

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE L-ARGININA E ALISQUIRENO
SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR MESENTÉRICA NA
HIPERTENSÃO RENOVASCULAR**

Vinícius Mengal

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

VITÓRIA, DEZEMBRO DE 2019

VINÍCIUS MENGAL

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE L-ARGININA E ALISQUIRENO
SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR MESENTÉRICA NA
HIPERTENSÃO RENOVASCULAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sonia Alves Gouvea

**VITÓRIA
2019**

VINÍCIUS MENGAL

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE L-ARGININA E ALISQUIRENO
SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR MESENTÉRICA NA
HIPERTENSÃO RENOVASCULAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovado em 27 de dezembro de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Sonia Alves Gouvea, UFES
(Orientadora)

Prof.^a Dr.^a Silvana dos Santos Meyrelles, UFES
(Membro Interno)

Prof.^a Dr.^a Lívia Carla de Melo Rodrigues, UFES
(Membro Interno)

Prof. Dr. Helder Mauad, UFES
(Membro Externo)

Prof. Dr. Henrique de Azevedo Futuro Neto, EMESCAM
(Membro Externo)

DEDICATÓRIA

Integralmente a Deus, força propulsora para a entrada, permanência e defesa deste trabalho. Aos meus pais, que não pouparam esforços e auxílios, aos meus avós (in memoriam) que certamente muito se felicitam com essa conquista e a todos os amigos e familiares que me apoiaram constantemente!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que foi a força superior com a qual à minha maneira me apoiou nos momentos difíceis e foi quem me permitiu chegar até aqui.

Agradeço também aos meus pais, Lúcia e Antônio, que por vezes renunciaram seus sonhos para que eu conseguisse realizar os meus, que com amor e dedicação não mediram esforços para realização de mais esse sonho. Pai e mãe, obrigado pela confiança e apoio incondicional sempre.

Não poderia deixar de mencionar, meus avós (in memoriam), que um dia depositaram em mim grandes expectativas, e hoje, conquisto mais uma. Agradeço imensamente por terem me ensinado grande parte do alicerce que hoje possuo!

Agradeço em especial à Profª Drª Gláucia Rodrigues Abreu por ter aberto as portas do laboratório e à Profª Drª Sonia Alves Gouvea por ter acreditado no meu potencial e de forma ímpar ter contribuído para o meu crescimento. Deus não podia ter escolhido outra orientadora; Com ela compartilhei muitos momentos de aprendizado, rizadas, companheirismo e solidariedade e crescimento. A você chefe meu muito obrigado!

Deixo meu agradecimento aos meus queridos amigos de laboratório, e da vida, Suellem Guedes, Fabrício Bragança da Silva, Erick Gonçalves, Lucas Bonela, Marcela Marçal Thebit e Daniely Souza de Nardi. Em especial a Drª Simone Alves de Almeida, que em muitos momentos foi suporte científico e pessoal nessa árdua caminhada e ao Bruno Maia Costa por ter chegado no momento tão complicado e que, não mediu esforços em me ajudar em tudo que precisei.

Em especial, agradeço às Drªs Cintia Helena Santuzzi e Renata Viana Tiradentes que depois de longos períodos de experimentos, risos e correrias me fizeram crescer, aprender e chegar aonde cheguei. À vocês devo grande parte da técnica, destreza e conhecimento que ora construí! Sua ajuda foi primordial para o sucesso deste trabalho.

À profª Drª Nazaré Souza Bissolli por possibilitar que os experimentos fossem desenvolvidos em seus laboratórios, sem contar nos auxílios para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos alunos de iniciação científica que direta ou indiretamente contribuíram de forma ímpar para a concretização desse trabalho; em especial a

Isabela Dominicini, Katiane Oliveira, Laiza dos Santos, Laís Lopes e Taylor Gonçalves Nunes, Byanka Brito Nascimento.

Obrigado à minha família, tios e primos e amigos pela compreensão e apoio, e em especial a um grande amigo, Lucas Sousa Oliveira, que me amparou e aguentou as pontas em muitas necessidades no final dessa jornada.

