aorta de ratos com hipertensão renovascular

Visando explicar por qual mecanismo estaria ocorrendo o aumento da modulação endotelial pelo NO nos ratos tratados com a terapia associada de Alisquireno + L-arginina, a expressão proteica da isoforma endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) da síntese do óxido nítrico foram avaliadas. Assim, em condições basais (segmentos arteriais retirados logo após o animal ser sacrificado) a expressão da eNOS e iNOS foram detectadas, através da técnica de Western Blot em segmentos de aorta torácica de ratos dos diferentes grupos estudados. Foi observado nestas artérias que a hipertensão renovascular (2R1C) e o tratamento isolado com L-arginina (L-arg) aumentou a expressão proteica da eNOS quando comparado aos grupos Sham, tratado com alisquireno (ALSK) e tratado com a associação das drogas (ALSK + L-arg) (2R1C: $1,16 \pm 0,05$ n= 4; L-arg: $1,17 \pm 0,07$ n= 6 vs. Sham: $0,85 \pm 0,09$ n=4, ALSK: $0,83 \pm 0,05$ n=5 e ALSK+L-arg: $0,81 \pm 0,07$ n=4) (Figura 19 A). Adicionalmente, ao avaliarmos a expressão proteica de iNOS nos segmentos arteriais observamos um *upregulation* da iNOS no grupo 2R1C comparados aos demais grupos estudados (Sham, ALSK, L-arg e ALSK+L-arg) (2R1C: $1,54 \pm 0,37$ n=5 vs. Sham: $0,46 \pm 0,07$ n=4; ALSK: $0,61 \pm 0,08$ n=4; L-arg: $0,40 \pm 0,05$ n=5 e ALSK+L-arg: $0,70 \pm 0,14$ n=4) (Figura 19 B).

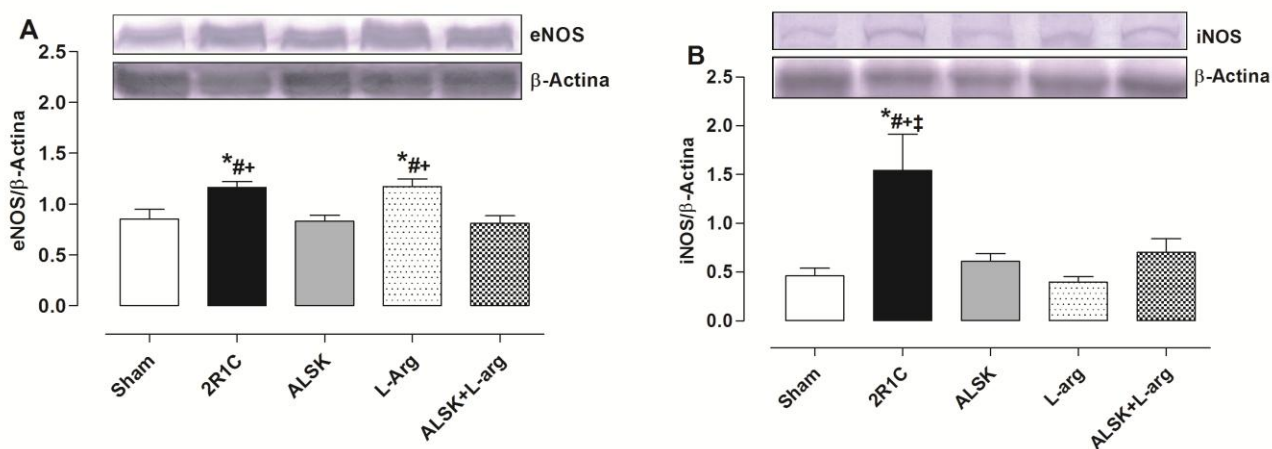


Figura 29: Resultados da expressão protéica da isoforma endotelial (**A**) e induzível (**B**) da sintase do óxido nítrico (eNOS e iNOS respectivamente), por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos com hipertensão renovascular dos grupos Sham (Sham), dois rins um clipe (2R1C), tratado com alisquireno (ALSK), tratado com L-arginina (L-arg) e tratado com alisquireno + L-arginina (ALSK+L-arg). Na parte superior da figura estão as bandas de Western Blot representativas da expressão da eNOS e da β -actina. Os resultados (média \pm EPM) estão expressos como relação entre a densidade das bandas da eNOS e da β -actina. ANOVA (uma via) seguido de Tukey: $p > 0,05$.

4.7.2 Participação da Angiotensina II local no tratamento com alisquireno e L-arginina sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica de ratos com hipertensão renovascular.

Sabendo que a fisiopatologia da hipertensão investigada nesse estudo possui íntima relação com o sistema renina angiotensina, neste protocolo, investigamos a participação da Angiotensina II local na resposta contrátil à fenilefrina no tratamento isolado com alisquireno e L-arginina e na associação dessas drogas (alisquireno + L-arginina). O enalapril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) e também o losartan, um inibidor específico de receptor para Angiotensina II do subtipo AT₁ foram usados nos segmentos de aorta dos ratos com hipertensão renovascular dos diferentes grupos estudados.

4.7.2.1 Efeito do tratamento com alisquireno e L-arginina sobre a enzima conversora da angiotensina (ECA) de ratos com hipertensão renovascular.

A incubação com o inibidor da ECA (Enalapril, 10 µM) apresentou resposta máxima (R_{máx}) significativamente menor no grupo ALSK+L-arg comparado aos grupos Sham e L-arg (Tabela 10). Ao avaliarmos a R_{máx} dos diferentes grupos incubados com enalapril comparados com a condição controle (E+) observamos uma significativa redução da R_{máx} nos grupos 2R1C, ALSK e ALSK+L-arg comparados aos seus respectivos controle E+. Por outro lado, a avaliação da sensibilidade (pD₂) não demonstrou diferenças significativas entre os diferentes grupos quando incubados com Enalapril, entretanto, ao avaliarmos a sensibilidade dos diferentes grupos incubados com enalapril comparados com a condição controle (E+) detectamos um aumento da pD₂ no grupo 2R1C comparado com a condição controle (E+) (Tabela 10).

A análise da curva concentração resposta a fenilefrina na condição controle (E+) e ao incubarmos os anéis com Enalapril, demonstrou que no grupo Sham e nos

animais hipertensos tratamentos com L-arginina (L-arg) e alisquireno associado a L-arginina (ALSK+L-arg) o Enalapril não alterou a resposta contrátil à fenilefrina (Figura 20 A, D e E). No entanto, na presença deste fármaco, houve uma diminuição da reatividade à fenilefrina no grupo 2R1C e no grupo tratado com a monoterapia de alisquireno (Figura 20 B e C).

Visando uma melhor comparação desses resultados, foi calculada a diferença percentual da área abaixo da curva (% dAUC) dos gráficos. Assim, foi possível observar que apesar do Enalapril reduzir a resposta contrátil a fenilefrina nos grupos 2R1C e ALSK, a magnitude dessa resposta, avaliada através da área abaixo da curva foi menor no grupo tratado com a monoterapia de alisquireno (ALSK) quando comparado ao grupo 2R1C (Figura 20 F). Assim, foi possível observar que apesar da resposta contrátil demonstrar um provável envolvimento da ECA na ação vascular desses grupos (2R1C e ALSK) essa análise sugere que o tratamento com alisquireno promove certa proteção vascular no que diz respeito à função da ECA local. (%dAUC 2R1C= $34,80 \pm 8,39\%$ vs ALSK= $9,96 \pm 8,16\%$, § $p < 0,05$, ANOVA (uma via seguido por Tukey)) (Figura 20 F).

Tabela 10: Resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e a sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos diferentes grupos estudados, na presença e na ausência de Enalapril.

| | $R_{m\acute{a}x}$ (%) | pD_2 |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|
| Sham E ⁺ | $92,4 \pm 4,4$ | $6,77 \pm 0,35$ |
| Sham Enalapril | $94,1 \pm 6,44$ | $6,89 \pm 0,23$ |
| 2R1C E ⁺ | $148,1 \pm 15,6$ | $7,25 \pm 0,14$ |
| 2R1C Enalapril | $82,3 \pm 7,24 \uparrow$ | $7,84 \pm 0,11 \uparrow$ |
| ALSK E ⁺ | $112,3 \pm 7,4$ | $7,74 \pm 0,21$ |
| ALSK Enalapril | | |

| | | |
|----------------------|------------------|-------------|
| L-arg E+ | 70,6 ± 6,92 † | 8,04 ± 0,21 |
| | 106,6 ± 8,8 | 8,20 ± 0,24 |
| L-arg Enalapril | 95,14 ± 6,56 | 8,31 ± 0,18 |
| ALSK + L-arg E+ | 84,3 ± 7,6 | 8,28 ± 0,37 |
| ALSK+L-arg Enalapril | 62,8 ± 8,10 † *‡ | 8,88 ± 0,43 |

Valores expressos em média ± EPM; Teste *t* não-pareado. † $p < 0,05$; $R_{\text{máx}}$ e pD_2 : E⁺ vs Enalapril. ANOVA (uma via seguido por tukey) * $p < 0,05$; $R_{\text{máx}}$: vs Sham Enalapril e ‡ $p < 0,05$ vs L-arg Enalapril.

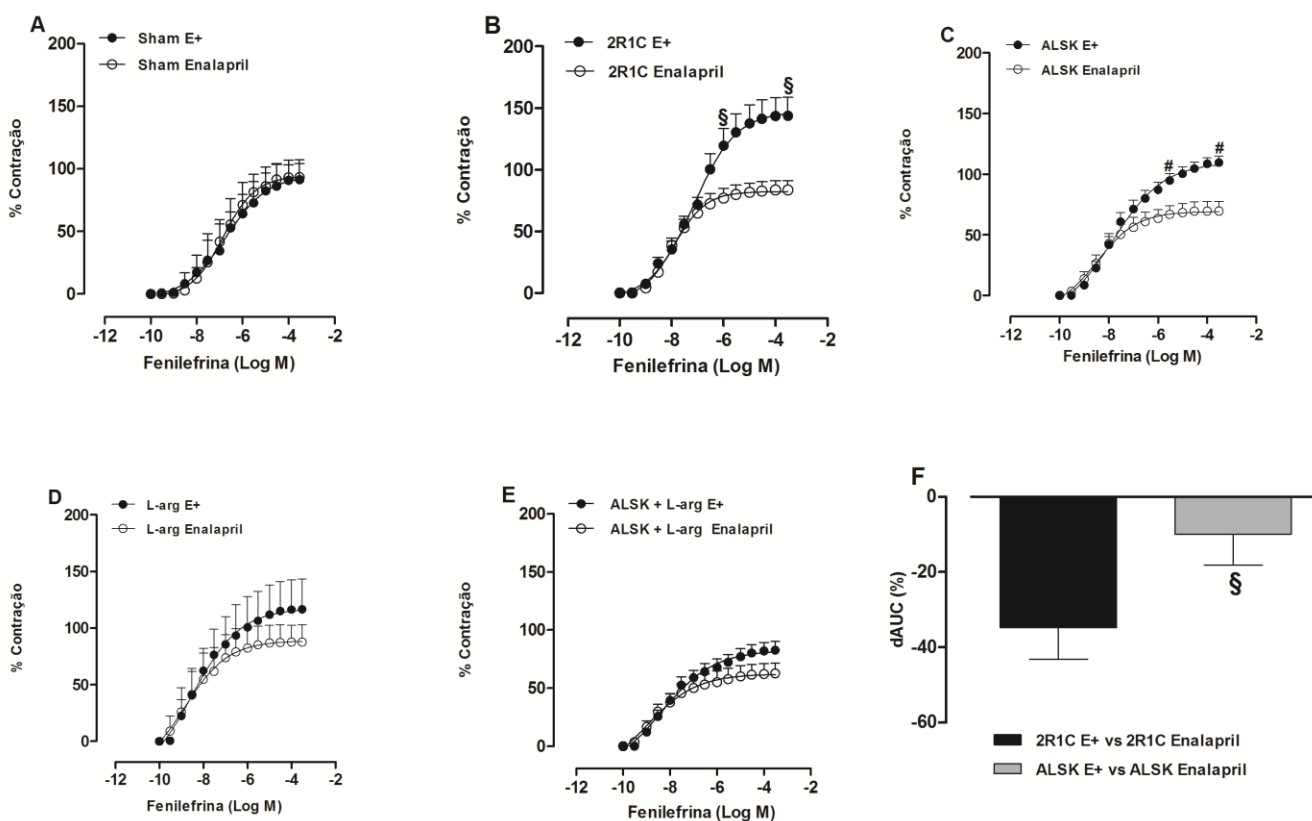


Figura 20: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (A) Sham (Sham E⁺) e após a incubação com Enalapril (Sham Enalapril); (B) 2R1C (2R1C E⁺) e após a incubação com Enalapril (2R1C Enalapril); (C) Alisquireno (ALSK E⁺) e após a incubação com Enalapril (ALSK Enalapril); (D) L-arginina (L-arg E⁺) e após a incubação com Enalapril (L-arg Enalapril); (E) Alisquireno + L-arginina (ALSK + L-arg E⁺) e após a incubação com Enalapril (ALSK + L-arg Enalapril); (F) Diferença percentual da área abaixo da curva entre os grupos estudados. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; ANOVA (uma e duas vias) seguido de Tukey.. * $p < 0,05$ para Sham E⁺ vs Sham Enalapril; § $p < 0,05$ 2R1C E⁺ vs 2R1C Enalapril; # $p < 0,05$ ALSK E⁺ vs ALSK Enalapril; ‡ $p < 0,05$ L-arg E⁺ vs L-arg Enalapril e + $p < 0,05$ ALSK + L-arg E⁺ vs ALSK + L-arg Enalapril e % dAUC 2R1C vs ALSK.

4.7.2.2 Efeito do tratamento com alisquireno e L-arginina sobre o receptor da Angiotensina II do subtipo AT₁ em ratos com hipertensão renovascular.

Para investigar se há maior interação da angiotensina II com os receptores do subtipo AT₁, os anéis isolados foram incubados com o Losartan (10 μM). A incubação com o Losartan apresentou resposta máxima (R_{máx}) significativamente menor no grupo L-arg comparado aos grupos Sham, 2R1C e ALSK (Tabela 11) da mesma forma, o grupo ALSK +L-arg apresentou R_{máx} reduzida comparado aos grupos Sham e 2R1C (Tabela 11). Por outro lado, ao avaliarmos a R_{máx} dos diferentes grupos incubados com Losartan comparados com a condição controle (E+) observamos uma significativa redução da R_{máx} nos grupos 2R1C, ALSK, L-arg e ALSK+L-arg comparados aos seus respectivos controle E+. A avaliação da sensibilidade (pD₂) não demonstrou diferenças significativas entre os diferentes grupos quando incubados com Losartan (Tabela 11).

A análise da curva concentração resposta a fenilefrina na condição controle (E+) e ao incubarmos os anéis com Losartan, demonstrou que no grupo Sham o Losartan não alterou a resposta contrátil à fenilefrina (Figura 21 A). No entanto, na presença deste fármaco, houve uma diminuição da reatividade à fenilefrina nos grupos 2R1C, e nos grupos tratados com ALSK, L-arg ou ALSK+L-arg (Figura 21 B, C, D e E).

Visando uma melhor comparação desses resultados, foi calculada a diferença percentual da área abaixo da curva (% dAUC) dos gráficos. Entretanto, não observamos nenhuma diferença significativa na magnitude dessa resposta. (Figura 21 F).

