

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

DIELI OLIVEIRA NUNES

**Ácido Linoleico Reduz a Reatividade Vascular e
Melhora a Disfunção Vascular de Artérias
Mesentéricas de Ratos Hipertensos**

VITÓRIA

2018

DIELI OLIVEIRA NUNES

**Ácido Linoleico Reduz a Reatividade Vascular e
Melhora a Disfunção Vascular de Artérias
Mesentéricas de Ratos Hipertensos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito final para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas, na área de concentração de Fisiologia Cardiovascular.

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Simão Padilha.

Coorientador: Prof. Dr. Rogério Faustino R. Junior.

VITÓRIA

2018



REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE TESE DA CANDIDATA AO
TÍTULO DE DOUTORA PELO PPGCF/CCS/UFES

Nº Matrícula do^(a) Candidato^(a): 2014230026

A Comissão Julgadora que examinou a Tese de Doutorado, intitulada "**Ácido Linoleico Reduz a Reatividade Vascular e Melhora a Disfunção Vascular de Artérias Mesentéricas de Ratos Hipertensos**", apresentada e defendida publicamente pela aluna **Dieli Oliveira Nunes**, no dia 4 de outubro de 2018, às 08h30, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida tese de Doutorado e, portanto, declara que a aluna faz jus à obtenção do Título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Vitória – ES, 4 de outubro de 2018.

Profª Drª Alessandra Simão Padilha
(Orientadora)

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
(Membro Externo)

Prof. Dr. Rogério Faustino Ribeiro Junior
(Coorientador)

Profª Drª Aurélia Araújo Fernandes
(Membro Externo)

Profª Drª Ivanita Stefanon
(Membro Interno)

Prof. Dr. José Geraldo Mill
(Membro Interno)

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Espírito Santo, ES, Brasil)

Nunes, Dieli Oliveira, 1989 -
N972a Ácido Linoleico Reduz a Reatividade Vascular e Melhora a Disfunção
Vascular de Artérias Mesentéricas de Ratos Hipertensos / Dieli Oliveira
Nunes - 2018.
142 f. : il.

Orientador: Alessandra Simão Padilha.
Coorientador: Rogério Faustino R. Junior.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal do
Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Ácido Linoleico. 2. Hipertensão. 3. Óxido Nítrico. I. Padilha,
Alessandra Simão. II. R. Junior, Rogério Faustino. III. Universidade Federal
do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 612

Dedico esta tese de doutorado, com muito carinho e gratidão, à minha família que amo profundamente. Obrigada pelo apoio e dedicação incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus, por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos e por tornar tudo isso possível.

Aos meus pais, por todas as abdições em função de minhas necessidades. Pai e mãe, obrigada pela confiança e apoio incondicional sempre. Ao meu irmão, sempre disponível para me amparar com seu carinho e atenção indescritível. Irmão, obrigada pelos conselhos e conversas enriquecedoras. Ao meu noivo Fabio, por abraçar meus planos como os seus, pela paciência, pela compreensão de minhas ausências e pelo incentivo. Você foi fundamental para a conquista de mais uma etapa. À querida Penha, pelo exemplo de coragem e persistência para se manter firme na caminhada. Obrigada pelo apoio, inspiração e por me mostrar que sempre no final vale a pena.

À Profa. Dra. Alessandra, pela confiança desde o começo de minha caminhada na pesquisa, com início no mestrado e agora, com a concretização de mais uma etapa. Alê, muito obrigada por todo apoio, carinho e, sobretudo, por me inspirar e por compartilhar comigo seu extenso conhecimento. Com seu jeito doce e paciente você contribuiu para meu crescimento pessoal e profissional. Tenho orgulho de ser sua aluna.

Ao Prof. Dr. Rogério, pelas contribuições indispensáveis a este projeto e pelas valiosas "ideias", fundamentais para o aperfeiçoamento deste trabalho. Roger, sua dedicação e paixão pela pesquisa é contagiante. Aprendi muito com você. Muito obrigada!

À Camila, pela impecável dedicação e inspiração pela pesquisa. Minha "irmã científica", não tenho palavras para descrever o quanto foi importante ao longo desses anos. Obrigada pela paciência, preocupação e por compartilhar seu conhecimento comigo. Grande parte dessa conquista foi graças a sua dedicação gratuita, que jamais hesitou em me ajudar. Meus sinceros agradecimentos. Alegro-me de todas as suas conquistas e desejo muito a sua felicidade e seu sucesso nessa jornada!

Ao Vinícius, por aceitar a empreitada de trabalhar neste projeto, pela disponibilidade e disposição. Nossa parceria deu muito certo e foi muito importante para a conclusão desta tese.

À Wena, por toda ajuda e disposição nas longas jornadas de experimentos, muitas vezes nos três turnos. Obrigada por acreditar em mim e por aceitar este trabalho com total disponibilidade.

Aos meus “irmãos científicos”, por toda cumplicidade e confiança. Marito, meu "irmão gêmeo", você foi fundamental nesta trajetória; te agradeço por ser tão presente e parceiro, pelos conselhos, pelas descontrações, pelos esclarecimentos técnicos e científicos e, sobretudo, pela amizade ao longo desses seis anos. Gilson, "irmão mais velho", obrigada por compartilhar seu conhecimento comigo e por estar presente sempre em que precisei; você é "fera"! Thiago, "nosso caçula", com seu jeito atencioso, honesto e solícito fez toda a diferença nesta trajetória; obrigada pelo carinho e pela cumplicidade. Cada um de vocês me ensinou muito e eu levarei para sempre comigo.

À Karolini, um anjo na forma de amiga. Karol, obrigada por ser meu braço direito e esquerdo em todos os momentos que compartilhamos e, acima de tudo, por ser essa luz abençoada por onde você passa. Deus soube escolher rigorosamente as melhores pessoas para caminhar comigo e me ajudar a rabiscar essa história que é a vida.

À Sabrina, minha querida amiga. Obrigada pelo carinho, pelas longas conversas, pela parceria e pela linda e sincera amizade que construímos dentro e fora do laboratório. Você é sinônimo de garra, foco, coragem, determinação e uma brilhante mulher! Nunca permita apagar esse brilho contagiante.

Aos professores e parceiros de laboratório, Dalton, Leonardo e, em especial, à Ivanita, por aceitar o convite de compor a banca examinadora desta tese. Professores, obrigada pelas ideias, questionamentos e reflexões ao longo de nossas reuniões científicas, dando sentido a muitos dos conhecimentos que pareciam abstratos para mim. Agradeço por estarem conosco e disponibilizarem a vasta sabedoria para o desenvolvimento da ciência.

Agradeço a todos aos meus amigos pelo companheirismo e pela força, em especial aos meus amigos do LEMC que me ajudaram a concluir essa etapa, me auxiliando nos experimentos, colaborando com as ideias e tornando o ambiente de trabalho um lugar mais leve e alegre.

Aos colegas de outros laboratórios, que juntos compartilhamos muitos momentos de preocupação e alegria no decorrer das disciplinas e nos esbarrões pelos corredores.

Agradeço a todos os profissionais que colaboraram com meu doutorado, em especial ao Anderson, profissional totalmente competente e admirável, obrigada por me auxiliar na rotina do laboratório. Agradeço à Cíntia, nossa impecável secretária, pela disponibilidade e atenção sempre que precisamos. E ao Rodolfo, que cuida com tanta dedicação dos nossos animais e nos atende com total prontidão diante das inúmeras requisições.

À banca examinadora, obrigada pelas correções, contribuições e disponibilidade. E, agradeço especialmente à professora Priscila, uma das pessoas fundamentais para meu ingresso na pesquisa há 6 anos atrás. Priscila, obrigada pela generosidade e pelo apoio quando eu mais precisei.

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

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

À CAPES, CNPq e FAPES pelo apoio financeiro.

"Insanidade é continuar fazendo sempre a mesma coisa e esperar resultados diferentes."

Albert Einstein

RESUMO

Os ácidos graxos poliinsaturados ômega-6 são bem conhecidos por seu importante papel em muitas funções fisiológicas e, também, na redução dos riscos de doenças cardiovasculares, especialmente o ácido linoleico (AL). Com isso, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito do tratamento com AL sobre a pressão arterial e a função das artérias de resistência mesentérica (AMR) em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Os SHR machos foram tratados diariamente com AL (15 mg/kg) ou veículo (controle) por 15 dias. Comparado com os controles, o tratamento com AL diminuiu a pressão arterial (PAS (mmHg) - Controle: $139 \pm 1,8$ vs AL: $128,4 \pm 1,7$; PAD (mmHg) - Controle: $78,6 \pm 1,1$ vs AL: $70,1 \pm 3,7$) e mostrou: (1) aumento do lúmen e diâmetro externo, (2) diminuição da parede:lúmen e espessura da parede, (3) diminuição da rigidez e (4) menor deposição de colágeno em AMR. O tratamento com AL reduziu a resposta contrátil à fenilefrina, embora não tenham sido observadas alterações na AMR quanto às respostas à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio. A incubação com L-NAME alterou a reatividade à fenilefrina apenas no grupo tratado com AL, sugerindo que o tratamento pode melhorar a biodisponibilidade de NO, o que foi confirmado pela análise semiquantitativa “*in situ*” de NO. A incubação com tiron diminuiu a reatividade vascular à fenilefrina em ratos tratados com LA, acompanhada pela diminuição ânion superóxido observada na AMR. Além disso, a incubação com indometacina (inibidor não seletivo de COX), NS 398 (inibidor específico de COX-2), furegrelato (inibidor da sintase de TXA_2), SQ 29,548 (antagonista do receptor TP) e SC 19220 (antagonista do receptor EP1) reduziu as respostas vasoconstritoras à fenilefrina no grupo tratado com AL. Estes resultados foram acompanhados por uma redução na expressão da proteína de COX-2. Em conclusão, estes achados mostram que o tratamento com AL diminuiu a pressão arterial, acompanhado por alterações estruturais e funcionais nas artérias de resistência de SHR. Estas alterações funcionais envolvem um aumento na biodisponibilidade de NO e redução na produção de ânion superóxido. Por fim, a melhora da disfunção endotelial e alterações estruturais nesse modelo de hipertensão podem ser responsáveis pela redução da pressão arterial.

Palavras-chave: Ácido linoleico; hipertensão; artérias mesentéricas de resistência; função vascular; remodelamento vascular.

ABSTRACT

Omega-6 polyunsaturated fatty acids are well known for their important role in many physiological functions and in reducing the risks of cardiovascular diseases, especially linoleic acid (LA). Therefore, we aimed to investigate the effect of linoleic acid (LA) treatment on the blood pressure and function of mesenteric resistance arteries (MRA) in spontaneous hypertensive rats (SHR). Male SHR were treated daily with LA (15 mg/kg) or vehicle (control) for 15 days. Compared with controls, LA treatment decreased blood pressure (SBP (mmHg) - Control: $139 \pm 1,8$ vs LA: $128,4 \pm 1,7$; DBP (mmHg) - Control: $78,6 \pm 1,1$ vs AL: $70,1 \pm 3,7$ and showed the following in MRA: (1) increased lumen and external diameter, (2) decreased wall:lumen ratio and wall thickness, (3) decreased stiffness and (4) less collagen deposition. LA treatment reduced the contractile response to phenylephrine, although there were no changes observed in MRA in regard to the acetylcholine or sodium nitroprusside responses. Incubation with L-NAME left-shifted the reactivity to phenylephrine only in the MRA treated group, suggesting that LA treatment can improve NO bioavailability, which was confirmed by NO "*in situ*" quantification analyses. Incubation with tiron decreased vascular reactivity to phenylephrine in MRA in LA rats, which was accompanied by decreased superoxide anion production. Moreover, incubation with indomethacin (non-selective COX inhibitor), NS 398 (COX-2 specific inhibitor), furegrelate (TXA₂ synthase inhibitor), SQ 29.548 (TP receptor antagonist) and SC 19220 (EP1 receptor antagonist) reduced the vasoconstrictor responses to phenylephrine in MRA in the treated group. These results were accompanied by a reduction in COX-2 protein expression. In conclusion, these findings show that LA treatment decreases blood pressure, accompanied by structural and functional changes in resistance arteries of SHR rats. These functional changes involve NO bioavailability and reduction in superoxide anion production. At last, the improvement of endothelial dysfunction and structural changes in this hypertension model may be responsible for the reduction in blood pressure.

Keywords: Linoleic acid; hypertension; mesenteric resistance arteries; vascular function; vascular remodeling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem ilustrativa das características da parede arterial (adaptado de Sherwood, 2011)31

Figura 2: Classificação de artérias quanto ao tipo de remodelamento arterial. O diagrama mostra a maneira em que o remodelamento vascular pode modificar as secções transversais dos vasos sanguíneos. O ponto de partida é o vaso no centro. O remodelamento pode ser hipertrófico (maior área da camada média; vasos na coluna direita), eutrófico (sem mudanças na área da camada média; vasos na coluna do meio) ou hipotrófico (menor área da camada média; vasos na coluna esquerda). Essas formas de remodelamento podem ser interna (redução do diâmetro interno; vasos na linha superior) ou externa (aumento do diâmetro interno; vasos na linha inferior) (adaptado de VAN VARIK et al., 2012, apud MULVANY et al., 1996).33

Figura 3: Mecanismos de redução na disponibilidade de óxido nítrico com a hipertensão. ADMA: dimetil arginina assimétrica; BH4: tetrahidrobiopterina; hsp90: proteína de choque térmico 90; NO: óxido nítrico; NOS: óxido nítrico sintase; O₂⁻: ânion superóxido; ONOO⁻: peroxinitrito. (Adaptado de TANG & VANHOUTTE, 2010).40

Figura 4: Síntese de prostanóides e mecanismos de sinalização. AA: ácido araquidônico; AC: adenilato ciclase; AMPc: adenosina monofosfato cíclico; CML: célula muscular lisa; COX: ciclooxigenase; PLA2: fosfolipase A2; PLC: fosfolipase C.....45

Figura 5: Via de biosíntese dos PUFAs ômega-3 e ômega-6 (adaptado de Lehninger et al., 2005)48

Figura 6: Caminhos envolvidos no metabolismo do AL e AA. - AL é metabolizado por 5- e 15-lipoxigenase (LOX) para formar ácido 9-hidroxi-octadecadienóico (9-HODE) e 13-HODE, respectivamente. O ácido linoléico também pode ser

metabolizado em AA. Por sua vez, o ácido araquidônico é usado para formar prostaglandinas (por ciclooxigenases) e epóxidos (pelo citocromo p450 epoxigenasecaminho) (SHARMA et al., 2016).50

Figura 7: Esquema representativo das etapas e protocolos experimentais desenvolvidos no presente estudo.55

Figura 8: Esquema representativo da preparação experimental dos anéis de artéria mesentérica para a realização de estudos de reatividade vascular *in vitro*.60

Figura 9: Registro com curvas representativas do teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e da avaliação da integridade funcional do endotélio. (ACh: acetilcolina).61

Figura 10: Esquema representativo das curvas concentração-resposta à fenilefrina (Fe), em que pode ser observada a vasoconstrição em artérias mesentéricas (A) e vasodilatação frente à acetilcolina (ACh) (B). (adaptado de Batista, 2014).62

Figura 11: Esquema representativo dos protocolos das curvas concentração-resposta à fenilefrina (Fe) após a incubação por 30 minutos com os fármacos estudados. (adaptado de Batista, 2014).64

Figura 12: Comparação da Pressão Arterial Sistólica (PAS) (em mmHg) entre os grupos SHR controle e SHR AL, no início (dia 1) e no final do tratamento (dia 15) com ácido linoleico. Resultados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs SHR controle; teste t de *Student*. Número de ratos expresso por n.74

Figura 13: Pressão Arterial Sistólica (A), Pressão Arterial Diastólica (B), Pressão Arterial Média (C) e Frequência Cardíaca (FC) dos ratos dos grupos SHR

Controle e SHR AL. Resultados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs SHR controle; teste t de *Student*. Número de ratos expresso entre parênteses.....75

Figura 14: Medidas de diâmetro interno (A) e externo (B), espessura de parede (C) e relação média/lúmen (D) em artérias mesentéricas de resistência de ratos controle e AL induzidas por crescentes mudanças de pressão intravascular. Os dados são expressos como média \pm SEM dos valores frente às alterações de pressão intravascular. Número de animais é indicado entre parênteses. * $p < 0,05$ vs. Controle; ANOVA duas vias e pós-teste de Fisher.77

Figura 15: Medidas de estresse de parede (A), tensão de parede (B) e relação stress/strain (C) em artérias mesentéricas de resistência de ratos controle e LA induzidas por crescentes mudanças de pressão intravascular. Os dados são expressos como média \pm SEM dos valores frente às alterações de pressão intravascular. Número de animais é indicado entre parênteses. * $p < 0,05$ vs. Controle; ANOVA duas vias e pós-teste de Fisher.....79

Figura 16: Quantificação do conteúdo de colágeno (A) e elastina (B). Imagens histológicas representativas de seções arteriais microscópicas coradas utilizando o kit Verhoeff obtida de artérias de resistência mesentérica de ratos controle e tratados com AL. Os dados são expressos como média \pm SEM dos valores frente às alterações de pressão intravascular. * $p < 0,05$ vs. Controle pelo teste t de *Student*. Número de ratos expresso entre parênteses.80

Figura 17: Curvas concentração-resposta à fenilefrina (A), Curvas concentração resposta à acetilcolina (B) e ao nitroprussiato de sódio (C) em anéis de artérias mesentéricas de ratos dos grupos SHR controle e SHR AL. Resultados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs SHR controle; ANOVA duas vias e pós-teste de Fisher. Número de ratos expresso entre parênteses.82

Figura 18: Efeito do L-NAME (100 μ M) e dAAC na presença e ausência do tratamento com (A); Imagens fluorescentes representativas de seções arteriais microscópicas marcadas com 4,5-Diaminofluoresceína (DAF) e quantificação de

óxido nítrico obtida de artérias de resistência mesentérica de ratos controle e tratados com AL (B). Resultados expressos como média ± EPM. *p<0,05 SHR AL vs SHR AL L-NAME; ANOVA duas vias e pós-teste de Fisher e * p <0,05 pelo teste t de Student. Número de ratos expresso entre parênteses.84

Figura 19: Efeito do tiron (1 µM) e dAAC na presença e ausência do tratamento com (A); Imagens fluorescentes representativas de seções arteriais microscópicas marcadas pela oxidação do dihidroetídeo (DHE) e quantificação de ânions superóxidos obtida de artérias de resistência mesentérica de ratos controle e tratados com AL (B). Resultados expressos como média ± EPM. *p<0,05 SHR AL vs SHR AL Tiron; #p<0,05 SHR Controle vs SHR Controle Tiron; ANOVA duas vias e pós-teste de Fisher e * p <0,05 pelo teste t de Student. Número de ratos expresso entre parênteses.86

Figura 20: Curvas concentração-resposta com os bloqueios na presença e ausência do tratamento com AL: indometacina (10 µM) e dAAC (A); NS 398 e dAAC (B) Resultados expressos como média ± EPM. *p<0,05 SHR AL vs SHR AL NS 398; #p<0,05 SHR Controle vs SHR Controle indometacina/NS 398; ANOVA duas vias e pós-teste de Fisher e *p<0,05 pelo teste t de Student. Número de ratos expresso entre parênteses.88

Figura 21: Curvas concentração-resposta com os bloqueios na presença e ausência do tratamento com AL: furegrelato (1 µM) e dAAC (A); SQ 29,548 e dAAC (B); SC 19220 e dAAC. Resultados expressos como média ± EPM. *p<0,05 SHR AL vs SHR AL furegrelato/SQ 29,548/SC 19220; #p<0,05 SHR Controle vs SHR Controle furegrelato/SQ 29,548/SC 19220; ANOVA duas vias e pós-teste de Fisher e *p<0,05 pelo teste t de Student. Número de ratos expresso entre parênteses.89

Figura 22: Análise densitométrica da expressão protéica da eNOS (A), COX-2 (B) e PPARγ (C) em artérias de resistência mesentérica de ratos controle e tratados com AL. Na parte superior da figura estão demonstradas as bandas

representativas da expressão. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses. * $p < 0,05$ pelo teste t de *Student*.90

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Valores do peso corporal (g) dos animais dos grupos Controle e Ácido Linoléico (AL).73
- Tabela 2:** Valores de pressão arterial sistólica (PAS), em mmHg, obtidos por pletismografia da artéria caudal dos animais dos grupos Controle e Ácido Linoleico (AL).74
- Tabela 3:** Valores de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial sistólica (PAD), pressão arterial sistólica (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) dos animais dos grupos Controle e Ácido Linoleico (AL).75
- Tabela 4:** Valores de pD_2 e R_{max} obtidos das curvas concentração-resposta à fenilefrina, a acetilcolina (ACh) e ao nutriprussiato de sódio (NPS) em artérias mesentéricas de ratos dos grupos Controle e Ácido Linoleico (AL).82
- Tabela 5:** Valores de pD_2 e R_{max} obtidos das curvas concentração-resposta à fenilefrina e ao L-NAME em artérias mesentéricas de ratos dos grupos Controle e Ácido Linoleico (AL).84
- Tabela 6:** Valores de pD_2 e R_{max} obtidos das curvas concentração-resposta à fenilefrina e ao tiron em artérias mesentéricas de ratos dos grupos Controle e Ácido Linoleico (AL).86
- Tabela 7:** Valores de pD_2 e R_{max} obtidos das curvas concentração-resposta à fenilefrina, à indometacina, ao NS 398, ao furegrelato, ao SQ 29,548 e ao SC 19220 em artérias mesentéricas de ratos dos grupos Controle e Ácido Linoleico (AL).90

LISTA DE ABREVIATURAS

‰: Porcentagem

[Ca⁺²]: Concentração intracelular de Ca⁺²

°C: Graus Celsius

13-HODE: Ácido 13-hidroxiocetadecadienóico

9-HOPE: Ácido 9-hidroxiocetadecadienóico

AA: Ácido araquidônico

AC: Adenilato ciclase

ACh: Acetilcolina

ADP: Adenosina difosfato

AL: Ácido linoleico

AMPc: Adenosina monofosfato cíclico

AMPK: Proteína quinase dependente de AMPc

ANOVA: Análise de variância

ATP: Adenosina trifosfato

BH4: Tetrahidrobiopterina

BK_{Ca}: Canais para K⁺ ativados por cálcio de larga condutância

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CAPES: Coordenadoria de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior

CEUA: Comitê de ética em experimentação

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX: Ciclooxygenase

COX-1: Ciclooxygenase-1

COX-1: Isoforma da ciclooxygenase tipo 1

COX-2: Ciclooxygenase-2

COX-2: Isoforma da ciclooxygenase tipo 2

Ct: Grupo Controle

DAF-2: 4,5-diaminofluoresceína

DAF-2: Diaminofluoresceína

DAG: Diacilglicerol

dAUC: Diferenças das áreas abaixo das curvas

DC: Debito cardíaco

DHA: Ácido docosaexaenóico

DHE: Dihidroetidio

ECA: Enzima conversora de angiotensina

EDHF: Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

eNOS: Isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico

EPA: Ácido eicosapentaenóico

EPM: Erro padrão da média

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

ET: Endotelina

ET-1: Endotelina-1

ET-2: Endotelina-2

FAD: Flavina-adenina-dinucleotídeo

FAPES: Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo

FC: Frequência cardíaca

Fe: Fenilefrina

FMN: Flavinmononucleotídeo

GMPc: 3,5 – monofosfato cíclico de guanosina

GPx: Glutathione peroxidase

GTP: Trifosfato de guanosina

H₂O: Água

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HAS: Hipertensão arterial sistêmica

HDL: Lipoproteína de alta densidade

hsp90: Proteína de choque térmico 90

i.m: Intramuscular

IK_{Ca}: Canais para K⁺ ativados por cálcio de intermediária

Indo: Indometacina

iNOS: Isoforma induzível da sintase de óxido nítrico

IP3: 1,4,5 – inositol trifosfato

K_{ATP}: Canais para K⁺ sensíveis ao ATP

K_{Ca}: Canais para K⁺ dependentes de Ca⁺²

KCl: Cloreto de potássio

K_{ir}: Canais para K⁺ retificador de influxo

K_v: Canais para K⁺ voltagem dependentes

L-NAME: Inibidor não-seletivo da NOS, o N-nitro-L-arginina metil éster

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

LOX: Lipoxigenase

M: Molar

min: Minuto

mL: Mililitros

MLV: Músculo liso vascular

NADPH: Adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH: Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato

nM: Nanomolar

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

NPS: Nitroprussiato de sódio

O₂^{•-} : Ânion superóxido

ONOO⁻: Peróxido de nitrito

PA: Pressão arterial

PAD: Pressão arterial diastólica

PAM: Pressão arterial média

PAS: Pressão arterial sistólica

pD₂: Sensibilidade

PGI₂: Prostaciclina

PKA: Proteína quinase A

PLA₂: Enzima fosfolipase A2

PPAR: Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma

PPAR_γ: Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa

ppm: Partículas por milhão

PUFAs: Ácidos graxos poliinsaturados

R_{máx}: Resposta máxima

RS: Retículo sarcoplasmático

RVP: Resistência Vascular Periférica

SHR: Ratos espontaneamente hipertensos

SK_{Ca}: Canais para K⁺ ativados por cálcio de baixa condutância

SNC: Sistema nervoso central

SOD: Superóxido dismutase

SRA: Sistema renina angiotensina

SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona

Tiron: 4,5-dihidroxi-1,3-benzeno-dissulfônico

TXA₂: Tromboxano

μM: Micromolar

ω-3 ou n-3: Ômega-3

ω-6 ou n-6: Ômega-6

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	28
1.1	HIPERTENSÃO ARTERIAL	28
1.1.1	Caracterização do modelo experimental	29
1.1.2	Remodelamento vascular e hipertensão arterial	31
1.1.3	Disfunção endotelial e hipertensão arterial	35
1.2	MÚSCULO LISO E REGULAÇÃO DO TÔNUS VASCULAR	38
1.2.1	Óxido Nítrico	39
1.2.2	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio - EDHF	41
1.2.3	Espécies reativas de oxigênio	42
1.2.4	Ciclooxigenase-2	43
1.3	ÁCIDOS GRAXOS	47
1.3.1	Ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs)	47
1.3.2	Ácido linoleico (AL)	49
2	OBJETIVOS	53
2.1	OBJETIVO GERAL	53
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
3	MATERIAL E MÉTODOS	54
3.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	54
3.1.1	Modelo Experimental	54
3.2	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PRESSÓRICOS	56
3.2.1	Medida indireta da pressão arterial sistólica	56
3.2.2	Medida direta de parâmetros hemodinâmicos	56
3.3	ESTUDO DAS PROPRIEDADES ESTRUTURAL E MECÂNICAS DE ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA	57
3.3.1	Miógrafo de pressão	57
3.3.2	Cálculo das propriedades mecânicas e estruturais	58

3.4	AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO VASCULAR.....	59
3.4.1	Avaliação da integridade do músculo liso vascular	61
3.4.2	Avaliação da integridade funcional do endotélio	61
3.5	PROTÓCOLOS EXPERIMENTAIS.....	62
3.5.1	Efeito do tratamias mesentéricas.....	62
3.5.1.1	Influência tratamento por quinze dias com ácido linoleico na liberação de óxido nítrico em resposta à fenilefrina.....	63
3.5.1.2	Efeito do tratamento com ácido linoleico na produção de espécies reativas em resposta à fenilefrina	63
3.5.1.3	Envolvimento dos prostanóides derivados do ácido araquidônico sobre a resposta contrátil à fenilefrina após tratamento com ácido linoleico ..	63
3.6	QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO E DE ÓXIDO NÍTRICO <i>IN SITU</i>	64
3.6.1	Fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetideo	64
3.6.2	Detecção da produção de óxido nítrico.....	65
3.7	ANÁLISE HISTOLÓGICA DE ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA. 66	
3.8	EXPRESSÃO PROTÉICA DA COX-2, eNOS E PPAR- γ	66
3.8.1	Preparação do tecido e quantificação das proteínas	66
3.8.2	Eletroforese e transferência das amostras	67
3.8.3	Incubação com Anticorpos.....	67
3.8.4	Detecção das Proteínas	68
3.9	EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
3.10	FÁRMACOS, REAGENTES e ANTICORPOS	70
4	RESULTADOS	73
4.1	VALORES DE PESO CORPORAL	73
4.2	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PRESSÓRICOS	73
4.2.1	Tratamento com ácido linoleico reduz pressão arterial sistólica de ratos acordados.....	73

4.2.2	Influência do tratamento com ácido linoleico sobre as medidas hemodinâmicas.....	74
4.3	PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E MECÂNICAS VASCULARES.....	76
4.3.1	Parâmetros morfológicos arteriais de ratos hipertensos são melhorados após tratamento com ácido linoleico.....	76
4.3.2	Tratamento com ácido linoleico modifica os parâmetros mecânicos arteriais de ratos hipertensos.....	78
4.3.3	Avaliação das proteínas da matriz extracelular em artérias mesentéricas de resistência.....	80
4.4	REATIVIDADE VASCULAR.....	81
4.4.1	Resposta contrátil ao cloreto de potássio (KCl) em artérias mesentéricas de resistência.....	81
4.4.2	Tratamento com ácido linoleico reduz a vasoconstrição em artérias mesentéricas de ratos hipertensos sem alterar o relaxamento..	81
4.4.3	Tratamento com ácido linoleico melhora a biodisponibilidade de óxido nítrico em ratos hipertensos.....	83
4.4.4	Estresse oxidativo é reduzido em ratos hipertensos após tratamento com ácido linoleico.....	85
4.4.5	Tratamento com ácido linoleico reduz participação dos prostanóides derivados da via da ciclooxigenase (COX).....	87
5	DISCUSSÃO.....	91
5.1	INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM ÁCIDO LINOLEICO SOBRE AS MEDIDAS HEMODINÂMICAS DIRETA E INDIRETA EM RATOS HIPERTENSOS.....	92
5.2	ÁCIDO LINOLEICO MELHORA OS PARÂMETROS ESTRUTURAIS E MECÂNICOS EM RATOS HIPERTENSOS.....	94
5.3	RESPOSTAS VASOMOTORAS ENVOLVIDAS NO TRATAMENTO COM DO ÁCIDO LINOLEICO.....	98
5.3.1	Efeitos do tratamento com ácido linoleico sobre a via do óxido nítrico.....	100

5.3.2	Envolvimento do ânion superóxido na reatividade vascular de artérias mesentéricas de ratos hipertensos	100
5.3.3	Modulação da vasomotricidade pelos prostanóides derivados da via da ciclooxigenase (COX) após tratamento com ácido linoleico	101
6	SUMARIZAÇÃO DOS RESULTADOS.....	104
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	105
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
9	ANEXO - Artigo publicado referente à tese.....	133

1 INTRODUÇÃO

1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL

A hipertensão arterial é uma condição clínica multifatorial, caracterizada por elevação sustentada dos níveis pressóricos. Esta patologia representa um importante fator de risco para doenças cardiovasculares, incluindo doença arterial coronariana, doença vascular periférica, acidente vascular encefálico, insuficiência cardíaca e doença renal crônica. No Brasil, a hipertensão arterial atinge 32,5% (36 milhões) de indivíduos adultos, contribuindo direta ou indiretamente para 50% das mortes por doença cardiovascular (VII Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, 2016).

De acordo com as VII Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, a *American Heart Association* e o *VIII Joint National Committee*, os níveis pressóricos considerados normais para adultos são inferiores ou iguais a 140 mmHg de pressão arterial sistólica e a 90 mmHg de pressão arterial diastólica. Contudo, uma vez que não existe um valor preciso a partir do qual os valores de pressão arterial passam a aumentar o risco cardiovascular, a conceituação de hipertensão arterial é arbitrária e definida operacionalmente por razões práticas para avaliação de risco e tratamento de um indivíduo; e também por considerações em relação à lesão de órgãos-alvo e demais doenças associadas (PEREIRA & KRIEGER, 2005; JAMES et al., 2014).