Ao CNPq/CAPES pela bolsa de estudo concedida.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF) da UFES! Não podendo me esquecer de todas as portas dos diferentes laboratórios um dia abertas no decorrer do projeto do programa de pós-graduação em ciências fisiológicas, meu muito obrigado a TODOS pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

À banca examinadora, obrigado pelas correções, contribuições e disponibilidade. E, meu agradecimento vai a cada um de forma ímpar e especial. Ao professor Dr. Helder Mauad por desde a iniciação científica me acompanhar nas atividades de laboratório; A professora Dr^a Silvana dos Santos Meyrelles por desde sempre ter aberto as portas de seu laboratório e me auxiliado nos experimentos; Ao professor Dr. Henrique de Azevedo Futuro Neto por mais uma vez estar presente nessa etapa final; E à professora Dr^a Lívia Carla de Melo por iluminar minhas manhãs pelos corredores e agora abrilhantar ainda mais esse momento.

Assim como, todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste sonho.

“20 segundos de coragem podem mudar o rumo da sua história Φ ”

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	Erro! Indicador não definido.
LISTA DE ABREVIATURAS.....	15
RESUMO	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	21
1.2. HIPERTENSÃO DE GOLDBLATT DOIS RINS, UM CLIPE.....	23
1.3. REMODELAMENTO VASCULAR E HIPERTENSÃO ARTERIAL	26
1.4. DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E HIPERTENSÃO ARTERIAL	27
1.5 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	30
1.5 CICLOOXIGENASE-2.....	36
1.6 ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS NA HIPERTENSÃO RENOVASCULAR	38
2. JUSTIFICATIVA	42
3. OBJETIVOS	43
3.1. Objetivo Geral	43
3.2. Objetivos Específicos	43
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS	44
4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	44
4.2.1 Tratamento.....	44
4.2.2 Modelo de hipertensão renovascular (Hipertensão 2K1C).....	45
4.2.3 Análise da medida direta e indireta da pressão arterial sistólica (PAS)	45
4.2.4 Reatividade do Leito Vascular Mesentérico	46
4.2.4.1 Protocolos do Estudo da Reatividade Vascular:	48
4.2.4.1.1 Reatividade vascular ao agente vasoconstrictor (NA) e ao agente vasodilatador (Ach)	48

4.2.4.1.2 Avaliação da participação do endotélio sobre a resposta vascular ao agente vasoconstrictor (NA) e ao agente vasodilatador (Ach)	48
4.2.5 Estudos da expressão proteica	49
4.2.5.1 Western Blot para detecção de proteínas em artérias mesentéricas	49
4.2.5.2 Preparação dos tecidos e quantificação de proteínas	49
4.2.5.3 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)	50
4.2.5.4 Incubação dos anticorpos	51
4.2.6 Estudo da geração de espécies reativas de oxigênio – Dihidroetídeo (DHE)	52
4.2.7 Detecção da produção de óxido nítrico	53
4.2.8 Análise histológica de artérias mesentéricas superiores	53
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
5 RESULTADOS	55
5.1 Efeitos dos tratamentos com Alisquireno e L-arginina sobre a Pressão Arterial e Frequência Cardíaca de ratos com hipertensão renovascular.....	55
5.2 Efeitos do tratamento com Alisquireno e L-arginina sobre função vascular do leito mesentérico isolado	56
5.3 Efeitos do tratamento com Alisquireno e L-arginina sobre a deposição de colágeno e espessamento da parede da artéria mesentérica superior	65
5.4 Quantificação da disponibilidade local de óxido nítrico utilizando 4,5diaminofluoresceína (DAF-2) em artéria mesentérica superior e leito vascular mesentérico de ratos com hipertensão renovascular	67
5.5 Quantificação da geração de espécies reativas de oxigênio pela oxidação do Dihidroetídeo (DHE) em artéria mesentérica superior e leito vascular mesentérico de ratos com hipertensão renovascular	69
5.6 Expressão proteica do estresse oxidativo e inflamação no leito vascular mesentérico de ratos com hipertensão renovascular tratados com alisquireno e L-arginina.....	71