Tabela 81: Resposta máxima (R_{máx}) e a sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos diferentes grupos estudados, na presença e na ausência de Losartan.

| | Rmáx (%) | pD ₂ |
|-----------------------------|-------------------|-----------------|
| Sham E ⁺ | 92,4 ± 4,4 | 6,77 ± 0,35 |
| Sham Losartan | 93,4 ± 6,82 | 7,55 ± 0,28 |
| 2R1C E ⁺ | 148,1 ± 15,6 | 7,25 ± 0,14 |
| 2R1C Losartan | 86,9 ± 8,69 † | 7,93 ± 0,32 |
| ALSK E ⁺ | 112,3 ± 7,4 | 7,74 ± 0,21 |
| ALSK Losartan | 78,8 ± 6,40 † | 8,47 ± 0,15 |
| L-arg E ⁺ | 106,6 ± 8,8 | 8,20 ± 0,24 |
| L-arg Losartan | 44,7 ± 9,06 † *§# | 10,98 ± 2,87 |
| ALSK + L-arg E ⁺ | 84,3 ± 7,6 | 8,28 ± 0,37 |
| ALSK+L-arg Losartan | 52,9 ± 6,35 † *§ | 11,11 ± 3,44 |

Valores expressos em média ± EPM; Teste *t* não-pareado. † p<0,05; Rmáx e pD₂: E⁺ vs Losartan. ANOVA (uma via seguido por tukey) *p<0,05; Rmáx: vs Sham Losartan, §p<0,05; Rmáx: vs 2R1C Losartan e # p<0,05 Rmáx: vs ALSK Losartan.

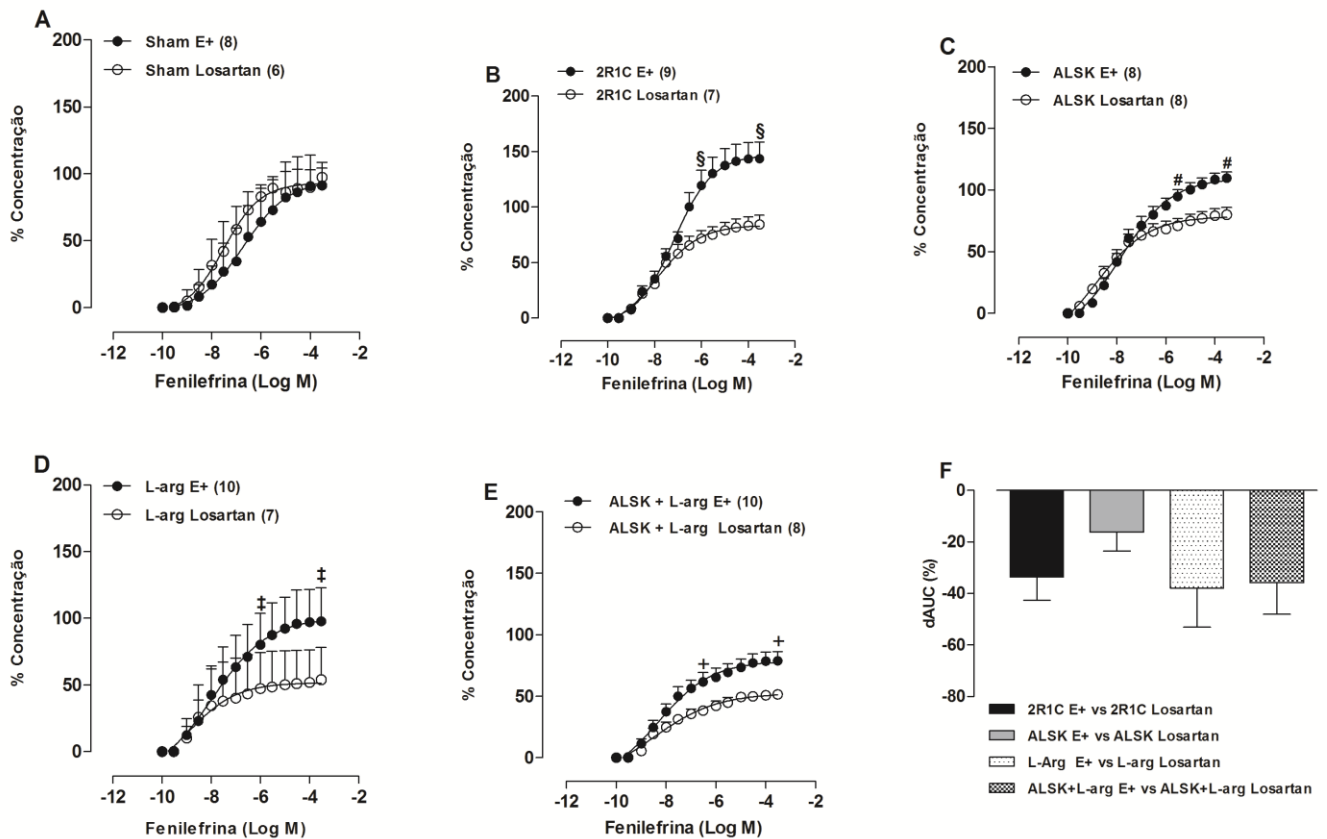


Figura 21: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (A) Sham (Sham E⁺) e após a incubação com Losartan (Sham Losartan); (B) 2R1C (2R1C E⁺) e após a incubação com Losartan (2R1C Losartan); (C) Alisquireno (ALSK E⁺) e após a incubação com Losartan (ALSK Losartan); (D) L-arginina (L-arg E⁺) e após a incubação com Losartan (L-arg Losartan); (E) Alisquireno + L-arginina (ALSK + L-arg E⁺) e após a incubação com Losartan (ALSK + L-arg Losartan); (F) Diferença percentual da área abaixo da curva entre os grupos estudados. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; ANOVA (uma e duas vias) seguido de Tukey. *p< 0,05 para Sham E⁺ vs Sham Losartan; § p<0,05 2R1C E⁺ vs 2R1C Losartan; #p<0,05 ALSK E⁺ vs ALSK Losartan; ‡ p<0,05 L-arg E⁺ vs L-arg Losartan e + p<0,05 ALSK + L-arg E⁺ vs ALSK + L-arg Losartan.

4.7.2.2.1 Expressão Protéica do receptor da Angiotensina II do subtipo AT₁ em aorta de ratos com hipertensão renovascular

A expressão dos receptores AT₁ foi detectada, através da técnica de Western Blot em segmentos de aorta torácica de ratos com hipertensão renovascular dos grupos Sham, 2R1C, ALSK, L-arg e ALSK+L-arg. Foi observado nestas artérias que a hipertensão renovascular promoveu uma elevação da expressão proteica de AT₁

comparado aos grupos Sham, ALSK e ALSK+L-arg (Sham= $1,0 \pm 0,12$ n=5; 2R1C= $1,45 \pm 0,13$ n=5; ALSK= $1,03 \pm 0,14$ n=8; L-arg= $1,20 \pm 0,08$ n=5; ALSK+L-arg= $1,04 \pm 0,08$ n=6) (Figura 22).

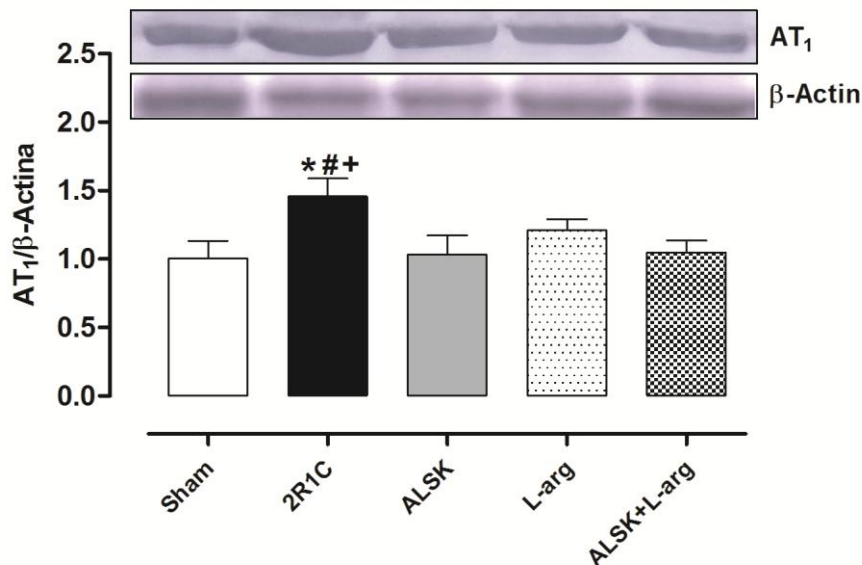


Figura 22: Resultados da expressão protéica do receptor da Angiotensina II do subtipo AT₁, por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Sham (n=5), 2R1C (n=5), ALSK (n=8), L-arg (n=5) e ALSK+L-arg (n=6). Na parte superior da figura estão as bandas de Western Blot representativas da expressão do receptor AT₁ e da β-actina. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como relação entre a densidade das bandas do receptor AT₁ e da β-actina. ANOVA (uma via seguida por Fisher) *p<0,05 2R1C vs Sham; #p<0,05 2R1C vs ALSK e +p<0,05 2R1C vs ALSK+L-arg.

4.7.2.2.2 Expressão Protéica do receptor da Angiotensina II do subtipo AT₂ em aorta de ratos com hipertensão renovascular

A expressão protéica dos receptores AT₂ foi detectada nos segmentos de aorta torácica de todos os grupos experimentais através da técnica de Western Blot.

A mensuração desse receptor foi realizada para analisar a expressão de um dos componentes vasodilatadores do sistema renina angiotensina. Assim, conforme pode ser observado na Figura 19, o grupo ALSK+L-arg apresentou um notório aumento na expressão dos receptores AT₂ em decorrência do efeito do tratamento dessa associação das drogas (alisquireno e L-arginina) quando comparado aos

grupos Sham e L-arg (Sham= $0,67 \pm 0,06$ n=6; 2R1C= $0,84 \pm 0,11$ n=6; ALSK= $0,95 \pm 0,07$ n=6; L-arg= $0,67 \pm 0,12$ n=6; ALSK+L-arg= $1,30 \pm 0,19$ n=6) (Figura 23).

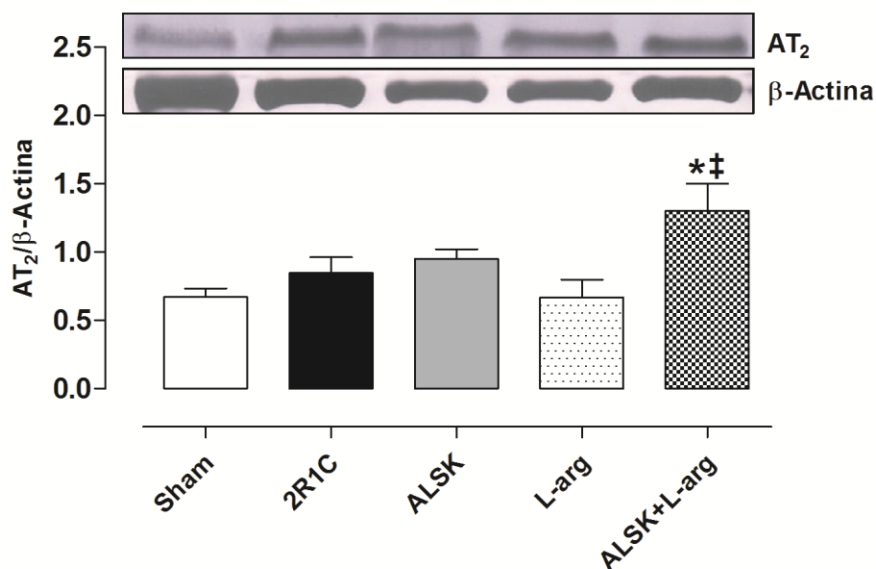


Figura 23: Resultados da expressão protéica do receptor da Angiotensina II do subtipo AT₂, por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Sham (n=6), 2R1C (n=6), ALSK (n=6), L-arg (n=6) e ALSK+L-arg (n=6). Na parte superior da figura estão as bandas de Western Blot representativas da expressão do receptor AT₂ e da β actina. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como relação entre a densidade das bandas do receptor AT₂ e da β actina. ANOVA (uma via seguido por Fisher): *p<0,05 ALSK+L-arg vs Sham; ‡p<0,05 ALSK+L-arg vs L-arg.

4.7.3 Participação das espécies reativas de oxigênio (EROs) no tratamento com alisquireno e L-arginina sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica de ratos com hipertensão renovascular.

O papel do estress oxidativo na gênese e manutenção da hipertensão arterial tem sido recentemente demonstrado, incluindo na hipertensão renovascular, adicionalmente, sabe-se que as EROs promovem seus efeitos em muitos tecidos, dentre eles, o vaso sanguíneo é um dos alvos mais afetados pelo stress oxidativo. Sendo assim, neste protocolo, investigamos a participação das EROs local

na resposta contrátil à fenilefrina de ratos com hipertensão renovascular e ratos tratados com a monoterapia de alisquireno e L-arginina e na associação dessas drogas (alisquireno + L-arginina). O apocinina, um inibidor da NADPH oxidase e também a superóxido dismutase (SOD), um “varredor” do ânion superóxido (O_2^-) foram usados nos segmentos de aorta dos ratos com hipertensão renovascular dos diferentes grupos estudados.

4.7.3.1 Influência da administração de apocinina, um inibidor da NADPH oxidase no tratamento com alisquireno e L-arginina sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica de ratos com hipertensão renovascular.

A NADPH oxidase é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio do organismo. Para analisar a influência da NADPH oxidase na resposta contrátil à fenilefrina em ratos com hipertensão renovascular, utilizamos a apocinina (0,3 μ M), um inibidor não-seletivo da NADPH oxidase.

A incubação com apocinina apresentou resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) significativamente menor no grupo 2R1C comparado ao grupo Sham (Tabela 12) da mesma forma, o grupo ALSK +L-arg apresentou $R_{m\acute{a}x}$ reduzida comparado aos grupos Sham e L-arg (Tabela 12). Por outro lado, ao avaliarmos a $R_{m\acute{a}x}$ dos diferentes grupos incubados com apocinina comparados com a condição controle (E+) observamos uma significativa redução da $R_{m\acute{a}x}$ nos grupos 2R1C, ALSK e ALSK+L-arg comparado aos seus respectivos controle (E+). Por outro lado, a avaliação da sensibilidade (pD_2) não demonstrou diferenças significativas entre os diferentes grupos quando incubados com apocinina (Tabela 12).

A avaliação da curva concentração resposta a fenilefrina na condição controle (E+) e ao incubarmos os anéis com apocinina observamos uma diminuição da reatividade à fenilefrina no grupo 2R1C, ALSK e no grupo ALSK+L-arg (Figura 24 B, C e E).

Visando uma melhor comparação desses resultados, foi calculada a diferença percentual da área abaixo da curva (% dAUC) dos gráficos. Assim, foi possível

observar que apesar da apocinina reduzir a resposta contrátil a fenilefrina nos grupos 2R1C, ALSK e ALSK +L-arg a magnitude dessa resposta, avaliada através da área abaixo da curva foi menor no grupo tratado com a associação das drogas (ALSK+L-arg) quando comparado ao grupo 2R1C (Figura 24 F), demonstrando que esse tratamento promove uma proteção vascular no que diz respeito à função da NADPH oxidase local. (%dAUC 2R1C: $64,65 \pm 6,57\%$ vs ALSK+L-arg: $18,68 \pm 10,32\%$, § $p < 0,05$, ANOVA (uma via seguido por Tukey) (Figura 24 F).

Tabela 12: Resposta máxima (R_{máx}) e a sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: Sham, 2R1C, ALSK, L-arg e ALSK+L-arg, na presença e na ausência de Apocinina.

| | R _{máx} (%) | pD ₂ |
|-----------------------------|----------------------|-----------------|
| Sham E ⁺ | 92,4 ± 4,4 | 6,77 ± 0,35 |
| Sham apocinina | 91,7 ± 3,68 | 7,83 ± 0,21 |
| 2R1C E ⁺ | 148,1 ± 15,6 | 7,25 ± 0,14 |
| 2R1C apocinina | 49,5 ± 7,73 † * | 7,70 ± 0,17 |
| ALSK E ⁺ | 112,3 ± 7,4 | 7,74 ± 0,21 |
| ALSK apocinina | 61,3 ± 14,58 † | 10,2 ± 1,85 |
| L-arg E ⁺ | 106,6 ± 8,8 | 8,20 ± 0,24 |
| L-arg apocinina | 85,2 ± 17,2 | 12,9 ± 3,13 |
| ALSK + L-arg E ⁺ | 84,3 ± 7,6 | 8,28 ± 0,37 |
| ALSK+L-arg apocinina | 38,0 ± 4,45 † *‡ | 8,96 ± 0,47 |

Valores expressos em média ± EPM; Teste *t* não-pareado. † $p < 0,05$; R_{máx}: E⁺ vs apocinina. ANOVA (uma via seguido por tukey) * $p < 0,05$; R_{máx}: vs Sham apocinina, ‡ $p < 0,05$; R_{máx}: vs L-arg apocinina.