Quanto a sua origem, a hipertensão arterial pode ser classificada como primária ou secundária. A hipertensão primária é a forma mais prevalente na população, contribuindo para aproximadamente 95% dos casos, e não apresenta causa definida, porém está relacionada à interação de fatores genéticos e ambientais heterogêneos, como tabagismo, sedentarismo, estresse e consumo excessivo de sal e álcool. Por sua vez, a hipertensão secundária tem prevalência de 3 a 5% e está associada a algumas condições clínicas, como: hipertireoidismo, hipotireoidismo, doença renal crônica, síndrome da apnéia e hipopnéia obstrutiva do sono, entre outros (VII Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, 2016).

A pressão arterial sanguínea é mantida dentro de valores normais graças ao volume sanguíneo e à capacitância da circulação, que são resultantes da interação entre o DC (débito cardíaco = frequência cardíaca x volume sistólico), a

resistência vascular periférica (RVP) e a capacitância venosa. Ao considerar a relação Pressão Arterial = DC x RVP, conclui-se que fatores capazes de alterar o DC e/ou a RVP, modificam conseqüentemente a pressão arterial. No entanto, alterações na resistência vascular são as principais responsáveis por modificações na pressão arterial (BOHR; WEBB, 1984a; LUND-JOHANSEN, 1983a).

É importante considerar que a resistência vascular, principalmente em artérias de resistência, pode ser modificada pela estrutura, pela mecânica e pela função vasomotora dos vasos sanguíneos (INTENGAN; SCHIFFRIN, 2000a). Alterações estruturais, como redução do diâmetro luminal e espessamento da parede arterial, alterações mecânicas, como redução da elasticidade, bem como, modificações nas respostas vasoconstritora e vasodilatadora dependentes do endotélio, podem repercutir em aumento da resistência vascular e, conseqüentemente, na hipertensão arterial (LÜSCHER; VANHOUTTE, 1986a; MULVANY, Michael J, 2002a). Dentre as alterações celulares que modificam a resistência vascular, podem ser citados: o aumento intracelular de Ca^{2+} que, por sua vez, aumenta a reatividade do músculo liso vascular a agentes vasoconstritores, como os agonistas α -1 adrenérgicos e noradrenalina (HOROWITZ et al., 1996a); o aumento da sensibilidade às proteínas contráteis; o aumento da permeabilidade da membrana aos íons cálcio e sódio, entre outros (BOHR; WEBB, 1984a; MARÍN, 1993).

Em se tratando de modelos experimentais de hipertensão, já é bem descrito que vasos sanguíneos de ratos hipertensos apresentam maior reatividade aos agentes pressores do que de animais normotensos (HOLLOWAY; BOHR, 1973). Este aumento de reatividade pode estar associado à maior sensibilidade do músculo liso vascular aos agentes vasoconstritores, sendo que em estados crônicos de hipertensão arterial, as modificações estruturais intensificam o aumento da reatividade (BERECEK; RASCHER; GROSS, 1979).

1.1.1 Caracterização do modelo experimental

Os diversos fatores envolvidos na gênese e/ou manutenção da pressão arterial foi o que levou pesquisadores a proporem modelos experimentais onde se pudesse melhor caracterizar a doença e, desta forma, compreender o quanto

estes fatores separados ou associados poderiam atuar através de diferentes mecanismos.

A cepa de SHR (ratos espontaneamente hipertensos) desenvolvida por Okamoto & Aoki (1963) é um modelo de hipertensão arterial crônica, determinada geneticamente e com grandes semelhanças ao curso de desenvolvimento da hipertensão essencial humana, razão pela qual tem sido um modelo amplamente utilizado na avaliação da hipertensão essencial. Até a 4ª semana de vida desta cepa, os níveis pressóricos de ratos são normais. A partir da 4ª semana, a pressão arterial do SHR sofre um rápido e importante incremento observado até a 12ª semana de vida, alcançando níveis de pressão sistólica de aproximadamente 180-200 mmHg. Este incremento nos níveis pressóricos continua sendo observado de maneira mais gradual até a 20ª semana (MULVANY, M J; NYBORG, 1980).

Adicionalmente, características funcionais também podem aumentar a resistência vascular periférica e, de fato, Mulvany & Nyborg (1980) demonstraram que as artérias mesentéricas de SHR apresentavam, previamente ao aumento da pressão arterial, maior sensibilidade à noradrenalina, a qual parece ter sido causada por uma maior sensibilidade ao cálcio.

O aumento da resistência vascular periférica associado com disfunção endotelial observado na hipertensão arterial, bem como a perda da função modulatória exercida pelos fatores derivados do endotélio parece ter participação crítica no desenvolvimento desta condição (BOHLEN, 1986). As alterações da função endotelial na hipertensão têm sido atribuídas ao desequilíbrio na geração e/ou liberação de mediadores envolvidos na contração e no relaxamento vascular (SCHIFFRIN, E L, 2001).

É possível observar ainda que, os SHR com quatro semanas de vida já apresentam alterações estruturais importantes em artérias mesentéricas de resistência, tais como maior espessura da camada arterial média e razão parede:lúmen (RIZZONI, D et al., 1994), além de maior rigidez vascular, previamente ao aumento da pressão arterial. Esta última característica está geralmente associada ao aumento na quantidade de colágeno e alterações na distribuição de elastina, levando a uma lâmina elástica interna mais compacta (GONZÁLEZ et al., 2006a).

1.1.2 Remodelamento vascular e hipertensão arterial

No sistema circulatório, os vasos sanguíneos apresentam suas paredes divididas basicamente em três camadas: túnica adventícia, túnica média e túnica interna (LAUGHLIN; NEWCOMER; BENDER, 2008). A estrutura dos vasos sanguíneos varia de acordo com seu papel fisiológico. A parede arterial é organizada em três camadas concêntricas. Túnica íntima, camada de células mais interna que envolve o lúmen, delimitada pela camada elástica, composta por um arranjo linear e longitudinal de células endoteliais e membrana basal; túnica média, tecido compreendido entre a lâmina elástica interna e a externa, composto de um arranjo de células musculares lisas dispostas em forma circunferencial embebidas em matriz extracelular rica em colágeno, elastina e proteoglicanos; túnica adventícia, camada localizada externamente à lâmina elástica externa, é composta de fibroblastos organizados longitudinalmente, inseridos na matriz extracelular rica em colágeno e elastina, pequenos vasos e terminações nervosas (Figura 1) (HILLEBRANDS et al., 2001).

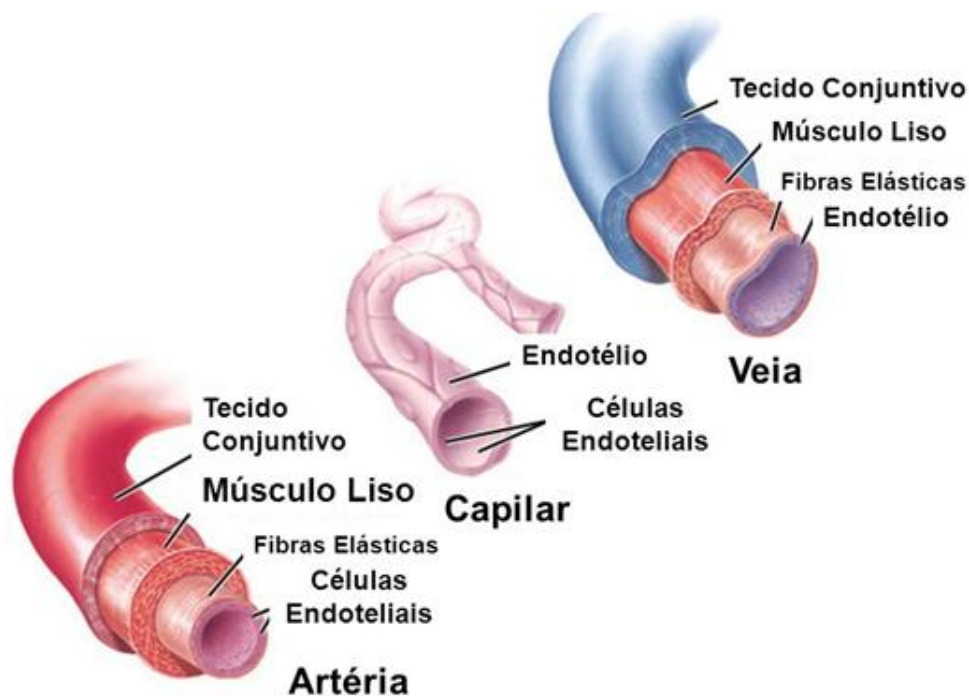


Figura 1: Imagem ilustrativa das características da parede arterial (adaptado de Sherwood, 2011).

De acordo com a Lei de *Poiseuille*, a resistência vascular periférica varia inversamente ao raio do vaso a quarta potência ($R = 8\eta L/\pi r^4$, onde η = viscosidade; L = comprimento; r = raio). Dessa maneira, pequenas alterações do diâmetro luminal podem influenciar grandemente na resistência vascular periférica e, conseqüentemente, levar a uma modulação significativa da pressão arterial. Nesse sentido, mudanças na geometria do vaso, conhecidas como remodelamento vascular, podem ocorrer devido a alterações na função (reatividade vascular), na distensibilidade (rigidez vascular) ou na estrutura vascular (ARRIBAS et al., 2006; INTENGAN; SCHIFFRIN, 2000; MARTINEZ-LEMUS et al., 2009; MULVANY, 2008).

O remodelamento das artérias de resistência, observadas em condições clínicas como na hipertensão arterial, não ocorrem como consequência do aumento na pressão sanguínea, mas sim para normalizar a tensão da parede na artéria. Sendo assim, com base na Lei de *Laplace*, o aumento da pressão arterial observado na hipertensão arterial é mantido pelo aumento na razão parede:lúmen (razão P/L) arterial. Nesse sentido, em um primeiro momento, o aumento na quantidade de substâncias neuro-humorais pode elevar a pressão sanguínea, alterando a tensão da parede na artéria. No entanto, para normalizar a tensão de parede em longo prazo, a pressão arterial elevada é mantida pelo aumento da razão P/L dos vasos (MULVANY, 1999).

As características estruturais primárias dos vasos responsáveis pela razão P/L são o diâmetro e a espessura da parede vascular, estando o vaso submetido a uma determinada pressão transmural. Nessa condição, o diâmetro do lúmen é determinado pelas propriedades mecânicas passivas e ativas do vaso. As propriedades passivas podem ser descritas pela relação entre a pressão intraluminal e a medida do lúmen sobre condições em que as células do músculo liso estão totalmente relaxadas, enquanto que as propriedades ativas são determinadas pelo estado contrátil das células musculares lisas, pelo seu número e organização (MULVANY, 1999).

As alterações na estrutura vascular, conhecidas como remodelamento arterial, são consideradas um processo complexo que pode envolver o aumento (hipertrofia), a diminuição (hipotrofia) ou o rearranjo (eutrofia) dos componentes da parede vascular e, também, a redução (remodelamento para dentro) ou o

aumento (remodelamento para fora) do diâmetro do lúmen vascular (Figura 2) (MULVANY et al., 1996).

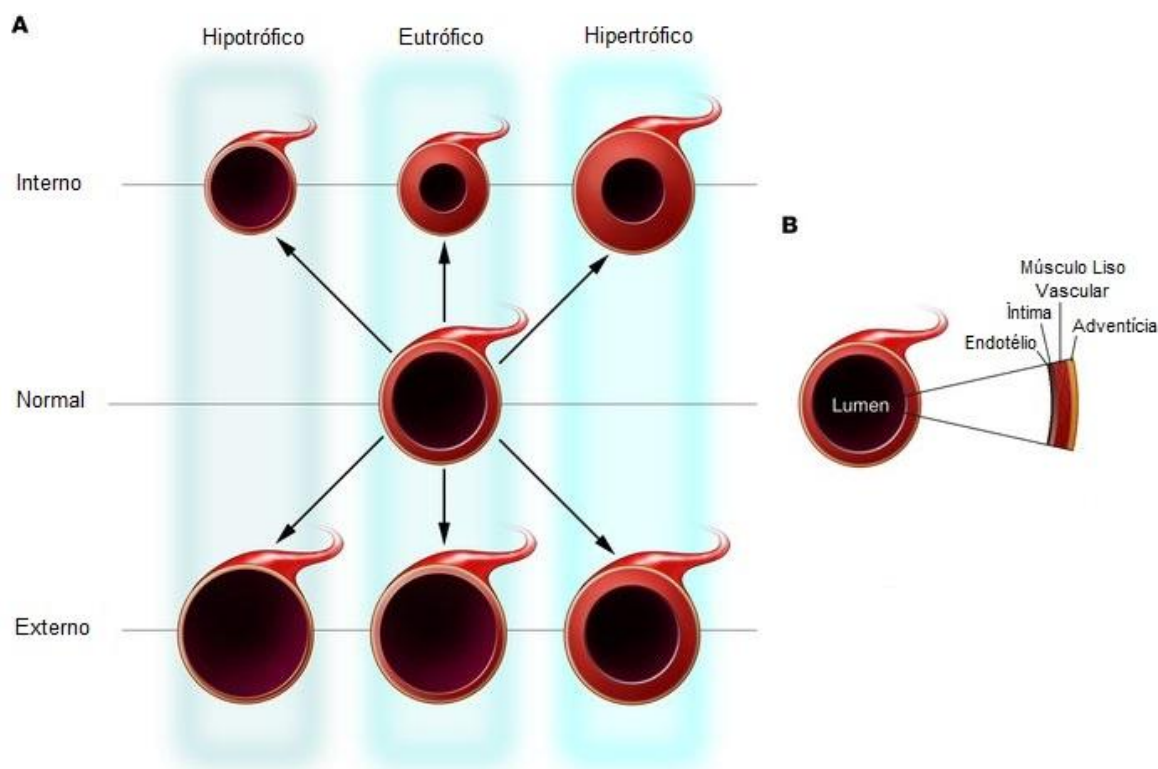


Figura 2: Classificação de artérias quanto ao tipo de remodelamento arterial. (A) O diagrama mostra a maneira em que o remodelamento vascular pode modificar as seções transversais dos vasos sanguíneos. O ponto de partida é o vaso no centro. O remodelamento pode ser hipertrófico (maior área da camada média; vasos na coluna direita), eutrófico (sem mudanças na área da camada média; vasos na coluna do meio) ou hipotrófico (menor área da camada média; vasos na coluna esquerda). Essas formas de remodelamento podem ser interna (redução do diâmetro interno; vasos na linha superior) ou externa (aumento do diâmetro interno; vasos na linha inferior). (B) Detalhamento das camadas arteriais (adaptado de CARRETERO, 2005).

O remodelamento hipotrófico ocorre quando há redução na área de secção transversa da parede vascular, representada pela mudança observada na figura 1. Esse tipo de remodelamento arterial parece estar relacionado à redução de componentes da parede vascular (MÁRQUEZ-MARTÍN et al., 2012; POURAGEAUD; DE MEY, 1997), sendo encontrado em arteríola aferente renal de rato SHR (NØRRELUND et al., 1994).

Em artérias que apresentam um remodelamento eutrófico, a parede arterial sofre uma reestruturação, porém, sem apresentar alterações no volume da

camada média arterial. Este tipo de remodelamento predomina em pacientes que apresentam hipertensão essencial leve (SCHIFFRIN et al., 1993) e em modelos experimentais como 2-rins-1-clipe (LI; SCHIFFRIN, 1996), com hipertensão induzida por angiotensina II (BRIONES, Ana M et al., 2009) e especificamente em artérias mesentéricas de resistência e pequenas artérias coronárias de modelos experimentais como o SHR (MULVANY et al., 1978).

Por sua vez, no remodelamento hipertrófico ocorre o aumento da área de secção transversa da parede arterial, crescimento da túnica média do vaso, resultando em uma “invasão” do lúmen vascular. Esse remodelamento parece predominar em modelos animais com hipertensão arterial severa, como no modelo DOCA-sal (DENG; SCHIFFRIN, 1992), 1-rim-1-clipe (DENG; SCHIFFRIN, 1991) e no modelo Dahl-sal sensível (D’USCIO et al., 1997).

Além da modificação da geometria arterial, na hipertensão arterial o remodelamento vascular também está associado ao aumento da rigidez da parede vascular (ARRIBAS et al., 2006; INTENGAN; SCHIFFRIN, 2000). Esse tipo de modificação é resultante da somatória da rigidez ativa (representada pelo tônus do músculo liso vascular) (AGABITI-ROSEI et al., 2009) com a rigidez passiva, sendo essa última, um efeito das propriedades visco-elásticas intrínseca, principalmente das fibras de colágeno e de elastina presente na matriz extracelular (BRIONES et al., 2010).

O colágeno é uma proteína muito rígida cuja função é limitar a distensão do vaso produzida pela pressão, sendo que no sistema vascular predominam os colágenos do tipo I e III (BRIONES et al., 2010). O aumento na deposição de colágeno pode ser responsável por alterações mecânicas e pelo remodelamento vascular observado com a hipertensão. Já está bem estabelecido na literatura que a hipertensão estimula a produção de colágeno em artérias de resistência de modelos experimentais de hipertensão arterial tais como o SHR (GONZÁLEZ et al., 2006), o induzido por ouabaína (BRIONES, Ana M et al., 2006a) ou por infusão de angiotensina II (BRIONES et al., 2009).

A elastina constitui 90% das fibras elásticas, é um polímero insolúvel constituído por moléculas solúveis de tropoelastina, e por uma glicoproteína denominada fibrilina. A tropoelastina é a proteína precursora da elastina, sintetizada principalmente pelas células musculares lisas, embora os fibroblastos e as células endoteliais também apresentem capacidade elastogênica. As fibras

de elastina formam lâminas fenestradas que permitem o contato celular através de seus orifícios (BRIONES et al., 2010). A elastina é a proteína mais abundante em artérias de grande calibre (JACOB, 1993), no entanto também é detectada em artérias de resistência (BRIONES, Ana M et al., 2003).

As propriedades mecânicas passivas das artérias são principalmente oferecidas pelas fibras elásticas e colágenas, e são facilmente afetadas por alterações estruturais do vaso, como o remodelamento vascular. A rigidez e a geometria dos componentes do vaso, assim como a pressão intraluminal, a qual estão expostos, determinam as alterações na distensibilidade vascular (BRIONES et al., 2009; INTEGAN; SCHIFFRIN, 2000). Em particular, o colágeno e a elastina têm sido diretamente associados com a maior rigidez da parede vascular observada em animais hipertensos (BRIONES et al., 2003, 2009). Adicionalmente, alterações na elastina já foram demonstradas em artérias de condutância (ARRIBAS et al., 2008) e artérias de resistência de SHR (GONZÁLEZ et al., 2006), antes mesmo do desenvolvimento da hipertensão arterial comprometendo a propriedade mecânica da parede arterial e, eventualmente contribuindo para o desenvolvimento da hipertensão arterial.

Diante desse contexto, existe uma grande associação entre o processo de remodelamento vascular induzido pela hipertensão arterial e as alterações mecânicas observadas em artérias de resistência, sendo os componentes da matriz extracelular os principais responsáveis por esta associação.

1.1.3 Disfunção endotelial e hipertensão arterial

O endotélio pode ser considerado um verdadeiro sistema autócrino, parácrino e endócrino do organismo humano, capaz de promover síntese e liberação de substâncias metabolicamente ativas, participantes da regulação da homeostase e do tônus vascular (RUBANYI, 1993). Entretanto, o papel do endotélio não se restringe ao controle do tônus e a função vasomotora, mas se estende à regulação da proliferação e migração das células musculares lisas vasculares e adesão de leucócitos (MONCADA et al., 1977; MONCADA et al., 1991).

As células endoteliais vasculares formam uma camada monocelular que reveste a superfície luminal de todos os vasos sanguíneos e estão estrategicamente situadas entre a circulação e o restante da parede vascular, com importante participação na tônus do músculo liso vascular, ação fundamental para a manutenção da pressão sanguínea em níveis normais. Considerado o maior órgão endócrino no organismo, o endotélio vascular é capaz de liberar substâncias relacionadas à vasomotricidade que abrange a síntese de substâncias vasoativas denominadas fatores de relaxamento derivados do endotélio (EDRF) e fatores constritores derivados do endotélio (EDCF) (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009b; FRÖLICH; FÖRSTERMANN, 1989; FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

Dentre os EDRF, o óxido nítrico (NO) é o mais potente agente vasodilatador, inibidor da agregação plaquetária, da coagulação e da proliferação celular. Entretanto, existem outros fatores mediadores da vasodilatação como a bradicinina, a prostaciclina (PGI₂) e o EDHF (fator hiperpolarizante derivado do endotélio). Dentre as substâncias vasoconstritoras, podemos citar a angiotensina II, a endotelina-1 e os produtos do metabolismo do ácido araquidônico como o tromboxano A₂ (TXA₂) (CARVALHO, Mhc et al., 2001). Além disso, as espécies reativas de oxigênio geradas pelas três camadas da parede vascular, participam na modulação do tônus vascular produzindo tanto vasodilatação como vasoconstrição em função da espécie reativa de oxigênio e do leito vascular (Figura 3) (PARAVICINI; TOUYZ, 2008).

Diante desse contexto, é importante considerar que, alterações na síntese e/ou liberação desses fatores podem interferir na gênese e/ou manutenção da hipertensão arterial (LÜSCHER; VANHOUTTE, 1986a). Aumento da síntese de fatores vasoconstritores e de fatores de crescimento e, também, redução da síntese ou liberação de fatores vasodilatadores são modificações importantes na função endotelial e podem promover elevação da resistência vascular e, conseqüentemente, da pressão arterial. Essas variações da função do endotélio foram estudadas por diversos pesquisadores, levando à denominação disfunção endotelial (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; TANG; VANHOUTTE, 2010).

A disfunção endotelial se tornou um preditor de doenças cardiovasculares, sendo considerada uma característica comum da hipertensão (VANHOUTTE et

al., 2009). Variações na função endotelial são consideradas um dos principais fatores responsáveis pelo incremento e manutenção da pressão arterial.

1.2 MÚSCULO LISO E REGULAÇÃO DO TÔNUS VASCULAR

O tônus do músculo liso vascular é um fator determinante de resistência vascular. Sua regulação é realizada pelos fatores derivados do endotélio, pressão sanguínea, inervação e por estímulos hormonais. As células musculares lisas vasculares requerem um aumento na concentração de Ca^{+2} citoplasmático, para deflagrar a sua contração. Este aumento, por sua vez, 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; TOUYZ et al., 2018).

É importante ressaltar que, a contração do músculo liso vascular é mediada por dois mecanismos, sendo eles o acoplamento eletromecânico e o acoplamento farmacomecânico (LINCOLN et al., 2001).

O acoplamento eletromecânico promove a contração através de modificações no potencial de membrana da célula. A despolarização da membrana induzida, por exemplo, pelo aumento da concentração de K^{+} extracelular, promove influxo de Ca^{2+} através da abertura de canais para cálcio operados por voltagem, causando contração (BÜLBRING; TOMITA, 1987; GANITKEVICH; ISENBERG, 1991).

Por outro lado, o acoplamento farmacomecânico baseia-se na contração induzida por agonistas contráteis, como norepinefrina, endotelina, angiotensina II e serotonina. Esses agonistas ligam-se a receptores específicos da membrana da célula muscular lisa que são acoplados à proteína G. A interação agonista-receptor ativa a subunidade α da proteína G, que por sua vez, ativa a fosfolipase C (PLC) levando à síntese de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 interage com seus receptores na membrana do retículo sarcoplasmático e estimula a liberação de Ca^{2+} . O DAG ativa a proteína quinase C (PKC), que aumenta a mobilização de Ca^{2+} através de canais da membrana, além de aumentar a sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca^{2+} e fosforilar a cadeia leve da miosina (MLC).

Todos esses mecanismos contribuem para o aumento da oferta do Ca^{+2} à maquinaria contrátil. Dessa forma, o Ca^{2+} liga-se à calmodulina, formando o complexo Ca^{2+} -calmodulina. Uma vez formado o complexo Ca^{2+} -calmodulina,

ocorre ativação da quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), viabilizando a interação entre os miofilamentos de actina e miosina, portanto, a contração muscular (HOROWITZ et al., 1996b; KIM et al., 2008; STULL et al., 1991).

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

1.2.1 Óxido Nítrico

O NO é o principal mediador do relaxamento vascular, um radical livre gasoso, com uma meia-vida curta, mas extremamente difusível pela membrana celular, originado, principalmente, através da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) em uma reação que implica a conversão do aminoácido L-arginina para L-citrulina. Em condições fisiológicas, o relaxamento mediado pelo NO pode ser induzido por diversos estímulos (físicos e/ou químicos) tais como: estiramento vascular, alterações na velocidade de fluxo sanguíneo (*shear stress*), agregação plaquetária, acetilcolina, adenosina difosfato (ADP), bradicinina, angiotensina II, serotonina (5-HT), entre outras (MARÍN; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 1997; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

Após sua síntese e liberação pelo endotélio, o NO promove vasodilatação difundindo-se para o músculo liso vascular e, através da ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs) promove aumento da concentração intracelular de GMPc (3, 5-monofosfato de guanosina cíclico). O GMPc ativa a proteína quinase G (PKG) seguindo com o relaxamento vascular. Dentre os mecanismos pelos quais a PKG produz o relaxamento, se encontram: 1) a ativação de canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} que hiperpolarizam a membrana e inibem a entrada de cálcio do meio extracelular pelos canais de Ca^{+2} dependentes de voltagem promovendo relaxamento; 2) inibição da produção de IP_3 e fosforilação do receptor IP_3 , o qual desestimula a liberação de Ca^{+2} pelo retículo sarcoplasmático; 3) estimulação da Ca^{2+} ATPase da membrana plasmática, estimulando a saída de Ca^{2+} , e do retículo sarcoplasmático (SERCA) estimulando sua recaptação; 4) fosforilação da MLCK

que inibe sua atividade e reduz a contração muscular lisa vascular (CARVAJAL et al., 2000; MARÍN; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 1997).

O fato do NO possuir meia-vida curta se deve à sua rápida oxidação a nitrito e nitrato. Um dos mecanismos mais aceitos para explicar a disfunção endotelial associada com a hipertensão é a diminuição na disponibilidade de NO. Desse modo, menor disponibilidade de NO está associada à diminuição na síntese, no aumento da degradação ou na redução da ativação da guanilato ciclase (Figura 3). A menor síntese de NO pode resultar da deficiência de substratos e co-fatores para a NOS, diminuída expressão ou ativação da NOS, tais como fosforilação da enzima ou interação com proteínas (hsp90 ou calmodulina), ou ainda um aumento nos inibidores endógenos da enzima (ADMA). A maior degradação de NO ocorre pela reação do NO com moléculas tais como hemoglobina e albumina, e principalmente por reagir com radicais livres derivados do oxigênio, principalmente ânion superóxido (resultando em peroxinitrito - ONOO⁻), resultando em inibição da sua atividade biológica e consequente prejuízo na resposta vasodilatadora (HUIE; PADMAJA, 1993; TANG; VANHOUTTE, 2010).

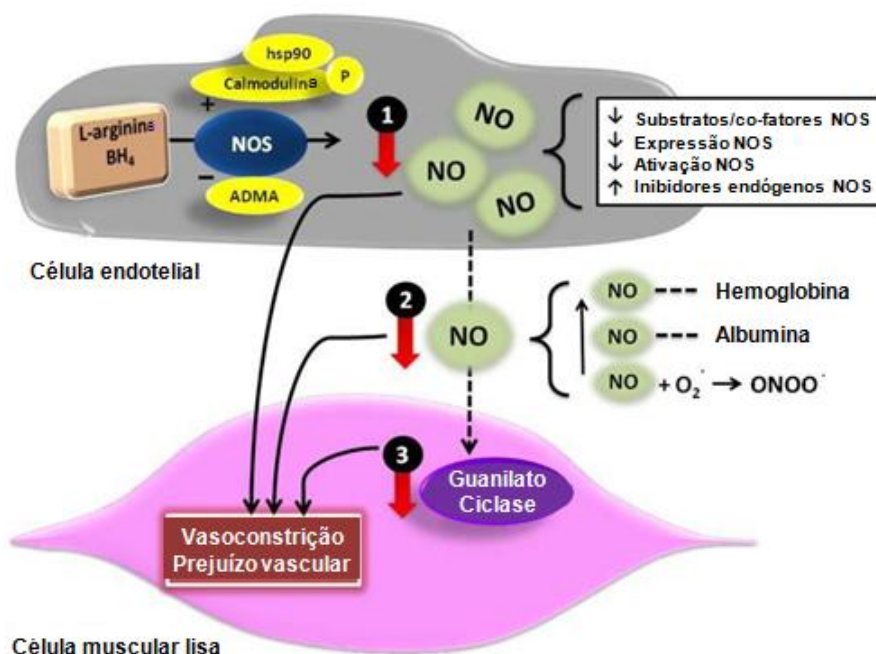


Figura 3: Mecanismos de redução na disponibilidade de óxido nítrico com a hipertensão. ADMA: dimetil arginina assimétrica; BH₄: tetrahydrobiopterina; hsp90: proteína de choque térmico 90; NO: óxido nítrico; NOS: óxido nítrico sintase; O₂⁻: ânion superóxido; ONOO⁻: peroxinitrito (Adaptado de TANG & VANHOUTTE, 2010).

1.2.2 Fator hiperpolarizante derivado do endotélio - EDHF

O EDHF é um potente fator vasodilatador sintetizado pelas células endoteliais com grande importância nas artérias de resistência e arteríolas. Este fator promove o relaxamento pela hiperpolarização das células musculares lisas através da ativação de canais de potássio dependentes de Ca^{+2} , por exemplo, em leito vascular mesentérico (ADEAGBO; TRIGGLE, 1993).

Na síntese de EDHF a hiperpolarização das células endoteliais pode seguir três respostas: a) hiperpolarização endotelial facilitando aumento de cálcio intracelular, resultando na síntese de EDHF; b) hiperpolarização endotelial conduzida para o músculo liso vascular através das *gap junctions* e c) liberação de íons K^+ pelo endotélio ativando canais de K^+ de larga condutância resultando na hiperpolarização do músculo liso vascular (SHIMOKAWA; MATOBA, 2004).

Diante da existência de mudança do potencial de repouso da membrana plasmática do músculo liso vascular, concluíram que a hiperpolarização da membrana muscular lisa é outro mecanismo que explica o relaxamento dependente do endotélio (GARLAND; MCPHERSON, 1992; NAGAO; VANHOUTTE, 1991). A ativação dos canais para potássio do músculo liso vascular, por EDHF, leva a hiperpolarização da membrana por diminuir a atividade dos canais de Ca^{2+} tipo L voltagem dependente, reduzindo assim o cálcio intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovendo o relaxamento (NELSON; QUAYLE, 1995)

Atualmente, sabe-se que os canais para potássio envolvidos na hiperpolarização promovida pelo EDHF são: 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^+ ativados por cálcio de larga condutância (BK_{Ca}); os canais para K^+ ativados por cálcio de intermediária condutância (IK_{Ca}); os canais para K^+ ativados por cálcio de baixa condutância (SK_{Ca}). Todavia, a natureza química do EDHF ainda não está bem estabelecida e muitos são os estudos que especulam qual seria a substância responsável pela hiperpolarização (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009).