6 DISCUSSÃO	74
6.1 EFEITOS SOBRE OS NÍVEIS PRESSÓRICOS.....	74
6.2 EFEITOS SOBRE A MORFOLOGIA VASCULAR	76
6.3 EFEITOS SOBRE A DISFUNÇÃO VASCULAR	78
6.3.1 Via do óxido nítrico.....	80
6.3.2 Modulação da vasomotricidade pelos prostanóides derivados da via da ciclooxigenase (COX).....	82
6.4 SUMARIZAÇÃO DOS RESULTADOS.....	83
7. CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Números de mortes pelas principais causas entre a população mundial, em todas as faixas etárias, no ano de 2018. Dados compilados da OurWorldInData.org. Disponível em: <https://ourworldindata.org/causes-of-death>.....19

Figura 2. Relação entre os principais fatores e as mortes por doenças cardiovasculares no mundo em 2018. Dados compilados do Institute for health metrics and evaluation da University of Washington. Disponível em: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/#..20>

Figura 3. Endotélio como um dispositivo de entrada-saída. Os estímulos (sistema de entrada) surgem do ambiente extracelular; e as respostas (sistema de saída) manifestam-se como o fenótipo celular; o ponto de ajuste representa as propriedades intrínsecas da célula endotelial (sistema de controle). LPS, lipopolissacarídeo; EROs, espécies reativas de oxigênio. Adaptado: Aird, 2004.....28

Figura 4. Efeitos NO endotelial. A estimulação de receptores endoteliais e o estresse de cisalhamento estimulam a produção do NO, o qual age na própria célula endotelial ou em células adjacentes, como as células musculares lisas, leucócitos e plaquetas encontrados na corrente sanguínea, resultando em numerosos efeitos envolvidos na homeostase vascular (modificado de Rattmann, 2009).....29

Figura 5. Representação das respostas adaptativas do organismo mediante o balanço entre a produção e controle das espécies reativas (ER). EROs, espécies reativas de oxigênio; ERN, espécies reativas de nitrogênio; ERS, espécies reativas de enxofre, ERCl, espécies reativas de cloro; M(n+), metais de transição; ERC, espécies reativas de carbono. Adaptado: Vasconcelos et al., 2007.....32

Figura 6. Ação esquemática do sistema antioxidante enzimático sobre as espécies reativas de oxigênio. O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) gerado a partir dos processos fisiológicos ou patológicos de estruturas como a NADPH oxidase, cadeia respiratória mitocondrial e eNOS desacoplada é então captado pela enzima superóxido dismutase (SOD) que, por transferência de elétron, o transforma em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), liberando uma molécula de oxigênio. Caso a enzima falhe, ou o ânion esteja excedente no meio, o $O_2^{\bullet-}$ pode interagir com moléculas de óxido nítrico (NO) para formar peroxinitrito ($ONOO^-$) e/ou participar no ciclo de oxirredução do ferro (Fe^{n+}) e gerar radicais hidroxilas (HO^{\bullet}), potente agente oxidante. O H_2O_2 quando não recrutado a exercer funções essenciais será dismutado em uma molécula inócua de água (H_2O), seja pela ação da catalase (e neste processo uma molécula de O_2 também será formada) ou pela glutathiona peroxidase (GPx). Esta última catalisa o H_2O_2 necessitando de duas moléculas de glutathiona (GSH) e neste processo a glutathiona oxidada (GSSG) será restaurada ao seu estado natural pela atividade da glutathiona redutase (GR), que oxida uma molécula de NADPH.....34

Figura 7. 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.....37

Figura 8. Organograma de protocolo experimental.....45

Figura 9. Reatividade do leito mesentérico. Em (A) fotografia de artéria mesentérica superior. Em (B) fotografia do leito mesentérico, após canulação da artéria mesentérica sendo perfundido pela solução nutridora.....47

Figura 10: Curva dose-resposta à NE (A) e ACh (B) nos LVMs na ausência de inibidores de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (●) SHAM, (■) 2K1C, (◆) ALSK, (▲) L-ARG e (▼) ALSK+L-ARG (B; D) Área abaixo da curva (AAC) entre os grupos.....58