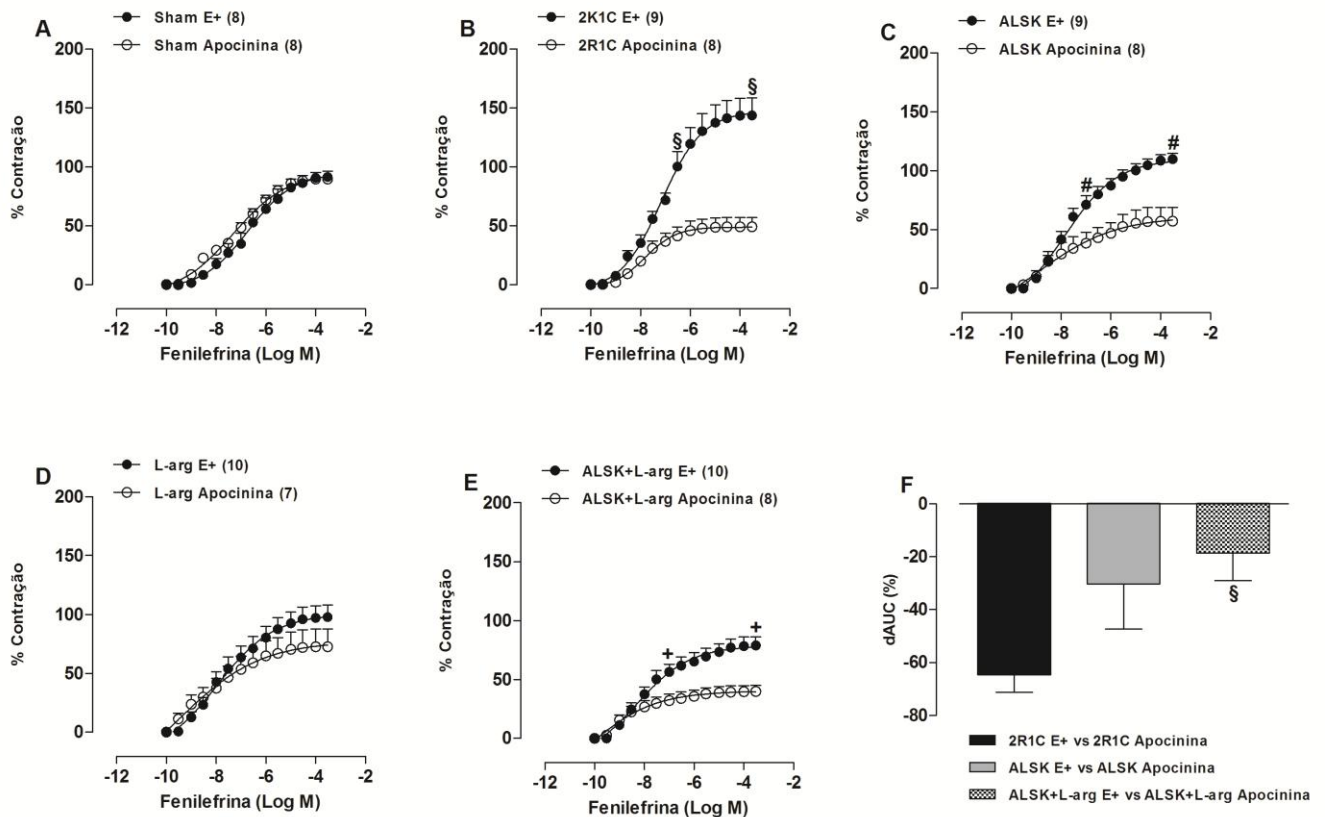


Figura 24: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (A) Sham (Sham E⁺) e após a incubação com apocinina (Sham apocinina); (B) 2R1C (2R1C E⁺) e após a incubação com apocinina (2R1C apocinina); (C) Alisquireno (ALSK E⁺) e após a incubação com apocinina (ALSK apocinina); (D) L-arginina (L-arg E⁺) e após a incubação com apocinina (L-arg apocinina); (E) Alisquireno + L-arginina (ALSK + L-arg E⁺) e após a incubação com apocinina (ALSK + L-arg apocinina); (F) Diferença percentual da área abaixo da curva entre os grupos estudados. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; ANOVA (uma e duas vias) seguido de Tukey.. *p < 0,05 para Sham E⁺ vs Sham apocinina; § p < 0,05 2R1C E⁺ vs 2R1C apocinina; # p < 0,05 ALSK E⁺ vs ALSK apocinina; ‡ p < 0,05 L-arg E⁺ vs L-arg apocinina e + p < 0,05 ALSK + L-arg E⁺ vs ALSK + L-arg apocinina. % dAUC 2R1C vs ALSK+L-arg.

4.7.3.2 Influência da administração da superóxido dismutase (SOD), um “varredor” do ânion superóxido (O₂⁻) no tratamento com alisquireno e L-arginina sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aorta torácica de ratos com hipertensão renovascular.

Sabe-se que a biodisponibilidade de óxido nítrico pode ser reduzida por espécies reativas de oxigênio, aumentando assim a contração vascular. Diante disso, investigamos a influência da exposição dos anéis de aorta à enzima

superóxido dismutase (SOD, 150 U/ml) na resposta contrátil à fenilefrina em ratos com hipertensão renovascular. Ao avaliarmos a R_{máx} dos diferentes grupos incubados com SOD comparados com a condição controle (E+) observamos uma significativa redução da R_{máx} nos grupos 2R1C e ALSK comparados com seus respectivos controles (E+) (Tabela 13). Adicionalmente, a avaliação da sensibilidade (pD₂) foi significativamente maior no grupo 2K1C na presença de SOD quando comparado com o seu controle E+ (Tabela 13).

Conseqüentemente, a avaliação da curva concentração resposta a fenilefrina na condição controle (E+) e na presença de SOD observamos que esse “varredor” foi capaz de reduzir a reatividade à fenilefrina somente nos grupos 2R1C e ALSK (Figura 25 B e C).

Visando uma melhor comparação desses resultados, foi calculada a diferença percentual da área abaixo da curva (% dAUC) dos gráficos. Assim, foi possível observar que apesar da SOD reduzir a resposta contrátil à fenilefrina nos grupos 2R1C e ALSK a magnitude dessa resposta, avaliada através da área abaixo da curva foi menor no grupo tratado com a monoterapia de alisquireno (grupo ALSK) quando comparado ao grupo 2R1C (Figura 25 F) (%dAUC 2R1C: 49,94 ± 5,91% vs ALSK: 29,61 ± 6,93%, § p<0,05, ANOVA (uma via seguido por Tukey) (Figura 25 F).

Tabela 93: Resposta máxima (R_{máx}) e a sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: Sham, 2R1C, ALSK, L-arg e ALSK+L-arg, na presença e na ausência de Apocinina. Contração

| | R _{máx} (%) | pD ₂ |
|---------------------|----------------------|-----------------|
| Sham E ⁺ | 92,4 ± 4,4 | 6,77 ± 0,35 |
| Sham SOD | 87,4 ± 6,86 | 7,38 ± 0,21 |
| 2R1C E+ | 148,1 ± 15,6 | 7,25 ± 0,14 |
| 2R1C SOD | 62,9 ± 7,17 † | 7,88 ± 0,25 † |

| | | |
|-----------------------------|---------------|-------------|
| ALSK E ⁺ | 112,3 ± 7,4 | 7,74 ± 0,21 |
| ALSK SOD | 72,9 ± 8,30 † | 7,79 ± 0,32 |
| L-arg E ⁺ | 106,6 ± 8,8 | 8,20 ± 0,24 |
| L-arg SOD | 72,4 ± 14,1 | 8,30 ± 0,34 |
| ALSK + L-arg E ⁺ | 84,3 ± 7,6 | 8,28 ± 0,37 |
| ALSK+L-arg SOD | 67,4 ± 4,79 | 8,58 ± 0,54 |

Valores expressos em média ± EPM; Teste *t* não-pareado. † *p*<0,05; Rmáx: E⁺ vs SOD.

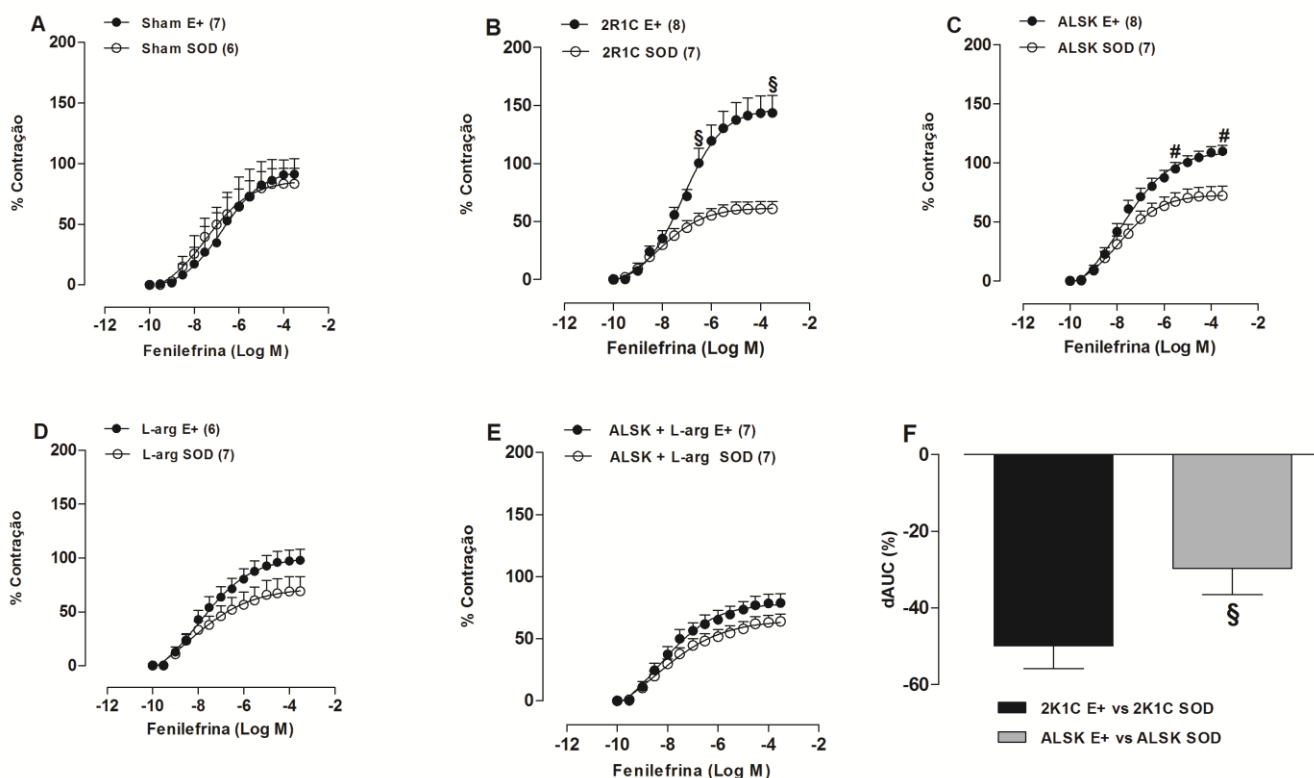


Figura 35: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (A) Sham (Sham E⁺) e após a incubação com SOD (Sham SOD); (B) 2R1C (2R1C E⁺) e após a incubação com SOD (2R1C SOD); (C) Alisquireno (ALSK E⁺) e após a incubação com SOD (ALSK SOD); (D) L-arginina (L-arg E⁺) e após a incubação com SOD (L-arg SOD); (E) Alisquireno + L-arginina (ALSK + L-arg E⁺) e após a incubação com SOD (ALSK + L-arg SOD); (F) Diferença percentual da área abaixo da curva entre os grupos estudados. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; ANOVA (uma e duas vias) seguido de Tukey.. **p*< 0,05 para Sham E⁺ vs Sham SOD; § *p*<0,05 2R1C E⁺ vs 2R1C SOD; #*p*<0,05

ALSK E⁺ vs ALSK SOD; ‡ p<0,05 L-arg E⁺ vs L-arg SOD e + p<0,05 ALSK + L-arg E⁺ vs ALSK + L-arg SOD. % dAUC 2R1C vs ALSK.

4.7.3.2.1 Expressão Protéica da Superóxido Dismutase Mitocondrial – Mn SOD2 em aorta de ratos com hipertensão renovascular

Sabe-se que a superóxido dismutase (Mn SOD2) catalisa a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, impedindo este radical livre de reagir com o NO, assim aumentando sua biodisponibilidade. Por este motivo, analisamos a expressão da Mn SOD2. A expressão protéica da SOD foi detectada nos segmentos de aorta torácica de todos os grupos experimentais através da técnica de Western Blot.

O grupo ALSK+L-arg apresentou um aumento significativo da expressão da SOD comparado aos grupos 2R1C, ALSK e L-arg. (ALSK+L-arg= $1,63 \pm 0,20$ n=7 vs. 2R1C= $1,12 \pm 0,08$ n=6; ALSK= $1,15 \pm 0,13$ n=8; L-arg= $1,07 \pm 0,10$ n=9) (Figura 26).

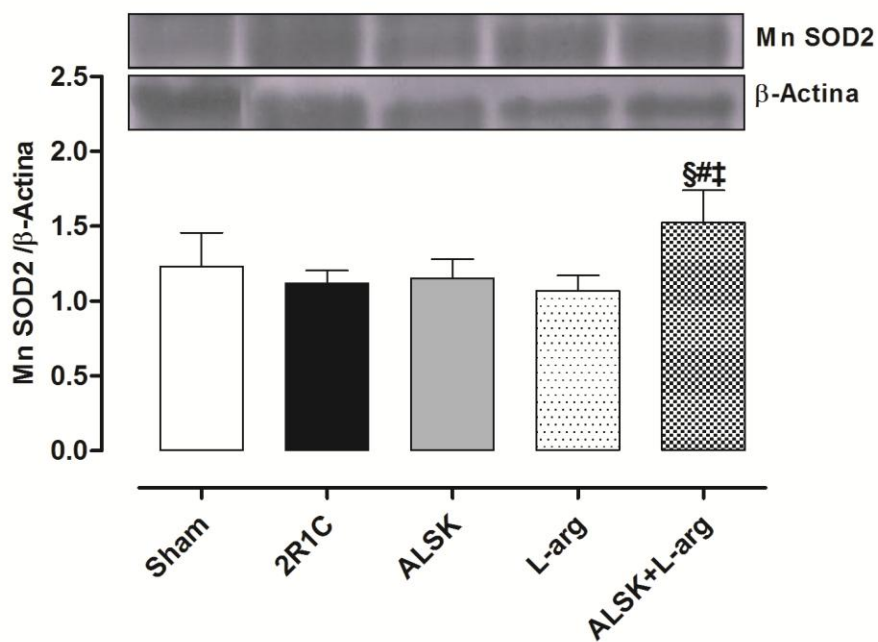


Figura 26: Resultados da expressão protéica da Superóxido Dismutase Mitocondrial – Mn SOD2, por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Sham (n=5), 2R1C (n=6), ALSK (n=8), L-arg (n=9) e ALSK+L-arg (n=7). Na parte superior da figura estão as bandas de Western Blot representativas da expressão de Mn SOD2 e da β actina. Os resultados

(média \pm EPM) estão expressos como relação entre a densidade das bandas de Mn SOD2 e da β actina. ANOVA (uma via seguido por Fisher). § $p < 0,05$ 2R1C vs. ALSK+L-arg; # $p < 0,05$ ALSK vs. ALSK+L-arg; ‡ $p < 0,05$ L-arg vs. ALSK+L-arg.