Alguns trabalhos apontam como possíveis candidatos a EDHF os produtos do ácido araquidônico pela via da citocromo P450, o íon potássio, o óxido nítrico de estoques intracelulares, o peróxido de hidrogênio ou mesmo o acoplamento

elétrico entre as células endoteliais e musculares lisas através de junções comunicantes (gap junctions) (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006; PRICKETT et al., 2017; RABELO et al., 2003).

A contribuição dos EDHF é significativamente maior em vasos de pequeno diâmetro que em artérias de grandes calibre (URAKAMI-HARASAWA et al., 1997; WOOLFSON; POSTON, 1990).

1.2.3 Espécies reativas de oxigênio

O metabolismo aeróbico celular produz várias substâncias eletricamente instáveis e potencialmente reativas capazes de causar oxidação, denominadas espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo as de maior relevância: ânion superóxido, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\cdot) (YUYUN; NG; NG, 2018).

A produção de ERO no metabolismo celular é proveniente de diversos mecanismos, entre eles: geração oxidativa de energia pela cadeia mitocondrial (LEE, Hsin-Chen; WEI, 2007), produção de radicais livres pelo citocromo P-450, mecanismo de defesa dos fagócitos que produzem radical superóxido, a xantina oxidase, mieloperoxidases, ciclooxygenases, lipooxygenases, NOS e as enzimas da família das NADPH oxidases (BEDARD; KRAUSE, 2007; MUELLER et al., 2005; WESELER; BAST, 2010).

No sistema vascular, o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) assume destacada relevância entre as EROs, sendo formado pela redução univalente do oxigênio que é mediada por enzimas como a NADPH oxidase e xantinas oxidases, além da NOS desacoplada (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; WESELER; BAST, 2010). Após ser formado, o ânion superóxido pode dar origem a outros radicais livres, como o peroxinitrito, produto da reação do $O_2^{\cdot-}$ e o $OONO^\cdot$. Por outro lado, através da ação da superóxido dismutase (SOD), o ânion superóxido é dismutado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual pode ser convertido em água por ação da glutathione peroxidase (GPx) ou da catalase.

Em sistemas biológicos observa-se que a produção de oxidantes é balanceada pela produção de antioxidantes, substâncias que reduzem a severidade do estresse oxidativo, e estão presentes no nosso organismo através de fontes enzimáticas ou não enzimáticas. Dentre as enzimas antioxidantes se

incluem a superóxido dismutase (SOD), catalase e a glutathiona peroxidase e as fontes não enzimáticas de antioxidantes incluem vitaminas A, C e E, flavonóides, entre outras. Portanto, a eficiência do sistema antioxidante depende das enzimas antioxidantes, assim como da ingestão dietética e, pode ser modificado por diversos fatores como a idade, a nutrição e o exercício físico (FINAUD et al., 2006).

O aumento na produção de ERO promove diversos efeitos vasculares como a regulação do crescimento e diferenciação celular, a modulação da produção e degradação da MEC, a inativação do NO e a estimulação de diversas quinases e genes pró-inflamatórios, que colaboram para o remodelamento vascular e a disfunção endotelial presentes na hipertensão (BRIONES; TOUYZ, 2010; BRIONES; ARRIBAS; SALAICES, 2010; TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, 2004). A maior produção de ERO já foi observada em pacientes com hipertensão arterial essencial, em geral analisada através de biomarcadores de peroxidação lipídica e de estresse oxidativo no plasma (REDÓN et al., 2003). A produção de ERO através da NADPH oxidase também está aumentada em células do músculo liso vascular de artérias de resistência de pacientes hipertensos (TOUYZ; SCHIFFRIN, 2001). Em estudos realizados em animais experimentais observa-se que SHR apresentam maior produção de $O_2^{\cdot-}$ em aorta do que os ratos normotensos (ALVAREZ, Y et al., 2008; TANITO et al., 2004).

Um mecanismo notório que influencia as doenças cardiovasculares é a reação do ânion superóxido com o óxido nítrico, o que leva à diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico e, portanto, aos efeitos vasodilatadores e anti-inflamatórios do óxido nítrico, além da formação de peroxinitrito, que contribui para o estresse oxidativo. Além disso, o ânion superóxido também contribui para o processo inflamatório, participando do aumento da expressão de COX-2, presente na hipertensão arterial (ALVAREZ, Y et al., 2008; TANITO et al., 2004).

1.2.4 Cicloxigenase-2

Os prostanóides derivados da via da ciclooxigenase são substâncias liberadas pelo endotélio com poder vasomotor, os quais desempenham importante função na regulação do tônus vascular e participam das respostas à

agressão vascular (ALVAREZ, et al., 2005, 2007). Por este motivo, estão diretamente relacionados ao controle do tônus e da reatividade vascular em condições fisiológicas e patológicas.

Existem duas isoformas principais da ciclooxigenase, denominadas ciclooxigenase-1 (COX-1) e 2 (COX-2) que realizam a síntese das prostaglandinas e do tromboxano A_2 (TXA₂) (SMITH et al., 1996). A isoforma constitutiva, COX-1, é expressa em muitos tecidos e sintetiza pequenas quantidades de PGs e tem como principal função a manutenção das funções fisiológicas (LUO et al., 2016). A COX-2 é a isoforma induzida por estímulos pró-inflamatórios, citocinas, fatores mitogênicos e endotoxinas e possui a expressão relacionada, principalmente, com processos inflamatórios (PATRONO, Carlo, 2016).

Primeiramente, o ácido araquidônico, constituinte dos fosfolipídios de membrana é liberado por ação da fosfolipase A_2 (PLA₂). Em seguida, o ácido araquidônico pode ser oxidado por enzimas endoperoxidases, como a COX, onde será convertido em endoperóxido PGG₂ e, posteriormente a PGH₂, o precursor imediato de muitas outras prostaglandinas e tromboxanos. O último estágio ocorre com a conversão de PGH₂ para produtos finais de prostanóides, biologicamente ativos, por ação de sintases específicas. O perfil dos produtos gerados pelo metabolismo do ácido araquidônico pode variar de acordo com cada tecido e é determinado primariamente pela quantidade de sintases específicas de prostaglandinas presentes no tecido (BOS et al., 2004).

Os prostanóides mais comuns são PGI₂, PGE₂, PGD₂, PGF_{2α} e o tromboxano A_2 (TXA₂). Estes prostanóides vão ter seus efeitos mediados pela união a receptores acoplados a proteína G (Figura 4). A PGI₂, PGE₂, PGD₂ produzem vasodilatação por união a seus receptores específicos IP, EP₂/EP₄ e DP, respectivamente, que estão acoplados a proteína Gs. Após esta união, se produz a ativação da adenilato ciclase (AC) que aumenta a concentração de AMPc (adenosina monofosfato cíclico) e produz vasodilatação. Em contra partida, a PGE₂, através da união ao receptor EP₃, acoplado a proteína Gi, produz contração por inibição da adenilato ciclase. Em adição, a própria PGE₂, a PGF_{2α} e o TXA₂ produzem contração por união aos receptores EP₁, FP e TP, respectivamente, que estão acoplados a proteína Gq. Esta união ativa a fosfolipase C (PLC) formando os segundos mensageiros inositol trifosfato (IP₃) e

DAG, ativando a mobilização de cálcio intracelular e PKC (proteína quinase C), dando lugar a contração (BOS et al., 2004).

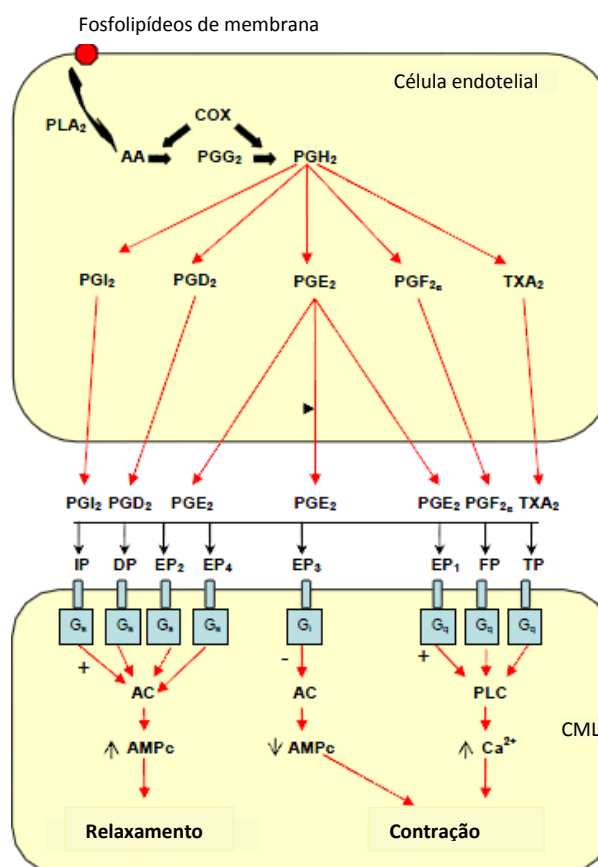


Figura 4: Síntese de prostanóides e mecanismos de sinalização. AA: ácido araquidônico; AC: adenilato ciclase; AMPc: adenosina monofosfato cíclico; CML: célula muscular lisa; COX: ciclooxigenase; PLA2: fosfolipase A2; PLC: fosfolipase C.

É importante destacar que o TXA₂, embora possa contribuir para o tônus vascular, tem papel fundamental em condições fisiológicas e estimulação da agregação plaquetária, onde o balanço entre o TXA₂ derivado das plaquetas e de prostaciclina derivada do endotélio, a qual inibe a agregação plaquetária, é crucial para a homeostase. Em contrapartida, em situações patológicas, o TXA₂ atua ativamente na manutenção de várias doenças cardiovasculares, dentre elas a hipertensão arterial (SELLERS & STALLONE, 2008). Estudos demonstraram que a utilização de inibidores da tromboxano sintase (ex: furegrelato) e bloqueadores do receptor TP (ex: SQ 29,548) reduzem a pressão arterial e previnem o desenvolvimento da hipertensão em modelos de ratos hipertensos como o SHR e 2-rins-1-clipe (BOUSSAIRI et al., 1994; CARVALHO, M H et al., 1997; GALIPEAU

et al., 2001). Esses estudos confirmam, portanto, que o TXA₂ e seu precursor PGH₂ tem um importante papel na patogênese da hipertensão arterial.

Dessa forma, além da participação da COX na manutenção das condições fisiológicas, atualmente é bem conhecida a implicação dos prostanóides derivados desta via no processo patológico de várias doenças que cursam com inflamação, como as cardiovasculares e renais (SCHÖNBECK et al., 1999; VANE et al., 1994; WU, K K, 1995). Em modelos experimentais de hipertensão foi notada maior expressão da COX-2 e maior participação dos prostanóides contráteis derivados desta via na resposta vascular a fenilefrina (ALVAREZ et al., 2005).

É importante considerar que os componentes estruturais de membrana influenciam diretamente na sinalização da cascata dos eicosanóides. Com isso, uma proporção adequada de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6 traduz a molécula precursora para a síntese de prostanóides, os quais possuem alta atividade biológica, atuando em funções homeostáticas, principalmente por regular a atividade plaquetária, além de participarem da manutenção do tônus vascular, proliferação de células do músculo liso vascular, e como mediadores da resposta inflamatória e agente quimiotáticos, além de outras funções (PARKER, 1987; FEUERSTEIN; HALLENBECK, 1987; DUBOIS et al., 1998; OATES et al., 1988; KAWABE; USHIKUBI; HASEBE, 2010).

1.3 ÁCIDOS GRAXOS

Na alimentação, a gordura usualmente está na forma de triacilgliceróis, que consistem de três diferentes ácidos graxos acoplados a uma molécula de glicerol e são as principais formas de armazenamento de gordura no organismo. A hidrólise ácida dos triacilglicerídios leva aos correspondentes ácidos carboxílicos – conhecidos como ácidos graxos.

Os ácidos graxos constituem componentes estruturais de membranas celulares, interagindo em cascatas bioquímicas importantes para produzir ações fisiológicas, além de cumprir funções energéticas e de reservas metabólicas (CONNOR, 2000; WANG, 2018). Assim, a adequação dietética de seu consumo é importante para o equilíbrio do funcionamento do organismo.

Os ácidos graxos são espécies químicas que caracterizam-se por apresentarem cadeia de carbonos e hidrogênios ligados entre si, que podem ter tamanhos variados. Ao longo da cadeia podemos encontrar dois tipos de ligações químicas, originando assim as diferentes famílias de ácidos graxos que são encontradas na natureza. Sendo assim, podem ser classificados como saturados ou insaturados, dependendo da ausência ou presença de ligações duplas carbono-carbono, respectivamente. Os insaturados são facilmente convertidos em saturados através da hidrogenação catalítica (redução). A presença de insaturação nas cadeias de ácido carboxílico dificulta a interação intermolecular, fazendo com que, em geral, estes se apresentem, à temperatura ambiente, no estado líquido; já os saturados, com uma maior facilidade de empacotamento intermolecular, são sólidos. De acordo com estes critérios podemos classificar os ácidos graxos em saturados, monoinsaturados e poliinsaturados.

1.3.1 Ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs)

Os PUFAs são os mais importantes componentes dos fosfolípidos que formam as membranas das células e podem ser sub-divididos em duas famílias de acordo com a posição da primeira insaturação da cadeia carbônica, sendo então chamadas família ômega-6 (ω -6 ou n-6) e família ômega-3 (ω -3 ou n-3). As diferentes posições e número de duplas ligações dão aos ácidos graxos

diferentes propriedades químicas, nutricionais e funcionais (SPECTOR, 1999; LAU et al., 2013).

Os ácidos graxos das famílias n-6 (linoleico) e n-3 (α -linolênico) são classificados como essenciais, visto que o corpo humano é incapaz de sintetizá-lo, sendo sua ingestão obrigatória (RATNAYAKE; GALLI, 2009). Após ingeridos, os PUFAs podem sofrer os processos de dessaturação (oxidação com formação de duplas ligações) e alongação (aumento da cadeia carbônica com átomos de carbono) no retículo endoplasmático, especialmente no fígado (CALDER & GRIMBLE, 2002). A metabolização do AL resulta na formação do ácido araquidônico (AA), enquanto que, EPA (ácido eicosapentaenóico) e DHA (ácido docosaenóico) são os produtos finais da metabolização do ácido α -linolênico (Figura 5).

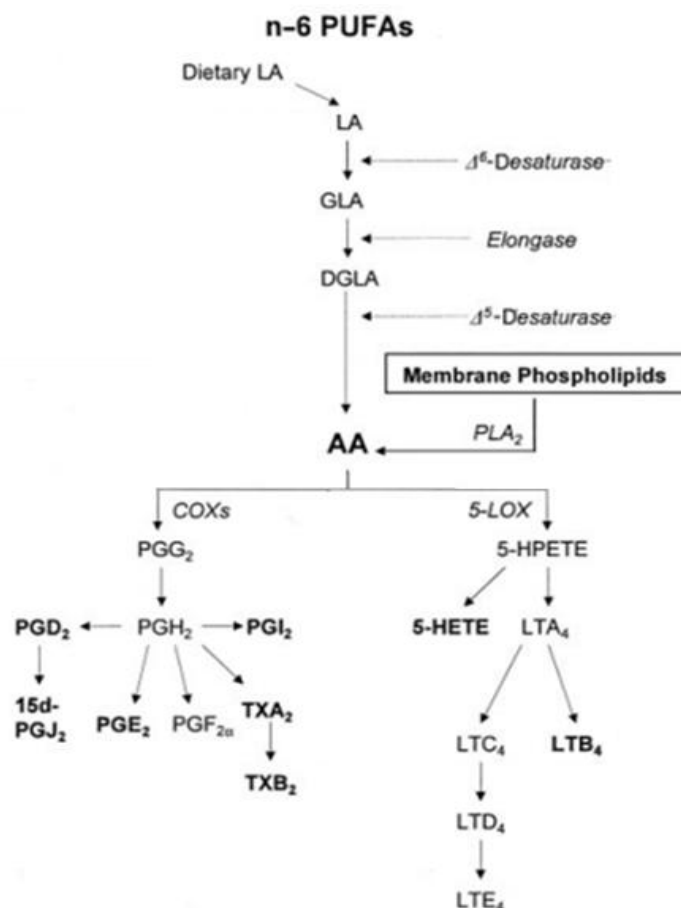


Figura 5: Via de biossíntese dos PUFAs ômega-3 e ômega-6 e via da COX (adaptado de Larsson al., 2004).

Os PUFAs são incorporados à membrana plasmática das células desempenhando funções indispensáveis à fisiologia celular (ALEXANDER, 1998),

como a homeostase e fluidez de membrana, assim como os processos de sinalização e de expressão gênica (DAS, 2006). Além disso, alguns são precursores de substâncias fisiologicamente ativas, os eicosanóides, como o AA e o EPA (LEE, Je et al., 2016).

As principais origens dietéticas do n-6 são os óleos de origem vegetal, tais como, o óleo de soja, óleo de milho, óleo de canola e óleo de girassol (YOUUDIM et al., 2000). Já os PUFAs n-3 são encontrados, principalmente, em óleo de peixe e em peixes de águas frias e profundas, como salmão, arenque, atum, sardinhas, e, em menor proporção, nos óleos vegetais como linhaça e azeite de oliva. Este acúmulo em peixes ocorre devido à expressiva quantidade desses PUFAs n-3 no fitoplâncton, os quais sintetizam EPA e DHA, que provê a sua distribuição ao longo da cadeia alimentar marinha (CONNOR, 2000).

Um balanço dietético adequado na proporção de n-6/n-3 é essencial ao metabolismo do organismo humano, uma vez que desempenham papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares e aterosclerose (AYALA et al., 2009), manutenção da integridade das células endoteliais (ROSS, 2018) (TOBOREK et al., 2002), na inibição da vasoconstrição e agregação plaquetária (AYALA et al, 2009), no crescimento fetal e desenvolvimento neural (Kim, 2007), na ação anti-inflamatória e antitrombótica (CHAPKIN et al., 2009), na ação sobre a prevenção do câncer (CALVIELLO et al., 2007), além de participar das funções imunomoduladoras (ANDRADE; CARMO, 2006).

1.3.2 Ácido linoleico (AL)

Os PUFAs n-6 são bem conhecidos por seu importante papel em muitas funções fisiológicas e, também, na redução dos riscos de doenças cardiovasculares, especialmente o AL. No entanto, alguns estudos sugerem que o consumo excessivo de PUFA n-6 pode levar a efeitos adversos para a saúde (ANDER et al., 2003; PATRONO; CIABATTONI; 1990), sugerindo aumento na síntese de TXA₂, os quais elevam os riscos de hipercolesterolemia, hiperlipoproteinemia, infarto do miocárdio e doenças ateroscleróticas (PATRONO et al, 1990; HIRAFUJI et al, 2003).

No entanto, estudos esclarecem que o aumento da taxa de AL em humanos não está associado ao aumento da inflamação (KLEIN-PLATAT et al., 2005; VAUGHAN et al., 2015). Ferrucci et al., (2006) observaram que concentrações plasmáticas totais de PUFA n-6 estavam inversamente associadas à proteína C reativa sérica, IL-6 e TNF- α . Além disso, Pischon et al. (2003) observaram que os níveis mais baixos de inflamação foram encontrados em indivíduos que tiveram o maior consumo de n-3 e n-6 PUFAs, entre 405 homens saudáveis e 454 mulheres saudáveis.

O AL é o PUFA mais amplamente encontrado na dieta dos indivíduos. Após consumido, o AL pode ser usado como fonte de energia, ser esterificado para formar lipídios neutros e polares tais como fosfolipídio e triacilglicerol e, ainda, servir como componente estrutural para manter um certo nível de fluidez da membrana. Além disso, quando liberado dos fosfolipídios de membrana, pode ser oxidado enzimaticamente em uma variedade de derivados envolvidos na sinalização celular (Figura 6). Reforçando essas ações, estudos evidenciam que a ingestão de AL não aumenta significativamente os níveis de AA no organismo (LANDS, 1992; LIOU et al., 2007; WHELAN; FRITSCH, 2013).

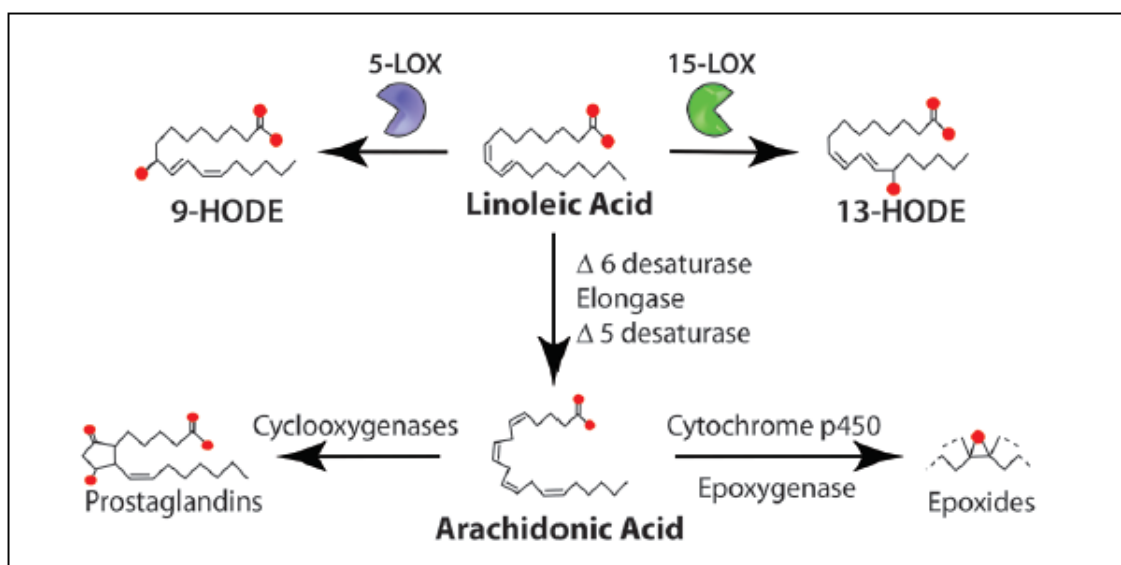


Figura 6: Caminhos envolvidos no metabolismo do AL e AA. - AL é metabolizado por 5- e 15-lipoxigenase (LOX) para formar ácido 9-hidroxiocetadecadienóico (9-HODE), respectivamente. O ácido linoléico também pode ser metabolizado em AA. Por sua vez, o ácido araquidônico é usado para formar prostaglandinas (por ciclooxigenases) e epóxidos (pelo citocromo p450 epoxigenasecaminho) (SHARMA et al., 2016).

Como destacado por Farvid e colaboradores (2014), grandes variações na ingestão de AL não foram capazes de afetar os níveis de AA circulante e celulares. E ainda, em revisão sistemática, a qual foi utilizada diferentes concentrações de AL (reduzida em $\leq 90\%$ ou aumentada) na dieta, não foram observadas alterações nos níveis plasmáticos e nos eritrócitos de AA nos participantes do estudo (RETT; WHELAN, 2011).

Os estudos que buscaram atribuir o efeito inflamatório ao AL, não foram capazes de comprovarem com seus achados. Baseado nisso, Johnson & Fritsche (2012), após avaliarem 15 ensaios populacionais os quais aumentaram os níveis de LA na dieta, concluíram que esta suplementação não alterou a concentração de marcadores inflamatórios. Em estudos utilizando células endoteliais vasculares, o PUFA n-6 apresentou propriedades anti-inflamatórias, suprimindo a produção de moléculas de adesão, quimiocinas e interleucinas (DE CATERINA, 2000).

Reforçando estes achados, Asp e colaboradores (2011), ao introduzirem, por 16 semanas, óleo de cártamo (rico em LA) na dieta de 35 mulheres pós-menopáusicas com diabetes mellitus do tipo 2, foram capazes de obter reduções significativas nas taxas de proteína C-reativa, hemoglobina glicada e aumento na lipoproteína de alta densidade (HDL). Além disso, alguns trabalhos demonstram que a alta ingestão de AL pode melhorar a sensibilidade à insulina (KUROTANI et al., 2012; SUMMERS et al., 2002) e reduzir os níveis de colesterol LDL (BJERMO et al., 2012; RASSIAS; KESTIN; NESTEL, 1991).

O desenvolvimento da hipertensão e de doença cardiovascular tem sido associado ao desequilíbrio e deficiência de ácido graxo poliinsaturado, principalmente o AL (HORROBIN, 1995; NAFTILAN; DZAU; LOSCALZO, 1986). Diversos estudos têm atribuído uma relação benéfica entre a pressão arterial elevada e o tratamento com AL, como restauração da pressão arterial em ratos hipertensos (KAWAHARA et al., 1990; GRIMSGAARD et al., 1999; MIURA et al., 2008); anti-hipertensivos em SHR (ST LOUIS et al., 1992); melhora da pressão arterial em humanos hipertensos (IACONO; DOUGHERTY, 1993); melhora nas pressões sistólica e diastólica (MIURA et al., 2008).

Além dos benefícios supracitados, o AL também está associado aos efeitos cardioprotetores. Ribeiro-Júnior e colaboradores (2010), demonstraram que o tratamento com óleo de soja, rico em AL, por 15 dias em ratos, foi associado a

uma melhora da função inotrópica do ventrículo esquerdo, com aumento das atividades enzimáticas da Na^+K^+ , ATPase e da miosina cardíaca, e da expressão proteica da SERCA 2a e do trocador sódio-cálcio. Este efeito não foi acompanhado de hipertrofia cardíaca ou de alterações na pressão arterial (in vivo).

Diante desses fatos, fica evidente a importância do AL no desempenho da regulação da pressão arterial e na função vascular. Entretanto, os mecanismos pelos quais ocorrem estas melhoras ainda não foram esclarecidos. Baseado no papel fundamental da artéria mesentérica na resistência vascular periférica e no controle da pressão arterial, a hipótese do presente estudo configura-se que o AL é capaz de melhorar as desordens vasculares e os níveis pressóricos elevados em SHR.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se o tratamento por quinze dias com ácido linoleico melhora a hipertensão arterial e as alterações vasculares observadas em SHR.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do tratamento com ácido linoleico sobre a pressão arterial sistólica, através de medida indireta;
- Analisar o efeito do tratamento com ácido linoleico nos parâmetros hemodinâmicos, tais como a pressão arterial sistólica, diastólica e média e, frequência cardíaca, em animal anestesiado;
- Investigar, em artérias mesentéricas de resistência de SHR tratados com ácido linolênico:
 - a. A reatividade vascular a agentes vasoconstritores e vasodilatadores;
 - b. A liberação de fatores vasodilatadores e vasoconstritores derivados do endotélio, especificamente, o óxido nítrico e os prostanoídes derivados da ciclooxigenase.
- Verificar a influência do tratamento com ácido linoleico sobre os parâmetros estrutural, tais como diâmetro do vaso, do lúmen, espessura de parede e relação parede/lúmen, e mecânico, tais como estresse de parede, tensão de parede e relação stress/strain em artéria mesentérica de resistência de SHR.
- Detectar a produção *in situ* de ânion superóxido em artérias mesentéricas de resistência de animais tratados com ácido linoleico por quinze dias.
- Mensurar a produção *in situ* de óxido nítrico em artérias mesentéricas de resistência de animais tratados com ácido linoleico por quinze dias.
- Quantificar o conteúdo de colágeno e elastina em cortes histológicos em artérias de resistência de animais após tratamento com ácido linoleico.
- Investigar a expressão proteica da isoforma da ciclooxigenase-2, eNOS e PPAR γ em artérias de resistência de animais tratados com ácido linoleico por quinze dias.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos, com três meses de idade, cedidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Os animais foram mantidos em gaiolas sob condições de controle de temperatura e um ciclo claro e escuro de 12/12 horas, com livre acesso a água e a ração.

A cepa SHR caracteriza-se por um modelo de hipertensão arterial crônica determinada geneticamente (OKAMOTO; AOKI, 1963). Tem sido largamente utilizada para investigações sobre a hipertensão devido às semelhanças do desenvolvimento da hipertensão arterial humana essencial primária.

O uso e cuidado dos 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 41/2013).

3.1.1 Modelo Experimental

Os animais foram distribuídos de forma aleatória em dois grupos experimentais: grupo controle e grupo tratado com ácido linoleico (AL). Os animais tratados receberam ácido linoleico (15 mg/kg, im) diluído em salina (30%) mais etanol (absolut, PA), enquanto que, os animais controle eram expostos ao veículo do tratamento (volume final administrado - 0,1 mL, im).

É importante ressaltar que a via intramuscular de administração foi para assegurar que todos os ratos recebessem a mesma dose diária. Além disso, a escolha pela dose diária foi determinada com base em dados anteriores da literatura, os quais mostraram que 35 mg/kg não apresentou efeitos cardiotoxicos durante a exposição aguda (MITCHELL et al., 2002). Diferentes doses foram

testadas e, de acordo com nossos dados preliminares, 15 mg/kg é a quantidade mínima de AL que mostrou efeitos benéficos sobre a função vascular.

Na Figura 5 foram esquematizados os protocolos experimentais realizados.

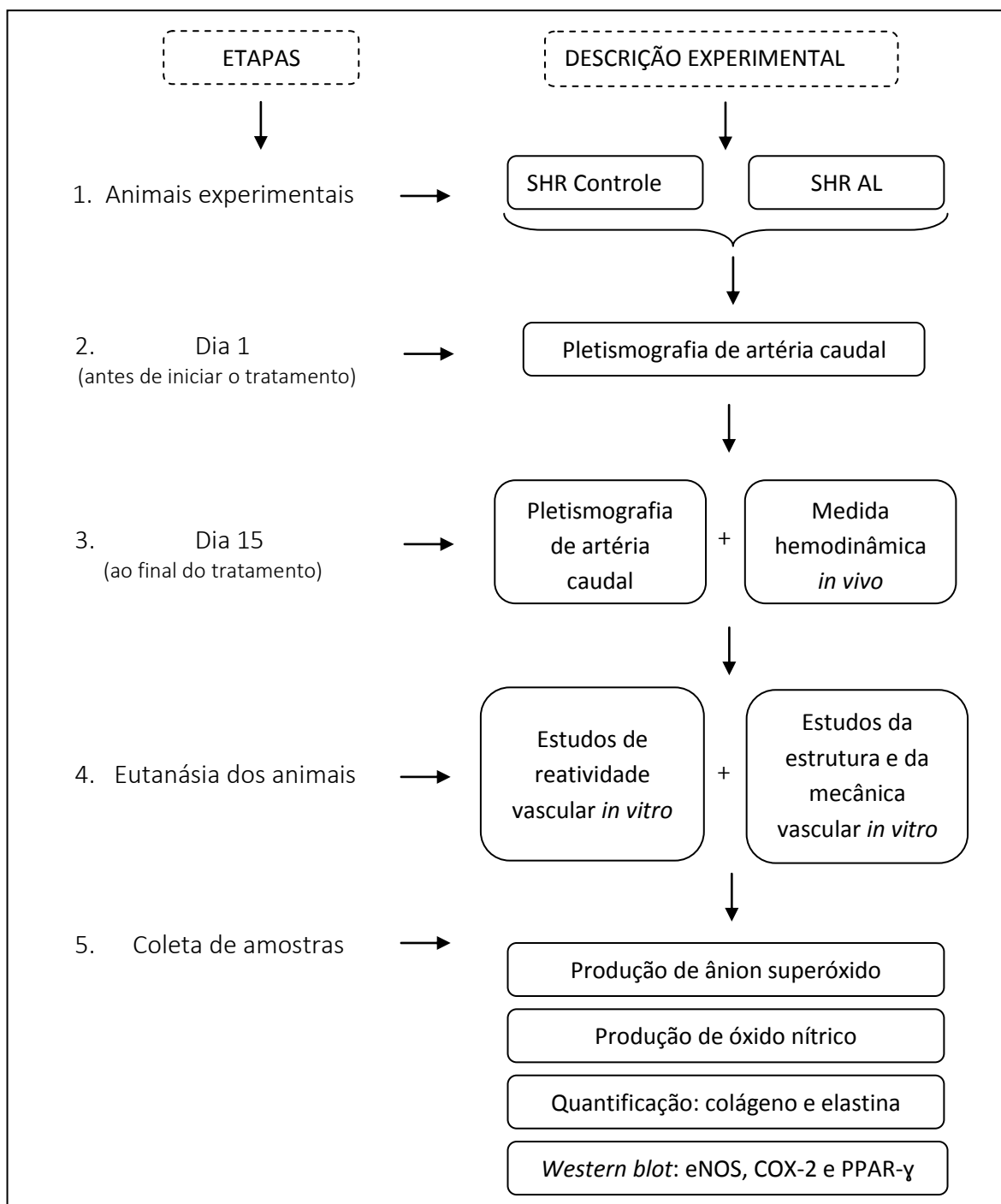


Figura 7: Esquema representativo das etapas e protocolos experimentais desenvolvidos no presente estudo. Grupo controle: SHR Controle; Grupo tratado: SHR AL-

3.2 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PRESSÓRICOS

3.2.1 Medida indireta da pressão arterial sistólica

A pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada nos animais controle e tratados com LA, antes do início do tratamento e ao final dos quinze dias, pelo método de pletismografia de cauda (Insight – Medidor de pressão, versão 2.11). 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.