Figura 11: Curva dose-resposta à NE nos LVMs de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (A) SHAM e após a incubação com L-NAME (SHAM L-NAME); (B) 2K1C e após a incubação com L-NAME (2K1C L-NAME); (C) ALSK e após a incubação com L-NAME (ALSK L-NAME); (D) L-ARG e após a incubação com LNAME (L-ARG L-NAME); (E) ALSK+L-ARG e após a incubação com L-NAME (ALSK+L-ARG L-NAME); (F) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAAC%) dose-resposta à NE antes (ausência de inibidores farmacológicos) e após a inibição com L-NAME.....59

Figura 12. (A) Curva dose-resposta à ACh nos LVMs de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (A) SHAM e após a incubação com L-NAME (SHAM L-NAME); (B) 2K1C e após a incubação com L-NAME (2K1C L-NAME); (C) ALSK e após a incubação com L-NAME (ALSK L-NAME); (D) L-ARG e após a incubação com LNAME (L-ARG L-NAME); (E) ALSK+L-ARG e após a incubação com L-NAME (ALSK+L-ARG L-NAME); (F) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAAC%) dose-resposta à ACh antes (ausência de inibidores farmacológicos) e após a inibição com L-NAME. As respostas de relaxamento estão expressas como porcentagem na redução da pressão de perfusão relativa a contração induzida pela NE.....60

Figura 13: Curva dose-resposta à NE nos LVMs de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (A) SHAM e após a incubação com L-NAME+Indo (SHAM L-NAME+Indo); (B) 2K1C e após a incubação com L-NAME+Indo (2K1C L-NAME+Indo); (C) ALSK e após a incubação com L-NAME+Indo (ALSK L-NAME+Indo); (D) L-ARG e após a incubação com LNAME+Indo (L-ARG L-NAME+Indo); (E) ALSK+L-ARG e após a incubação com L-NAME+Indo (ALSK+L-ARG L-NAME+Indo); (F) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAAC%) dose-resposta à NE antes (ausência de inibidores farmacológicos) e após a inibição com L-NAME e Indometacina.....62

Figura 14. (A) Curva dose-resposta à ACh nos LVMs de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (A) SHAM e após a incubação com L-NAME+Indo (SHAM L-NAME+Indo); (B) 2K1C e após a incubação com L-NAME+Indo (2K1C L-NAME+Indo); (C) ALSK e após a incubação com L-NAME+Indo (ALSK L-NAME+Indo); (D) L-ARG e após a incubação com LNAME+Indo (L-ARG L-NAME+Indo); (E) ALSK+L-ARG e após a incubação com L-NAME+Indo (ALSK+L-ARG L-NAME+Indo); (F) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAAC%) dose-resposta à ACh antes (ausência de inibidores farmacológicos) e após a inibição com L-NAME e Indometacina. As respostas de relaxamento estão expressas como porcentagem na redução da pressão de perfusão relativa a contração induzida pela NE.....63

Figura 15. Imagens histológicas representativas de seções arteriais microscópicas coradas utilizando hematoxilina e eosina (SHAM:A-B; 2K1C:D-E; ALSK:G-H; L-ARG:J-K; ALSK+L-ARG:M-N) e picrossirius red (SHAM:C; 2K1C:F; ALSK:I; L-ARG:L; ALSK+L-

ARG:O) obtida de artérias de resistência mesentérica de ratos controle e tratados com alisquireno e L-arginina. Quantificação da espessura da parede do vaso (P) e quantificação do conteúdo de colágeno (Q).....66

Figura 16. Imagens de microscopia apresentam a fluorescência emitida por 4,5 diaminofluoresceína (DAF-2) na artéria mesentérica superior e artérias mesentérica de resistência dos ratos Sham (A;F), 2K1C (B;G), ALSK (C;H), L-ARG (D;I) e ALSK+L-ARG (E;J). Gráfico com valores da fluorescência emitida por dihidroetídio (DHE) em artéria mesentérica superior (K) e leito vascular mesentérico (L).....68