4.7.3.2.2 Expressão Protéica da subunidade gp91phox da NADPH oxidase em aorta de ratos com hipertensão renovascular

Os resultados demonstrados anteriormente através do bloqueio com a apocinina e a exposição à enzima SOD sugerem que o tratamento com a associação das drogas alisquireno e L-arginina foi capaz de minimizar a liberação/ ativação de radicais livres no modelo de hipertensão renovascular, dessa forma, tivemos por objetivo investigar a expressão proteica da subunidade gp91phox, NOX2, nas aortas dos grupos estudados, uma vez que esta subunidade é a principal isoforma da NADPH oxidase presente nos vasos sanguíneos.

A avaliação da expressão da subunidade gp91phox, NOX2, foi realizada através da técnica de Western Blot. Assim, conforme observado na Figura 23, o ratos hipertensos (2R1C) e o tratamento com a monoterapia de alisquireno (ALSK) apresentaram maior expressão proteica da gp91phox que os animais do grupo Sham e do grupo tratado com a associação das drogas (ALSK+L-arg) enquanto que os tratamentos com L-arginina ou ALSK+L-arg foram capazes de retornar os valores desta proteína a valores semelhantes aos do grupo controle (Sham= $0,87 \pm 0,07$ n=4; 2R1C= $1,51 \pm 0,20$ n=4; ALSK= $1,44 \pm 0,23$ n=6; L-arg= $1,04 \pm 0,13$ n=4; ALSK+L-arg= $0,96 \pm 0,16$ n=4) (Figura 27).

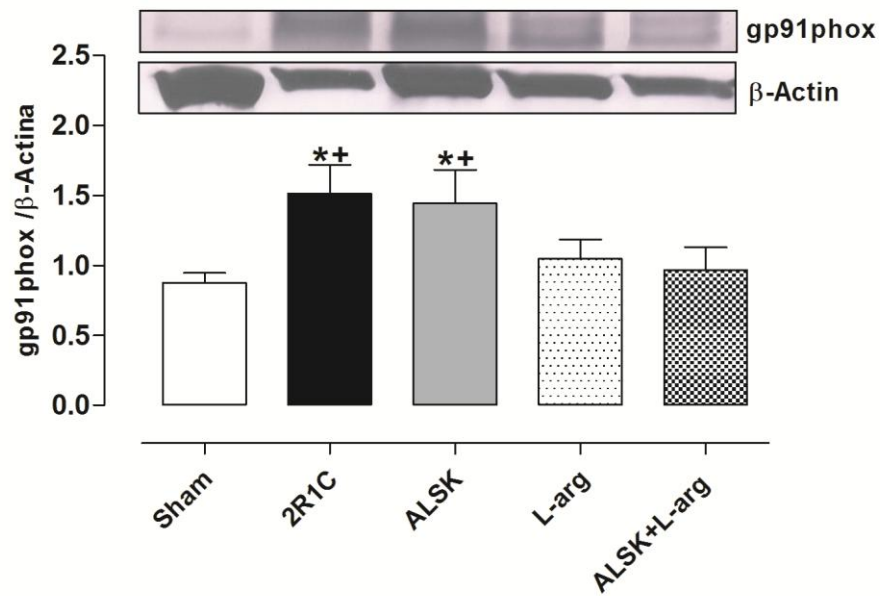


Figura 27: Resultados da expressão protéica da subunidade gp91phox, NOX2, por meio da técnica de Western Blot, em segmentos de artéria aorta torácica de ratos dos grupos Sham (n=4), 2R1C (n=4), ALSK (n=6), L-arg (n=4) e ALSK+L-arg (n=4). Na parte superior da figura estão as bandas de Western Blot representativas da expressão do receptor gp91phox e da β actina. Os resultados (média ± EPM) estão expressos como relação entre a densidade das bandas do receptor gp91phox e da β actina. ANOVA (uma via seguido por Fisher): * $p < 0,05$ 2R1C e ALSK vs Sham; + $p < 0,05$ 2R1C e ALSK vs ALSK+L-arg.

5 DISCUSSÃO

Apesar da hipertensão renovascular ter sua prevalência estimada em 2% da população de hipertensos, (Voiculescu *et al.*, 2001), essa prevalência é diferenciada quando se considera a faixa etária e o perfil clínico dos pacientes, sendo baixa a prevalência em hipertensos leves não-complicados e elevada em hipertensos severos, refratários ou acelerados e em pacientes mais idosos (Praxedes, 2002), caracterizando-se como uma hipertensão severa e de alta mortalidade.

Sabe-se que a fisiopatologia da hipertensão renovascular envolve alterações hormonais, neurais e hemodinâmicas secundárias a estenose da artéria renal. O SRAA, especificamente a formação final de angiotensina II, tem envolvimento importante na gênese e manutenção da hipertensão advinda da doença renovascular (Navar *et al.*, 2002). Adicionalmente, estudos apontam que o aumento da pressão arterial induz mudanças duradouras na parede vascular arterial (Safar *et al.*, 1998) e que essas alterações resultam da interação de vários mecanismos locais como mudanças na função das células endoteliais. Dentre os mecanismos envolvidos com a disfunção endotelial a ação da angiotensina II e o estresse oxidativo no endotélio e músculo liso vascular são bastante discutidos (Triggle *et al.*, 2003; Kolluru *et al.*, 2010). Sendo assim, a disfunção endotelial parece contribuir para manutenção do processo hipertensivo (Cannon III, 1998; Intengan e Schiffrin, 2001).

Varias classes de medicamentos vem sendo proposto como tratamento clinico da hipertensão renovascular, os mais pesquisados e utilizados são os bloqueadores do SRAA os quais apresentam renoproteção e controle da hipertensão (Kobori *et al.*, 2007). Há vários grupos farmacológicos sendo utilizado com intuito de contrapor-se ao SRAA, como os IECA, bloqueadores de receptor AT₁ e recentemente o alisquireno, um inibidor direto de renina (Gradman & Kad, 2008). Por outro lado, as medicações também estão sendo investigadas quanto à sua capacidade de aumentar a disponibilidade de NO e diminuir o estresse oxidativo. Estudos apontam que o tratamento precoce com L-arginina previne a hipertensão renovascular experimental (Abreu *et al.*, 1999), e sua infusão em ratos, causa vasodilatação renal

e natriurese acompanhado por aumento na excreção de nitrito e nitrato, L-citrulina e GMPc (Deng *et al.*, 1995). Outros estudos demonstraram que a L-arginina é capaz de aumentar a produção de NO na circulação renal (Ackermann *et al.*, 1998).

Sendo assim, Nós optamos por estudar esta hipertensão renovascular, pois estes pacientes são altamente suscetíveis a desenvolver resistência aos medicamentos anti-hipertensivos convencionais, aumentando a morbidade e a mortalidade (Faselis *et al.*, 2013). Assim, há uma necessidade de estudos para uma melhor compreensão e para desenvolver novas abordagens terapêuticas contra a progressão da doença. Mediante estas informações, a importância desse estudo reside no fato de avaliar e tornar mais conhecido o efeito do tratamento por 21 dias de alisquireno e L-arginina de forma isolada e associada na hipertensão renovascular sobre o sistema cardiovascular, mais especificamente sobre a artéria aorta. Dessa maneira, o estudo nos permitiu analisar se os efeitos dos tratamentos propostos na hipertensão renovascular em anéis de aorta relacionam-se com alterações na via do óxido nítrico, na produção de radicais livres e no envolvimento do SRAA.

Assim, os principais achados desse estudo foram: (I): os altos níveis pressóricos visto no grupo 2R1C foram parcialmente restaurados pelo tratamento com L-arg e totalmente restaurados pela combinação das drogas ALSK+L-arg; (II): todos os tratamentos proposto no estudo foram efetivos em reduzir a resposta vasoconstrictora à fenilefrina e prevenir a disfunção endotelial; e (III): os mecanismos relacionados com a normalização da pressão arterial e prevenção da disfunção endotelial no grupo ALSK+L-arg são possivelmente devido à restauração do SRAA vascular e a redução do estresse oxidativo local. Portanto, nossos dados evidenciam pela primeira vez os efeitos do tratamento com alisquireno e L-arg sobre a reatividade vascular na hipertensão renovascular.

Com o intuito de esclarecer os possíveis mecanismos envolvidos na resposta promovida pelos diferentes tratamentos proposto nesse estudo, serão discutidos minuciosamente os resultados encontrados em cada protocolo realizado neste trabalho.

5.1 EFEITO DOS TRATAMENTOS COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA DE RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR.

A hipertensão arterial pode ser estudada através de vários modelos experimentais. Entre as hipertensões renais podemos citar: a renovascular que decorre da oclusão parcial da artéria renal (hipertensão renovascular Goldblatt). Em 1934, Goldblatt *et al.* mostraram uma elevação substancial da pressão arterial de cães, cujo suprimento sanguíneo aos rins era reduzido por meio de cliques de prata colocados na artéria renal. Desde então, muitos modelos experimentais de hipertensão, baseados na redução do fluxo sanguíneo renal, têm sido desenvolvidos em várias espécies animais, recebendo o nome genérico de hipertensão de Goldblatt. Em nossos experimentos utilizamos o modelo experimental produzida pela constrição de uma artéria renal, com o rim contralateral íntegro (2R1C). Esse modelo possui fisiopatologia já conhecida e bastante explorada que demonstra que a constrição da artéria renal leva ao aumento da liberação de renina e essa estimula a liberação de angiotensina II, a qual promove fatores intrarrenais distintos além de apresentar modulação sistêmica culminando na elevação da pressão arterial que se inicia poucos minutos após a redução do fluxo renal, atingindo um platô em 2 a 3 semanas.

A hipertensão arterial é um fator de risco para doenças cardiovasculares e disfunção renal, acometendo uma parcela significativa da população mundial (Chobanian *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 2005). Como tratamento são sugeridas mudanças no estilo de vida, como hábitos alimentares saudáveis e atividade física (Chobanian *et al.*, 2003; Pescatello *et al.*, 2004). No entanto, o principal tratamento para a hipertensão arterial é a terapia farmacológica. O recente tratamento com o inibidor direto da renina, pelo princípio ativo alisquireno, tem sido prescrito por atuar diretamente no bloqueio da renina, promovendo um bloqueio mais completo do sistema renina-angiotensina (Bortolotto & Malachias, 2009). Em nosso estudo, a monoterapia de alisquireno em ratos com hipertensão renovascular não promoveu efeitos antihipertensivos apesar de ter restaurado a reatividade vascular a fenilefrina.

Uma provável explicação para esse achado poderia estar no fato de existir vias alternativas, chamadas de não ECA, que estão envolvidas na ativação do SRAA local (Strasser *et al.*, 2007). Assim, além da ECA, a quimase pode atuar sobre a angiotensina I e formar a angiotensina II, que também pode ser formada a partir do angiotensionogênio pela via da catepsina G e da tonina (Atlas, 2007). Sendo assim, Depois de formada a angiotensina II pode se ligar a seus receptores e promover sua ação. Sabe-se que os receptores AT₁ estão diretamente envolvidos nas respostas da pressão arterial, pois acarretam a vasoconstrição, liberação de aldosterona, retenção de sódio, proliferação celular e estresse oxidativo (Oigman & Neves, 2000).

Por outro lado a monoterapia de L-arginina promoveu uma redução significativa da PAS apesar de não normalizar a pressão de ratos com hipertensão renovascular. Corroborando nossos achados estudos demonstram que o tratamento com L-arg apresenta significativo efeito sobre a redução dos níveis hipertensores, e sobretudo, na proteção de órgãos-alvo, considerando sua capacidade de aumentar a disponibilidade de NO e diminuir o estresse oxidativo endotelial (Deng *et al.*, 1995; Ackermann *et al.*, 1998). Adicionalmente, estudos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório (Gouvea *et al.*, 2002; Gouvea *et al.*, 2004) apontam para o tratamento com L-arg como promissor não somente na redução da hipertensão arterial, mas sobretudo, na proteção de órgãos-alvo, nesses estudos, os animais que receberam L-arginina tiveram uma redução nos níveis hipertensores da ordem de 25% após 7 dias de tratamento na hipertensão renovascular. Além do efeito sistêmico sobre a PA, a L-arginina promoveu diurese e natriurese nos hipertensos tratados, reverteu a hipertrofia cardíaca, aumentou a massa do rim clipado e reduziu significativamente a atividade da ECA no plasma, coração e rim cuja artéria renal recebeu o clipe. Vários mecanismos poderiam justificar as ações do tratamento com L-arg, um deles seria o aumento na formação de NO no rim. O aumento na formação de NO pode ser um componente importante na reversão da hipertensão renovascular 2R1C por facilitar a reperfusão renal, cardíaca e promover vasodilatação sistêmica.

Entretanto, a associação do alisquireno e da L-arg foi capaz de restaurar totalmente a PA sugerindo um possível efeito aditivo associado à combinação dessas terapias (ALSK+L-arg).

Assim, conhecendo a fisiopatologia da hipertensão renovascular, a alteração de PAS desses ratos poderia estar associada com as alterações vasculares, assim a reatividade vascular à fenilefrina em anéis de aorta foi avaliada a fim de compreender a influencias dos diferentes tratamentos proposto no estudo sobre a disfunção endotelial produzida pela hipertensão 2R1C.

5.2 EFEITO DOS TRATAMENTOS COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR À FENILEFRINA NA AORTA

A Fenilefrina (agonista α_1 adrenérgico) promoveu resposta vasoconstrictora concentração dependente. Conforme esperado, os animais do grupo 2R1C apresentaram uma hipercontratilidade em relação aos demais grupos, Sugere-se que a hipertensão 2R1C pode desencadear um desequilíbrio na síntese e/ou na liberação de fatores endoteliais responsáveis pela vasomotricidade de aorta torácica.

Por outro lado, no presente estudo, observou-se que os tratamentos com ALSK, L-arg ou sua associação ALSK+L-arg promoveram uma diminuição, concentração dependente, da reatividade à fenilefrina em anéis de aorta comparado ao grupo 2R1C. Resultado semelhante foi encontrado por Batenburg *et al* (2013) que demonstrou melhora da disfunção endotelial e redução para pressão arterial após 3 semanas de tratamento com alisquireno em ratos diabéticos hipertensos. Contudo, este estudo mostrou uma diminuição da reatividade, concentração dependente em leito mesentérico.

Sendo assim, esses achados apontam que apesar de a monoterapia de alisquireno não promover efeito antihipertensivo em ratos 2R1C ele promove redução da disfunção vascular em anéis de aorta torácico.

A modulação endotelial foi avaliada através de um protocolo de reatividade vascular na ausência e na presença do endotélio vascular. De acordo com os resultados, Na ausência do endotélio a resposta contrátil a fenilefrina foi potencializada em todos os grupos estudados. No entanto, a magnitude dessa resposta, avaliada através da área abaixo da curva, foi maior no grupo tratado com

ALSK + L-arg quando comparado somente com os grupos 2R1C e ALSK. Esses dados associados à diminuição da reatividade vascular a FE sugerem que o tratamento de ALSK+L-arg foi mais potente em liberar um fator de relaxamento derivado do endotélio.

O endotélio funciona como regulador do tônus vascular por liberar substâncias vasoconstrictoras e vasodilatadoras. No entanto, em diversas condições patológicas como na hipertensão arterial, o equilíbrio na liberação dessas substâncias encontra-se alterado (Luscher *et al.*, 1992; Triggle *et al.*, 2003). No presente trabalho pode-se pressupor que há alteração endotelial advinda da hipertensão renovascular e que os tratamentos, principalmente o tratamento com ALSK+L-arg, seja capaz de restaurar o desequilíbrio na síntese, na liberação e/ou no efeito de algum desses mediadores capazes de relaxar ou contrair o músculo liso vascular.