Para o registro pressórico, os animais eram colocados em um contentor cilíndrico de acrílico e este transferido para um aparato que promovia um ambiente escuro e aquecido à 37 °C, por um período de 15 minutos a 20 minutos, a fim de promover dilatação da artéria caudal. Em seguida, a cauda dos animais era conectada ao manguito inflável dotado de sensor de fluxo que, por sua vez, estava conectado ao amplificador e este ao computador, para obtenção dos dados pressóricos. A média de três medidas, que não variassem mais que 4 mmHg, foi utilizada.

A medida indireta de pressão arterial com este método é similar ao método utilizado em humanos, com esfigmomanômetro, ou seja, a PAS é detectada através da onda de pulso que surge após o colapso da artéria dado pela insuflação do manguito de pressão.

3.2.2 Medida direta de parâmetros hemodinâmicos

Ao final dos quinze dias de tratamento, os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg de peso corporal) através de injeção intraperitoneal, e submetidos à cirurgia para cateterização da artéria carótida direita para mensuração dos parâmetros cardiovasculares *in vivo*. O plano anestésico foi avaliado pela responsividade ao estímulo doloroso, e quando necessário, houve suplementação na dose utilizada. Com os animais mantidos aquecidos e oxigenados, a artéria carótida direita foi cateterizada com um micromanômetro

Millar (MikroTip® 2F, Millar Instruments Inc., Houston, TX, USA). O cateter foi conectado ao hardware ligado a um computador que permitiu aquisição online dos sinais pelo software AcqKnowledge® 3.7.5 (Biopac Systems Inc., CA, USA). Os parâmetros hemodinâmicos de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram coletados após período de estabilização de no mínimo 10 minutos.

3.3 ESTUDO DAS PROPRIEDADES ESTRUTURAL E MECÂNICAS DE ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA

3.3.1 Miógrafo de pressão

Para a técnica de artérias pressurizadas foram utilizadas artérias mesentéricas de terceiro ramo montadas em um miógrafo de pressão (Danish Myo Tech, model P110, J. P. Trading, Aarhus, Dinamarca), com segmentos de aproximadamente 2 mm.

Inicialmente, as extremidades da artéria foram canuladas com microcânulas de vidro e fixada com fios de sutura de nylon cirúrgico. Em seguida, o comprimento da artéria foi ajustado aumentando a pressão intraluminal até aproximadamente 140 mmHg até que as paredes arteriais estivessem paralelas e sem estiramento. Com esse procedimento, foi possível verificar se a artéria estava adequadamente pressurizada. Assim, o seguimento foi perfundido com solução de Krebs-Henseleit na ausência de cálcio (KHS $0Ca^{2+}$) (em mM: 130 NaCl, 14,9 $NaHCO_3$, 3,7 KCl, 1,2 KH_2PO_4 , 1,2 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 11 glicose, 10 HEPES e 10 EGTA, pH 7,4), por 30 minutos. A solução de KHS $0Ca^{2+}$, utilizada para determinar as propriedades passivas do vaso, foi preparada omitindo o $CaCl_2$ e adicionando EGTA 10 mM.

Após o período de estabilização, a artéria foi ajustada de modo que suas paredes ficassem paralelas sem tensionar. A pressão intraluminal, então, foi aumentada para 140 mmHg de modo que a artéria se ajustasse na cânula. Em sequência, o seguimento foi ajustado para uma pressão de 45 mmHg e mantido em período de estabilização por 30 minutos, à 37°C, em solução de KHS. Ao final

deste período, a pressão intraluminal foi reduzida para 10 mmHg e uma curva de pressão de diâmetro foi obtido pelo aumento gradual da pressão intraluminal de 20 mmHg, até que se atingisse 140 mmHg. Para cada valor de pressão intraluminal, ao final dos 3 minutos, foram medidos o diâmetro interno (D_i) e externo (D_e) e, também, foram medidos em condição passiva (D_{i0Ca} e D_{e0Ca}).

3.3.2 Cálculo das propriedades mecânicas e estruturais

Para a medida do diâmetro interno e externo em condição passiva, os seguintes parâmetros estruturais foram calculados:

1) Espessura da parede (EP)

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

2) Relação Parede/Lúmen (P/L)

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

Os parâmetros mecânicos foram calculados segundo a metodologia de Baumbach & Heistad (1989):

3) Strain (ϵ) – Representa a variação nas dimensões de um corpo (deformação, ϵ) em consequência de uma dada pressão aplicada.

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

Onde: D_{00Ca} é o diâmetro interno à 10 mmHg e D_{i0Ca} é o diâmetro interno observado para uma dada pressão intravascular sob condição de completo relaxamento, ambos medidos em meio OCa^{2+} .

- 4) Stress de parede (σ) – Tensão (medida por unidade de área) produzida na parede arterial frente a alterações da pressão intraluminal, do diâmetro interno e da espessura da parede.

$$\sigma = \frac{(P \times D_{(0Ca)})}{(2EP)}$$

Onde: P é a pressão intraluminal (1 mmHg = 133.4 N/m²) e EP é a espessura da parede em cada pressão intraluminal em meio 0Ca²⁺.

Independente da geometria, a rigidez arterial é determinada pelo módulo de elasticidade de Young o qual pode ser expresso pela relação entre tensão e deformação ($E = \text{Stress/Strain}$). A relação *stress-strain* exibe um comportamento curvilíneo, assim, torna-se mais apropriado o cálculo da relação tangencial ou módulo elástico incremental (E_{inc}), o qual pode ser determinado pela inclinação (β) da curva de *stress-strain* ($E_{inc} = \delta\sigma/\delta\varepsilon$) (DOBRIN, 1978). E_{inc} foi obtida por ajuste dos dados de *stress-strain* de cada animal a uma curva exponencial usando a equação $\sigma = \sigma_{orig}e^{\beta\varepsilon}$, onde σ_{orig} é a tensão no diâmetro original (diâmetro a 10 mmHg). Considerando a equação acima, nota-se que $E_{inc} = \beta\sigma$. Para um dado valor σ , E_{inc} é diretamente proporcional à β . Um aumento em β implica um aumento no E_{inc} , o que significa um aumento de rigidez.

3.4 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO VASCULAR

Para estudar a reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência, foi utilizado o método descrito por Mulvany & Halpern (1977). Após análise dos parâmetros hemodinâmicos nos animais anestesiados, os mesmos foram eutanaziados e exsanguinados.

O leito mesentérico foi removido e posto em uma placa de petri contendo solução de Krebs-Henseleit a 4^o C (composição em mM: NaCl 118; KCl 4,7; NaHCO₃ 25; CaCl₂.2H₂O 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄.7H₂O 1,2; EDTA 0,01 e glicose 11). Ramos de terceira ordem da artéria mesentérica superior foram dissecados e cortados em segmentos de 2,0 mm de comprimento com o auxílio de um

microscópio de dissecação. Dois fios de tungstênio (40 μm de diâmetro) foram inseridos no lúmen das artérias e montados em um miógrafo para vasos de resistência para estudos de tensão isométrica (Danish Myo Tech, Modelo 410A e 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca). Um dos fios foi acoplado a um transdutor de tensão e o outro a um micrômetro que permite o estiramento das artérias. O miógrafo, por sua vez, foi conectado a um sistema para aquisição (Powerlab/800 ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Austrália) de dados e este a um computador (Figura 6).

Posteriormente, as artérias foram estabilizadas por um período de 30 minutos em solução de Krebs-Henseleit, gaseificada com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2 , pH 7,4) e mantida à temperatura de 37 °C. Transcorrido o período de estabilização, as artérias foram estiradas a uma tensão de repouso considerada ótima em relação ao seu diâmetro interno. Para isso, em cada segmento arterial a relação tensão:diâmetro interno foi calculado e a circunferência interna correspondente a uma pressão transmural de 100 mmHg para um vaso relaxado *in situ* (L_{100}) foi determinada (Mulvany & Halpern, 1977). Para a realização dos experimentos, as artérias foram mantidas com uma circunferência interna L_1 , calculado como $L_1 = 0,90 \times L_{100}$, circunferência na qual o desenvolvimento de força é máximo (Mulvany & Halpern, 1977).

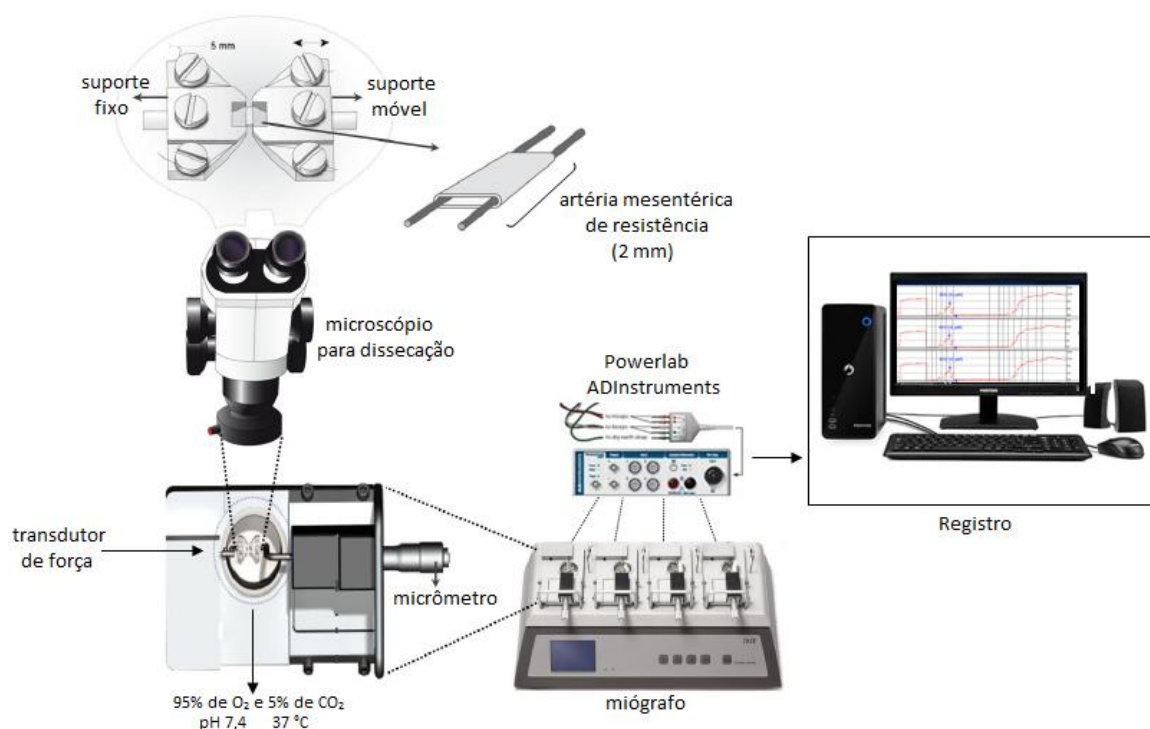


Figura 8: Esquema representativo da preparação experimental dos anéis de artéria mesentérica para a realização de estudos de reatividade vascular *in vitro*.

3.4.1 Avaliação da integridade do músculo liso vascular

Após o período de estabilização em sua tensão de estiramento ideal, foi administrado ao banho KCl 120 mM para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização. Ao atingir o platô nos registros de contração máxima do músculo liso vascular, período de aproximadamente 30 minutos, os anéis foram lavados três vezes com solução de Krebs Henseleit e após retorno à sua tensão basal, determinou-se a presença de endotélio (Figura 9).

3.4.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio

Com intuito de verificar se o tratamento com ácido linoleico altera a função endotelial, esta foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina (ACh). Para tal, os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina (Fe) suficiente para atingir 50% da contração produzida pela solução de Krebs-Henseleit com KCl 120 mM, e então, o relaxamento foi obtido por exposição a 10 μ M de ACh. As artérias que não alcançavam 70% do relaxamento foram descartadas (Figura 7).

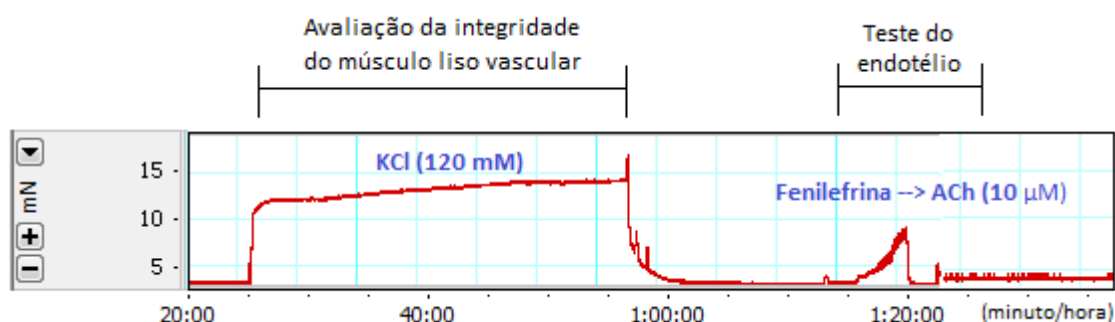


Figura 9: Registro com curvas do teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e da avaliação da integridade funcional do endotélio. (KCl: cloreto de potássio; ACh: acetilcolina).

3.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.5.1 Efeito do tratamento por quinze dias com ácido linoleico sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina, dilatadora à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio em artérias mesentéricas

Após a avaliação da integridade do músculo liso e do endotélio, utilizando-se fenilefrina, agonista alfa-adrenérgico, em concentrações crescentes (0,1 nM – 0,3 mM) aplicadas ao banho, foi verificado se o tratamento com ácido linoleico afeta a responsividade vascular constritora. O efeito frente a esta concentração crescente de fenilefrina foi normalizado em função da resposta contrátil máxima induzida pelo KCl (120 mM) (Figura 8).

Para estudar o efeito do tratamento sobre a resposta vasodilatadora dependente do endotélio, foram realizadas curvas concentração-resposta à acetilcolina (0,01 nM a 0,3 mM), nos anéis previamente contraídos com fenilefrina 1 μ M após obtido o platô (Figura 8). Os mesmos critérios foram seguidos para avaliar a vasodilatação não mediada pelo endotélio através do relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (0,01 nM a 0,3 mM).

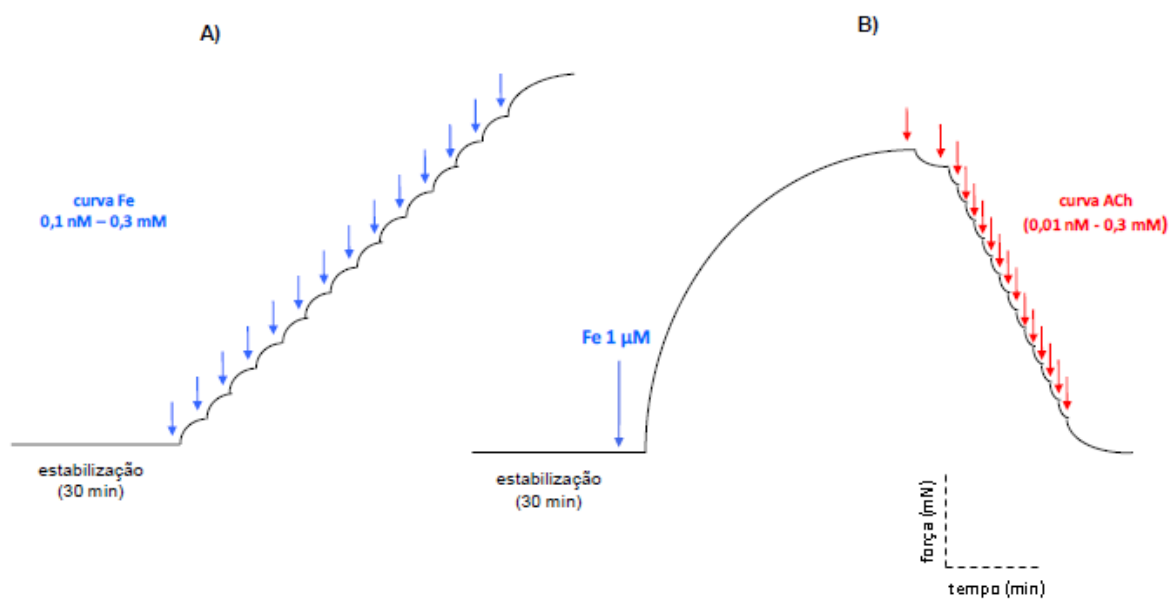


Figura 10: Esquema representativo das curvas concentração-resposta à fenilefrina (Fe), em que pode ser observada a vasoconstricção em artérias mesentéricas (A) e vasodilatação frente à acetilcolina (ACh) (B). (adaptado de Batista, 2014).

3.5.1.1 Influência tratamento por quinze dias com ácido linoleico na liberação de óxido nítrico em resposta à fenilefrina

Com a finalidade de estudar a participação do óxido nítrico (NO) na resposta contrátil à fenilefrina, as artérias mesentéricas foram incubadas com um inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o N G -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 μ M). Para estimar a biodisponibilidade de NO, foi calculada a diferença das áreas abaixo da curva de fenilefrina, na ausência e na presença AL, associada ao L-NAME em relação à situação controle (Figura 9).

3.5.1.2 Efeito do tratamento com ácido linoleico na produção de espécies reativas em resposta à fenilefrina

Estudos mostram que o aumento da produção de EROs contribui para a disfunção endotelial na hipertensão arterial (BARADARAN; NASRI; RAFIEIAN-KOPAEI, 2014; LASSEGUE; SAN MARTIN; GRIENDLING, 2012; PELLEGRINO, 2016; SINHA; DABLA, 2015). Sendo assim, foram realizados experimentos de reatividade vascular *in vitro* na presença de antioxidantes para investigar se o tratamento com AL melhora a disfunção endotelial através da modulação da produção de EROs.

Para isso, os experimentos em artérias mesentéricas foram desenvolvidos na ausência (controle) e na presença de um varredor de ânion superóxido, ácido 4,5-dihidroxi-1,3-benzeno-dissulfônico (tiron, 1 μ M) o qual foi adicionado ao banho por 30 minutos antes da realização da curva com fenilefrina (Figura 9).

3.5.1.3 Envolvimento dos prostanóides derivados do ácido araquidônico sobre a resposta contrátil à fenilefrina após tratamento com ácido linoleico

Para avaliar a participação dos prostanóides derivados da via do ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil à fenilefrina, os anéis foram incubados com indometacina (10 μ M), inibidor não específico da ciclooxigenase;

NS 398 (1 μM), inibidor específico da COX-2; furegrelato (1 μM), inibidor da sintase de TXA₂; SQ 29,548 (1 μM), antagonista do receptor TP (tromboxano A₂) e SC 19220 (10 μM), antagonista do receptor EP1 (prostaglandina E2) (Figura 9).

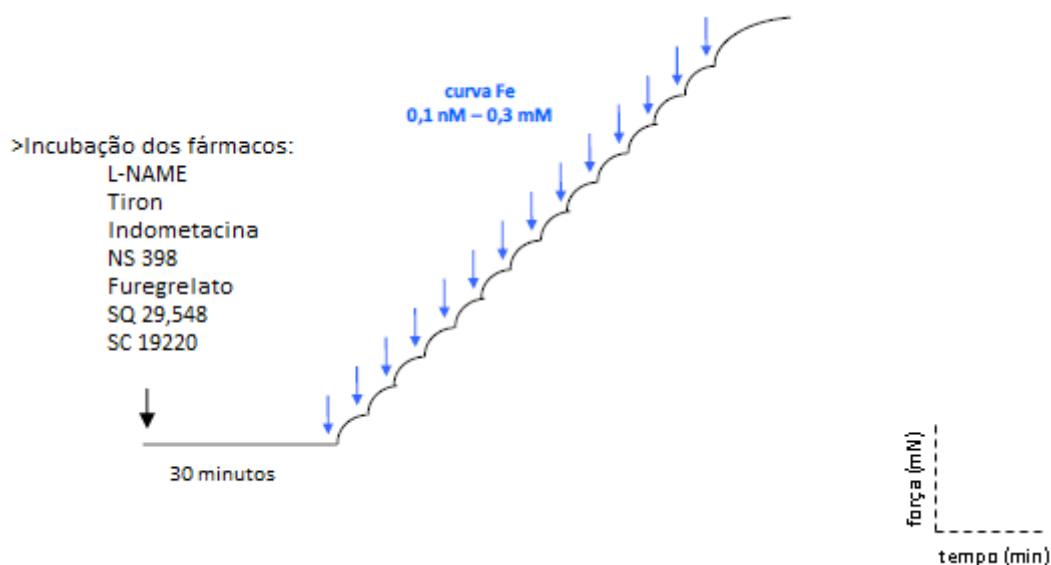


Figura 11: Esquema representativo dos protocolos das curvas concentração-resposta à fenilefrina (Fe) após a incubação por 30 minutos com os fármacos estudados. (adaptado de Batista, 2014).

3.6 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO E DE ÓXIDO NÍTRICO *IN SITU*

3.6.1 Fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídeo

Para verificar a influência do tratamento por quinze dias com ácido linoleico sobre a produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$, foi utilizada a técnica de fluorescência produzida pela oxidação do corante fluorescente oxidativo dihidroetídeo (DHE). Este é um derivado do etídio que entra em contato com $\text{O}_2^{\cdot-}$, oxida-se, transformando-se em brometo de etídio e posteriormente se liga ao DNA das células emitindo fluorescência vermelha.

Os segmentos de artéria mesentérica foram limpos e mantidos por 1 hora em solução Krebs-HEPES (em mM: 130 NaCl, 5,6 KCl, 2 CaCl₂, 0,24 MgCl₂, 8,3 HEPES e 11 glicose, pH 7,4) com sacarose 30%. Posteriormente, estes

segmentos foram transferidos para um meio de inclusão (Tissue-Plus® OCT Compound) para cortes em criostato e mantidas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

As secções arteriais foram cortadas no criostato em anéis com $10\text{ }\mu\text{m}$ de espessura e fixadas em lâminas gelatinizadas. Em seguida, as lâminas foram mantidas em estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por uma hora para retirar o meio de inclusão. Após este procedimento, as lâminas contendo os cortes foram incubadas com tampão Krebs-HEPES em idênticas condições por 30 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após o excesso de solução ser escorrido e seco, foi realizada a incubação com DHE ($2\mu\text{M}$) em câmara úmida protegida da luz, à temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos.

As imagens das secções de artéria mesentérica foram detectadas com microscópio de fluorescência invertido (Leica DM 2500, objetiva 40x) e câmara fotográfica (Leica DFC 310 FX) com filtro 568 nm. As imagens foram quantificadas pelo software MetaMorph.

3.6.2 Detecção da produção de óxido nítrico

A disponibilidade local de NO foi determinada utilizando 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2). Os procedimentos envolvidos desde a coleta das amostras arteriais até os cortes das mesmas, seguem igualmente as condições descritas no protocolo de DHE.

Em sequência, as artérias mesentéricas foram incubadas com tampão fosfato ($0,1\text{ M}$) contendo CaCl_2 ($0,45\text{M}$) em estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos para remover o meio de inclusão. Em seguida, as lâminas foram secas e incubadas com DAF-2 ($8\text{ }\mu\text{M}$) diluído solução tampão nas mesmas condições de tempo e temperatura. Imagens digitais foram coletadas no microscópio de fluorescência Leica DM 2500 com a objetiva de 40x e câmera Leica DFC 310 FX, usando a mesma configuração de imagem para controle e grupo tratado com AL. A densidade de fluorescência média foi calculada usando o software MetaMorph.

3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA DE ARTÉRIAS MESENTÉRICAS DE RESISTÊNCIA

A rigidez arterial depende basicamente do equilíbrio entre componentes distensíveis, como a elastina, e elementos menos distensíveis, como colágeno e fibronectina (INTENGAN et al., 1999a). O desequilíbrio destas proteínas está presente em diversos quadros de doenças cardiovasculares, inclusive na hipertensão.

Sendo assim, para determinar o conteúdo de colágeno e de elastina no modelo experimental do presente estudo, os segmentos arteriais foram removidos do mesentério e transferido para um meio de inclusão (Tissue-Plus® OCT Compound) e, em seguida, congelados. Após obtenção dos cortes em criostado (10 μ m), as secções arteriais foram coradas utilizando o kit Verhoeff (EasyPath) específico para colágeno e elastina.

As imagens foram capturadas com um microscópio (Leica, objetiva 40x) usando uma câmera digital acoplada. As análises quantitativa e qualitativa do conteúdo e distribuição de colágeno e elastina foram realizadas com o software ImageJ Fiji.

3.8 EXPRESSÃO PROTÉICA DA COX-2, eNOS E PPAR- γ

Este protocolo foi desenvolvido com o objetivo de analisar a influência do tratamento com AL na expressão protéica da isoforma da COX-2, eNOS e PPAR- γ em ratos hipertensos. Para isso, as amostras das artérias mesentéricas foram coletadas e armazenadas a -80 °C até serem homogeneizadas.

3.8.1 Preparação do tecido e quantificação das proteínas

A extração de proteínas foi procedida com a homogeneização dos segmentos arteriais por trituração em tampão de lise RIPA (Sigma), em banho de gelo. Depois de homogeneizadas as amostras eram centrifugadas (Eppendorf-Neitheier- Hinz GmbH 22331, Alemanha) durante 10 minutos, 6.000 rpm a 4° C e,

em seguida, o sobrenadante era retirado e feita então a quantificação protéica (Fotômetro Bioquímica, Bio 2000, Brasil) pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Posteriormente, foi calculado o volume necessário para uma carga de 50 µg de proteína, sendo este volume de amostra aliqotado e acrescido igual volume de de 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%).

3.8.2 Eletroforese e transferência das amostras

As amostras foram carregadas em géis de SDS-poliacrilamida 10% (1,5 M Tris HCl pH: 8.8, acrilamida 40%, glicerol 100%, SDS 10%, APS 10% e Temed) previamente imersos em um tampão para eletroforese (25 mM de Tris HCl, 190 mM de glicina e 0,1% de SDS) e submetidas a uma voltagem constante de 80V por aproximadamente 2 horas e 30 minutos (PowerPac™ HC, BioRad, Singapura) a 4° C. Após o término da eletroforese, foi feita a transferência elétrica das proteínas para uma membrana de Nitrocelulose (Amersham, UK) previamente ativada por água durante 20 segundos. Para a transferência, foi realizado o método de transferência líquida na qual o gel, a membrana e o papel Whatman foram montados em um sistema de sanduíche em suporte Holder Cassete e acoplados a auma cuba (Trans-Blot SD Cell Bio-Rad, USA) contendo uma solução tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 190 mM e Metanol 20%) à 4° C com uma corrente de 60 V por 2 horas.

3.8.3 Incubação com Anticorpos

Ao final da transferência, as membranas foram incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, com solução bloqueadora (leite desnatado 5%, Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 à 0,1%, pH 7,5) para evitar a união não-específica com reativos não-imunológicos. Em seguida, as membranas eram incubadas durante toda a noite à 4° C, sob agitação, com solução de 5% de albumina em tampão TBS-T (Tris HCl 10 mM, NaCl 100mM e Tween 20 à 0,1%, pH 7,5) adicionados aos anticorpos primários: anti-eNOS (1:250; Santa Cruz

Biotechnology), anti-COX-2 (1:1000, Cayman), anti-PPAR- γ (1:250, Cell Signaling).

Ao final da incubação dos anticorpos primários, as membranas eram lavadas, sob agitação, com solução TBS-T durante 15 minutos para remoção do excesso do anticorpo primário, sendo trocada a solução de TBS-T a cada 5 minutos. Posteriormente as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário, Imunoglobulina IgG anti-camundongo ou anti-coelho conjugado com peroxidase (1:5000, StressGen, Victoria, Canada). O excesso desse anticorpo secundário foi descartado por 20 minutos de lavagem das membranas com TBS-T sob agitação, trocando a solução a cada 5 minutos.

Para atestar que todas as amostras apresentavam a mesma carga de proteína nas membranas, estas foram incubadas com um anticorpo primário para a alfa-actina (1:15.000, Sigma Aldrich), como controle de carga de cada amostra.

3.8.4 Detecção das Proteínas

As proteínas foram detectadas por uma reação de quimioluminescência por meio da exposição da membrana, durante 22 minutos, a um sistema de detecção (ELC Plus, AmershamTM GE Healthcare, UK). Em seguida, as membranas foram fotografadas pelo equipamento ChemiDocTMXRS+ (Bio-rad), cujo uso foi gentilmente cedido pelas professoras Rita Gomes Wanderley e Cristina Martins e Silva, do departamento de Farmacologia e Bioquímica da UFES. Este aparelho detecta a quimioluminescência obtida após catalise da reação entre os substratos do reagente ECL Plus pela enzima peroxidase presente nos anticorpos secundários ligados às proteínas específicas na membrana de nitrocelulose. Esta reação forma bandas quimioluminescentes em locais da membrana de acordo com o peso molecular da proteína de interesse.

A análise densitométrica foi utilizada para quantificar as bandas das proteínas e, para isto as imagens das membranas foram analisadas com auxílio do software Image Lab 6.0 (Bio-rad). Os valores de densitometria óptica foram normalizados pelos valores da alfa-actina de cada amostra em cada membrana

analisada, de forma a minimizar a influência erros de pipetagem das amostras sobre os resultados finais da expressão das proteínas.

3.9 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados e aplicação dos testes estatísticos foram utilizados os programas Microsoft Office Excel e GraphPad Prism Software 6.0 (San Diego, Califórnia, EUA). Os resultados encontram-se expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) do número de animais usados em cada experimento (n).

As respostas vasoconstritoras e vasodilatadoras foram normalizadas pela resposta contrátil ao KCl (120 mM) e expressa em percentagem da contração. Para cada curva de concentração-resposta, a resposta máxima (R_{max}) e a sensibilidade (pD_2 : $-\log EC_{50}$), foram calculados usando análise de regressão não linear de cada curva individualmente

Para comparar os efeitos da incubação dos fármacos nas respostas contráteis à fenilefrina, os resultados foram expressados através da diferença da área abaixo da curva (dAAC) de concentração-resposta nas situações controle (sem fármaco) e nas situações experimentais (presença de fármacos).