Figura 17. Imagens de microscopia apresentam a fluorescência emitida por dihidroetideo na artéria mesentérica superior e artérias mesentérica de resistência dos ratos SHAM (A;F), 2K1C (B;G), ALSK (C;H), L-ARG (D;I) e ALSK+L-ARG (E;J). Gráfico com valores da fluorescência emitida por dihidroetideo em artéria mesentérica superior (K) e leito vascular mesentérico (L).....70

Figura 18. Efeitos do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e a associação de alisquireno e L-arginina (ALSK+L-ARG) sobre a expressão proteica da eNOS (A), iNOS (B), SOD-2 (C), catalase (D), COX-2 (E), TNF- α (F) e AT1R (G) no leito vascular mesentérico. Na parte lateral estão as bandas representativas da expressão proteica. Valores expressos em média \pm EPM entre a densidade das bandas de eNOS, iNOS, SOD-2, catalase, COX-2, TNF- α e AT1R corrigidos pela β -actina;.....72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre a pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) em ratos com hipertensão renovascular 2K1C..... 55

Tabela 2. Efeitos do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre a pressão arterial direta (mmHg) e frequência cardíaca em ratos com hipertensão renovascular 2K1C.....56

Tabela 3. Efeitos do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre os valores de resposta máxima (R_{máx}, g) e sensibilidade (pD₂) das curvas dose-resposta à NE em leito mesentérico de ratos com hipertensão renovascular 2K1C.....64

Tabela 4. Efeitos do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre os valores de resposta máxima (R_{máx}, g) e sensibilidade (pD₂) das curvas dose-resposta à ACh em leito mesentérico de ratos com hipertensão renovascular 2K1C.....64

LISTA DE ABREVIATURAS

2K1C – Dois rins e um clipe;
AA – Ácido araquidônico;
AAC – Área abaixo da curva;
AC – Adenilato ciclase;
ACh – Acetilcolina;
ALSK – Alisquireno;
AMPc – Adenosina monofosfato cíclico;
ANG I - Angiotensina I;
ANG II – Angiotensina II;
AT1R – Receptor de angiotensina 1;
BRAs – Bloqueadores do receptor AT1;
BSA – Albumina bovina;
CML – Célula muscular lisa;
CO₂ – Dióxido de carbono;
COX – Ciclooxigenase;
COX-1 – Ciclooxigenase – 1;
COX-2 – Ciclooxigenase – 2;
dAAC – Diferença de área abaixo da curva;
DAC – Doença arterial coronariana;
DAF-2 – 4,5 Diaminofluoresceína;
DCV – Doenças cardiovasculares;
DHE – Dihidroetídio;
ECA – Enzima conversora de angiotensina;
EDCF – Fatores constritores derivados do endotélio;
EDMF – Fator hiperpolarizante derivado do endotélio;
EDRF – Fatores de relaxamento derivados do endotélio;
eNOS – Óxido nítrico sintases endotelial;
EPM – Erro padrão da média;
ER – Espécies reativas;
ERC – Espécies reativas de carbono;
ERCL – Espécies reativas de cloro;
ERE – Espécies reativas de enxofre;
ERN – Espécies reativas de nitrogênio;
EROs – Espécies reativas de oxigênio;
ET-1 – Endotelina 1;
FC – Frequência cardíaca;
GPX – Glutaciona peroxidase;
GR – Glutaciona redutase;
GSM – Glutaciona;
GSSG – Glutaciona disulfeto;
H₂O – Água;