5.3 EFEITO DOS TRATAMENTOS COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE E INDEPENDENTE DO ENDÓTELIO.

A partir dos resultados descritos acima, que demonstram um desequilíbrio na função endotelial, foi investigado como a hipertensão 2R1C e os diferentes tratamentos propostos alterava o relaxamento vascular dependente do endotélio. Para isto, foram realizadas curvas concentração resposta a acetilcolina, que promove relaxamento dependente do endotélio, em anéis de aorta. Nossos achados demonstram que somente o grupo ALSK+L-arg restaurou o relaxamento dependente do endotélio, sugerindo que a vasodilatação dependente do endotélio foi preservada nesse grupo, ou seja, não alterou a produção de NO pela acetilcolina. Por outro lado os demais grupos (2R1C, ALSK e L-arg) apresentaram um prejuízo curvas concentração resposta a acetilcolina, sugerindo uma alteração da produção de NO estimulada pela acetilcolina.

Entretanto, ao avaliarmos a resposta máxima, observamos que o grupo L-arg, assim como o grupo ALSK+L-arg, se assemelha ao grupo Sham demonstrando que a monoterapia de L-arg também restaura o relaxamento dependente do endotélio, ou seja, foi capaz de prevenir o prejuízo na produção e/ou liberação de NO pela acetilcolina promovida pela hipertensão renovascular.

Resultados semelhantes foram encontrados por Guo *et al.* (2000) que demonstraram que a hipertensão renovascular promoveu prejuízo na vasodilatação induzida por acetilcolina e um marcado aumento da contração induzida por fenilefrina, ainda nesse estudo, os autores demonstram que o tratamento por quatro semanas com L-arg foi efetivo em restaurar parcialmente a reatividade aórtica de ratos com hipertensão renovascular.

Imanishi *et al.* (2008) demonstraram um aumento na concentração plasmática de NO em resposta a infusão intra aórtica de acetilcolina em ratos espontaneamente arteriosclerótico tratados com alisquireno, entretanto esse resultado foi significativamente potencializado quando o alisquireno foi associado ao valsartan, bloqueador seletivo do receptor AT₁, sugerindo que o tratamento com alisquireno promove efeito protetor na disfunção endotelial, mas que a monoterapia não é tão eficaz quanto a sua associação com outros fármacos. Essas diferenças entre resultados podem ser devido aos diferentes modelos experimentais avaliados além de diferente dosagens da droga e tempo de exposição.

Para avaliar se a hipertensão renovascular e os diferentes tratamentos propostos promovem prejuízo no relaxamento do músculo liso vascular, foram realizados experimentos com o nitroprussiato de sódio (NPS). O NPS promoveu resposta vasodilatadora, concentração dependente, semelhante em todos os grupos experimentais, sugerindo que nem a hipertensão 2R1C e nem os tratamentos modificaram a capacidade de relaxamento do músculo liso vascular. Resultados semelhantes foram encontrados por Arruda *et al.* (2005), que também mostraram que não houve diferença no relaxamento induzido pelo NPS 28 dias após indução da hipertensão renovascular. Contudo, este estudo foi avaliado a reatividade ao NPS concentração dependente em leito mesentérico.

A partir destes resultados, poder-se-ia supor que os tratamentos com alisquireno, L-arg e principalmente a associação dessas drogas influencia a liberação de fatores vasodilatadores derivado do endotélio. Os mecanismos pelos quais a hipertensão 2R1C altera a reatividade vascular é bastante discutidos, entretanto a influencia do tratamento com as droga alisquireno e L-arginina nessa hipertensão ainda não foi investigado. Assim, no presente estudo, desenvolvemos

um experimento para avaliar os efeitos do tratamento com alisquireno e L-arginina na disfunção endotelial em ratos com hipertensão renovascular. Nós selecionamos o modelo 2R1C que foi desenvolvido por Goldblatt décadas atrás, porque a disfunção endotelial é uma característica precoce da hipertensão 2R1C que é dependente do SRAA (Arruda *et al.*, 2005). Neste sentido, o estudo propôs investigar algumas vias que possivelmente poderiam esclarecer a ação vascular desses tratamentos em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular.

5.4 FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO EFEITO DOS TRATAMENTOS COM ALISQUIRENO E L-ARGININA DE RATOS COM HIPERTENSAO RENOVASCULAR SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA

5.4.1 Efeito dos Tratamentos com Alisquireno e L-arginina de Ratos com Hipertensão Renovascular na Via do Óxido Nítrico

Considerando os resultados do presente estudo procuramos avaliar se os diferentes tratamentos proposto no estudo aumentariam os efeitos vasodilatadores do endotélio, através do aumento da biodisponibilidade de NO. Dentre os fatores vasoativos derivados do endotélio, o NO é o principal fator relaxante do endotélio que modula as respostas contráteis vasculares a diferentes agonistas (Li *et al.*, 2014). Assim, com o objetivo de avaliar uma possível participação dessa via, foi realizada uma curva concentração resposta à fenilefrina na presença de L-NAME, um inibidor inespecífico da síntese do NO. Este fármaco, ao inibir a NOS, impede a síntese de NO e, conseqüentemente, a formação de GMPc na célula muscular.

Alterações na via do NO, têm sido extensivamente descritas em estudos experimentais com hipertensão renovascular (Wickman *et al.*, 2001; Gava *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014)

A disfunção endotelial é comumente observada na hipertensão arterial crônica e caracteriza-se pela deficiência de óxido nítrico (NO) biodisponibilidade e aumento nos níveis de ROS. Neste estudo, o L-NAME, em anéis de ratos 2R1C tratados com alisquireno, L-arginina ou a combinação de ambos potencializou a resposta vasoconstrictora à fenilefrina em todos os grupos analisados, entretanto, essa resposta foi potencializada em maior proporção no grupo ALSK+L-arg quando comparado ao grupo 2R1C. Sugerindo que o tratamento associado (ALSK+L-arg)

em anéis de aorta além de diminuir a reatividade vascular, aumenta a modulação endotelial na resposta contrátil a fenilefrina por aumentar a biodisponibilidade de NO. Dessa forma, dentre os tratamentos estudados, o tratamento com ALSK+L-arg mostrou ser efetivo no relaxamento induzido pela Ach e apresentou um aumento da biodisponibilidade de NO local.

Evidências sugerem que o tratamento com alisquireno aumenta a biodisponibilidade de NO e melhora arteriosclerose em modelos animais (Imanishi *et al.*, 2008; Nussberger *et al.*, 2008). Adicionalmente, a suplementação oral de L-arginina vem demonstrando ser efetiva no aumento substancial dos níveis de NO e do status antioxidante, tanto em ratos como em humanos (Gouvea *et al.*, 2004; Jabłęcka *et al.*, 2004). Ainda nesse sentido, Ochiai *et al.* (2012) sugerem que a suplementação de L-citrulina promove melhora funcional da rigidez arterial em humanos.

A fim de explicar por qual mecanismo estaria ocorrendo o aumento da modulação endotelial pelo NO, a expressão proteica de eNOS e iNOS foram avaliadas. Os resultados do presente estudo obtidos pela técnica de Western Blot demonstraram que a hipertensão renovascular aumentou a expressão proteica da isoforma de eNOS, corroborando Hyoshi *et al.* (2005), o qual também demonstrou que a hipertensão renovascular aumenta os níveis aórticos totais de eNOS. Adicionalmente, estudos apontam que forças mecânicas na prede vascular, como elevada pressão arterial e *Shear stress* são fatores que elevam a expressão endotelial de eNOS (Rochette *et al.*, 2013). Por conseguinte, corroborado com os dados funcionais, o aumento da eNOS no grupo 2R1C pode ser um mecanismo compensatório perante a hipercontratibilidade a fenilefrina associada ao prejuízo no relaxamento induzido pela Ach em anéis de. Recentemente, Silva *et al.*, 2014 demonstraram que a ativação dos receptores alfa-1 adrenérgicos, através da fenilefrina, contribui para o aumento da fosforilação da eNOS, no resíduo Ser¹¹⁷⁷ em aorta de ratos com hipertensão 2R1C, que, conseqüentemente, diminui a resposta contrátil induzida pelo fenilefrina. No entanto, apesar das melhorias nas respostas vasculares mediadas pelo NO, a expressão da proteína da eNOS nos grupos tratados com alisquireno, tanto de forma isolada ou em associação com L-

arginina, não foi alterada, sugerindo que esses tratamentos preveniram uma resposta compensatórias a alterações locais.

Seguindo o propósito de elucidar os mecanismos de ação da hipertensão renovascular e os diferentes tratamentos propostos nesse estudo na via do óxido nítrico, o próximo passo foi avaliar a isoforma induzível de óxido nítrico (iNOS). Relatos prévios mostram que a iNOS está presente em uma variedade de tecidos, principalmente em resposta a mediadores endógenos da inflamação, hipóxia e estresse oxidativo (Sun *et al.*, 2010). Além disso, o aumento da atividade e da expressão da iNOS está bem descrita em doenças inflamatórias como, por exemplo, a hipertensão arterial (Briones *et al.*, 2000; Álvarez *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2010).

Nossos dados demonstram que a hipertensão renovascular aumentou a expressão de iNOS nos anéis de aorta de ratos 2R1C. No entanto, também foi demonstrado que a iNOS foi significativamente reduzida em todos os grupos de tratamentos, sugerindo que ambas as drogas foram eficazes na prevenção do aumento da regulação da iNOS observada em ratos 2K1C. Este achado é importante porque a Ang II pode induzir um aumento da expressão de iNOS em células endoteliais, e este efeito está associado ao aumento do estresse oxidativo e geração de EROs (Alvaréz *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2010). Além disso, estudos anteriores demonstraram que a iNOS é capaz de gerar o superóxido independentes da produção de NO (Rochette *et al.*, 2013; Amaral *et al.*, 2013). Sendo assim, parece que os tratamentos propostos nesse estudo são capazes de controlar o aumento da isoforma iNOS em aorta de ratos com hipertensão renovascular e possivelmente pela modulação do SRAA local.

Baseado nesses dados especulou-se sobre a participação do sistema renina-angiotensina vascular nesse modelo experimental.

5.4.2 Participação da Angiotensina II local sobre o efeito dos Tratamentos com Alisquireno e L-arginina de Ratos com Hipertensão Renovascular

Está bem documentado que o aumento da atividade do SRAA desempenha um papel importante no desenvolvimento e manutenção de hipertensão 2R1C. A interação entre os diferentes componentes do SRAA determina sua atividade e influencia a regulação da pressão arterial, balanço renal de sódio e risco

cardiovascular (Lacolly *et al.*, 2009). Dentre os componentes do SRAA, a angiotensina II exerce efeito predominante no tônus vascular, mediado via interação com o receptor de angiotensina do subtipo 1 (AT_1) do músculo liso vascular (Griendling *et al.*, 1996; Rajagopalan *et al.*, 1996). A angiotensina II exerce numerosos efeitos no sistema cardiovascular, entre eles: vasoconstrição, crescimento de células do músculo liso celular, hipertrofia miocárdica, fibrose, disfunção endotelial e inflamação vascular (Rajagopalan *et al.*, 1996). Além disso, a angiotensina II contribui para hipertensão arterial via seu efeito central, vascular e renal.

A angiotensina II também é considerada como importante mediador do estresse oxidativo vascular, sendo esta uma potente ativadora da NAD(P)H oxidase, liberando radicais livres (Rajagopalan *et al.*, 1996; Doughan *et al.*, 2008; Qin *et al.*, 2008; Garrido & Griendling, 2009).

Mediante essas informações investigamos a participação da Ang II local na resposta contrátil a fenilefrina utilizando o Enalapril, um inibidor da ECA e também o Losartan, um inibidor do receptor de Ang II do subtipo AT_1 em ratos com hipertensão renovascular tratados com Alisquireno e sua associação com a L-arginina.

Os segmentos de aorta foram incubados com enalapril, para bloquear a ECA, e conseqüentemente, reduzir a formação de Ang II. Este fármaco promoveu redução da resposta contrátil à FE somente nos anéis do grupo 2R1C e no grupo tratado com alisquireno. Pode-se deduzir que a hipertensão renovascular e a monoterapia com alisquireno são capazes de estimular a atividade da ECA local e promover aumento de angiotensina II local para interagir com os receptores do subtipo AT_1 no músculo liso vascular. Entretanto, se avaliarmos a área abaixo da curva entre esses grupos podemos observar uma redução significativa no grupo tratado com ALSK quando comparado ao grupo 2R1C, demonstrando uma possível redução da Ang II local com esse tratamento. Por outro lado, o tratamento com L-arginina isolado ou a associação dos tratamentos (ALSK+L-arg) foram eficazes na redução da angiotensina II local, podendo ser esse um dos fatores que reduziu a resposta constritora a fenilefrina e restaurou a vasodilatação dependente do endotélio.

Desta forma, para investigar a participação da angiotensina II local, no tratamento com alisquireno e L-arginina de ratos com hipertensão renovascular, foi utilizado um antagonista do receptor AT_1 , o losartan. Diferente do enalapril, o losartan reduziu a resposta contrátil à fenilefrina nos grupos 2R1C, ALSK, L-arg e ALSK+L-arg. Sugerindo que a hipertensão renovascular foi capaz de promover um *upregulation* do receptor AT_1 . Ao avaliarmos a R_{max} entre os grupos observamos que essa estava reduzida nos grupos L-arg e ALSK+L-arg comparados aos grupos 2R1C e Sham demonstrando a eficiência desses tratamentos em modular o receptor AT_1 local. Corroborando esses dados, a expressão proteica do receptor AT_1 local apresentou um *upregulation* no grupo 2R1C comparado com os grupos Sham, ALSK e ALSK+L-arg demonstrando que os tratamentos propostos, principalmente a combinação de ALSK+L-arg, são capazes de modular tanto a concentração de Angio II local quando a expressão de AT_1 local.

Estudos prévios demonstraram que o receptor AT_2 é contraregulatório das ações vasoconstritoras de Ang II via AT_1 , assim dentre uma dessas ações destaca-se a vasodilatação. Embora a via ainda não esteja completamente esclarecida, especula-se ocorrer por um mecanismo endotélio-dependente, envolvendo receptores de Bradicinina do tipo 2 (BK2), NO e guanosina cíclica 3',5'-monofosfato (Siragy & Carey, 1997; Hannan *et al.*, 2003). Sendo assim, avaliamos a expressão proteica desse subtipo de receptor endotelial (AT_2) a fim de compreender o envolvimento dessa via na hipertensão renovascular e diante dos diferentes tratamentos propostos.

A expressão proteica de AT_2 apresentou um *upregulation* no grupo ALSK+L-arg comparado aos grupos Sham e L-arg, entretanto não demonstrou diferenças em relação ao grupo 2R1C sugerindo que a modulação vascular promovida pelo tratamento com ALSK+L-arg não seja mediada via AT_2 e sim AT_1 .

Estudos recentes têm demonstrado que alterações da liberação de angiotensina II local e dos prostanóides vasoconstritores aumentam a liberação de EROs em aorta de ratos normotensos (WKY), SRH (Alvarez *et al.*, 2005) e também em ratos com hipertensão renovascular (Dias *et al.*, 2014). Em adição, Griendling *et al.*, (1994, 2000), documentaram que a Ang II foi capaz de aumentar as EROs

derivadas da NADPH oxidase. Assim, especulou-se sobre a participação desta via no aumento da liberação de radicais livres.