Para variáveis de distribuição normal, as diferenças foram analisadas usando o teste t de *Student* pareado ou não pareado para comparação de duas médias. Para comparar três médias ou mais, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) duas vias. Quando o teste ANOVA detectava significância estatística, foi realizado o pós-teste (pos-hoc) de Fisher. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$.

3.10 FÁRMACOS, REAGENTES e ANTICORPOS

- Acetilcolina, cloridrato (Sigma)
- Ácido aminoacético (Glicina) (Sigma)
- Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Merck)
- Ácido tiobarbitúrico (Sigma)
- Ácido tricloroacético (Merck)
- Albumina bovina (Sigma)
- Anticorpo produzido em camundongo para α -actina (Sigma)
- Anticorpo monoclonal produzido em coelho para anti-COX-2 (Cayman Chemical)
- Anticorpo monoclonal produzido em camundongo para anti-eNOS (Sigma, Aldrich, Germany)
- Anticorpo monoclonal produzido em camundongo para anti-PPAR- γ (Sigma, Aldrich, Germany)
- Azul de bromofenol (Sigma)
- Bicarbonato de sódio (Vetec)
- Cloreto de cálcio dihidratado (Merck)
- Cloreto de potássio (Merck)
- Cloreto de sódio (Merck)
- DAF-2 (4,5-diaminofluoresceína) (Sigma)
- Dihidroetídeo (Sigma)
- Dodecil-sulfato de sódio (SDS) (Sigma)
- Furegrelato (Sigma)

- Fosfato de potássio monobásico (Merck)
- Glicerol (Sigma)
- Glicose (Merck)
- Heparina (Roche)
- Hidróxido de sódio (Sigma)
- Indometacina (Sigma)
- Kit Verhoeff (EasyPath)
- Leite desnatado (Nestlé)
- L-Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)
- Metanol (Sigma)
- N,N, N',N'- Tetrametil-etilenodiamina (Temed) (Sigma)
- N,N'- Metilenbisacrilamida 40% Solução 37, 5:1 (Acrilamida) (Sigma)
- N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma)
- Nitroprussiato de sódio, dihidratado (Fluka)
- NS 398(N-(2-ciclohexiloxi-4-nitrofenil) metanosulfonamida) (Sigma)
- OCT tissue-tek (Sakura)
- Persulfato de amônio (APS) (Sigma)
- Polioxietileno sorbitam monolaurato (Tween 20) (Sigma)
- Reagente para detecção de Western Blot (ECL Plus) (Amersham)
- Sacarose (Merck)
- Superóxido dismutase de eritrócito bovino (SOD) (Sigma)
- Sulfato de magnésio heptahidratado (Merk)

- SQ 19,548 (Ácido [1S-[1 alfa,2 beta (5Z),3 beta,4 alpha]-7-[3-[[2-
[(fenilamino) carbonil]hidrazin]metil]-7-oxabicyclo[2.2.1]hept-2-il]-5-heptenoico)
(Sigma)
- SC 19220 (ácido 2-acetilhidrazida 10(11H)-carboxílico) (Sigma)
- Tiron (Sigma)
- Tris HCl (Sigma)
- Uretana (Sigma)

Todos os fármacos foram diluídos em água destilada mantidas no congelador a -20° C.

4 RESULTADOS

4.1 VALORES DE PESO CORPORAL

Os animais dos grupos controle e AL apresentaram peso semelhante no início e ao término do tratamento, demonstrando que o tratamento por 15 dias com AL não influencia no ganho de peso corpóreo, como representado na Tabela 1.

Tabela 1: Valores do peso corporal (g) dos animais dos grupos Controle e Ácido Linoléico (AL).

	Peso Corporal (g)	
	SHR Controle (n=8)	SHR AL (n=8)
Dia 1	255 ± 2,2	262 ± 4,0
Dia 15	275 ± 1,6	280 ± 4,3

Valores expressos como média ± EPM. $p > 0,05$ vs SHR controle, teste t de *Student*.

4.2 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PRESSÓRICOS

4.2.1 Tratamento com ácido linoleico reduz pressão arterial sistólica de ratos acordados

A medida indireta da PAS por pletismografia da artéria caudal permitiu verificar a redução da pressão arterial sistólica diante do tratamento com AL (Figura 12), o qual foi mensurado no início e no final dos 15 dias de tratamento (Tabela 2).

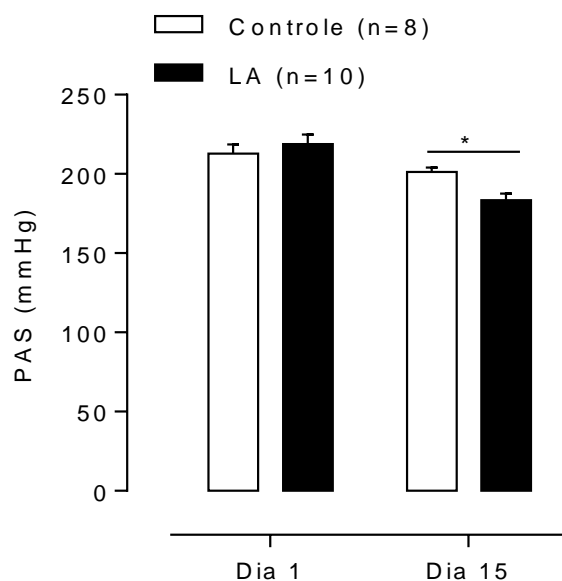


Figura 12: Comparação da Pressão Arterial Sistólica (PAS) (em mmHg) entre os grupos SHR controle e SHR AL, no início (dia 1) e no final do tratamento (dia 15) com ácido linoleico. Resultados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs SHR controle; teste t de *Student*. Número de ratos expresso por n.

Tabela 2: Valores de pressão arterial sistólica (PAS), em mmHg, obtidos por pletismografia da artéria caudal dos animais dos grupos Controle e Ácido Linoleico (AL).

Pressão Arterial Sistólica (mmHg)		
	SHR Controle (n=8)	SHR AL (n=10)
Dia 1	212,9 \pm 5,7	218,7 \pm 6,0
Dia 15	201,1 \pm 2,8	183,4 \pm 4,2*

Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs SHR controle, teste t de *Student*.

4.2.2 Influência do tratamento com ácido linoleico sobre as medidas hemodinâmicas

As medidas hemodinâmicas diretas confirmaram que os animais SHR tratados com ácido linoleico apresentam redução da pressão arterial (sistólica, diastólica e média) quando comparado aos animais SHR controles. Porém, os valores de frequência cardíaca permaneceram inalterados entre os grupos experimentais. (Figura 13). Os valores encontram-se na Tabela 3.

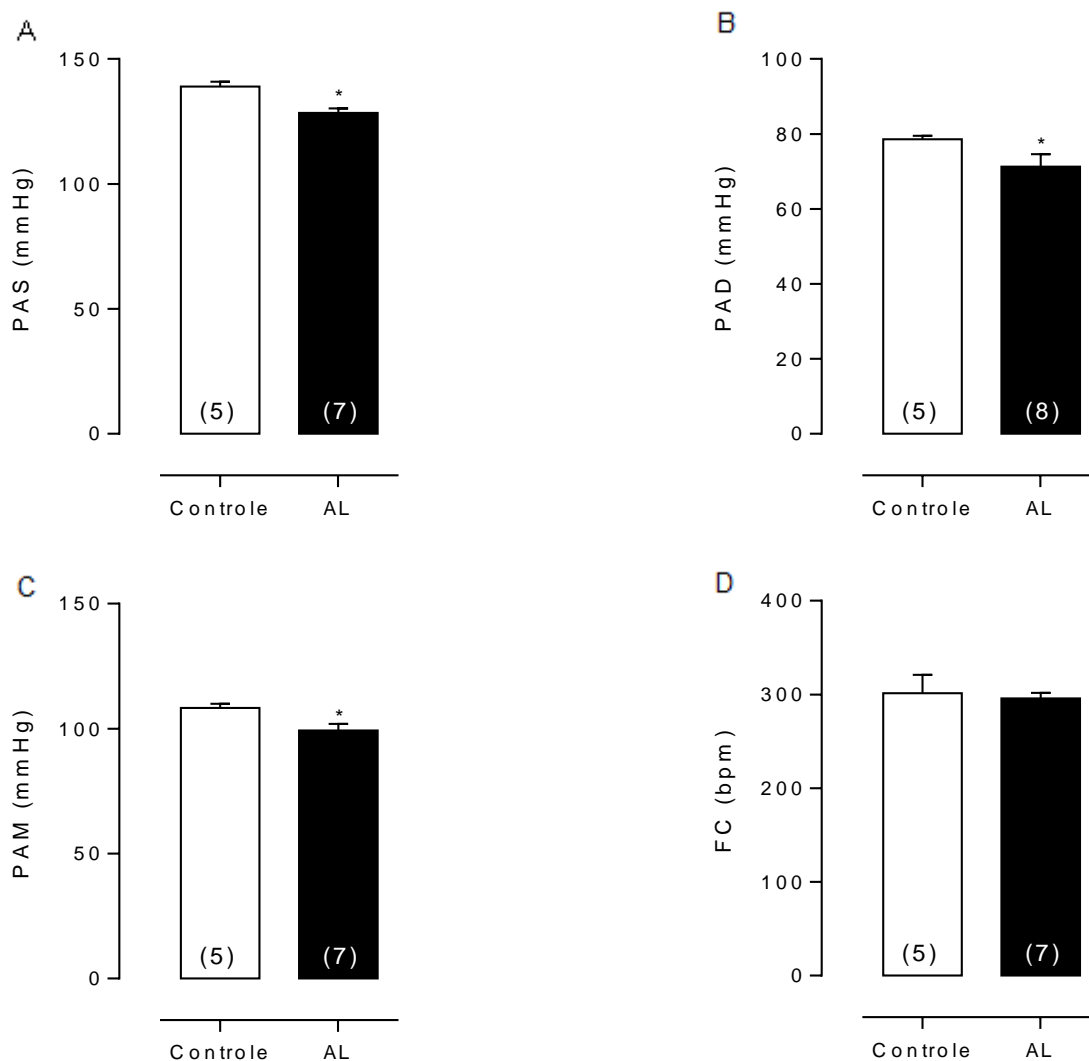


Figura 13: Pressão Arterial Sistólica (A), Pressão Arterial Diastólica (B), Pressão Arterial Média (C) e Frequência Cardíaca (D) dos ratos dos grupos SHR Controle e SHR AL. Resultados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs SHR controle; teste t de *Student*. Número de ratos expresso entre parênteses.

Tabela 3: Valores de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) dos animais dos grupos Controle e Ácido Linoleico (AL).

Parâmetros Hemodinâmicos		
	SHR Controle (n=8)	SHR AL (n=8)
PAS (mmHg)	139 \pm 1,8	128,4 \pm 1,7*
PAD (mmHg)	78,6 \pm 1,1	70,1 \pm 3,7*
PAM (mmHg)	108,2 \pm 1,7	99,2 \pm 2,7*
FC (bpm)	301,5 \pm 19,0	295,9 \pm 6,0

Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs SHR controle, teste t de *Student*.

4.3 PROPRIEDADES ESTRUTURAIS E MECÂNICAS VASCULARES

4.3.1 Parâmetros morfológicos arteriais de ratos hipertensos são melhorados após tratamento com ácido linoleico

O parâmetro morfológico das artérias mesentéricas de resistência foi determinado através de vários parâmetros estruturais como o diâmetro do vaso e do lúmen, a espessura da parede e a relação parede:lúmen entre os grupos experimentais estudados.

Como pode ser observado na Figura 14, o aumento na pressão intraluminal produziu um aumento no diâmetro do vaso, no diâmetro do lúmen, assim como uma redução na espessura de parede e na relação parede:lúmen em todas as artérias mesentéricas de resistência, como esperado. No entanto, após tratamento com AL, observou-se aumento no diâmetro do vaso (A) e do lúmen (B), diminuição na espessura de parede (C) e na relação parede:lúmen (D) nas pressões impostas, quando comparados ao grupo controle.

Diante desses resultados, o tratamento com AL foi capaz de melhorar as condições estruturais avaliadas das artérias de ratos hipertensos após tratamento por 15 dias.

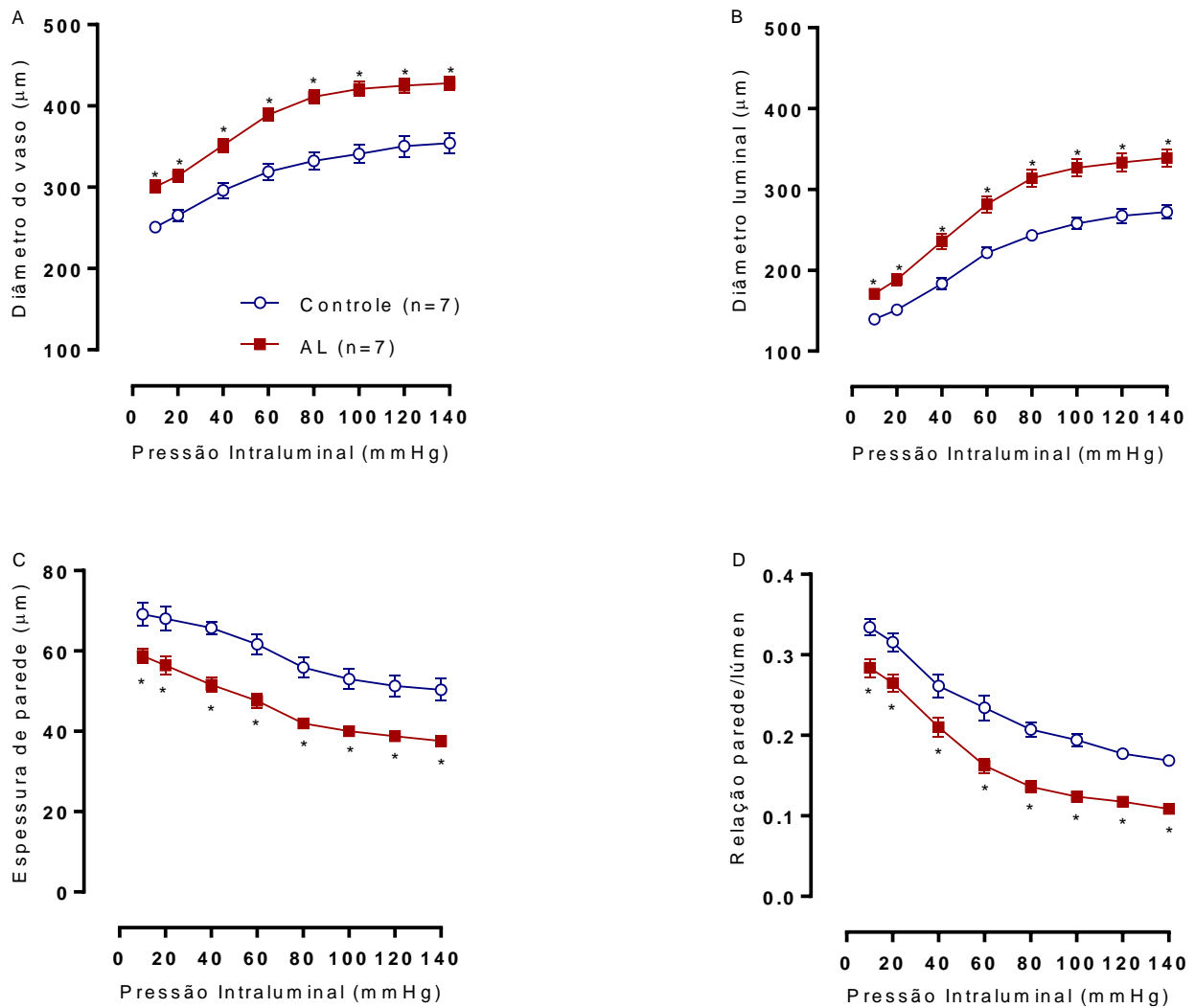


Figura 14: Medidas de diâmetro interno (A) e externo (B), espessura de parede (C) e relação média/lúmen (D) em artérias mesentéricas de resistência de ratos controle e AL induzidas por crescentes mudanças de pressão intravascular. Os dados são expressos como média \pm SEM dos valores frente às alterações de pressão intravascular. Número de animais é indicado entre parênteses. * $p < 0,05$ vs. Controle; ANOVA duas vias e pós-teste de Fisher.

4.3.2 Tratamento com ácido linoleico modifica os parâmetros mecânicos arteriais de ratos hipertensos

A Figura 15 expõe os resultados dos parâmetros mecânicos induzidos por crescentes mudanças de pressão intravascular em artéria mesentérica de resistência de ratos tratados com ácido linoleico comparado ao grupo controle.

A rigidez de um vaso é calculada em função de sua capacidade de se ajustar (strain) em diferentes intervalos de pressão (stress) em que é imposta a sua parede. Na Figura 15A e 15B, a tensão e o estresse de parede mostraram-se significativamente maior no grupo AL, como já era esperado, visto que o diâmetro interno dos animais tratados com AL está aumentado, o que significa que um maior diâmetro leva a um aumento de tensão e estresse na parede do vaso.

As curvas de stress-strain dos animais controle e tratados com AL demonstraram significante deslocamento para a direita, o que indica menor rigidez vascular (Figura 15C).

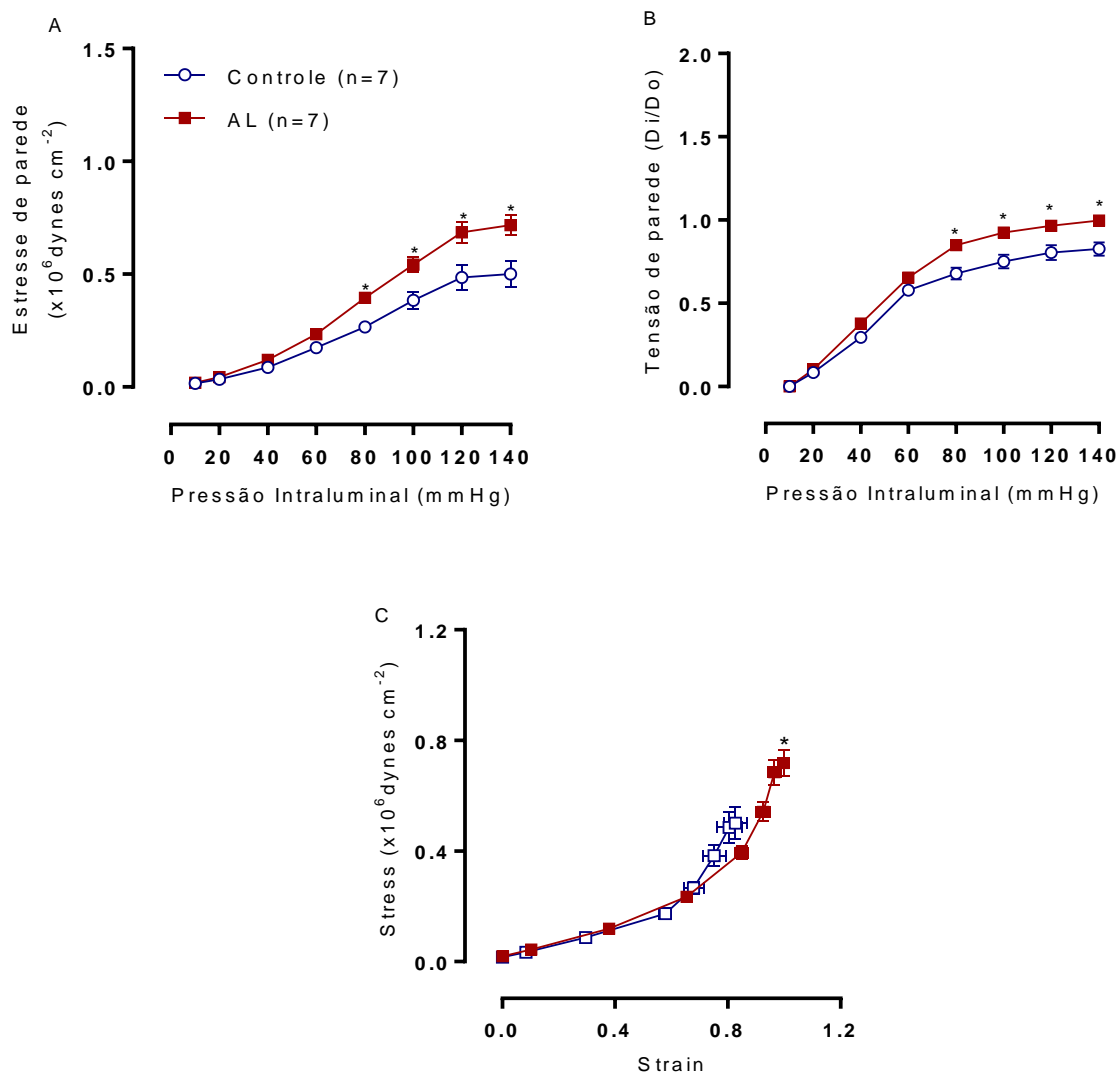


Figura 15: Medidas de estresse de parede (A), tensão de parede (B) e relação stress/strain (C) em artérias mesentéricas de resistência de ratos controle e AL induzidas por crescentes mudanças de pressão intravascular. Os dados são expressos como média \pm SEM dos valores frente às alterações de pressão intravascular. Número de animais é indicado entre parênteses. * $p < 0,05$ vs. Controle; ANOVA duas vias e pós-teste de Fisher.

4.3.3 Avaliação das proteínas da matriz extracelular em artérias mesentéricas de resistência

As respostas vasculares dependem da organização da matriz extracelular, a qual envolve propriedades de elasticidade e de resistência ao estiramento do vaso, podendo alterar a rigidez vascular. Sendo assim, as proteínas colágeno e elastina foram quantificadas em segmentos arteriais dos grupos experimentais.

Observou-se uma diminuição significativa do conteúdo de colágeno (Figura 16A) nas artérias mesentéricas dos animais tratados com AL. No entanto, a deposição do conteúdo de elastina não foi estatisticamente diferente entre os grupos experimentais ($p = 0,22$) (Figura 16B).

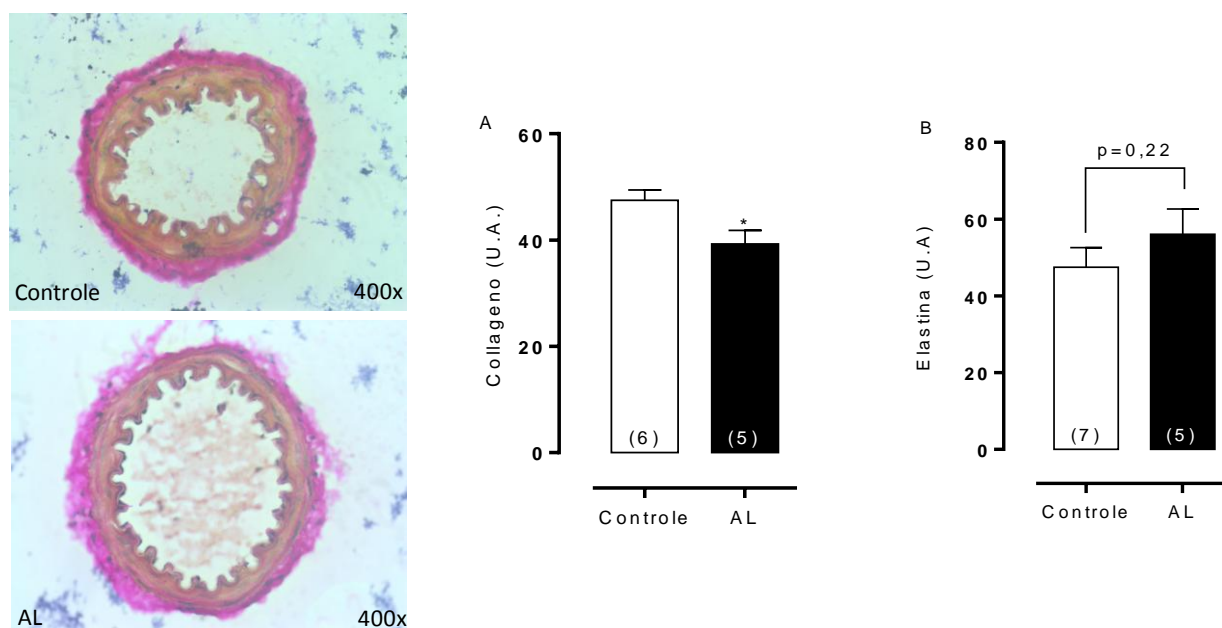


Figura 16: Quantificação do conteúdo de colágeno (A) e elastina (B). Imagens histológicas representativas de seções arteriais microscópicas coradas utilizando o kit Verhoeff obtida de artérias de resistência mesentérica de ratos controle e tratados com AL. Os dados são expressos como média \pm SEM dos valores frente às alterações de pressão intravascular. * $p < 0,05$ vs. Controle pelo teste t de Student. Número de ratos expresso entre parênteses.

4.4 REATIVIDADE VASCULAR

4.4.1 Resposta contrátil ao cloreto de potássio (KCl) em artérias mesentéricas de resistência

Com a finalidade de verificar a capacidade contrátil das artérias utilizadas, foi testado o componente funcional do músculo liso vascular com uma solução rica em KCl (120 mM). Diferenças na contração ao KCl nos grupos experimentais podem ser um indicativo de lesão/alteração do músculo liso vascular.

Diante do tratamento com ácido linoleico, a resposta ao KCl foi similar entre os grupos experimentais (Controle: $20,02 \pm 0,9$ mN vs AL: $21,59 \pm 0,7$ mN, (n=10); teste t – $p > 0,05$). Estes resultados indicam que o tratamento não prejudicou a capacidade contrátil do músculo liso vascular.

4.4.2 Tratamento com ácido linoleico reduz a vasoconstrição em artérias mesentéricas de ratos hipertensos sem alterar o relaxamento

Mediante a realização das curvas concentração-resposta desenvolvidas com fenilefrina, foi observado que os ratos hipertensos tratados com AL apresentaram menor responsividade contrátil à fenilefrina, em comparação com os SHR controles, deslocando a curva para a esquerda e para baixo (Figura 17A; Tabela 4).

Do mesmo modo, mediante o desenvolvimento das curvas concentração-resposta à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio as artérias mesentéricas de ratos hipertensos não apresentaram diferença no relaxamento dependente e independente do endotélio (Figura 15B e 17C); Tabela 4).

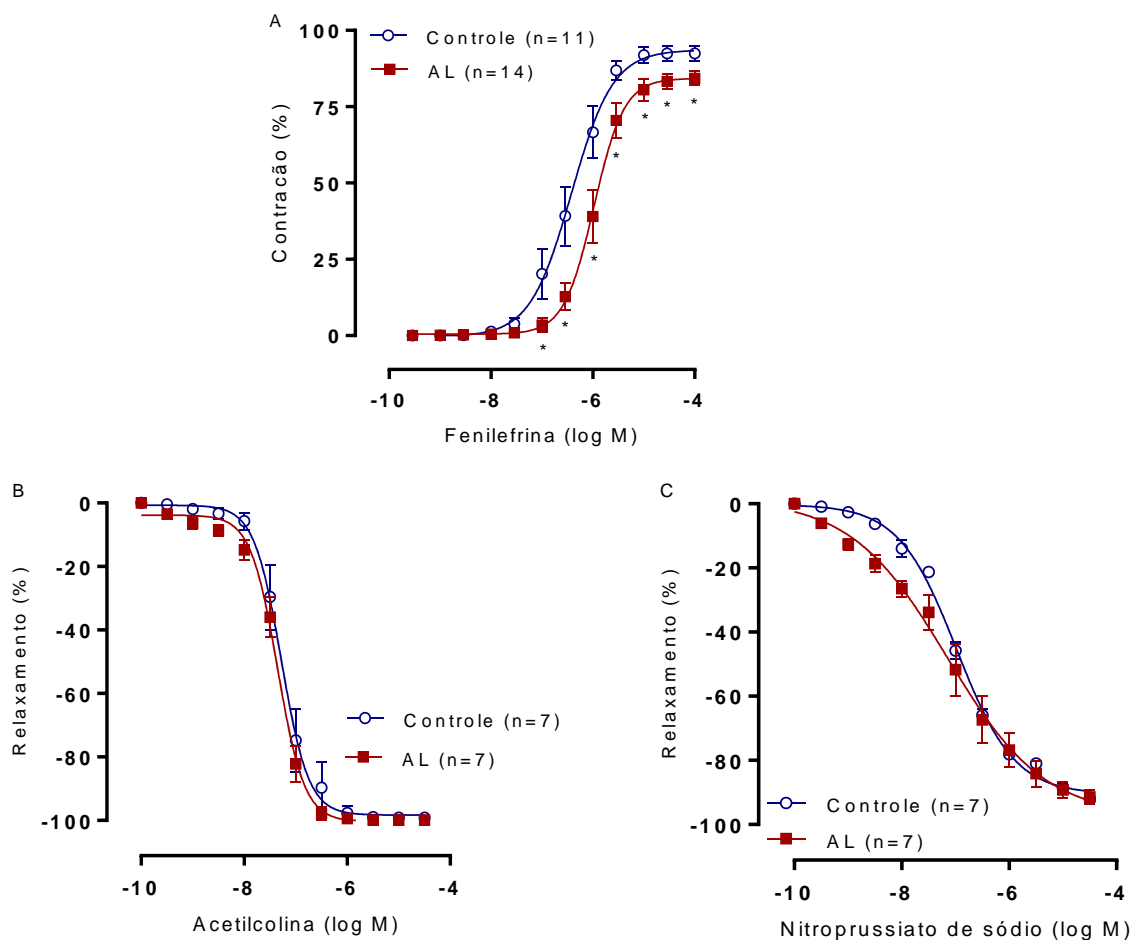


Figura 17: Curvas concentração-resposta à fenilefrina (A), Curvas concentração resposta à acetilcolina (B) e ao nitroprussiato de sódio (C) em anéis de artérias mesentéricas de ratos dos grupos SHR controle e SHR AL. Resultados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs SHR controle; ANOVA duas vias e pós-teste de Fisher. Número de ratos expresso entre parênteses.

Tabela 4: Valores de pD_2 e R_{max} obtidos das curvas concentração-resposta à fenilefrina, a acetilcolina (ACh) e ao nitroprussiato de sódio (NPS) em artérias mesentéricas de ratos dos grupos Controle e Ácido Linoleico (AL).

	SHR Controle		SHR AL	
	pD_2	R_{max}	pD_2	R_{max}
Fenilefrina	$6,4 \pm 0,1$	$92,4 \pm 2,4$	$5,9 \pm 0,1^*$	$84,3 \pm 2,3^*$
ACh	$7,2 \pm 0,1$	$99,1 \pm 0,9$	$7,3 \pm 0,06$	$99,8 \pm 1,3$
NPS	$6,9 \pm 0,03$	$91,9 \pm 0,8$	$7,0 \pm 0,2$	$91,4 \pm 2,3$

Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs SHR controle, teste t de Student.

4.4.3 Tratamento com ácido linoleico melhora a biodisponibilidade de óxido nítrico em ratos hipertensos

Para avaliar o papel do óxido nítrico na resposta vasoconstritora à fenilefrina, curvas concentração-resposta foram construídas em segmentos arteriais pré-incubados com um inibidor da sintase de óxido nítrico, o L-NAME.

L-NAME promoveu menor resposta contrátil nos segmentos de aorta de SHR controle quando comparados aos SHR AL (dAAC - Controle: $7,3 \pm 4,1$ vs AL: $38,7 \pm 8,2^*$; teste t – $*p > 0,05$), visto que a hipertensão cursa com redução da biodisponibilidade de óxido nítrico, sugerindo uma modulação aumentada de NO após tratamento por 15 dias com ácido linoleico (Figura 18A).