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio;
HE – Hematoxilina & Eosina;
iECA – Inibidor da ECA;
INDO – Indometacina;
iNOS – Óxido nítrico sintase indutível;
IP – Receptor de prostaciclina;
L-ARG – L-arginina;
L-NAME – N^w-nitro-arginina-metil-éster;
LPS – Lipopolisacarídeo;
LVM – Leito vascular mesentérico;
M⁽ⁿ⁺⁾ – Metais de transição;
MMPs – Metaloproteinases de matriz;
NA – Noradrenalina;
nNOS – Óxido nítrico sintases neuronal;
NO – Óxido nítrico;
NOS – Óxido nítrico sintases;
O₂ – Oxigênio;
O₂^{•-} – Ânion superóxido;
OH⁻ – Radical hidroxila;
ONOO – Peroxinitrito;
PAD – Pressão arterial diastólica;
PAM – Pressão arterial média;
PAS – Pressão arterial sistólica;
PG – Prostaciclina;
PGD₂ – Prostaglandina D₂;
PGE₂ – Prostaglandina E₂;
PGF₂- α – Prostaglandina F₂- α;
PGH₂ – Prostaglandina H₂;
PGI₂ – Prostaglandina I₂;
PGMS – Prostaglandina endoperóxido sintase;
PLA – Enzima fosfolipase A₂;
PLS – Fosfolipase C;
PR – Picrosirius red;
R_{max} – Resposta máxima;
SOD – Superóxido dismutase;
SRAA – Sistema renina-angiotensina aldosterona;
TGF-α – Fator de crescimento tumoral;
TNF-α – Fator de necrose tumoral;
TP – Receptor de tramboxano prostanóide;
TXA₂ – Tramboxano;
CMLV – Células do músculo liso vascular;

RESUMO

A angiotensina II possui importante papel na patogênese da hipertensão renovascular e está associada à disfunção endotelial, aumento da inflamação e estresse oxidativo. A interação entre a angiotensina II e a via da COX tem sido apontada na patogênese das injúrias vasculares, relacionando a um aumento na produção de EROs e redução na produção/biodisponibilidade de NO. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do alisquireno e L-arginina administrados de maneira isolada ou associada sobre as alterações vasculares em ratos com hipertensão renovascular. A hipertensão renovascular foi induzida em ratos machos Wistar utilizando clip de prata implantado cirurgicamente na artéria renal esquerda e os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais: SHAM, 2-rins, 1-clipe (hipertensão 2K1C), 2K1C tratado com alisquireno (50 mg.kg⁻¹.dia⁻¹; ALSK), 2K1C tratado com L-arginina (10 mg.kg⁻¹.dia⁻¹; L-ARG) e 2K1C tratado com associação de alisquireno+L-arginina (ALSK+L-ARG), os tratamentos foram iniciados 7 dias após clipagem da artéria renal com duração de 21 dias. A pressão arterial foi monitorada ao longo do tratamento e ao final da quarta semana após a clipagem foram realizadas curvas dose-resposta à norepinefrina (NE) e acetilcolina (ACh) em leitos vasculares mesentéricos (LVM) isolados na ausência e presença de bloqueadores para avaliação da reatividade vascular. Após 21 dias de tratamento apenas o grupo ALSK+L-ARG foi eficaz na normalização da pressão arterial sistólica quando comparado ao grupo 2K1C (123,91±1,68 vs. 200,50±5,36 mmHg). Nossos achados mostram também que os tratamentos foram efetivos em melhorar a função endotelial no LVM de ratos com hipertensão renovascular. Alterações na via do óxido nítrico (NO) parecem ser o principal mecanismo responsável pelo prejuízo na reatividade vascular, como observado nas curvas dose-resposta à ACh e NE em presença de L-NAME, embora a via dos prostanoídes também pareça estar associada. O efeito antioxidante do alisquireno e sua capacidade em reduzir o estresse oxidativo em artéria mesentérica superior pode ser um importante mecanismo para a melhora no remodelamento vascular encontrado em nossos estudos. Em contrapartida, o aumento da biodisponibilidade de NO e a redução do estresse oxidativo proporcionado pela L-arginina, associada à redução de COX-2 e TNF-alpha pode ser o principal mecanismo pelo qual essa terapêutica além de melhorar função vascular, reduz também os níveis pressóricos. E que, quando associados se potencializam e melhoram todos os parâmetros avaliados, mostrando valores muito semelhantes ao nosso grupo normotenso. Portanto, nosso trabalho demonstra pela primeira vez que o tratamento com alisquireno associado a L-arginina foi efetivo em reduzir a PA e prevenir a disfunção endotelial em LVM de ratos com hipertensão renovascular, além disso, apontamos que os mecanismos envolvidos nesses efeitos parecem estar relacionados com uma redução do estresse oxidativo e inflamação e consequente aumento da produção/biodisponibilidade de NO.