5.4.3 Efeito dos Tratamentos com Alisquireno e L-arginina de Ratos com Hipertensão Renovascular na via dos radicais livres

O estresse oxidativo pode afetar a reatividade vascular por diferentes mecanismos. As EROs funcionam como segundo mensageiros, ativando numerosas moléculas sinalizadoras e desempenham um papel importante na fisiopatologia vascular (Touyz & Schiffrin, 2004, 2008; Alvaréz *et al.*, 2008). Além disso, o stress oxidativo está envolvido na patogênese da arteriosclerose, acometimentos neurodegenerativas, câncer e muitas outras desordens incluindo a hipertensão arterial (Vaziri & Khan, 2007).

O ânion superóxido é produzido por uma variedade de enzimas, incluindo xantina oxidase, ciclooxigenase e a NADPH oxidase. Esta última desempenha maior função nas células vasculares (Kawashima & Yokorama, 2004). Está bem estabelecido que a NADPH oxidase é a principal fonte vascular de O_2^- (Harrinson & Gongora, 2009; Griending *et al.*, 2000; McIntyre *et al.*, 1999). Hamilton *et al.* (2002) estudaram inibidores da NADPH oxidase, e demonstraram que a apocinina foi o composto com maior potencial para reduzir a produção de O_2^- . Estes pesquisadores demonstraram que o tratamento com apocinina em artérias isoladas de ratos diminuiu a produção de radicais livres estimulados pela NAD(P)H oxidase e aumentou a biodisponibilidade de NO, resultados semelhantes foram encontrados em artérias e veias de humanos (Ni *et al.*, 2004).

Deste modo, a apocinina, foi utilizada para avaliar a via dos radicais livres no tratamento com alisquireno e L-arginina de ratos com hipertensão renovascular. O presente estudo demonstrou que este fármaco reduziu a reatividade vascular à fenilefrina somente nos segmentos arteriais dos grupos 2R1C, ALSK e ALSK+L-arg. No entanto na situação controle e no grupo tratado com L-arginina a apocinina não alterou a reatividade vascular. Portanto, esse resultado sugere que a enzima NADPH oxidase estaria estimulada no grupos 2R1C, ALSK e ALSK+L-arg, entretanto, a magnitude dessa resposta, avaliada através da área abaixo da curva,

foi maior no grupo tratado com 2K1C quando comparado ao grupo ALSK+L-Arg, sugerindo que o tratamento com a associação do ALSK+L-arginina foi capaz de minimizar a liberação/ ativação de radicais livres nesse modelo de hipertensão arterial. Entretanto, o tratamento com L-arginina isoladamente não alterou a reatividade vascular à fenilefrina, sugerindo que a L-arginina pode ser o principal fator envolvido na redução da liberação de ROS.

Ainda com a finalidade de investigar a participação do O_2^- , no tratamento com alisquireno e L-arginina em ratos com hipertensão renovascular foram realizadas curvas-concentração resposta a fenilefrina com a SOD, um sequestrador do ânion superóxido. A SOD dismuta o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e uma molécula de oxigênio e reduz os efeitos tóxicos do ânion superóxido (Touyz & Schinffrin, 2004).

A presença da SOD promoveu uma redução da reatividade vascular à fenilefrina somente nos grupos 2R1C e no grupo tratado com a monoterapia de alisquireno. Portanto, esse resultado sugere que existe uma concentração maior do O_2^- nos aneis expostos a hipertensão e no tratamento isolado com ALSK, entretanto, a magnitude dessa resposta, avaliada através da área abaixo da curva, foi maior no grupo 2R1C quando comparado ao grupo ALSK, sugerindo que o tratamento com a ALSK foi capaz de minimizar a liberação/ ativação de radicais livres nesse modelo de hipertensão arterial.

Somam-se aos resultados funcionais, os resultados obtidos pela expressão da subunidade gp91phox e expressão da enzima antioxidante SOD 2, os quais demonstraram que a hipertensão renovascular e a monoterapia de alisquireno aumentaram a expressão proteica de gp91phox comparado aos grupos Sham e ALSK+Larg, sugerindo que a disfunção endotelial observada no grupo 2R1C pode ser causado por um aumento na liberação de EROs, o que levaria a uma redução na biodisponibilidade de NO.

Corroborando esses achados, Jung *et al.*, (2004) reportaram que o aumento nas EROs causados pelo aumento na expressão das subunidades gp91phox e p22phox da NAD(P)H oxidase e do receptor AT_1 em ratos com hipertensão renovascular é um dos principais fatores responsáveis pela disfunção endotelial,

repercutindo em prejuízo na reatividade vascular. Por conseguinte, a estimulação de AT_1 pela Ang II estimula a NAD(P)H oxidase, resultando em aumento na geração do anion superóxido (Yung *et al.*, 2011). Além disso, sabe-se que o estresse oxidativo pode interferir na reatividade vascular por diferentes mecanismos, dentre eles, por meio de maiores concentrações de NO geradas a partir da iNOS, os quais podem reagir com EROs para produzir peroxinitrito, o que facilita a instalação de um estado pró-oxidante e aumenta o tônus vasoconstritor nas artérias (Cau *et al.*, 2012).

Adicionalmente, observamos que a expressão da enzima SOD 2 apresentou-se elevada no grupo ALSK+L-arg comparado aos grupos 2R1C, ALSK e L-arg, demonstrando a capacidade antioxidante da associação das drogas nesse modelo de hipertensão.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo revelam que após 21 dias de hipertensão renovascular foi observado significativo aumento da PA, aumento da reatividade vascular a fenilefrina, prejuízo no relaxamento à acetilcolina aumento da expressão proteica da eNOS e iNOS associada com aumento da expressão do receptor de AT₁ vascular e da subunidade da gp91phox, sugerindo que os efeitos vasculares da hipertensão 2R1C são dependentes do endotélio e envolvem o aumento da biodisponibilidade do NO, parte deste parecendo ser derivado da iNOS. Soma-se a estes achados, a participação do sistema renina-angiotensina como um dos possíveis mediadores do aumento da reatividade vascular a fenilefrina e ao prejuízo do relaxamento. O aumento da expressão de AT₁ associada ao aumento da liberação de angiotensina II local poderiam ativar a NADPH oxidase e consequentemente aumentar as EROs. Entretanto, nosso trabalho demonstra pela primeira vez que o tratamento com alisquireno associado a L-arginina foi efetivo em reduzir a PA e prevenir a disfunção endotelial em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular, além disso, apontamos que os mecanismos envolvidos nesses efeitos parecem estar relacionados com uma modulação local do SRAA e com uma redução do estresse oxidativo local mediado pelo sistema NAPH oxidase.

Portanto, nossos dados revelam os efeitos benéficos do alisquireno associado a L-arginina sugerindo que essa droga possa ser um novo agente anti-hipertensivo, especialmente como um medicamento adicional em doentes com hipertensão resistente e em pacientes com disfunção endotelial e doença renal.

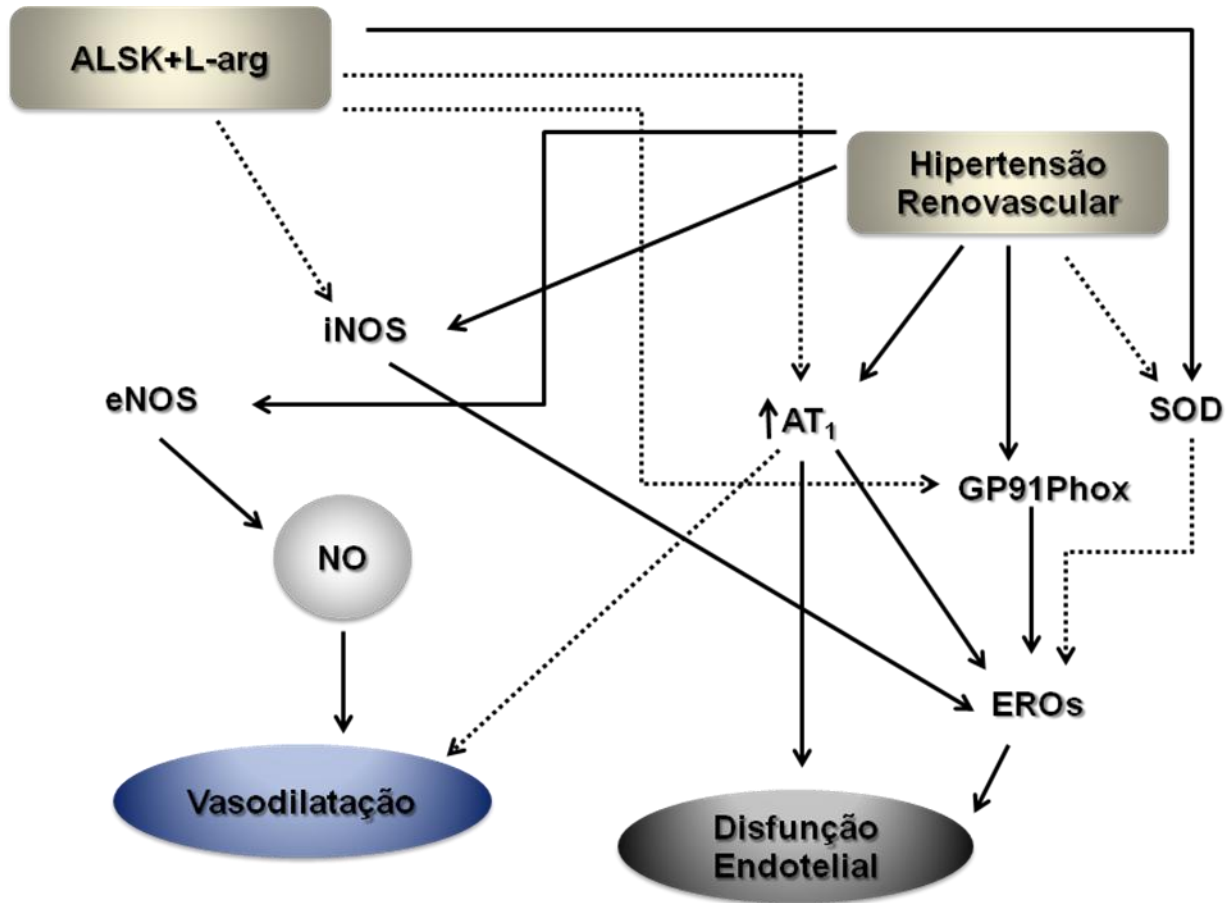


Figura 28: Diagrama esquemático mostrando os mecanismos propostos para a disfunção endotelial em anéis de aorta torácica de ratos com hipertensão renovascular e a normalização dos efeitos pelo tratamento com alisquireno + L-arginina.> inibição da via —> estimulação da via.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu GR, Futuro-Neto HA, Cabral AM, Vasquez EC. L-arginine restores the effect of ouabain on baroreceptor activity and prevents hypertension. *Hypertension* 1999; 34[part 2]: 729-732.

Ackermann A, Fernández-Alfonso MS, Sánchez de Rojas R, Ortega T, Paul M, González C. Modulation of angiotensin-converting enzyme by nitric oxide. *British Journal of Pharmacology*, 1998; 124:291-298.

Alvaréz Y, Briones AM, Balfagón G, Alonso MJ, Salaceis M. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *Journal of Hypertension*.2005; 23(4):767-777.

Alvaréz Y, Briones AM, Hernanz R, Pérez-Girón JV, Alonso MJ, Salaceis M. Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. *British Journal of Pharmacology*.2008; 153:926-935.

Amaral LM, Pinheiro LC, Guimaraes DA, Palei AC, Sertório JT, Portella RL, et al. Antihypertensive effects of inducible nitric oxide synthase inhibition in experimental pre-eclampsia. *J Cell Mol Med* 2013; 17(10): 1300-1307.

Andersen K, Weinberger MH, Constance CM, et al. Comparative effects of aliskiren-based and ramipril-based therapy on the renin system during long-term (6 months) treatment and withdrawal in patients with hypertension. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2009; 10(3):157–167.

Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide syntases. *Cardiovascular Research*.1999; 43:521-531.

Angeli JK. Efeitos do Gadolínio sobre a reatividade vascular em aorta de ratos. 2009.113f. Tese de Mestrado em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo.

Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 1994; 343: 1199-1206.

Antmam EM, DeMets D, Loscalzo J. Ciclooxygenase inhibition and cardiovascular risk. *Circulation*.2005; 112: 759-770.

Aronson JK, Duker MNG. Meyler's Side Effects of Drugs. 15 ed. Amsterdam: Elsevier, 2006.p 3378.

Arruda R.M., Peotta V.A., Meyrelles S.S., Vasquez E.C. Evaluation of vascular function in apolipoprotein E knockout mice with angiotensin-dependent renovascular hypertension. *Hypertension*. 2005; 46(4): 932-6.

Atlas SA. The rennin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm*. 2007; 13(8 Suppl B):9-20.

Azizi M, Menard J, Bissery A, et al. Pharmacologic demonstration of the synergistic effects of a combination of the renin inhibitor aliskiren and the AT1 receptor antagonist valsartan on the angiotensin II-renin feedback interruption. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15(12):3126–3133.

Azizi M, Webb R, Nussberger J, Hollenberg NK. Renin inhibition with aliskiren: Where are we now, and where are we going? *J Hypertens*. 2006; 24(2):243–256.

Bader M. Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010; 50: 439–465.

Bakris GL, Mesah GA. Pathogenesis and clinical physiology of hypertension. *Cardiological Clinical*. 2002; 20: 195-206.

Batenburg WW, van den Heuvel M, van Esch JH, van Veghel R, Garrelds IM, Leijten F, Danser AH. The (pro)renin receptor blocker handle region peptide upregulates endothelium-derived contractile factors in aliskiren-treated diabetic transgenic (mREN2)27 rats. *J hypertens*, 2013; 31(2): 292-302.

Beal MF, Serial review: Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radical Biology & Medicine*. 2002; 32(9): 797-803.

Beltrán AE, Briones AM, Garcia-Redondo AB, Rodríguez C, Miguel M, Álvarez Y. Alonso MJ. Martínez-González J, Salices M. p38 MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats. *Journal of Hypertension*. 2009; 27: 141-154.

Bohr DF, Webb RC. Vascular smooth muscle function and its changes in hypertension. *American Journal of Medicine*. 1984; 77: 3-16.

Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium dependent potassium channels in vascular smooth muscle cells. *Nature*.1994; 368: 850-853.

Bolton TB, Lang RJ, Takewaki T. Mechanism of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery. *Journal Physiology*.1984; 351: 594-572.

Bortolotto LA, Malachias MVB. Novos medicamentos na hipertensão resistente. *Rev Bras Hipertens*. 2009; 16(supl. 1):S13-5.

Brasil. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=1095 acesso em 17.07.2012.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Formulário Terapêutico Nacional 2010: Rename 2010. 2a. edição. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/FTN_2010.pdf.

Briones AM, Alonso MJ, Marín J, Balfagon G, Salaceis M. Influence of hypertension on nitric oxide synthase expression and vascular effects of lipopolysaccharide in the mesenteric arteries. *British Journal of Pharmacology*.2000; 131(2): 185-194.

Buñag R.D. Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *Journal of applied physiology* 1973; 34(2): 279-282.

Cai H, Harrinson DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidative stress. *Circulation Research*.2000; 87:840-844.

Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovascular Research*. 2005; 68: 26-36.

Campagnaro BP, Gava AL, Meyrelles SS et al., Cardiac- autonomic imbalance and baroreflex dysfunction in the renovascular angiotensin-dependent hypertensive mouse. *International*

Journal of Hypertension. 2012; Article ID 968123, 9 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/968123>.

Campagnaro BP, Tonini CL, Nogueira BV, Casarini DE, Vasquez EC, Meyrelles SS. DNA Damage and Augmented Oxidative Stress in Bone Marrow Mononuclear Cells from Angiotensin-Dependent Hypertensive Mice. *International Journal of Hypertension* 2013, Article ID 305202, 10 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/305202>

Cannon III RO. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clinical Chemistry*.1998; 44(8): 1809-1819.

Carretero OA, Oza BN, Scicli AG, Schork A. Renal tissue kallikrein, plasma renin and plasma aldosterone in renal hypertension. *Acta Physiol Lat Am* 1974; 24: 448.