As comparações entre pD_2 e R_{max} das curvas concentração-resposta à fenilefrina realizadas na ausência (curva controle) e na presença de L-NAME encontram-se na Tabela 5.

Para confirmar esta questão, a disponibilidade local de NO foi determinada nas artérias mesentéricas do grupos experimentais. Os segmentos arteriais do grupo SHR AL apresentaram maior a produção local de NO (DAF - Controle: $1,3 \pm 0,05$ vs AL: $2,4 \pm 0,2^*$; teste t – $*p > 0,05$) (Figura 18B), corroborando com os dados obtidos com bloqueio farmacológico. No entanto, não foi detectada mudanças significativas na expressão protéica da eNOS entre os grupos experimentais (Figura 22A).

Em resumo, esses resultados demonstram que o tratamento por 15 dias com AL aumenta a produção e/ou a biodisponibilidade de NO em SHR.

É importante considerar que a disfunção endotelial presente na hipertensão arterial está frequentemente associada à redução da biodisponibilidade de óxido nítrico causada pela produção de EROs. Diante disso, a próxima investigação foi estudar a influência do tratamento com AL e o estresse oxidativo.

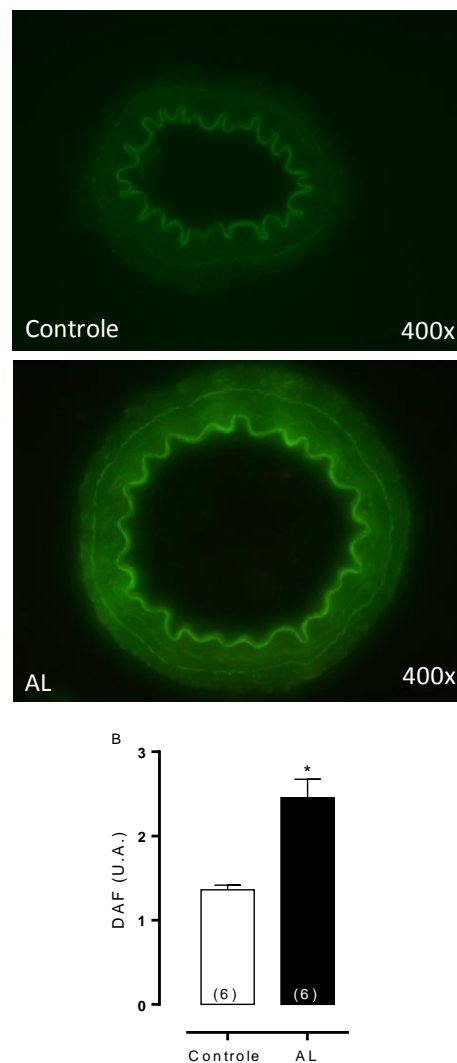
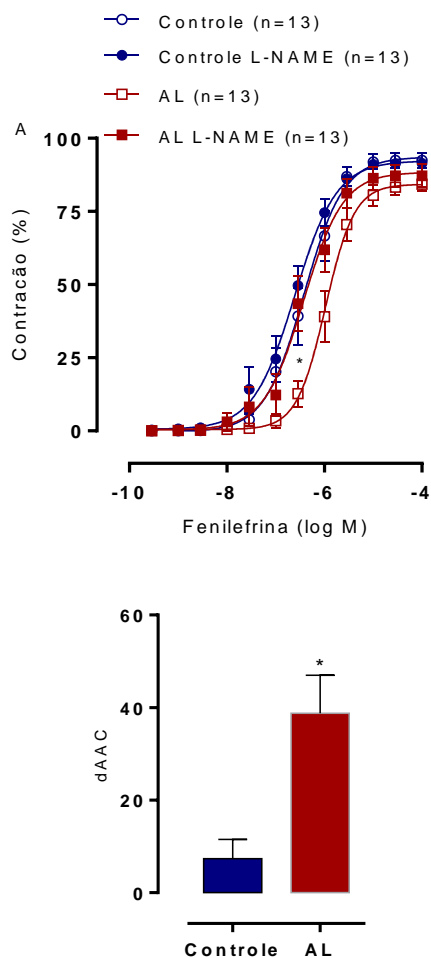


Figura 18: Efeito do L-NAME (100 μ M) e dAAC na presença e ausência do tratamento com (A); Imagens fluorescentes representativas de seções arteriais microscópicas marcadas com 4,5-Diaminofluoresceína (DAF) e quantificação de óxido nítrico obtida de artérias de resistência mesentérica de ratos controle e tratados com AL (B). Resultados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ SHR AL vs SHR AL L-NAME; ANOVA duas vias e pós-teste de Fisher e * $p < 0,05$ pelo teste t de Student. Número de ratos expresso entre parênteses.

Tabela 5: Valores de pD_2 e R_{max} obtidos das curvas concentração-resposta à fenilefrina e ao L-NAME em artérias mesentéricas de ratos dos grupos Controle e Ácido Linoleico (AL).

	SHR Controle		SHR AL	
	pD_2	R_{max}	pD_2	R_{max}
Fenilefrina	$6,4 \pm 0,14$	$92,4 \pm 2,4$	$5,9 \pm 0,12$	$84,3 \pm 2,3$
L-NAME	$6,6 \pm 0,12$	$91,3 \pm 3,4$	$6,4 \pm 0,14^*$	$89,1 \pm 3,1$

Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs Fenilefrina AL; teste t de Student.

4.4.4 Estresse oxidativo é reduzido em ratos hipertensos após tratamento com ácido linoleico

Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de artéria mesentérica foram realizadas na ausência (curva controle) e na presença de antioxidante, incubado previamente com tiron - 1 μM , varredor de ânions superóxido, por 30 minutos.

Os seguimentos arteriais dos SHR controle assim como dos SHR AL apresentaram deslocamento da curva concentração-resposta. No entanto, este deslocamento foi menor no grupo tratado com ácido linoleico (dAAC - Controle: $100,7 \pm 24,3$ vs AL: $46,1 \pm 12,4^*$, teste t - $*p > 0,05$) (Figura 19 A), demonstrando redução na participação de ânion superóxido na resposta contrátil à fenilefrina.

As comparações entre pD_2 e R_{max} das curvas concentração-resposta à fenilefrina realizadas na ausência (curva controle) e na presença de tiron encontram-se na Tabela 6.

Para confirmar os resultados funcionais obtidos, foi utilizada a técnica de fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídeo (DHE) para verificar a influência do tratamento com ácido linoleico sobre a produção vascular local de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Corroborando com os resultados funcionais encontrados, a produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ foi significativamente maior nas secções arteriais dos animais controle quando comparado aos animais tratados (DHE: - Controle: $13,9 \pm 1,5$ vs AL: $9,7 \pm 0,7^*$; teste t - $*p > 0,05$) (Figura 19B).

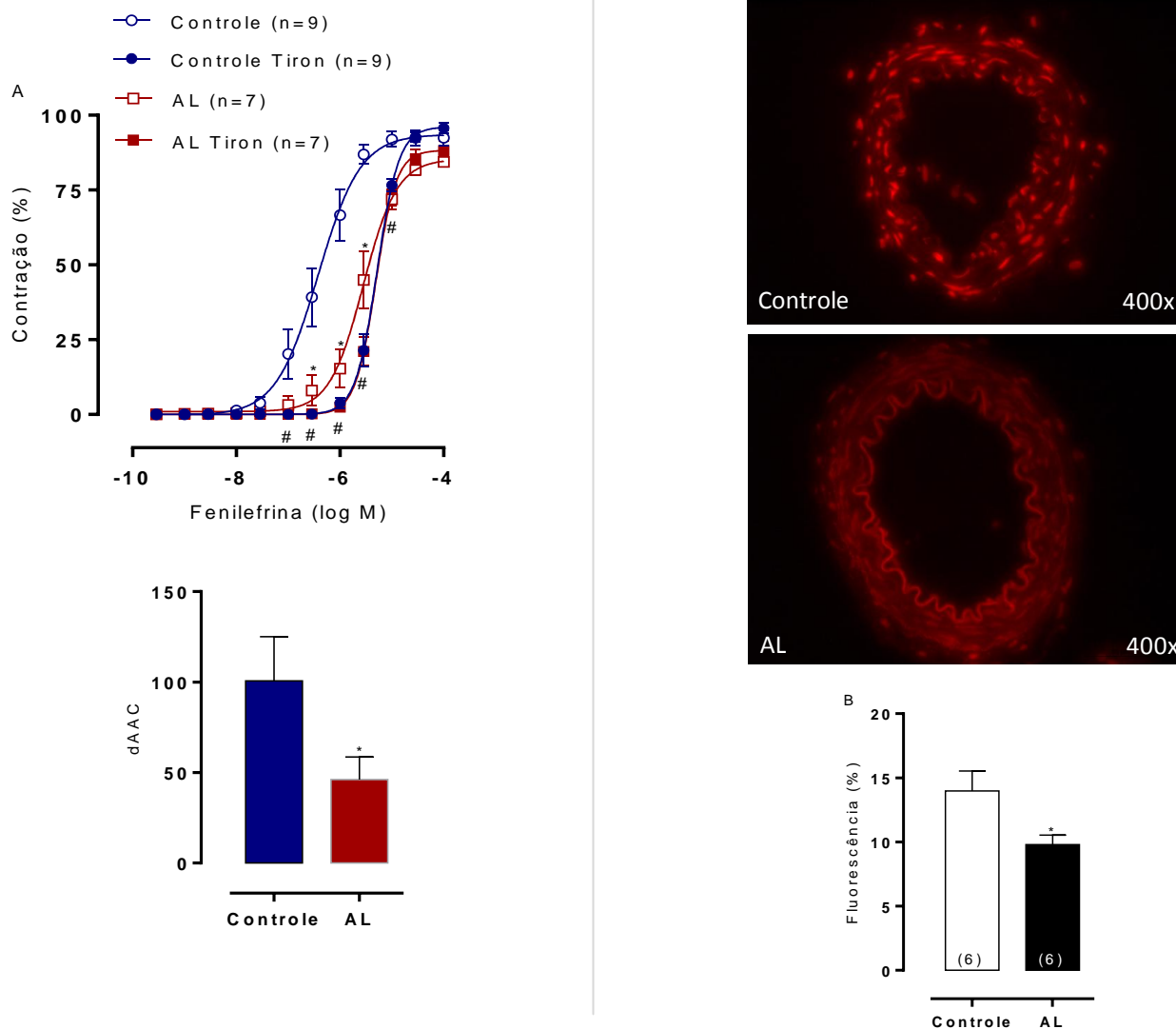


Figura 19: Efeito do tiron (1 μ M) e dAAC na presença e ausência do tratamento com (A); Imagens fluorescentes representativas de seções arteriais microscópicas marcadas pela oxidação do dihidroetídeo (DHE) e quantificação de ânions superóxidos obtida de artérias de resistência mesentérica de ratos controle e tratados com AL (B). Resultados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ SHR AL vs SHR AL Tiron; # $p < 0,05$ SHR Controle vs SHR Controle Tiron; ANOVA duas vias e pós-teste de Fisher e * $p < 0,05$ pelo teste t de Student. Número de ratos expresso entre

Tabela 6: Valores de pD_2 e R_{max} obtidos das curvas concentração-resposta à fenilefrina e ao tiron em artérias mesentéricas de ratos dos grupos Controle e Ácido Linoleico (AL).

	SHR Controle		SHR AL	
	pD_2	R_{max}	pD_2	R_{max}
Fenilefrina	$6,4 \pm 0,14$	$92,4 \pm 2,4$	$5,9 \pm 0,12$	$84,3 \pm 2,3$
Tiron	$5,2 \pm 0,04^*$	$96,8 \pm 1,7$	$5,3 \pm 0,03$	$89,09 \pm 3,13$

Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs Fenilefrina Controle; teste t de Student.

4.4.5 Tratamento com ácido linoleico reduz participação dos prostanóides derivados da via da ciclooxigenase (COX)

Para estudar a influência dos prostanóides derivados da via da COX sobre a resposta contrátil à fenilefrina em segmentos de artéria mesentérica dos grupos Controle e AL, foi realizada uma sequência de experimentos de reatividade vascular após incubação farmacológica.

Inicialmente, as artérias mesentéricas foram incubadas com um inibidor não seletivo da ciclooxigenase (COX): indometacina (10 μM). A indometacina reduziu as respostas vasoconstritoras à fenilefrina apenas nas artérias mesentéricas dos ratos controle (dAAC - Controle: $85,3 \pm 20,08$ vs AL: $15,4 \pm 2,5^*$, teste t – $*p>0,05$) (Figura 20A), demonstrando que o tratamento com AL diminuiu a participação de prostanóides vasoconstritores.

Diante desse resultado, foi investigado se esta resposta poderia estar associada a participação dos prostanóides derivados da COX-2. Para isso, os seguimentos arteriais foram incubados com o inibidor específico da COX-2: NS 398 (1 μM). Observou-se que na presença do NS 398 ocorreu redução da resposta contrátil à fenilefrina em ambos os grupos, porém esta redução foi maior no grupo controle (dAAC - Controle: $53,2 \pm 3,2$ vs AL: $39,1 \pm 3,2^*$, teste t – $*p>0,05$) (Figura 20B), indicando que os prostanóides contráteis são derivados da via da COX-2. Corroborando estes resultados, a expressão proteica da COX-2 foi maior no grupo controle comparado ao grupo AL (Figura 22B).

Em sequência, foi estudado o envolvimento dos prostanóides vasoconstritores derivados da via da COX-2: furegrelato (1 μM - inibidor da síntese do TXA_2), SQ 29,548 (1 μM - antagonista do receptor TP) e SC 19220 (10 μM - antagonista do receptor EP_1). Os resultados obtidos destes últimos bloqueios foram semelhantes aos encontrados com o NS 398: redução na contração induzida pela fenilefrina nos segmentos arteriais do grupo controle e tratado, mas esse efeito foi menor nos ratos tratados com AL, conforme indicado pelo dAAC (dAAC furegrelato - Controle: $101,8 \pm 29,2$ vs AL: $36,1 \pm 7,6^*$, teste t – $*p>0,05$); (dAAC SQ 29,548 - Controle: $73,3 \pm 13,7$ vs AL: $33,3 \pm 11,4^*$, teste t – $*p>0,05$); (dAAC SC19220 - Controle: $101,8 \pm 15,8$ vs AL: $66,9 \pm 8,07^*$, teste t – $*p>0,05$); (Figura 21A, 21B e 21C).

Por fim, foi investigada a participação de PPAR γ , visto que o ácido linoleico é um ligante natural deste fator de transcrição nuclear que controla as moléculas sinalizadoras anti-inflamatórias e está associado a uma redução na expressão de COX-2. Como mostra a Figura 22C, não houve diferença na expressão protéica entre os grupos experimentais ($p = 0,20$).

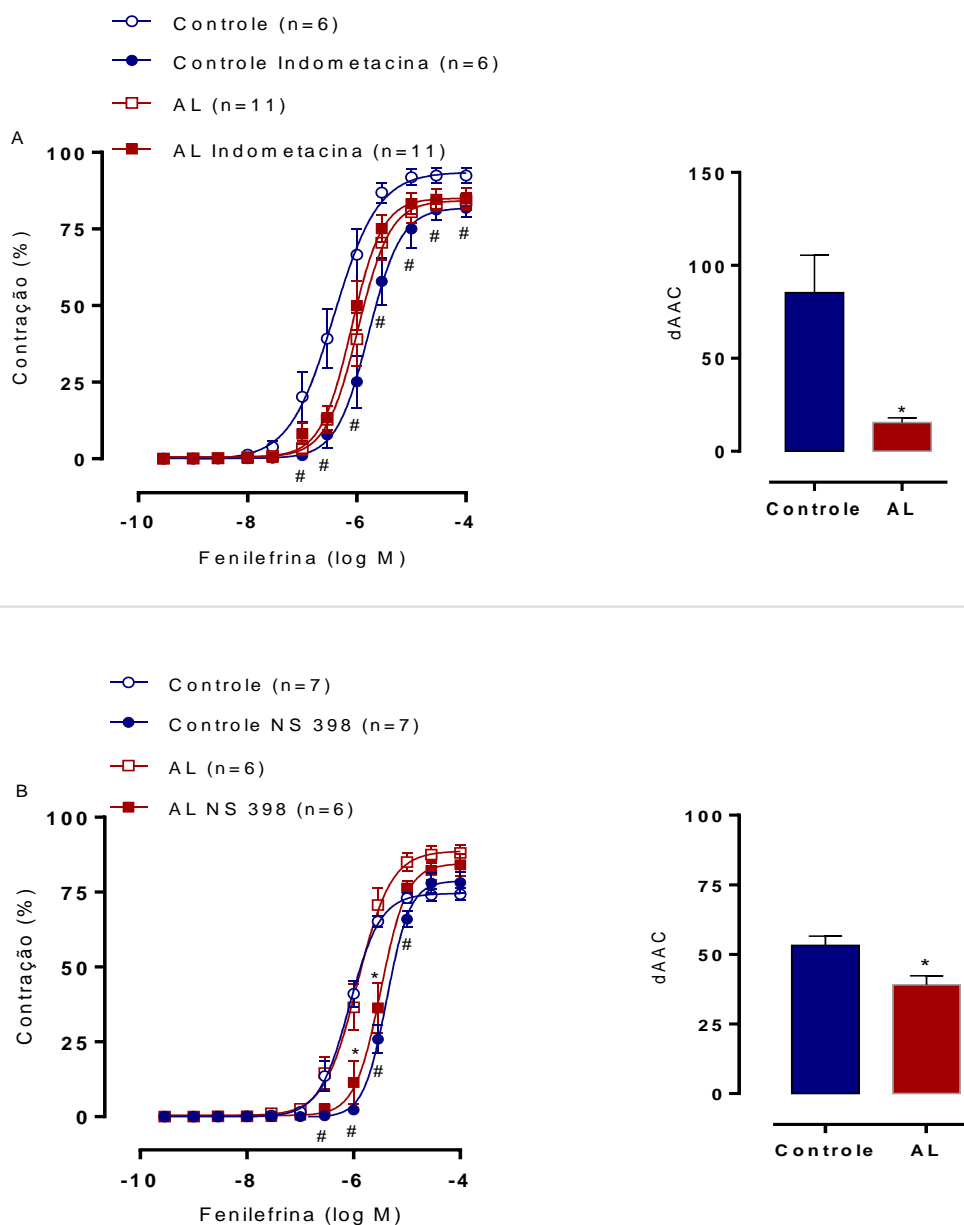


Figura 20: Curvas concentração-resposta com os bloqueios na presença e ausência do tratamento com AL: indometacina (10 μ M) e dAAC (A); NS 398 e dAAC (B) Resultados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ SHR AL vs SHR AL NS 398; # $p < 0,05$ SHR Controle vs SHR Controle indometacina/NS 398; ANOVA duas vias e pós-teste de Fisher e * $p < 0,05$ pelo teste t de Student. Número de ratos expresso entre parênteses.

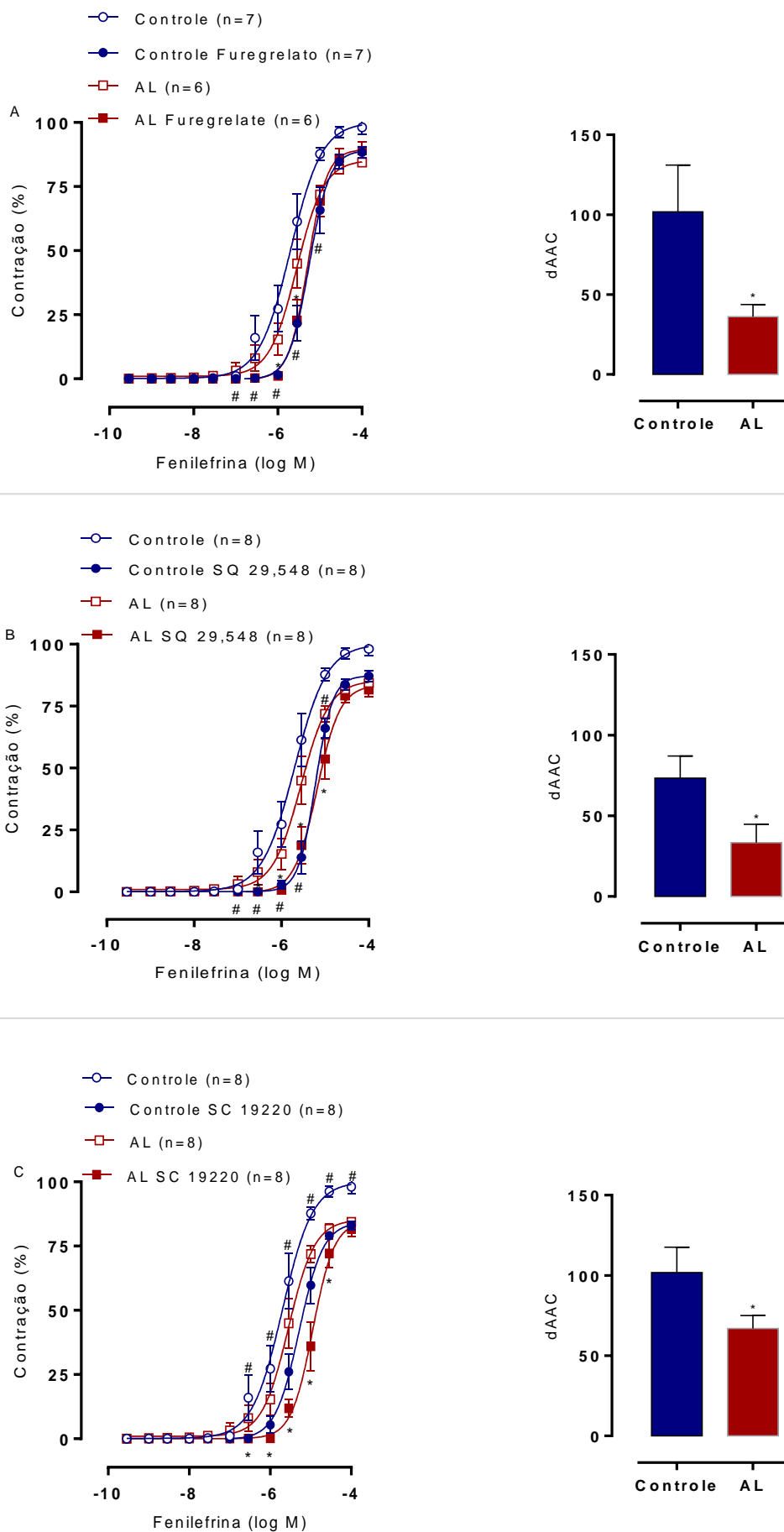


Figura 21: Curvas concentração-resposta com os bloqueios na presença e ausência do tratamento com AL: furegrelato (1 μ M) e dAAC (A); SQ 29,548 e dAAC (B); SC 19220 e dAAC. Resultados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ SHR AL vs SHR AL furegrelato/SQ 29,548/SC 19220; # $p < 0,05$ SHR Controle vs SHR Controle furegrelato/SQ 29,548/SC 19220; ANOVA duas vias e pós-teste de Fisher e * $p < 0,05$ pelo teste t de Student. Número de ratos expresso entre parênteses.

Tabela 7: Valores de pD_2 e R_{max} obtidos das curvas concentração-resposta à fenilefrina, à indometacina, ao NS 398, ao furegrelato, ao SQ 29,548 e ao SC 19220 em artérias mesentéricas de ratos dos grupos Controle e Ácido Linoleico (AL).

	SHR Controle		SHR AL	
	pD_2	R_{max}	pD_2	R_{max}
Fenilefrina	$6,4 \pm 0,14$	$92,4 \pm 2,4$	$5,9 \pm 0,12$	$84,3 \pm 2,3$
Indometacina	$5.75 \pm 0.13^*$	$81.85 \pm 2.81^*$	6.34 ± 0.07	82.83 ± 4.15
NS 398	$5.38 \pm 0.083^*$	78.78 ± 3.64	$5.53 \pm 0,11^*$	84.10 ± 4.44
Furegrelato	$5.26 \pm 0.09^*$	$89.57 \pm 2.13^*$	5.29 ± 0.08	90.08 ± 3.56
SQ 29,548	$5.22 \pm 0.06^*$	$87.75 \pm 2.19^*$	5.20 ± 0.09	$83.0 \pm 2,68$
SC 19220	$5.30 \pm 0.10^*$	$83.83 \pm 1.84^*$	$4.95 \pm 0.09^*$	$83.83 \pm 2,91$

Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs Fenilefrina Controle ou AL; teste t de *Student*.

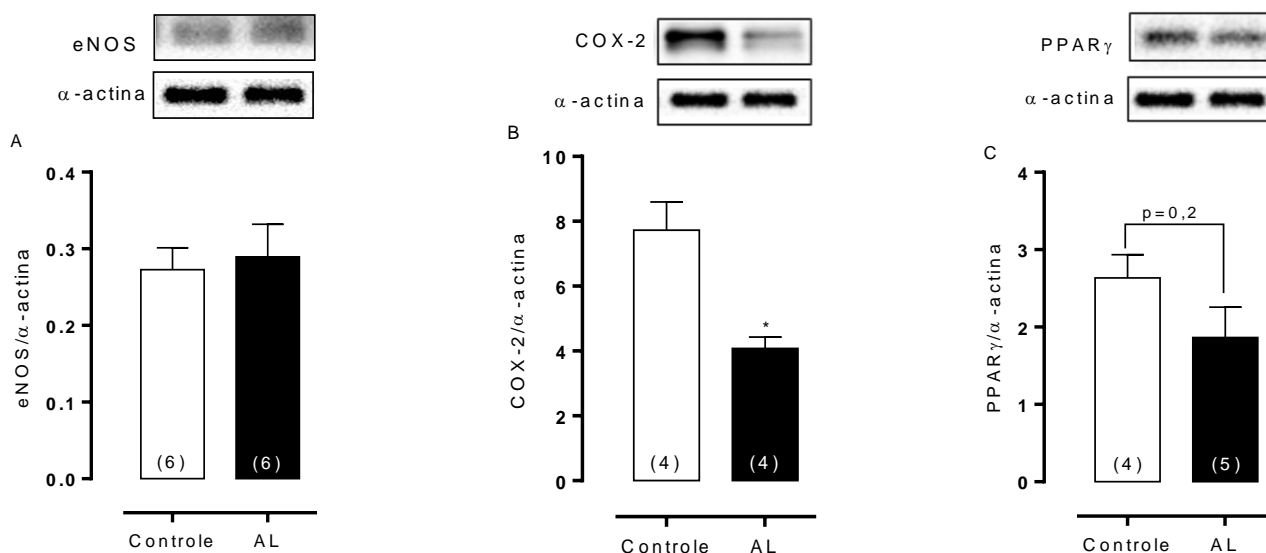


Figura 22: Análise densitométrica da expressão protéica da eNOS (A), COX-2 (B) e PPAR γ (C) em artérias de resistência mesentérica de ratos controle e tratados com AL. Na parte superior da figura estão demonstradas as bandas representativas da expressão. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses. * $p < 0,05$ pelo teste t de *Student*.

5 DISCUSSÃO

A hipertensão arterial é considerada uma doença inflamatória crônica de elevada prevalência mundial. Geralmente, é acompanhada por alterações vasculares estruturais, mecânicas e funcionais, como aumento da relação parede:lúmen, rigidez vascular (MONTEZANO et al., 2015) e aumento às respostas vasoconstritoras aos diferentes agonistas (DRUMMOND et al., 2011; SCHIFFRIN, E. L., 2012), que resultam no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (PERTICONE et al., 2001; RIZZONI et al., 2003; SCHIFFRIN, Ernesto L., 2018). Além disso, o desenvolvimento da hipertensão arterial e de doença cardiovascular têm sido associado à deficiência de PUFA, principalmente o AL (TSUKAMOTO; SUGAWARA, 2017; WU, Jason H.Y. et al., 2014).

Os resultados obtidos neste estudo mostram os efeitos do tratamento por 15 dias sobre os níveis pressóricos e as alterações vasculares em SHR. O AL foi capaz de reduzir os níveis pressóricos e de melhorar dos parâmetros estruturais e mecânicos nas artérias mesentéricas de resistência. Além disso, foi observada menor deposição de colágeno, o que pode ser responsável pela diminuição da rigidez vascular. Associado a estes efeitos, a resposta vasoconstritora provocada pela fenilefrina foi reduzida em artérias mesentéricas de resistência dos animais hipertensos. Essa resposta é decorrente do aumento da biodisponibilidade de NO, provavelmente como resultado da redução da produção de ânion superóxido e diminuição da participação de prostanóides vasoconstritores derivados da COX-2.

Com intuito de esclarecer os possíveis mecanismos envolvidos na resposta promovida pelo AL, os resultados encontrados neste trabalho serão discutidos adiante.

5.1 INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM ÁCIDO LINOLEICO SOBRE AS MEDIDAS HEMODINÂMICAS DIRETA E INDIRETA EM RATOS HIPERTENSOS

As importantes alterações estruturais e funcionais nas pequenas artérias mesentéricas foram capazes de melhorar a PAS, PAD e PAM após 15 dias de tratamento com AL. As artérias de resistência desempenham um papel crucial na regulação da pressão arterial, do fluxo sanguíneo local e da perfusão tecidual (DAVIS; HILL, 1999; MULVANY, M J; HALPERN, 1977).

O desenvolvimento de hipertensão e de doença cardiovascular tem sido associado à deficiência de ácido graxo poliinsaturado, principalmente o AL (HORROBIN, 1995; NAFTILAN; DZAU; LOSCALZO, 1986). De fato, vários estudos sugerem que o metabolismo anormal dos ácidos graxos está presente durante a hipertensão (MILLANVOYE-VAN BRUSSEL; SIMON; FREYSS-BÉGUIN, 1994; POISSON et al., 1993). AL demonstrou restaurar a hipertensão induzida pelo acetato de desoxicorticosterona em ratos (KAWAHARA et al., 1990). Além disso, evidências reforçam que o ácido gama-linolênico, um metabólito do ácido linoleico, tem efeitos anti-hipertensivos em SHR (ST LOUIS et al., 1992). Ao mesmo tempo, dietas enriquecidas com gama-linolênico ou AL melhoraram a pressão arterial em humanos hipertensos (IACONO; DOUGHERTY, 1993) e atenuaram o desenvolvimento de hipertensão em SHR (ENGLER et al., 1992; HOFFMANN et al., 1986).

Reforçando a importância dos benefícios do AL na hipertensão, Kawahara e colaboradores (1990), alimentaram por quatro semanas ratos hipertensos (DOCA sal) com dieta rica em AL e observaram redução significativa na pressão arterial sistólica e na concentração de sódio nos eritrócitos. Corroborando com esses dados, um estudo epidemiológico demonstrou que populações que incluíam AL em suas dietas, apresentaram melhora nas pressões sistólica e diastólica (MIURA et al., 2008).

Sabe-se que o aumento da PAD tem importante relação com o aumento da resistência vascular periférica, enquanto que o aumento na PAS está mais relacionado ao maior débito cardíaco e rigidez da aorta, refletindo o aumento do sistema nervoso simpático. Além disso, fatores que influenciam o débito cardíaco, como contratilidade miocárdica e volemia, contribuem para a elevação da pressão arterial, bem como fatores que aumentam a resistência vascular periférica, sendo

as alterações na resistência vascular umas das principais responsáveis por modificações na pressão arterial (BOHR; WEBB, 1984; FOLKOW, 1982; LUND-JOHANSEN, 1983). Dentre as alterações que podem contribuir para o aumento de resistência vascular periférica, podem ser citadas as modificações vasculares estruturais, mecânicas e funcionais, como por exemplo: remodelamento vascular com diminuição do diâmetro do vaso e aumento da área de secção transversa da camada média (MULVANY, 2002); aumento da síntese de matriz extracelular, como colágeno e fibronectina; redução da atividade das metaloproteinases, reduzindo a degradação da matriz extracelular na camada média (TOUYZ, 2005); maior redução do relaxamento ou aumento da liberação de fatores vasoconstritores derivados do endotélio; aumento da contração do músculo liso; e aumento da atividade simpática (BOHR; WEBB, 1984; FOLKOW, 1982; JOYNER et al., 2010; LÜSCHER; VANHOUTTE, 1986).

É importante considerar que a redução nos valores de pressão arterial obtida no presente estudo pode ser justificada pela presença de fatores determinantes para diminuição da resistência vascular periférica, como a diminuição de fatores vasoconstritores, como EROs e COX-2, aumento do fator vasodilatador óxido nítrico e remodelamento vascular, processos observados em nosso trabalho diante do tratamento com AL, discutidos a seguir.

5.2 ÁCIDO LINOLEICO MELHORA OS PARÂMETROS ESTRUTURAIS E MECÂNICOS EM RATOS HIPERTENSOS

Na hipertensão, a aumentada resistência periférica é consequência de alterações estruturais e funcionais em pequenas artérias e arteríolas que regulam o fluxo e a pressão. O diâmetro luminal de artérias de resistência é determinado pelo nível de vasoconstrição exercida pela contração ativa de células do músculo liso vascular e por características estruturais do vaso (SUN et al., 2008). Portanto, a maior espessura de parede, junto da redução no lúmen arterial e, conseqüentemente, a maior relação parede:lúmen assumem um importante papel na vasoconstrição periférica (RIZZONI et al., 2003).

O remodelamento vascular e o aumento da rigidez na hipertensão estão associados a alterações estruturais e mecânicas vasculares (INTENGAN; SCHIFFRIN, 2000; MULVANY, 2012). O aumento da razão parede:lúmen é a principal característica do remodelamento vascular nesta patologia, e esse parâmetro tem valor prognóstico para eventos cardiovasculares (MATHIASSEN et al., 2007; RIZZONI et al., 2003). Além disso, mudanças passivas no diâmetro luminal dos vasos obtidas por pressões intravasculares são a base para o estabelecimento da ocorrência do remodelamento. Portanto, quando o diâmetro luminal passivo está diminuído, o remodelamento classifica-se como “inward” ou para o interior, e quando está aumentado classifica-se como “outward” ou para o exterior (MULVANY et al., 1996). E ainda, esta classificação de remodelamento foi refinada para incluir mudanças na área de secção transversa do vaso, definido como hipertrófico, eutrófico ou hipotrófico, em situações em que a área de secção transversa é aumentada, inalterada, ou diminuída, respectivamente (HONG et al., 2015; SUN et al., 2008).

O presente estudo avaliou as alterações estruturais e mecânicas em artérias mesentéricas de resistência, que contribuem ativamente e passivamente para a manutenção e regulação da resistência e do fluxo sanguíneo intestinal (CHRISTENSEN; MULVANY, 2001). Após tratamento com AL, observou-se modificações nos parâmetros morfológicos destas artérias quando comparado ao grupo controle, onde podemos observar uma redução nos diâmetros do lúmen e do vaso, associado a um aumento na espessura da parede e na relação parede:lúmen, caracterizando um remodelamento do tipo eutrófico interno do

vaso. O tipo de remodelamento vascular observado em artérias mesentéricas de resistência de SHR pode variar entre o eutrófico e o hipertrófico principalmente devido ao diâmetro das artérias. Entretanto, o aumento na relação parede:lúmen é observado em todos os vasos arteriais (FEIHL et al., 2008; RENNA et al.; 2013).

Ao final dos 15 dias de tratamento, mostramos que o AL foi capaz de modificar as alterações morfológicas induzidas pela hipertensão em artérias mesentéricas de resistência, onde podemos observar um aumento no diâmetro interno e externo do vaso, o qual ocorreu associado a uma redução do espessamento de parede e da relação parede:lúmen, sugerindo remodelamento hipotrófico externo (MULVANY, 2002, 2012).

Os mecanismos responsáveis pelo remodelamento vascular observado em artérias mesentéricas de ratos hipertensos e submetidos ao tratamento com AL não foram avaliados neste estudo. Entretanto, o crescimento da camada média do vaso pode envolver processo de hipertrofia ou hiperplasia das células do músculo liso vascular, assim como aumento na deposição de proteínas da matriz extracelular (INTENGAN; SCHIFFRIN, 2000; KORSGAARD; MULVANY, 1988; MULVANY et al., 1985). Neste contexto, proteínas da matriz extracelular, tais como o colágeno e a elastina, além de estarem envolvidas na modulação estrutural das artérias, também regulam as propriedades mecânicas do vaso (BRIONES et al., 2010; HERRERA et al., 2018).

Neste estudo, avaliamos o efeito do tratamento com AL sobre as duas principais proteínas de matriz em artérias mesentéricas de resistência de ratos hipertensos, o colágeno e a elastina. Mudanças na quantidade ou na organização destes dois maiores componentes da matriz extracelular podem modificar a complacência vascular e, como consequência, influenciar no diâmetro dos vasos em diferentes pressões intravasculares (BRIONES et al., 2010; MARTINEZ-LEMUS et al., 2008).

O colágeno é uma proteína muito rígida e que tem o papel fisiológico de limitar a distensão do vaso, entretanto colágeno excessivo é deletério para a parede vascular, aumentando a rigidez (BRIONES et al, 2010). A hipertensão arterial é uma das condições patológicas associada com excessiva deposição de colágeno tanto no coração (THENAPPAN et al., 2018), como em artérias de condução e de resistência (BRIONES et al., 2010). De fato, neste estudo observamos que as artérias mesentéricas de resistência dos ratos hipertensos

apresentaram redução na quantidade de colágeno e, estes dados estão de acordo com estudos prévios (BRIONES et al., 2006; GONZÁLEZ et al., 2006; INTENGAN et al., 1999).

A elastina também é considerada um importante determinante da propriedade mecânica da parede arterial e é essencial para a integridade e função estrutural vascular (DOBRIN, 1978; JACOB et al., 2001). Um desequilíbrio entre a síntese e a degradação de proteínas da matriz extracelular pode afetar a rigidez vascular. A rigidez arterial depende basicamente de um equilíbrio entre os componentes distensíveis, como a elastina, e elementos menos distensíveis, como o colágeno e a fibronectina (INTENGAN et al., 1999a). A elastina constitui 90% das fibras elásticas que formam lâminas fenestradas que permitem o contato celular. Estas fibras elásticas estão desenhadas de maneira que permita que a tensão se distribua uniformemente através da parede arterial. A síntese das fibras elásticas está mais restrita ao período fetal e neonatal, entretanto está bem estabelecido que o desenvolvimento da hipertensão está associado com um aumento das proteínas da matriz extracelular incluindo a elastina, na parede arterial, o que significaria uma reação ao aumentado estresse mecânico imposto pela hipertensão (ARRIBAS et al., 2006).

Neste estudo, observamos que o tratamento com AL melhora a rigidez arterial acompanhada pela diminuição da deposição de colágeno, um importante resultado, já que a rigidez vascular aumentada na hipertensão tem sido geralmente atribuída a um aumento do conteúdo desta proteína (LAURANT; TOUYZ; SCHIFFRIN, 1997). Parte deste efeito poderia estar ocorrendo justamente porque o tratamento com AL neste estudo reduziu a quantidade de ânion superóxido que se encontrava aumentada nas artérias mesentéricas dos ratos hipertensos, diminuindo, portanto o efeito das espécies reativas de oxigênio sobre estes vasos, o que leva a uma redução na síntese de colágeno (FARRAR; HUNTLEY; BUTCHER, 2015; ROQUE et al., 2013). Por outro lado, o conteúdo de elastina depositada não foi estatisticamente significativo entre os grupos estudados ($p = 0,22$).

Sabe-se que a composição da matriz extracelular na parede vascular é considerada como grande contribuidora das características visco-elásticas dos vasos sanguíneos (BRIONES et al., 2003, 2009). A relação stress-strain dos vasos não é linear devido à ação conjunta do colágeno e da elastina. Em uma

curva de relação stress-strain, a parte inicial da curva que corresponde a pressões mais baixas, e é determinada pela deformação das fibras de elastina, são muito distensíveis. Em contrapartida, a parte final da curva, que corresponde a pressões mais altas, está determinada pelas fibras de elastina totalmente estiradas e pela contribuição das fibras de colágeno, que são mais rígidas (DOBRIN, 1978). Neste estudo, observamos que após o tratamento com AL nos ratos hipertensos, houve uma melhora na deposição de colágeno e na rigidez arterial quando comparada aos SHR controles, como indicado através do deslocamento para a esquerda da curva de relação stress-strain.

5.3 RESPOSTAS VASOMOTORAS ENVOLVIDAS NO TRATAMENTO COM DO ÁCIDO LINOLEICO

O modelo experimental de hipertensão arterial utilizado, o SHR, desenvolvido em 1963 (OKAMOTO & AOKI, 1963) apresenta características intrínsecas responsáveis por alterações estruturais, mecânicas e funcionais, prévias ao aumento da pressão arterial, as quais muito possivelmente resultam em aumento da resistência vascular periférica levando ao desenvolvimento e manutenção da hipertensão arterial.

A hipertensão é um processo multifatorial que inclui disfunção endotelial e resulta principalmente no prejuízo da biodisponibilidade de NO devido a uma diminuição na produção deste gás e/ou aumento da sua degradação associado à produção de $O_2^{\cdot-}$ (TANG; VANHOUTTE, 2010). Portanto, a consequência final pode ser aumento das respostas contráteis e/ou diminuição das respostas vasodilatadoras.

As células do músculo liso vascular, assim como as demais células musculares, dependem diretamente de um aumento na concentração de cálcio citoplasmático para deflagrar sua contração. A fenilefrina é um agonista α 1-adrenérgico que atua sobre receptores no músculo liso vascular levando à contração e, conseqüentemente, redução da luz dos vasos sanguíneos. Os receptores α -1-adrenérgicos quando ativados, ativa à proteína G que, por sua vez, ativa a fosfolipase C (PLC), a qual hidrolisa a fosfatidilinositol bifostato (PIP_2), resultando em 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 estimula a liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, enquanto que o DAG ativa a proteína quinase C (PKC) resultando em maior mobilização de cálcio através de canais da membrana, o que aumenta a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio e fosforilação da cadeia leve da miosina. A fosforilação desta última ativa a ATPase miosínica que permite a formação das pontes cruzadas entre actina e miosina promovendo assim, a contração do músculo liso (BLAUSTEIN & HAMLYN, 2010).

No presente estudo, observamos que o tratamento com AL afetou a resposta contrátil em artérias mesentéricas de resistência de ratos hipertensos, confirmada pela diminuição da reatividade vascular após curvas concentração-resposta à fenilefrina.

A acetilcolina se liga ao receptor muscarínico (M3) levando ao aumento da concentração intracelular de cálcio por meio da ação de IP3 e DAG, os quais ativam as vias de produção de mediadores como o NO, a prostaciclina e EDHF. Estes mediadores se difundem para o músculo liso vascular e ativam a hiperpolarização dessas células (RATTMMAN, 2009). Em contrapartida, o nitroprussiato de sódio age como um doador de NO ao estimular a GCs que, por diversos mecanismos leva a hiperpolarização das células musculares lisas (GEWALTIG & KOJDA, 2002).

Considerando a modulação do tônus vascular diante do tratamento com AL, as respostas vasodilatadoras dependente e independente do endotélio por meio de curvas concentração-resposta à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio foram investigadas. Os relaxamentos não foram alterados entre os grupos experimentais. Estes resultados sugerem que o tratamento com AL não alterou a produção de NO estimulada pela ACh, tão pouco modificou a capacidade de relaxamento do músculo liso vascular.

Alterações decorrentes da disfunção endotelial nos processos hipertensivos são multifatoriais e em muitos casos, parecem depender do tipo de hipertensão desenvolvida, de sua duração e do leito vascular estudado. Há controvérsias na literatura em relação ao relaxamento vascular dependente do endotélio na hipertensão arterial, podendo estar diminuído, inalterado ou até mesmo aumentado (ANGUS; COCKS, 1989; BRIONES, et al., 1999; LEE et al., 1987; LÜSCHER et al., 1987; TADDEI et al., 1997).

As células endoteliais são importantes reguladores do tônus vascular através da produção de agentes vasoativos, como NO, ROS e prostanóides (FÖRSTERMANN, U, 1986). Tendo em vista que o tratamento com AL reduziu a reatividade vascular de artérias mesentéricas, sugere-se que haja uma melhora na modulação vascular diante da disfunção vascular descrita por trabalhos prévios no modelo experimental estudado. Nesse sentido, o estudo propôs investigar algumas vias que poderiam esclarecer a ação vascular do AL em segmentos arteriais.

5.3.1 Efeitos do tratamento com ácido linoleico sobre a via do óxido nítrico

Dentre os componentes vasoativos do endotélio, o NO se destaca pelo seu efeito vasodilatador, além de um potente inibidor da adesão e agregação plaquetária e da proliferação de células do músculo liso vascular (CANNON, 1998). Sua síntese é estimulada por vários fatores, como receptores endoteliais e pelas forças de cisalhamento produzidas pelo fluxo sanguíneo no vaso (*shear stress*) (PALMER et al., 1987).

A biodisponibilidade de NO tem sido frequentemente associada à disfunção endotelial, inclusive em modelos experimentais de hipertensão, diabetes e aterosclerose (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991b). Nossos estudos mostraram que o AL é capaz de melhorar a modulação do NO em resposta à fenilefrina, sugerindo que o tratamento com AL pode aumentar a biodisponibilidade do NO. Corroborando com os dados funcionais, os resultados obtidos através da produção local de NO também se mostrou aumentada no grupo AL. Em contra partida, a expressão protéica da eNOS não foi estatisticamente diferente em artérias mesentéricas dos grupos controle e tratado.

Estudos prévios demonstram que a exposição ao AL pode modificar a via do óxido nítrico. Ramasamy e colaboradores (1998) demonstraram, após vinte e quatro horas de tratamento com ácido linoléico oxidado (13-HPODE), que as células endoteliais de aorta bovina apresentavam níveis significativamente aumentados de RNAm da eNOS. Por outro lado, AL também tem mostrado inibir a atividade de NOS via ativação de PKC (MURAKAMI; CHAN; ROUTTENBERG, 1986) e diminuir a produção de NO em células endoteliais de artéria bovina (DAVDA et al., 1995). Portanto, existe alguma controvérsia em relação aos efeitos modulatórios do AL nas células endoteliais.

5.3.2 Envolvimento do ânion superóxido na reatividade vascular de artérias mesentéricas de ratos hipertensos

O endotélio vascular pode ser considerado um importante órgão-alvo da hipertensão arterial (RIZZONI, D et al., 1996), sendo cada vez mais crescentes as evidências de que a disfunção endotelial está envolvida tanto na gênese quanto

no desenvolvimento da hipertensão arterial. Diversos autores descreveram que na hipertensão arterial ocorre um desequilíbrio entre a produção aumentada dos fatores vasoconstritores e redução dos vasodilatadores produzidos pelo endotélio (BAUTISTA, 2003; LÜSCHER et al., 1988).

A hipertensão arterial, nas artérias mesentéricas de resistência de ratos, está associada ao aumento da oxidação de NO pelo $O_2^{\cdot-}$, no entanto, alterar a produção e liberação de NO (TADDEI et al., 1997b). Além disso, o aumento do estresse oxidativo, a disfunção endotelial, o remodelamento vascular e a inflamação têm sido observados nessa patologia (BRIONES et al., 2011).

No presente estudo, o AL reduziu a participação do anion superóxido em resposta à fenilefrina, o qual foi confirmada através da fluorescência de DHE. Portanto, sugerimos uma associação direta na redução da oxidação entre o NO- $O_2^{\cdot-}$, com a diminuição da rigidez vascular e as alterações na deposição de matriz extracelular observadas após o tratamento com AL.

5.3.3 Modulação da vasomotricidade pelos prostanóides derivados da via da ciclooxygenase (COX) após tratamento com ácido linoleico

O tônus vascular é regulado, entre outros fatores, pelos prostanóides produzidos pelo endotélio (LÜSCHER; NOLL, 1995). Os prostanoides são formados em vasos sanguíneos saudáveis predominantemente pela isoforma constitutiva da enzima ciclooxygenase, COX-1, embora seja expressa constitutivamente, pode ter sua expressão aumentada por diversos fatores, à exemplo do estresse de cisalhamento (DOROUDI et al., 2000). Entretanto, esses mediadores também podem ser sintetizados pela isoforma induzível, COX-2 (FÉLÉTOU; HUANG; VANHOUTTE, 2011), expressa constitutivamente em alguns tecidos, incluindo o endotélio vascular, além de ter sua expressão induzida em sítios inflamatórios (CANNON, C. P.; CANNON, 2012) e em doenças inflamatórias crônicas, como a hipertensão (CHOU et al., 1998).

Sabe-se também que há um sinergismo entre as vias que ligam a formação de EROS e prostanóides derivados da COX-2 e que, ambos, por sua vez, podem comprometer a função endotelial em doenças como hipertensão (BRIONES, M.; TOUYZ, 2010b; MARTÍNEZ-REVELLES et al., 2013a; TADDEI et al., 1997b).

Além do sinergismo entre EROS e COX-2, também é descrito que o aumento do estresse oxidativo pode induzir alterações na liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, na ativação da COX, nos receptores TP para tromboxano e IP para prostaciclina nas células endoteliais e músculo liso, podendo contribuir para o aumento de reatividade vascular observado na hipertensão (FÉLÉTOU et al., 2010; SELLERS; STALLONE, 2008).

Os prostanóides vasoconstritores produzidos pela COX-2 estão aumentados em diferentes modelos animais de hipertensão e são os principais responsáveis pela disfunção endotelial e pelo aumento das respostas vasoconstritoras observadas nessa patologia (MARTÍNEZ-REVELLES et al., 2013b). No presente estudo, observou-se diminuição da participação dos prostanóides vasoconstritores da COX-2 e, também dos receptores de TXA_2 (TP) e de PGE_2 (EP1), além da síntese de TXA_2 , principais mediadores pró-inflamatórios do dano vascular.

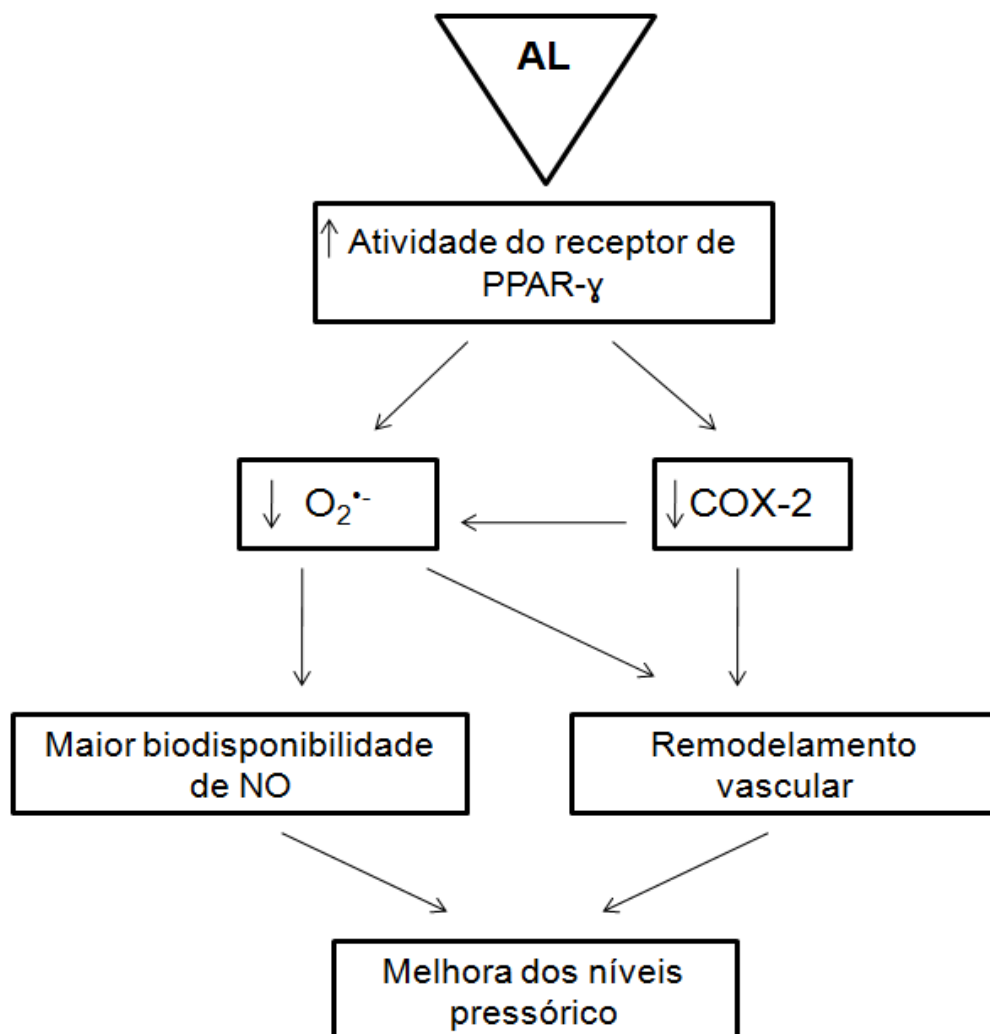
Corroborando com este achado, a expressão da proteína COX-2 foi diminuída nas artérias mesentéricas de ratos tratados com AL. Estudos anteriores demonstraram que AL é metabolizado em 13-HPODE por COX-1 e COX-2, e quando formado, o 13-HPODE pode ser um potente inibidor da formação de prostaglandinas a partir de ácido araquidônico (FUJIMOTO; YONEMURA; SAKUMA, 2008; RINGBOM et al., 2001).

Em diferentes modelos inflamatórios, como a hipertensão, foi demonstrado que o efeito anti-inflamatório dos agonistas de $\text{PPAR}\gamma$ está associado à redução da expressão de COX-2 (COLLINO et al., 2006). Um fator de transcrição nuclear que controla a diferenciação celular, o PPAR é expresso em todos os componentes do sistema vascular, incluindo células endoteliais, células do músculo liso vascular e monócitos/macrófagos.

O AL é um ligante natural de $\text{PPAR}\gamma$, envolvido na produção de moléculas sinalizadoras e anti-inflamatórias (HARRIS; SHEARER, 2014), contribuindo para a redução da inflamação e do estresse oxidativo (HARRIS; SHEARER, 2014; IVANOVA et al., 2015). Além disso, os agonistas do $\text{PPAR}\gamma$ podem inibir a expressão de vários componentes da NADPH oxidase, a principal fonte de $\text{O}_2^{\cdot-}$ a nível vascular, e conseqüentemente, a produção de espécies reativas de oxigênio, contribuindo para as ações anti-inflamatórias e de proteção vascular (HWANG et al., 2005). É importante considerar que uma diminuição na expressão

de PPARs vascular poderia participar na proliferação exacerbada da migração celular e inflamação observada na hipertensão (ZHANG et al., 2010). No presente estudo, embora a expressão da proteína PPAR γ não tenha sido alterada, ela não reflete a atividade do receptor, o que pode contribuir para as propriedades antiinflamatórias do AL.

6 SUMARIZAÇÃO DOS RESULTADOS



7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, os resultados apresentados neste estudo mostram que o tratamento do AL induz alterações estruturais e funcionais nas artérias de resistência de SHR, provavelmente pela redução da produção de ânion superóxido, podendo contribuir para o aumento da biodisponibilidade do NO e menor participação de prostanóides vasoconstritores derivados da COX-2, acarretando em melhora da disfunção endotelial após o tratamento com AL nesse modelo de hipertensão.

Todas essas alterações benéficas para as artérias de resistência podem contribuir para a redução da rigidez vascular e melhora da pressão arterial, atribuindo ao AL um grande potencial para o tratamento da hipertensão.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEAGBO, A S; TRIGGLE, C R. Varying extracellular [K⁺]: a functional approach to separating EDHF- and EDNO-related mechanisms in perfused rat mesenteric arterial bed. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 21, n. 3, p. 423–9, 1993.

AGABITI-ROSEI, Enrico; HEAGERTY, Anthony M; RIZZONI, Damiano. Effects of antihypertensive treatment on small artery remodelling. **Journal of hypertension**, v. 27, n. 6, p. 1107–14, 2009.

ALEXANDER, J W. Immunonutrition: the role of omega-3 fatty acids. **Nutrition**, v. 14, n. 7–8, p. 627–633, 1998.

ALVAREZ, Y et al. Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. **British journal of pharmacology**, v. 153, n. 5, p. 926–35, 2008.

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

ALVAREZ Y, BRIONES AM, BALFAGÓN G, ALONSO MJ, SALAICES M. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. **Journal of hypertension**, v. 23, n. 4, p. 767–77, 2005b.

ALVAREZ Y, PÉREZ-GIRÓN JV, HERNANZ R, BRIONES AM, GARCÍA-REDONDO A, BELTRÁN A, ALONSO MJ, SALAICES M.. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 321, n. 1, p. 381–388, 2007.

ANDER, Bradley P et al. Polyunsaturated fatty acids and their effects on cardiovascular disease. **Exp Clin Cardiol.**, v. 8, n. 4, p. 164–172, 2003.

ANDRADE, P.M.M.; CARMO, M.G.T. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. **Rev Mn-Metabólica**, v. 8, n. 3, p. 135–143, 2006.

ANGUS, J A; COCKS, T M. Endothelium-derived relaxing factor. **Pharmacology & therapeutics**, v. 41, n. 1–2, p. 303–52, 1989.

ARRIBAS, Silvia M.; HINEK, Aleksander; GONZÁLEZ, M. Carmen. Elastic fibres and vascular structure in hypertension. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, n. 3, p. 771–791, 2006a.

ARRIBAS, Silvia M et al. Heightened aberrant deposition of hard-wearing elastin in conduit arteries of prehypertensive SHR is associated with increased stiffness and inward remodeling. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 295, n. 6, p. H2299-307, 2008.

ARRIBAS, Silvia M; HINEK, Aleksander; GONZÁLEZ, M Carmen. Elastic fibres and vascular structure in hypertension. **Pharmacology & therapeutics**, v. 111, n. 3, p. 771–91, 2006b.

ASP, Michelle L et al. Time-dependent effects of safflower oil to improve glycemia, inflammation and blood lipids in obese, post-menopausal women with type 2 diabetes: a randomized, double-masked, crossover study. **Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v. 30, n. 4, p. 443–9, 2011.

AYALA, J. et al. Effects of polyunsaturated fatty acids (Omega-3) on the platelet aggregation. **Rev Latinoamer Hipertens.**, v. 4, n. 3, p. 71–78, 2009.

BARADARAN, Azar; NASRI, Hamid; RAFIEIAN-KOPAEI, Mahmoud. Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. **Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan**

University of Medical Sciences, v. 19, n. 4, p. 358–67, 2014.

BATISTA, Priscila Rossi de. **Upregulation do receptor tipo Toll 4 pela angiotensina II contribui para a hipertensão arterial e disfunção vascular através da produção de espécies reativas de oxigênio**. 2014. 220 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2013.

BAUTISTA, L E. Inflammation, endothelial dysfunction, and the risk of high blood pressure: epidemiologic and biological evidence. **Journal of human hypertension**, v. 17, n. 4, p. 223–30, 2003.

BEDARD, Karen; KRAUSE, Karl-Heinz. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 245–313, 2007.

BERECEK, K H; RASCHER, W; GROSS, F. Vascular reactivity in the pathogenesis of spontaneous hypertension. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 57 Suppl 5, p. 51s–53s, 1979.

BJERMO, Helena et al. Effects of n-6 PUFAs compared with SFAs on liver fat, lipoproteins, and inflammation in abdominal obesity: a randomized controlled trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 95, n. 5, p. 1003–1012, 2012.

BLAUSTEIN, Mordecai P; HAMLIN, John M. Signaling mechanisms that link salt retention to hypertension: endogenous ouabain, the Na(+) pump, the Na(+)/Ca(2+) exchanger and TRPC proteins. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1802, n. 12, p. 1219–1229, 2010.

BOHLEN, H G. Localization of vascular resistance changes during hypertension. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 8, n. 3, p. 181–3, mar. 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3949372>>. Acesso em: 25 jul. 2018.

BOHR, D F; WEBB, R C. Vascular smooth muscle function and its changes in hypertension. **The American journal of medicine**, v. 77, n. 4A, p. 3–16, 1984a.

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

BOUSSAIRI, E H et al. Thromboxane A₂-prostaglandin H₂ and renovascular hypertension in rats. **The American journal of physiology**, v. 267, n. 5 Pt 2, p. R1190-7, 1994.

BRADFORD, M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRIONES, A M et al. Role of iNOS in the vasodilator responses induced by L-arginine in the middle cerebral artery from normotensive and hypertensive rats. **British journal of pharmacology**, v. 126, n. 1, p. 111–20, 1999.

BRIONES, Ana M.; TOUYZ, Rhian M. Oxidative Stress and Hypertension: Current Concepts. **Current Hypertension Reports**, v. 12, n. 2, p. 135–142, 2010a.

BRIONES, Ana M et al. Alterations in structure and mechanics of resistance arteries from ouabain-induced hypertensive rats. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 291, n. 1, p. H193-201, 2006a.

Briones AM, Rodríguez-Criado N, Hernanz R, García-Redondo AB, Rodríguez-Díez RR, Alonso MJ, Egido J, Ruiz-Ortega M, Salaices M. Atorvastatin prevents angiotensin II-induced vascular remodeling and oxidative stress. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 54, n. 1, p. 142–9, 2009.

BRIONES AM, GONZÁLEZ JM, SOMOZA B, GIRALDO J, DALY CJ, VILA E, GONZÁLEZ MC, MCGRATH JC, ARRIBAS SM. Role of elastin in spontaneously hypertensive rat small mesenteric artery remodelling. **The Journal of physiology**,

v. 552, n. Pt 1, p. 185–95, 2003.

BRIONES, Ana M; ARRIBAS, Silvia M; SALAICES, Mercedes. Role of extracellular matrix in vascular remodeling of hypertension. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 19, n. 2, p. 187–94, 2010a.

BÜLBRING, E; TOMITA, T. Catecholamine action on smooth muscle. **Pharmacological reviews**, v. 39, n. 1, p. 49–96, 1987.

CALDER, P C; GRIMBLE, R F. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. **Eur J Clin Nutr.**, v. 56, n. s3, p. S14–S19, 2002.

CALVIELLO, G; SERINI, S; PICCIONI, E. n-3 polyunsaturated fatty acids and the prevention of colorectal cancer: molecular mechanisms involved. **Curr Med Chem.**, v. 14, n. 29, p. 3059–3069, 2007.

CANNON, C. P.; CANNON, P. J. COX-2 Inhibitors and Cardiovascular Risk. **Science**, v. 336, n. 6087, p. 1386–1387, 2012.

CANNON, R O. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. **Clin Chem.**, v. 44, n. 8 Pt 2, p. 1809–1819, ago. 1998.

CARVAJAL, Jorge A. et al. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 184, n. 3, p. 409–420, 2000.

CARRETERO, OSCAR A. Vascular remodeling and the kallikrein-kinin system. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(3):588-591.

CARVALHO, M H et al. The role of thromboxane A2 in the altered microvascular reactivity in two-kidney, one-clip hypertension. **Endothelium: journal of endothelial cell research**, v. 5, n. 3, p. 167–78, 1997.