Ceron CS, Castro MM, Rizzi E, *et al*, Spironolactone and hydrochlorothiazide exert antioxidant effects and reduce vascular matrix metalloproteinase-2 activity and expression in a model of renovascular hypertension. *British Journal of Pharmacology* 2010; 160(1):77–87.

Cervenka L., Vaneckova I., Maly J., Horacek V., EL-Cahr S.S. Genetic inactivation of the B₂ receptor in mice worsens two-kidney, one-clip hypertension: role of NO and the AT₂ receptor. *J.Hypertens*. 2003; 21: 1531-1538.

Cheung BMY. Blockade of the rennin angiotensin system. *HKMJ* 2002; 8:185-91.

Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, *et al*; National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*. 2003; 289(19):2560-72.

Cianci R, Martina P, Borghesi F, *et al*. Revascularization versus medical therapy for renal artery stenosis: antihypertensive drugs and renal outcome. *Angiology*. 2011; 62(1):92-99.

Cogan MG. Neurogenic regulation of proximal bicarbonate and chloride reabsorption. *Am J Physiol* 1986; 250(1 Pt 2): F22-6.

Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2032-2037.

Cooper RS, Wolf-Maier K, Luke A, Adeyemo A, Banegas JR, Forrester T, et al. An international comparative study of blood pressure in populations of European vs. African descent. *BMC Med.* 2005; 3:2.

Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, Oliveira-dos-Santos AJ, Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappel MC, Barkx H, Yagil Y, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature.* 2002; 417: 822-828.

Cruzado MC, Risler NR, Miatello RM, Yao G, Schiffrin EL, Touyz M. Vascular smooth muscle cell NA(P)H oxidase activity during the development of hypertension: Effect of angiotensin II and role of insulinlike growth factor-1 receptor transactivation. *American Journal of Hypertension.* 2005; 18: 81-87.

Dahlof B, Pennert K, Hansson L. Reversal of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. A metaanalysis of 109 treatment studies. *Am J Hypertens* 1992; 5:95-110.

Danser AH. (Pro)renin receptors: Are they biologically relevant? *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2009; 18(1):74–78.

Das S, Mattson DL. Exogenous L-Arginine Attenuates the Effects of Angiotensin II on Renal Hemodynamics and the Pressure Natriuresis-Diuresis Relationship. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2014; 41(4): 270-278.

Davidge ST. Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circulation Research.* 2001; 89: 650-660.

Deng X, Welch WJ, Wilcox CS. Renal vasodilation with l-arginine. *Hypertension,* 1995; 26:256-262.

Dias A.T, Cintra A.S, Frossard J.C, Palomino Z., Casarini D.E, Gomes I.B.S, et al., Inhibition of phosphodiesterase 5 restores endothelial function in renovascular hypertension. *Journal of Translational Medicine* 2014; 12:250.

Dias AT, Rodrigues BP, Porto ML, Gava AL, Balarini CM, Freitas FP, Palomino Z, Casarini DE, Campagnaro BP, Pereira TM, Meyrelles SS, Vasquez EC: Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice with renovascular hypertension. *J Transl Med.* 2014; 12:35.

DiBona GF. Neural control of renal tubular sodium reabsorption of the dog. *Fed Proceed* 1978; 37: 1214-7.

Doughan A, Harrison DG, Dikalov SI. Molecular Mechanisms of Angiotensin II-Mediated Mitochondrial Dysfunction. *Circulation Research*. 2008; 102: 488-496.

Duprez DA, Davis P and Botha J. The AGELESS Study: The Effect of Aliskiren vs Ramipril Alone or in Combination with Hydrochlorothiazide and Amlodipine in Patients ≥ 65 Years of Age with Systolic Hypertension. *Circulation* 2008; 118: S886–S887.

Dzau VJ, Pratt RE. Renin angiotensin system: biology, physiology and pharmacology. In: The heart and cardiovascular system. *New York: Raven Press*, 1986:1631-62.

Ernst ME, Moser M. Use of diuretics in patients with hypertension. *N Engl J Med*. 2009; 361(22):2153–2164.

Escobar C, Echarri R, Barrios V. Emerging drug combinations to optimize renovascular protection and blood pressure goals *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease* 2012; 5:69-80.

Faber JE, Brody MJ. Neural contribution to renal hypertension following acute renal artery stenosis in conscious rats. *Hypertension* 1983; 5: 1155-64

Faselis C, Doumas M, Papademetriou V: Common secondary causes of resistant hypertension and rational for treatment. *Int J Hypertens* 2011; Carey RM: *Resistant hypertension*. *Hypertension* 2013, 61(4):746–750

Fazan R., da Silva V.J.D, Salgado H.C. Modelos de hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens* 2001; 18: 19-29.

Félétou M, Calcium- activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *British Journal of Pharmacology*. 2009; 159:545-562.

Félétou M, Vanhoutte PM. EDHF: an Update. *Clinical Science*. 2010; 117:139-155.

Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelium- dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*. 1988; 93:515-24.

Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelium- Derived hyperpolarizing factor(s) hiperolarize(s) coronary smooth muscle. *The Physiologist*. 1985; 48:325.

- Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelium- Derived hyperpolarizing factor. Where are we now? *Arteriosclerosis, Thromosis and Vascular Biology*.2006; 26: 1215-1225.
- Félétou M, Vanhoutte PM.The third pathway: endothelium-dependent hyperpolarization.*Journal Physiology Pharmacology*.1999; 50(4):525-34.
- Fennell JP, Brosnan MJ, Frater AJ, Hamilton CA, Alexander MY, Nicklin SA, Heistad DD, BakerAH, DominiczakAF. Adenovirus mediated overexpression of extracellular superoxide dismutase improves endothelial dysfunction in a rat model of hypertension. *Gene Ther* 2002; 9:110-7.
- Fleming I, Busse R. NO: the primary EDHF. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*.1999; 31: 5-14.
- Folkow B. Physiological aspects of primary hypertension.*Physiological Review*.1982; 62: 347-504.
- Forstermann U, Munzel T, Endothelial nitric oxide syntase in vascular disease. From Marvel to menace. *Circulation*.2006; 113: 1708-1714.
- Forstermann U,Closs EL, Pollock JS, Nakane M, Schwartz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide syntase isozymes.Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*.1994; 23: 1121-1131.
- Fraga-Silva RA, Da Silva DG, Montecucco F, Mach F, Stergiopulos N, da Silva RF, Santos RAS. The Angiotensin-Converting Enzyme 2/Angiotensin-(1–7)/Mas receptor axis: A potential target for treating thrombotic diseases. *Thrombosis and Haemostasis* 2012; 108(6):1089-96.
- Freis ED. Age, race, and sex and other indices of risk in hypertension. *American Journal of Medicine*.1973; 55: 275-280.
- Friedrich S, Schmieder RE. Review of direct renin inhibition by aliskiren. *Journal of the Renin-Angiotensin- Aldosterone System*. 2013; 14(3): 193–196.
- Frolish JC, Forstermann U, Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance. Advanced Prostaglandin.*Tromboxane and leukotriene research*.1989; 19:211-215.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxationof arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*.1980; 288: 373-6.

- Garovic VD, Kane CG, Schwartz GL. Renovascular hypertension: balancing the controversies in diagnosis and treatment. *Cleve Clin J Med*. 2005; 72(12):1135-44, 1146-7.
- Garrido AM, Griendling KK. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2009; 302: 148-158.
- Gava AL, Peotta VA, Cabral AM, Vasquez EC, Meyrelles SS. Overexpression of eNOS prevents the development of renovascular hypertension in mice. *Can J Physiol Pharmacol*. 2008; 86(7):458-64.
- Gavras H. Corcoran Lecture. Angiotensin-converting enzyme inhibition and the heart. *Hypertension* 1994; 23:813-8.
- Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF e Summerville WW. Studies on experimental hypertension. I The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med* 1934; 59: 347-9.
- Goodfriend TL, Elliott ME, Catt KJ. Angiotensin receptors and their antagonists. *N Engl J Med* 1996; 334:1649-54.
- Gouvea, SA, Bissoli NS, Moysés MR, Cicilini MA, Pires JGP, Abreu GR. Activity of Angiotensin-Converting Enzyme After Treatment with L-Arginine in Renovascular Hypertension. *Clinical and experimental hypertension*, 2004; 56:569-579.
- Gouvea, SA, Moysés MR, Bissoli NS, Pires JGP, Cabral AM, Abreu GR. Oral administration of L-arginine decreases blood pressure and increases renal excretion of sodium and water in renovascular hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2002; 36: 943-949.
- Gradman AH, Kad R. Renin Inhibition in Hypertension. *JACC*, 2008; 51(5): 519-528.
- Gradman AH, Schmieder RE, Lins RL, et al. Aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor, provides dose-dependent antihypertensive efficacy and placebo-like tolerability in hypertensive patients. *Circulation* 2005; 111: 1012–1018.
- Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: Mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation*. 2003; 108: 1912-1916.
- Griendling KK, Lasségue B, Alexander RW. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annual Review Pharmacology Toxicology*. 1996; 36: 281-306.

- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NAD(P)H oxidase activity in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*.2000; 86: 494-501.
- Griendling KK, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: Role in Cardiovascular biology and disease. *Circulation Research*.1994; 74: 1141-1148.
- Griendling KK, Ushio-Fukai M. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regulatory Peptides*.2000; 91: 21-27.
- Grizzo LT, Cordelline S. Perinatal exposure affects nitric oxide and cyclooxygenase pathways in aorta of weaned rats. *Toxicological Sciences*.2008; (1): 207-214.
- Guan S, Fox J, Mitchell KD, Navar LG. Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension* 1992; 20:763-7.
- Guo YM, Zhu XN, Pan JY. Nitric oxide changes aortic function in rats with renal hypertension. *Sheng Li Xue Bao*, 52(3): 243-6, 2000.
- Hall JE. Historical Perspective of the rennin- angiotensin system. *Molecular Biotechnology*.2003; 24: 27-38.
- Hamilton CA, Brosnam MJ, Al-Benna S, Berg G, Dominiczack AF. NAD(P)H oxidase inhibition improves endothelial function in rat and human blood vessels. *Hypertension*.2002; 40: 755-762.
- Han Y, Fan ZD, Yuan N, Xie GQ, Gao J, *et al*. Superoxide anions in paraventricular nucleus mediate the enhanced cardiac sympathetic afferent reflex and sympathetic activity in renovascular hypertensive rats. *J Appl Physiol*. 2011;110: 646–652.
- Hannan RE, Davis EA, Widdop RE. Functional role of angiotensin II AT2 receptor in modulation of AT1 receptor-mediated contraction in rat uterine artery: involvement of bradykinin and nitric oxide. *Br J Pharmacol*. 2003;140:987-995.
- Hannken T, Schroeder R, Stahl RAK, Wolf G. Angiotensin II- mediated expression of p27kip1 and induction of cellular hypertrophy in renal tubular cells depend on the generation of the oxygen radicals. *Kidney International*.1998; 54: 1923-1933.
- Harrap SB. Hypertension: genes versus environmental. *Lancet*.1994; 334 (8916): 169-171.

- Harrison DG, Gongora MC. Oxidative stress and hypertension. *The Medical Clinics and North America*. 2009; 93: 621-635.
- Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T, Chayama K: Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N Engl J Med* 2002, 346:1954–1962.
- Hiyoshi H, Yayama K, Takano M, Okamoto H. Angiotensin Type 2 Receptor–Mediated Phosphorylation of eNOS in the Aortas of Mice With 2-Kidney, 1-Clip Hypertension *Hypertension* 2005; 45:967-97.
- Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension* 1999; 33:613-21.
- Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan RG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiological Reviews*. 1996; 76 (4): 967-1003.
- Imanishi T, Tsujioka H, Ikejima H, Kuroi A, Takarada S, Kitabata H, Tanimoto T, Muragaki Y, Mochizuki S, Goto M, Yoshida K, Akasaka T. Renin inhibitor aliskiren improves impaired nitric oxide bioavailability and protects against atherosclerotic changes. *Hypertension*. 2008; 52(3): 563-72.
- Intengan H D & Schiffrin E L. Vascular remodeling in hypertension: Roles of apoptosis, inflammation and fibrosis. *Hypertension*. 2001; 38(3):581-7
- Jabłocka A, Chęciński P, Krauss H, Micker M, Ast J. The influence of two different doses of L-arginine oral supplementation on nitric oxide (NO) concentration and total antioxidant status (TAS) in atherosclerotic patients. *Med Sci Monit*. 2004; 10(1): CR29-32.
- Jadhav M, Yeola C, Zope G, Nabar A. Aliskiren, the first direct renin inhibitor for treatment of hypertension: The path of its development. *J Postgrad Med*. 2012; 58(1): 32-38.
- Johansson M, Elam M, Rundqvist B, et al. Increased sympathetic nerve activity in renovascular hypertension. *Circulation*. 1999; 99(19):2537-2542.
- Jordan J, Engeli S, Boye SW, le Breton S, Keefe DL. Direct renin inhibition with aliskiren in obese patients with arterial hypertension. *Hypertension*. 2007; 49(5):1047–1055.

- Jung O, Schreiber JG, Geiger H, Pedrazzini T, Busse R, Brandes RP. gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. *Circulation*. 2004, 109(14):1795-801.
- Kawabe J, Fumitaka U, Naoyuk H. Prostacyclin in Vascular Diseases. *Circulation Journal*.2010; 74: 837-843.
- Kawashima S, Yokoyama M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2004; 24: 998-1005.
- Kerr S, Brosnan J, McIntyre M, Reid JL, Dominiczak AF, Hamilton CA. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: Role of endothelium. *Hypertension*.1999; 33: 1353-1358.
- Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A (2007). The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacology Review*, 59(3): 251-287.
- Koh KK, Oh PC, Quon MJ. Does reversal of oxidative stress and inflammation provide vascular protection? *Cardiovascular Research*.2009; 81: 649-659.
- Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and A. Jabłocka, J. Ast, P. Bogdański, M. Drozdowski, K. Pawlak-Lemańska, et al. reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 562-571.
- Kokubu T, Ueda E, Joh T, et al. Purification and properties of angiotensin I-converting enzyme in human lung and its role on the metabolism of vasoactive peptides in pulmonary circulation. *Adv Exp Med Biol* 1979; 120B: 467–475.
- Kolluru GK, Siamwala JH, Chatterjee. eNOS phosphorylation in health and disease. *Biochimie*. 2010; 30:1-13.
- Lacolly P, Safar ME, Regnault V, Frohlich ED. Angiotensin II, mechanotransdução, and pulsatile arterial hemodynamics in hypertension. *American Journal Physiology Heart Circulatory Physiology*. 2009; 297:1567-1575.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:680-685.

Lang D, Mosfer SI, Shakesby A, Donaldson F, Lewis MJ. Coronary microvascular endothelial cell redox state in left ventricular hypertrophy: the role of angiotensin II. *Circ Res* 2000; 86:463-9.

Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. Canais para K^+ ativados por Cálcio e a regulação do tônus vascular. *Physiology*. 2006; 21: 69-79.

Lee J, Choi KC, Yeum CH, Kim W, Yoo K, Park JW, Yoon PJ: Impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in chronic two-kidney, one clip hypertensive rats. *Nephrol Dial Transplant* 1995, 10(5):619–623.

Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 1993; 329:1456-62.

Li H, Horke S, Förstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2014; 237(1): 208-219.

Liard J, Peters G. Role of retention of water and sodium in two types of experimental renovascular hypertension in the rat. *Pflüegers Arch* 1973; 344: 93-108.

Lincoln T, Dey N, Sellak H. Signal Transduction in smooth muscle. Invited review: cGMP-dependent protein Kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *Journal Applied Physiology*. 2001; 91:2001.

Loscalzo J. L-Arginine and atherothrombosis. *J Nutr* 2004; 134: 2798-2800.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951. 193:265-276.