CARVALHO, Mhc et al. **Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções.** **Fortes ZB Rev Bras Hipertens.** [S.l: s.n.], 2001.

CHAPKIN, Robert S et al. Dietary docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid: emerging mediators of inflammation. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.**, v. 81, n. 2–3, p. 187–191, 2009.

CHOU, T C et al. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 31, n. 2, p. 643–8, 1998.

CHRISTENSEN, K L; MULVANY, M J. Location of resistance arteries. **Journal of vascular research**, v. 38, n. 1, p. 1–12, 2001.

COLLINO, Massimo et al. Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR-gamma agonists in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion. **European journal of pharmacology**, v. 530, n. 1–2, p. 70–80, 2006.

CONNOR, W E. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. **Am J Clin Nutr.**, v. 71, n. 1 Suppl, p. 171S–5S, 2000.

D'USCIO, L V et al. Structure and function of small arteries in salt-induced hypertension: effects of chronic endothelin-subtype-A-receptor blockade. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 30, n. 4, p. 905–11, 1997.

DAS, Undurti N. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. **Biotechnol J.**, v. 1, n. 4, p. 420–39, 2006.

DAVDA, R K et al. Oleic acid inhibits endothelial nitric oxide synthase by a protein kinase C-independent mechanism. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 26, n. 5, p. 764–70, 1995.

DAVIS, Michael J.; HILL, Michael A. Signaling Mechanisms Underlying the

Vascular Myogenic Response. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 387–423, 1999.

DE CATERINA, Raffaele; LIAO, James K; LIBBY, Peter. Fatty acid modulation of endothelial activation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 1, p. 213S–223S, 2000.

DENG, L. Y.; SCHIFFRIN, E. L. Effects of endothelin on resistance arteries of DOCA-salt hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 262, n. 6, p. H1782–H1787, 1992.

DENG LY, SCHIFFRIN EL. Morphological and functional alterations of mesenteric small resistance arteries in early renal hypertension in rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 261, n. 4, p. H1171–H1177, 1991.

DOBRIN, P B. Mechanical properties of arteries. **Physiological reviews**, v. 58, n. 2, p. 397–460, 1978.

DOROUDI, R et al. Effects of shear stress on eicosanoid gene expression and metabolite production in vascular endothelium as studied in a novel biomechanical perfusion model. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 269, n. 1, p. 257–64, 2000.

DRUMMOND, Grant R et al. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 10, n. 6, p. 453–71, 2011.

DUBOIS, R N et al. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 12, n. 12, p. 1063–73, 1998.

ENGLER, M M et al. Dietary gamma-linolenic acid lowers blood pressure and alters aortic reactivity and cholesterol metabolism in hypertension. **Journal of**

hypertension, v. 10, n. 10, p. 1197–204, 1992.

FARRAR, Emily J.; HUNTLEY, Geoffrey D.; BUTCHER, Jonathan. Endothelial-Derived Oxidative Stress Drives Myofibroblastic Activation and Calcification of the Aortic Valve. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0123257, 2015.

FEIHL, François et al. Hypertension and microvascular remodelling. **Cardiovascular research**, v. 78, n. 2, p. 274–85, 2008.

FÉLÉTOU, Michel; HUANG, Yu; VANHOUTTE, Paul M. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. **British journal of pharmacology**, v. 164, n. 3, p. 894–912, 2011.

FÉLÉTOU M, HUANG Y, VANHOUTTE PM.. Vasoconstrictor prostanoids. **Pflugers Archiv: European journal of physiology**, v. 459, n. 6, p. 941–50, 2010.

FÉLÉTOU, Michel; VANHOUTTE, Paul M. EDHF: an update. **Clinical Science**, v. 117, n. 4, p. 139–155, 2009a.

FÉLÉTOU, Michel; VANHOUTTE, Paul M. EDHF: an update. **Clin Sci (Lond)**., v. 117, n. 4, p. 139–155, 2009b.

FÉLÉTOU M, VANHOUTTE PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 26, n. 6, p. 1215–25, 2006.

FERRUCCI, Luigi et al. Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 91, n. 2, p. 439–46, 2006.

FEUERSTEIN, G; HALLENBECK, J M. Leukotrienes in health and disease. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 1, n. 3, p. 186–92, 1987.

FINAUD, J. et al. Antioxidant Status and Oxidative Stress in Professional Rugby Players: Evolution Throughout a Season. **International Journal of Sports Medicine**, v. 27, n. 2, p. 87–93, 2006.

FOLKOW, B. Physiological aspects of primary hypertension. **Physiological Reviews**, v. 62, n. 2, p. 347–504, 1982.

FÖRSTERMANN, U. [Significance of endothelial cells for the regulation of the tone of smooth muscle--formation of an endothelial, relaxing factor]. **Zeitschrift fur Kardiologie**, v. 75, n. 10, p. 577–83, 1986.

FÖRSTERMANN, Ulrich; SESSA, William C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European heart journal**, v. 33, n. 7, p. 829–37, 837a–837d, 2012.

FRÖLICH, J C; FÖRSTERMANN, U. Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance. **Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.**, v. 19, p. 211–215 1989.

FUJIMOTO, Yohko; YONEMURA, Toshimitsu; SAKUMA, Satoru. Role of linoleic Acid hydroperoxide preformed by cyclooxygenase-1 or -2 on the regulation of prostaglandin formation from arachidonic Acid by the respective enzyme. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 43, n. 2, p. 65–8, 2008.

FURCHGOTT, R F; ZAWADZKI, J V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature.**, v. 288, n. 5789, p. 373–376, 1980.

GALIPEAU, D et al. Chronic thromboxane synthase inhibition prevents fructose-induced hypertension. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 38, n. 4, p. 872–6, 2001.

GANITKEVICH V, Y a; ISENBERG, G. Depolarization-mediated intracellular calcium transients in isolated smooth muscle cells of guinea-pig urinary bladder. **The Journal of physiology**, v. 435, p. 187–205, 1991.

GARLAND, C J; MCPHERSON, G A. Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery. **British journal of pharmacology**, v. 105, n. 2, p. 429–35, 1992.

GONZÁLEZ, José M et al. Postnatal alterations in elastic fiber organization precede resistance artery narrowing in SHR. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 291, n. 2, p. H804-12, 2006a.

HARRIS, William S; SHEARER, Gregory C. Omega-6 fatty acids and cardiovascular disease: friend, not foe? **Circulation**, v. 130, n. 18, p. 1562–4, 2014.

HERRERA, Jeremy; HENKE, Craig A.; BITTERMAN, Peter B. Extracellular matrix as a driver of progressive fibrosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 1, p. 45–53, 2018.

HILLEBRANDS, J L et al. Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. **The Journal of clinical investigation**, v. 107, n. 11, p. 1411–22, n. 2001.

HOFFMANN, P et al. Comparative study of the blood pressure effects of four different vegetable fats on young, spontaneously hypertensive rats. **Lipids**, v. 21, n. 12, p. 733–7, 1986.

HOLLOWAY, E T; BOHR, D F. Reactivity of vascular smooth muscle in hypertensive rats. **Circulation research**, v. 33, n. 6, p. 678–85, 1973.

HONG, Zhongkui et al. Vascular Smooth Muscle Cell Stiffness and Adhesion to Collagen I Modified by Vasoactive Agonists. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0119533, 2015.

HOROWITZ, A et al. Mechanisms of smooth muscle contraction. **Physiological reviews**, v. 76, n. 4, p. 967–1003, 1996a.

HORROBIN, D F. Abnormal membrane concentrations of 20 and 22-carbon essential fatty acids: a common link between risk factors and coronary and peripheral vascular disease? **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 53, n. 6, p. 385–96, 1995.

HUIE, R E; PADMAJA, S. The reaction of no with superoxide. **Free radical research communications**, v. 18, n. 4, p. 195–9, 1993.

HWANG, Jinah et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands regulate endothelial membrane superoxide production. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 288, n. 4, p. C899-905, 2005.

IACONO, J M; DOUGHERTY, R M. Effects of Polyunsaturated Fats on Blood Pressure. **Annual Review of Nutrition**, v. 13, n. 1, p. 243–260, 1993.

INTENGAN, H D et al. Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats : effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition. **Circulation**, v. 100, n. 22, p. 2267–75, 1999a.

INTENGAN, H D; SCHIFFRIN, E L. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 36, n. 3, p. 312–8, 2000a.

IVANOVA, Ekaterina A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma in cardiovascular disorders and cardiovascular surgery. **Journal of Cardiology**, v. 66, n. 4, p. 271–278, 2015.

JACOB, M P. [Elastin: preparation, characterization, structure, biosynthesis and catabolism]. **Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales**, v. 187, n. 2, p. 166–80, 1993.

JACOB MP, BADIÉ-COMMANDER C, FONTAINE V, BÉNAZZOUG Y, FELDMAN L, MICHEL JB. Extracellular matrix remodeling in the vascular wall. **Pathologie-biologie**, v. 49, n. 4, p. 326–32, 2001.

JAMES, Paul A et al. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). **JAMA**, v. 311, n. 5, p. 507–20, 2014.

JOHNSON, Guy H; FRITSCHÉ, Kevin. Effect of dietary linoleic acid on markers of inflammation in healthy persons: a systematic review of randomized controlled trials. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 112, n. 7, p. 1029–41, 1041.e1–15, 2012.

JOYNER, Michael J; CHARKOUDIAN, Nisha; WALLIN, B Gunnar. Sympathetic nervous system and blood pressure in humans: individualized patterns of regulation and their implications. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 56, n. 1, p. 10–6, 2010.

KAWABE, Jun-ichi; USHIKUBI, Fumitaka; HASEBE, Naoyuki. Prostacyclin in vascular diseases. - Recent insights and future perspectives -. **Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society**, v. 74, n. 5, p. 836–43, 2010.

KAWAHARA, J et al. Dietary linoleic acid prevents the development of deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 15, n. 2 Suppl, p. I81-7, 1990.

KIM, H R et al. Smooth muscle signalling pathways in health and disease. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 12, n. 6A, p. 2165–80, 2008.

KLEIN-PLATAT, Carine et al. Plasma fatty acid composition is associated with the metabolic syndrome and low-grade inflammation in overweight adolescents. **The American journal of clinical nutrition**, v. 82, n. 6, p. 1178–84, 2005.

KORSGAARD, N; MULVANY, M J. Cellular hypertrophy in mesenteric resistance vessels from renal hypertensive rats. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 12, n. 2, p. 162–7, 1988.

KUROTANI, Kayo et al. High levels of stearic acid, palmitoleic acid, and dihomo- γ -linolenic acid and low levels of linoleic acid in serum cholesterol ester are associated with high insulin resistance. **Nutrition research (New York, N.Y.)**, v. 32, n. 9, p. 669–675.e3, 2012.

LANDS, W E. Biochemistry and physiology of n-3 fatty acids. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 6, n. 8, p. 2530–6, 1992.

LASSEGUE, B.; SAN MARTIN, A.; GRIENDLING, K. K. Biochemistry, Physiology, and Pathophysiology of NADPH Oxidases in the Cardiovascular System. **Circulation Research**, v. 110, n. 10, p. 1364–1390, 2012.

LAU, Beatrice Y Y et al. Investigating the role of polyunsaturated fatty acids in bone development using animal models. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 18, n. 11, p. 14203–27, 2013.

LAUGHLIN, M Harold; NEWCOMER, Sean C; BENDER, Shawn B. Importance of hemodynamic forces as signals for exercise-induced changes in endothelial cell phenotype. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 104, n. 3, p. 588–600, 2008.

LAURANT, P; TOUYZ, R M; SCHIFFRIN, E L. Effect of pressurization on mechanical properties of mesenteric small arteries from spontaneously hypertensive rats. **Journal of vascular research**, v. 34, n. 2, p. 117–25, 1997.

LEHNINGER, Albert L.; NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica**. 6. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, xxx, 1298 p., 2014.

LEE, Hsin-Chen; WEI, Yau-Huei. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 232, n. 5, p. 592–606, 2007.

LEE, Je et al. Fatty Acid Desaturases, Polyunsaturated Fatty Acid Regulation, and Biotechnological Advances. **Nutrients**, v. 8, n. 1, p. 23, 2016.

LEE, T J; SHIRASAKI, Y; NICKOLS, G A. Altered endothelial modulation of vascular tone in aging and hypertension. **Blood vessels**, v. 24, n. 3, p. 132–6, 1987.

LI, J S; SCHIFFRIN, E L. Effect of calcium channel blockade or angiotensin-converting enzyme inhibition on structure of coronary, renal, and other small arteries in spontaneously hypertensive rats. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 68–74, 1996.

LINCOLN, T M; DEY, N; SELLAK, H. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 91, n. 3, p. 1421–30, 2001.

LIOU, Y Angela et al. Decreasing linoleic acid with constant alpha-linolenic acid in dietary fats increases (n-3) eicosapentaenoic acid in plasma phospholipids in healthy men. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 4, p. 945–52, 2007.

LUND-JOHANSEN, P. Haemodynamics in early essential hypertension--still an area of controversy. **Journal of hypertension**, v. 1, n. 3, p. 209–13, 1983a.

Lund-Johansen P. Haemodynamics in early essential hypertension--still an area of controversy. **Journal of hypertension**, v. 1, n. 3, p. 209–13, 1983b.

LUO, Wenhong; LIU, Bin; ZHOU, Yingbi. The endothelial cyclooxygenase pathway: Insights from mouse arteries. **European Journal of Pharmacology**, v. 780, p. 148–158, 2016.

LÜSCHER, T F et al. Endothelium-dependent responses in carotid and renal arteries of normotensive and hypertensive rats. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 11, n. 6 Pt 2, p. 573–8, 1988.

LÜSCHER, T F; NOLL, G. The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. **Atherosclerosis**, v. 118 Suppl, p. S81-90, 1995.

LÜSCHER, T F; RAIJ, L; VANHOUTTE, P M. Endothelium-dependent vascular responses in normotensive and hypertensive Dahl rats. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 9, n. 2, p. 157–63, 1987.

LÜSCHER, T F; VANHOUTTE, P M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 8, n. 4, p. 344–8, 1986a.

MARÍN, J. Mechanisms involved in the increased vascular resistance in hypertension. **Journal of autonomic pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 127–76, 1993.

MARÍN, J; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, M A. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. **Pharmacology & therapeutics**, v. 75, n. 2, p. 111–34, 1997.

MÁRQUEZ-MARTÍN, Ana et al. Middle cerebral artery alterations in a rat chronic hypoperfusion model. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 112, n. 3, p. 511–8, 2012.

MARTINEZ-LEMUS, Luis A; HILL, Michael A; MEININGER, Gerald A. The plastic nature of the vascular wall: a continuum of remodeling events contributing to control of arteriolar diameter and structure. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 24, n. 1, p. 45–57, 2009.

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

MARTÍNEZ-REVELLES S1, AVENDAÑO MS, GARCÍA-REDONDO AB, ALVAREZ Y, AGUADO A, PÉREZ-GIRÓN JV, GARCÍA-REDONDO L, ESTEBAN V, REDONDO JM, ALONSO MJ, BRIONES AM, SALAICES M. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 1, p. 51–65, 2013b.

MATHIASSEN, Ole N et al. Small artery structure is an independent predictor of cardiovascular events in essential hypertension. **Journal of Hypertension**, v. 25, n. 5, p. 1021–1026, 2007.

MILLANVOYE-VAN BRUSSEL, E; SIMON, J; FREYSS-BÉGUIN, M. Altered phospholipid fatty acid content and metabolism in heart cell cultures from newborn spontaneously hypertensive rats. **American journal of hypertension**, v. 7, n. 11, p. 953–9, 1994.

MITCHELL, Lex A et al. Linoleic acid metabolites act to increase contractility in isolated rat heart. **Cardiovascular toxicology**, v. 2, n. 3, p. 219–30, 2002.

MIURA, K. et al. Relationship of Dietary Linoleic Acid to Blood Pressure: The International Study of Macro-Micronutrients and Blood Pressure Study. **Hypertension**, v. 52, n. 2, p. 408–414, 2008.

MONCADA, S et al. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. **Thrombosis research**, v. 11, n. 3, p. 323–44, 1977.

MONCADA, S; PALMER, R M; HIGGS, E A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological reviews**, v. 43, n. 2, p. 109–42, 1991a.

MONTEZANO, Augusto C. et al. Oxidative Stress and Human Hypertension: Vascular Mechanisms, Biomarkers, and Novel Therapies. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 31, n. 5, p. 631–641, 2015.

MUELLER, Cornelius F H et al. ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 25, n. 2, p. 274–8, 2005.

MULVANY et al. Vascular remodeling. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 28, n. 3, p. 505–6, 1996.

MULVANY MJ. Vascular remodelling of resistance vessels: can we define this? **Cardiovascular research**, v. 41, n. 1, p. 9–13, 1999.

MULVANY, M J et al. Vascular remodeling. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 28, n. 3, p. 505–6, 1996.

MULVANY, M J; BAANDRUP, U; GUNDERSEN, H J. Evidence for hyperplasia in mesenteric resistance vessels of spontaneously hypertensive rats using a three-dimensional disector. **Circulation research**, v. 57, n. 5, p. 794–800, 1985.

MULVANY, M J; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circulation research**, v. 41, n. 1, p. 19–26, 1977.

MULVANY, M J; HANSEN, O K; AALKJAER, C. Direct evidence that the greater contractility of resistance vessels in spontaneously hypertensive rats is associated with a narrowed lumen, a thickened media, and an increased number of smooth muscle cell layers. **Circulation research**, v. 43, n. 6, p. 854–64, 1978.

MULVANY, M J; NYBORG, N. An increased calcium sensitivity of mesenteric resistance vessels in young and adult spontaneously hypertensive rats. **British journal of pharmacology**, v. 71, n. 2, p. 585–96, 1980.

MULVANY, Michael J. Small artery remodelling in hypertension: causes, consequences and therapeutic implications. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v. 46, n. 5, p. 461–467, 2008.

MULVANY, Michael J. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. **News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society**, v. 17, p. 105–9, 2002a.

MULVANY MJ. Small artery remodeling in hypertension. **Current hypertension reports**, v. 4, n. 1, p. 49–55, 2002b.

MULVANY MJ. Small artery remodelling in hypertension. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 110, n. 1, p. 49–55, 2012.

MURAKAMI, K; CHAN, S Y; ROUTTENBERG, A. Protein kinase C activation by cis-fatty acid in the absence of Ca²⁺ and phospholipids. **The Journal of biological chemistry**, v. 261, n. 33, p. 15424–9, 1986.

NAFTILAN, A J; DZAU, V J; LOSCALZO, J. Preliminary observations on abnormalities of membrane structure and function in essential hypertension. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 8, n. 6 Pt 2, p. II174-9, 1986.

NAGAO, T.; VANHOUTTE, P. M. Hyperpolarization contributes to endothelium-dependent relaxations to acetylcholine in femoral veins of rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 261, n. 4, p. H1034–H1037, 1991.

NELSON, M. T.; QUAYLE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 268, n. 4, p. C799–C822, 1995.

NØRRELUND, H et al. Early narrowed afferent arteriole is a contributor to the development of hypertension. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 24, n. 3, p. 301–8, 1994.

OATES, John A. et al. Clinical Implications of Prostaglandin and Thromboxane A₂ Formation. **New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 12, p. 761–767, 1988.

OKAMOTO, K; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese circulation journal**, v. 27, p. 282–93, 1963.

PALMER, R M; FERRIGE, A G; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature.**, v. 327, n. 6122, p. 524–526, 1987.

PARAVICINI, Tamara M; TOUYZ, Rhian M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes care**, v. 31 Suppl 2, n. Supplement 2, p. S170-80, 2008.

PARKER, C W. Lipid mediators produced through the lipoxygenase pathway. **Annual review of immunology**, v. 5, n. 1, p. 65–84, 1987.

PATRONO, C; CIABATTONI, G; DAVI, G. Thromboxane biosynthesis in cardiovascular diseases. **Stroke.**, v. 21, n. 12 Suppl, p. IV130-133, 1990.

PATRONO, Carlo. Cardiovascular effects of cyclooxygenase-2 inhibitors: a mechanistic and clinical perspective. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 82, n. 4, p. 957–964, 2016.

PELLEGRINO, Daniela. Antioxidants and Cardiovascular Risk Factors. **Diseases**, v. 4, n. 1, p. 11, 2016.

PERTICONE, F et al. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. **Circulation**, v. 104, n. 2, p. 191–6, 2001.

PISCHON, Tobias et al. Habitual dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids in relation to inflammatory markers among US men and women. **Circulation**, v. 108, n. 2, p. 155–60, 2003.

POISSON, J P et al. Effect of salt-loading and spontaneous hypertension on in vitro metabolism of [1-14C]linoleic and [2-14C]dihomo-gamma-linolenic acids. **Biochemical medicine and metabolic biology**, v. 49, n. 1, p. 57–66, 1993.

POURAGEAUD, F; DE MEY, J G. Structural properties of rat mesenteric small arteries after 4-wk exposure to elevated or reduced blood flow. **The American journal of physiology**, v. 273, n. 4 Pt 2, p. H1699-706, 1997.

PRICKETT, Timothy C.R. et al. C-Type Natriuretic Peptides in Coronary Disease. **Clinical Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 316–324, 2017.

RABELO, Luíza A et al. Endothelium dysfunction in LDL receptor knockout mice: a role for H₂O₂. **British journal of pharmacology**, v. 138, n. 7, p. 1215–20, 2003.

RAMASAMY, S; PARTHASARATHY, S; HARRISON, D G. Regulation of endothelial nitric oxide synthase gene expression by oxidized linoleic acid. **Journal of lipid research**, v. 39, n. 2, p. 268–76, 1998.

RASSIAS, G; KESTIN, M; NESTEL, P J. Linoleic acid lowers LDL cholesterol without a proportionate displacement of saturated fatty acid. **European journal of clinical nutrition**, v. 45, n. 6, p. 315–20, 1991.

RATNAYAKE, W M Nimal; GALLI, Claudio. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. **Annals of nutrition & metabolism**, v. 55, n. 1–3, p. 8–43, 2009.

RATTMMAN, Y. D. **Mecanismos Endoteliais Envolvidos nos Efeitos Vasculares da *Dicksonia sellowiana* (PRESL.) Hook.** 2009. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, 2009.

REDÓN, Josep et al. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 41, n. 5, p. 1096–101, 2003.

RENNA, Nicolás F.; DE LAS HERAS, Natalia; MIATELLO, Roberto M. Pathophysiology of Vascular Remodeling in Hypertension. **International Journal of Hypertension**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

RETT, Brian S; WHELAN, Jay. Increasing dietary linoleic acid does not increase tissue arachidonic acid content in adults consuming Western-type diets: a systematic review. **Nutrition & metabolism**, v. 8, n. 1, p. 36, 2011.

RIBEIRO JUNIOR, Rogério Faustino et al. Soybean oil increases SERCA2a expression and left ventricular contractility in rats without change in arterial blood pressure. **Lipids Health Dis.**, v. 9, p. 53, 2010.

RINGBOM, T et al. Cox-2 inhibitory effects of naturally occurring and modified fatty acids. **Journal of natural products**, v. 64, n. 6, p. 745–9, 2001.

RIZZONI, D. et al. Prognostic Significance of Small-Artery Structure in Hypertension. **Circulation**, v. 108, n. 18, p. 2230–2235, 2003a.

RIZZONI D1, PORTERI E, BOARI GE, DE CIUCEIS C, SLEIMAN I, MUIESAN ML, CASTELLANO M, MICLINI M, AGABITI-ROSEI E. Prognostic Significance of Small-Artery Structure in Hypertension. **Circulation**, v. 108, n. 18, p. 2230–2235, 2003b.

RIZZONI, D et al. Vascular hypertrophy and remodeling in secondary hypertension. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 28, n. 5, p. 785–90, 1996.

RIZZONI D1, CASTELLANO M, PORTERI E, BETTONI G, MUIESAN ML, AGABITI-ROSEI E. Vascular structural and functional alterations before and after the development of hypertension in SHR. **American journal of hypertension**, v. 7, n. 2, p. 193–200, 1994.

RIZZONI, Damiano et al. Prognostic significance of small-artery structure in hypertension. **Circulation**, v. 108, n. 18, p. 2230–5, 2003.

ROQUE, Fernanda R et al. Aerobic exercise reduces oxidative stress and improves vascular changes of small mesenteric and coronary arteries in hypertension. **British Journal of Pharmacology**, v. 168, n. 3, p. 686–703, 2013.

ROSS, Mark D. Endothelial Regenerative Capacity and Aging: Influence of Diet, Exercise and Obesity. **Current Cardiology Reviews**, v. 14, 2018.

RUBANYI, G M. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 22 Suppl 4, p. S1-14, 1993.

SCHIFFRIN, E. L. Vascular Remodeling in Hypertension: Mechanisms and Treatment. **Hypertension**, v. 59, n. 2, p. 367–374, 2012.

SCHIFFRIN, E L. A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 38 Suppl 2, p. S3-6, 2001.

SCHIFFRIN, E L; DENG, L Y; LAROCHELLE, P. Morphology of resistance arteries and comparison of effects of vasoconstrictors in mild essential hypertensive patients. **Clinical and investigative medicine. Medecine clinique et experimentale**, v. 16, n. 3, p. 177–86, 1993.

SCHIFFRIN, Ernesto L. Hypertension in 2017: Novel mechanisms of hypertension and vascular dysfunction. **Nature Reviews Nephrology**, v. 14, n. 2, p. 73–74, 2018.

SCHÖNBECK, Uwe et al. Augmented Expression of Cyclooxygenase-2 in Human Atherosclerotic Lesions. **The American Journal of Pathology**, v. 155, n. 4, p. 1281–1291, 1999.

SELLERS, Minga M; STALLONE, John N. Sympathy for the devil: the role of thromboxane in the regulation of vascular tone and blood pressure. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 294, n. 5, p. H1978-86, 2008.

SHARMA, Salil et al. Role of Oxidized Lipids in Pulmonary Arterial Hypertension. **Pulmonary Circulation**, v. 6, n. 3, p. 261–273, 2016.

SHERWOOD, Lauralee. **Fisiologia Humana - Das Células aos Sistemas**. Cengage Learning, p. 1-872, 2010.

SHIMOKAWA, H; MATOBA, Tetsuya. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Pharmacological Research**, v. 49, n. 6, p. 543–549, 2004.

SINHA, Nakshi; DABLA, Pradeep Kumar. Oxidative stress and antioxidants in hypertension-a current review. **Current hypertension reviews**, v. 11, n. 2, p. 132–42, 2015.

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

SPECTOR, A A. Essentiality of fatty acids. **Lipids**, v. 34 Suppl, p. S1-3, 1999.

ST LOUIS, C et al. Antihypertensive effect of gamma-linolenic acid in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 19, n. 2 Suppl, p. II111-5, 1992.

STULL, J T et al. Vascular smooth muscle contractile elements. Cellular regulation. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 17, n. 6 Pt 1, p. 723–32, 1991.

SUMMERS, L K M et al. Substituting dietary saturated fat with polyunsaturated fat changes abdominal fat distribution and improves insulin sensitivity. **Diabetologia**,

v. 45, n. 3, p. 369–77, 2002.

SUN, Zhe et al. Extracellular matrix-specific focal adhesions in vascular smooth muscle produce mechanically active adhesion sites. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 295, n. 1, p. C268–C278, 2008.

TADDEI, S et al. Cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 29, n. 1 Pt 2, p. 274–9, 1997a.

TADDEI S, VIRDIS A, GHIADONI L, MAGAGNA A, SALVETTI A.. Cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 29, n. 1 Pt 2, p. 274–9, 1997b.

TANG, Eva H. C.; VANHOUTTE, Paul M. Endothelial dysfunction: a strategic target in the treatment of hypertension? **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 459, n. 6, p. 995–1004, 2010a.

TANG, Eva H C; VANHOUTTE, Paul M. Endothelial dysfunction: a strategic target in the treatment of hypertension? **Pflugers Archiv: European journal of physiology**, v. 459, n. 6, p. 995–1004, 2010b.

TANITO, Masaki et al. Enhanced oxidative stress and impaired thioredoxin expression in spontaneously hypertensive rats. **Antioxidants & redox signaling**, v. 6, n. 1, p. 89–97, 2004.

THENAPPAN, Thenappan; CHAN, Stephen Y.; WEIR, E. Kenneth. Role of Extracellular Matrix in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, p. ajpheart.00136.2018, 2018.

TOBOREK, Michal et al. Unsaturated fatty acids selectively induce an inflammatory environment in human endothelial cells. **Am J Clin Nutr.**, v. 75, n. 1, p. 119–25, 2002.

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

TOUYZ, R M; SCHIFFRIN, E L. Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. **Journal of hypertension**, v. 19, n. 7, p. 1245–54, 2001.

TOUYZ, Rhian M. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 14, n. 2, p. 125–31, 2005.

TOUYZ RM, ALVES-LOPES R, RIOS FJ, CAMARGO LL, ANAGNOSTOPOULOU A, ARNER A, MONTEZANO AC. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. **Cardiovascular Research**, v. 114, n. 4, p. 529–539, 2018.

TOUYZ, Rhian M; BRIONES, Ana M. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. **Hypertension Research**, v. 34, n. 1, p. 5–14, 2011.

TSUKAMOTO, Ikuyo; SUGAWARA, Shiori. Low levels of linoleic acid and α -linolenic acid and high levels of arachidonic acid in plasma phospholipids are associated with hypertension. **Biomedical Reports**, v. 8, n. 1, p. 69–76, 2017.

URAKAMI-HARASAWA, L et al. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 11, p. 2793–2799, 1997.

VANE, J R et al. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 6, p. 2046–50, 1994.

VANHOUTTE, P M et al. Endothelial dysfunction and vascular disease. **Acta Physiol (Oxf)**., v. 196, n. 2, p. 193–222, 2009.

VAUGHAN, Roger A. et al. A High Linoleic Acid Diet does not Induce Inflammation in Mouse Liver or Adipose Tissue. **Lipids**, v. 50, n. 11, p. 1115–1122, 2015.

VII DIRETRIZ BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. n.3, p.1-107; 2016.

WANG, Dong D. Dietary n-6 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular disease: Epidemiologic evidence. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 135, p. 5–9, 2018.

WESELER, Antje R.; BAST, Aalt. Oxidative Stress and Vascular Function: Implications for Pharmacologic Treatments. **Current Hypertension Reports**, v. 12, n. 3, p. 154–161, 2010.

WHELAN, Jay; FRITSCHKE, Kevin. Linoleic Acid. **Advances in Nutrition**, v. 4, n. 3, p. 311–312, 2013.

WOOLFSON, R G; POSTON, L. Effect of NG-monomethyl-L-arginine on endothelium-dependent relaxation of human subcutaneous resistance arteries. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 79, n. 3, p. 273–8, 1990.

WU, Jason H.Y. et al. Circulating Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids and Total and Cause-Specific Mortality. **CLINICAL PERSPECTIVE. Circulation**, v. 130, n. 15, p. 1245–1253, 2014.

WU, K K. Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. **Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)**, v. 33, p. 179–207, 1995.

YOUDIM, K A; MARTIN, A; JOSEPH, J A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. **International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for**

Developmental Neuroscience, v. 18, n. 4–5, p. 383–99, 2000.

YUYUN, Matthew F; NG, Leong L; NG, G André. Endothelial dysfunction, endothelial nitric oxide bioavailability, tetrahydrobiopterin, and 5-methyltetrahydrofolate in cardiovascular disease. Where are we with therapy? **Microvascular research**, v. 119, p. 7–12, 2018.

ZHANG, Lili et al. Impaired peroxisome proliferator-activated receptor-gamma contributes to phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells during hypertension. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 18, p. 13666–77, 2010.