Lucon AM, Praxedes JN, Mion Júnior D. Aspectos Históricos da Hipertensão Renovascular. In: Décio Mion Júnior D.; Júnior JER. (Org.). *Nefrologia*. 1996; 1 ed. São Paulo: Casa Editorial Venturia, v. 1: 110-114,1996.

Lupu AN, Maxwell MH, Kaufman JJ, White FN. Experimental unilateral renal artery constriction in the dog. *Cir Res* 1972; 30: 567.

Luscher TF, Boulanger CM, Dohi Y, Yang Z. Endothelium- derived contracting factors. *Hypertension*.1992; 19:117-130.

Macmahon S, Peto R, Cutler J. Blood pressure, stroke and coronary heart disease: effects of prolonged differences in blood pressure-evidence from nine prospective observational studies corrected for dilution bias. *Lancet*.1995; 335: 765-774.

Madamanchi et al. Oxidative Stress and Vascular Disease Arterioscler. *Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25: 29-38.

Mancini GB, Henry GC, Macaya C et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing Endothelial Dysfunction) Study. *Circulation* 1996; 94:258-65.

Mardini IA, FitzGerald GA. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: A growing class of anti-inflammatory drugs. *Molecular Interventions*.2001; 1(1): 30-8.

Marín J. Mechanisms involved in the increased vascular resistance in hypertension. *Journal of Autonomic Pharmacology*.1993; 13: 127-176.

Martinez-Maldonado M. Pathophysiology of renovascular hypertension. *Hypertension* 1991; 17: 707-19.

Martins-Oliveira A, Castro MM, Oliveira DM, Rizzi E, Ceron CS, Guimaraes D, Reis RI, Costa-Neto CM, Casarini DE, Ribeiro AA, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Contrasting effects of aliskiren versus losartan on hypertensive vascular remodeling. *Inter J Cardiol.* 2012; 167(4):1199-205.

Maschio G, Alberti P, Janin G. ACE inhibition in progressive renal insufficiency study group: effect of the angiotensin-convertingenzyme benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. *N Engl J Med* 1996; 334:939-45.

McCabe TJ, Fulton D, Romans LJ, Sessa WC. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "Calcium dependent" eNOS activation by phosphorylation. *The journal of biological chemistry.* 2000; 275 (9):6123-6128.

McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. Endothelial function in hypertension: The role of superoxide anion. *Hypertension*.1999; 34:539-545.

Messerli FH, Bangalore S, Julius S. Risk/benefit assessment of betablockers and diuretics precludes their use for first-line therapy in hypertension. *Circulation.* 2008; 117(20):2706–2715.

Michel T, Vanhoutte PM. Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch.* 2010; 450(6): 807-16.

Miller FJ Jr, Gutterman DD, Rios CD, Heistad DD, Davidson BL. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res* 1998; 82: 1298-305.

Moncada M, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*.1991; 43: 109-142.

Moncada S, Herman AG, Higgs EA, Vane JR. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the antithrombotic properties of vascular endothelium. *Thrombosis Research*.1977; 11: 323-44.

Naftilan AJ, Pratt RE, Eldridge CS, Lin HL, Dzau VJ. Angiotensin II induces c-fos expression in smooth muscle *via* transcriptional control. *Hypertension* 1989; 13:706-11.

Navar L.G., Zou L., Thun A.V., Wang C.T., Imig J.D., Mitchell K.D. Unraveling the Mystery of Goldblatt Hypertension. *News Physiol. Sci.* 1998; 13, 170-176.

Navar LG, Harrison-Bernard LM, Nishiyama A, Kobori H. Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypertension*, 2002; 39: 316-322.

Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *The American Physiological Society*.1995; 800-822.

NHANES III [National Health and Nutrition Examination Survey]. Hond ED, Nawrot T, Staessen JA. The relationship between blood pressure and blood lead in NHANES III. *Journal of Human Hypertension* 2002; 16: 563–568.

Ni Z, Hou S, Barton CH, Vaziri ND. Lead exposure raises superoxide and hydrogen peroxide in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Kidney International*. 2004; 66: 2329-2336.

Nussberger J, Aubert JF, Bouzourene K, Pellegrin M, Hayoz D, Mazzolai L. Renin inhibition by aliskiren prevents atherosclerosis progression: comparison with irbesartan, atenolol, and amlodipine. *Hypertension*. 2008; 51:1306–1311

Nussberger J, Wuerzner G, Jensen C, Brunner HR. Angiotensin II suppression in humans by the orally active renin inhibitor aliskiren (SPP100): Comparison with enalapril. *Hypertension*. 2002; 39(1):E1–E8.

Ochiai M, Hayashi T, Morita M, Ina K, Maeda M, Watanabe F, Morishita K. Short-term effects of L-citrulline supplementation on arterial stiffness in middle-aged men. *Int J Cardiol.* 2012 155(2): 257-61.

Ohsawa M, Tamura K, Kanaoka T, Wakui H, Maeda A, Dejima T *et al.*, Addition of aliskiren to Angiotensin receptor blocker improves ambulatory blood pressure profile and cardiorenal function better than addition of benazepril in chronic kidney disease. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(8): 15361-75.

Oigman W, Neves MFT. Sistema renina-angiotensina e hipertrofia ventricular esquerda. *Rev Bras Hipertens.* 2000; 7(3):261-7.

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

Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroberardino P, Verdecchia P, Schillaci G. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation* 2001; 104: 191-196.

Pescatello LS, Franklin BA, Fagard R, Farquhar WB, Kelley GA, Ray CA; American College of Sports Medicine. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. *Med Sci Sports Exerc.* 2004;36(3):533-53.

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Mirsky I, Braunwald E. Regression of left ventricular hypertrophy and prevention of left ventricular dysfunction by captopril in the spontaneously hypertensive rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 3310-4.

Pfeffer MA, Braunwald E, Moyet LA *et al.* Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med* 1992; 327:669-77.

Phillips MI, Schmidt-Ott KM. The Discovery of Renin 100 Years Ago. *News Physiol Sci* 1999;14: 271-4.

Pilz B, Shagdarsuren E, Wellner M, *et al.* Aliskiren, a human renin inhibitor, ameliorates cardiac and renal damage in double-transgenic rats. *Hypertension* 2005; 46: 569–576.

Pimenta E, Oparil S. Prehypertension: epidemiology, consequences and treatment. *Nature Review Nephrology*. 2010; 6(1):21-30.

Pradhan N, Rossi NF. Interactions Between the Sympathetic Nervous System and Angiotensin System in Renovascular Hypertension, *Current Hypertension Reviews* 2013; 9: 121-129.

Praxedes JN. Hipertensão renovascular: epidemiologia e diagnóstico. *Rev Bras Hipertens*. 2002; 9: 148-153

Qin Z, Gongora MC, Ozumi K, Itoh S, Akram K, Ushio-Fukai M, Harrison DG, Fukai T. Role of membrane ATPase in angiotensin II-induced Hypertension: a Key modulator extracellular superoxide dismutase function. *Hypertension*. 2008; 52:945-951.

Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and oxide nitric. *British Journal of Pharmacology*. 1987; 92: 639-646.

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

Rajapakse NW, Mattson DL. Role of L-arginine in nitric oxide production in health and hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009; 36: 249-255.

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

Rochette L, Lorin J, Zeller M, Guillard JC, Lorgis L, Cottin Y, et al. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets? *Pharmacol Ther* 2013; 140(3): 239-257.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *American Journal of Physiology*. 1986; 250 (19): 815-821.

Safar ME, London GM, Asmar R, Frohlich ED. Recent advances on large arteries in hypertension. *Hypertension* 1998; 32(1): 156-61.

Savvatis K, Westermann D, Schultheiss HP, Tschöpe C. First-line treatment of hypertension: critical appraisal of potential role of aliskiren and hydrochlorothiazide in a fixed combination. *Integrated Blood Pressure Control*. 2010; 3:163–170.

Schmieder RE, Philipp T, Guerediaga J, et al. Long-term antihypertensive efficacy and safety of the oral direct renin inhibitor aliskiren: a 12-month randomized, double-blind comparator trial with hydrochlorothiazide. *Circulation* 2009; 119: 417–425.

Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaike R, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nagao T, Egashira K, Fujishima M, Takeshita A: The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996, 28(5): 703–711

Silva BR, Pernomian L, Grando MD, Bendhack LM. Phenylephrine activates eNOS Ser 1177 phosphorylation and nitric oxide signaling in renal hypertensive rat aorta. *Eur J Pharmacol*. 2014; 738:192-9

Siragy HM; Carey RM (1997). The subtype 2 (AT₂) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J clin Investi*. 1997; 100: 264-269.

Skeegs LT, The existence of two forms of hyperensin. *The Journal of Experimental Medicine*. 1954; 100: 363.

Stanton A, Jensen C, Nussberger J, et al. Blood pressure lowering in essential hypertension with an oral renin inhibitor, aliskiren. *Hypertension* 2003; 42: 1137–1143.

Steckelings UM, Kaschima E, Unger T. The AT₂ receptor – A matter of love and hate. *Peptides*. 2005; 26: 1401-1409.

Stergiou GS, Skeva II. Renin-angiotensin system blockade at the level of the angiotensin converting enzyme or the angiotensin type-1 receptor: similarities and differences. *Curr Top Med Chem* 2004; 4(4):473-81.

Strasser RH, Puig JG, Farsang C, Croket M, Li J, van Ingen H. A comparison of the tolerability of the direct renin inhibitor aliskiren and lisinopril in patients with severe hypertension. *J Hum Hypertens*. 2007; 21(10):780-7.

Stroes E, Hijmering M, Zandvoort M, Wever R, Rabelink TJ, Faassen EE. Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Letters*.1998; 438: 161-164.

Sun HJ, Li P, Chen WW, Xiong XQ, Han Y. Angiotensin II and Angiotensin-(1-7) in Paraventricular Nucleus Modulate Cardiac Sympathetic Afferent Reflex in Renovascular Hypertensive Rats. *Plos One* 2012; 12(7): e52557.

Sun J, Lawrence J, Druhan J, Zweier L. Reactive oxygen and nitrogen species regulate inducible nitric oxide synthase function shifting the balance of nitric oxide and superoxide production. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.2010; 494: 130-137.

Takaya T, Hirata K, Yamashita T, Shinohara M, Sasaki N, Inoue N, Yada T, Goto M, Fukatsu A, Hayashi T, Alp NJ, Channon MK, Yokoyama M, Kawashima S. A specific role for eNOS-derived reactive oxygen species in atherosclerosis progression. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*.2007; 27: 1632-1637.

Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: Molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*.2003; 42: 1075-1081.

Taubman MB. Angiotensin II - a vasoactive hormone with ever increasing biological roles. *Circ Research* 2003; 92:911.

Tendera M, Aboyans V, Bartelink ML, et al; European Stroke Organisation; Authors/Task Force Members; ESC Committee for Practice Guidelines; Document Reviewers. ESC guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases: document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries. The Task Force on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Artery Diseases of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2011; 32(22): 2851-2906.

The CONSENSUSTrial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med* 1987; 316:1429-35.

Thomaz MJ, Lucon AM, Praxedes JN, Bortolotto LA, Srougi M. The role of nephrectomy of the atrophic kidney in bearers of renovascular hypertension. *Int Braz J Urol.* 2010; 36(2):159-70.

Tian XY, Wong WT, Leung FP, Zhang Y, Wang Y, Lee HK, et. al. Oxidative Stress-Dependent Cyclooxygenase-2-Derived Prostaglandin F_{2α} Impairs Endothelial Function in Renovascular Hypertensive Rats *Antioxidants & Redox Signaling* 2012; 16 (4): 363-373.

Touzy RM, Schiffrin EL. Reactive Oxygen Species and Hypertension: A complex association. *Antioxidants & Redox Signaling.*2008; 10 (6): 1041-1044.

Touzy RM, Schiffrin EL. Reactive Oxygen Species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochemistry and Cell Biology.*2004; 122: 339-352.

Touzy RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological Reviews.*2000; 52: 639-672.

Triggle CR, Hollenberg M, Anderson TJ, Ding H, Jiang Y, Ceroni L, Wiehler WB, Ella SMN, Ellis A, Andrews K, McGuire JJ, Pannirselvam M. The endothelium in health and disease – A Target for therapeutic intervention. *Journal of Smooth Muscle Research.* 2003; 39(6): 249-267.

Tsuda K, Tsuda S, Ueshima K, Nishio I, Masuyama Y. Neurotransmitter release and vascular responsiveness in mesenteric vasculatures from two-kidney, one-clip Goldblatt hypertensive rats. *Japan Heart J* 1989; 30: 85-94.

Tsyrlin VA, Galagudza MM, Kuzmenko NV, Pliss MG, Rubanova NS, Shcherbin YI. Arterial Baroreceptor Reflex Counteracts Long-Term Blood Pressure Increase in the Rat Model of Renovascular Hypertension. *Plos One* 2013; 6(8): e64788.

Urakami-Harasawa L, Shimokawa H, Nakashima M, Egashira K, Takeshita A. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. *J Clin. Invest.* 1997; 100: 2793-2799.

Vaidyanathan S, Jarugula V, Dieterich HA, Howard D, Dole WP. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of aliskiren. *Clin Pharmacokinet.* 2008; 47(8):515–531.

Vaziri ND, Khan M. Interplay of reactive oxygen species and nitric oxide in the pathogenesis of experimental lead-induced hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*. 2007; 34(9):920-5.

VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. DBH VI. *Revista Brasileira de Hipertensão*. 2010; 17(1):4.

Villamil A, Chrysant SG, Calhoun D, et al. Renin inhibition with aliskiren provides additive antihypertensive efficacy when used in combination with hydrochlorothiazide. *J Hypertens*. 2007; 25(1):217–226.

Voiculescu A, Hofer M, Hetzel GR, Malms J, Modder U, Grabensee B, Hollenbeck M. Noninvasive investigation for renal artery stenosis: contrast-enhanced magnetic resonance angiography and color doppler sonography as compared to digital subtraction angiography. *Clin Exper Hypertens* 2001; 23: 521-31

Waldmeier F, Glaenzel U, Wirz B, et al. Absorption, distribution, metabolism, and elimination of the direct renin inhibitor aliskiren in healthy volunteers. *Drug Metab Dispos*. 2007; 35(8):1418–1428.

Watts SW. Endothelin receptors: What's new and what do we need to know? *Am J Physiol Regul Comp Integr Comp Physiol*. 2010; 298: 254-260.

Webb DJ, Cumming AM, Adams FC, Hodsman GP, Leckie BJ, Lever AF, et al. Changes in active and inactive renin and in angiotensin II across the kidney in essential hypertension and renal artery stenosis. *J Hypertension* 1984; 2:605-14.

Wickman A, Andersson IJ, Jia J, Hedin L, Bergström G. Endothelial nitric oxide synthase protein is reduced in the renal medulla of two-kidney, one-clip hypertensive rats. *J Hypertens*. 2001; 19(9):1665-73

Wolf G, Ziyadeh FN, Thaïss F, Tomaszewski J, Caron RJ, Wenzel U, Zahner G, Helmchen U, Stahl RAK. Angiotensin II stimulates expression of the chemokine RANTES in rat glomerular endothelial cells: role of the angiotensin type 2 receptor. *J Clin Invest* 1997; 100:1047-58.

Wright J.W.; Yamamoto B.J.; Harding, J.W. Angiotensin receptor subtype mediated physiologies and behaviors: New discoveries na clinical taretts. *Prog. Neurobiol*. 2008; 84:157-181.

Wu XQ, Kong X, Zhou Y, Huang K, Yang JR, Li XL. Sesamin exerts renoprotective effects by enhancing NO bioactivity in renovascular hypertensive rats fed with high-fat-sucrose diet. *Eur J Pharmacol.* 2012; 683(1-3):231-7.

Yanagesawa M, Kurihara S, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular cells. *Nature.*1988; 322: 411-415.

Zhang H, Schmeisser A, Garlich CD, Plotze K, Damme U, Mugge A, Daniel WG. Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH-/ NADPH-oxidases. *Cardiovasc Res* 1999; 44:215-22.