Palavras-chave: hipertensão renovascular, disfunção endotelial, alisquireno, L-arginina, stress oxigênio e ciclooxigenase.

ABSTRACT

Angiotensin II has an important role in the pathogenesis of renovascular hypertension and is associated with endothelial dysfunction, increased inflammation and oxidative stress. The interaction between angiotensin II and the COX pathway has been pointed out in the pathogenesis of vascular injuries, relating to an increase in the production of ROS and a reduction in the production / bioavailability of NO. The aim of this study was to investigate the effects of aliskiren and L-arginine administered alone or in association with vascular changes in rats with renovascular hypertension. Renovascular hypertension was induced in male Wistar rats using a silver clip surgically implanted in the left renal artery and the animals were divided into the following experimental groups: SHAM, 2-kidneys, 1-clip (hypertension 2K1C), 2K1C treated with aliskiren (50 mg.kg⁻¹.day⁻¹; ALSK), 2K1C treated with L-arginine (10 mg.kg⁻¹.day⁻¹ ; L-ARG) and 2K1C treated with a combination of aliskiren + L-arginine (ALSK + L-ARG), the treatments were started 7 days after clipping the renal artery for 21 days. Blood pressure was monitored throughout the treatment and at the end of the fourth week after clipping, dose-response curves were performed for norepinephrine (NE) and acetylcholine (ACh) in mesenteric vascular beds (LVM) isolated in the absence and presence of blockers for evaluation. vascular reactivity. After 21 days of treatment, only the ALSK + L-ARG group was effective in normalizing systolic blood pressure when compared to the 2K1C group (123.91 ± 1.68 vs. 200.50 ± 5.36 mmHg). Our findings also show that the treatments were effective in improving the endothelial function in the LVM of rats with renovascular hypertension. Alterations in the nitric oxide (NO) pathway seem to be the main mechanism responsible for the impairment in vascular reactivity, as observed in the dose-response curves to ACh and NE in the presence of L-NAME, although the prostanoid pathway also seems to be associated. The antioxidant effect of aliskiren and its ability to reduce oxidative stress in the superior mesenteric artery may be an important mechanism for the improvement in vascular remodeling found in our studies. In contrast, the increase in the bioavailability of NO and the reduction of oxidative stress provided by L-arginine, associated with the reduction of COX-2 and TNF-alpha may be the main mechanism by which this therapy, in addition to improving vascular function, also reduces blood pressure levels. And that when associated, all the evaluated parameters are enhanced and improved, showing values very similar to our normotensive group. Therefore, our work demonstrates for the first time that treatment with aliskiren associated with L-arginine was effective in reducing BP and preventing endothelial dysfunction in LVM of rats with renovascular hypertension, in addition, we point out that the mechanisms involved in these effects seem to be related with a reduction of oxidative stress and inflammation and a consequent increase in NO production / bioavailability.

Key words: renovascular hypertension, endothelial dysfunction, aliskiren, L-arginine, oxidative stress and cyclooxygenase.

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são responsáveis pela alta taxa de morbidade e mortalidade do mundo moderno, destacando as mudanças dos padrões epidemiológicos de saúde para as doenças crônicas não transmissíveis (Mckeown, 2009; Benjamin *et al.*, 2018) com números relevantes, principalmente nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Tendo em vista o seu impacto econômico e social, as DCV têm se tornado alvo de diversos estudos, despertando o interesse especial dos pesquisadores, que buscam formas de prevenção e tratamento alternativos para essas doenças por atingirem grandes contingentes populacionais (Blacher *et al.*, 2016; Carvalho *et al.*, 2010).

Dados da plataforma *OurWorldInData.org*, que reúnem os registros das principais fontes científicas do mundo sobre tendências epidemiológicas de longo prazo, sumarizaram que em 2018 as DCV foram responsáveis por 17,65 milhões de mortes, projetando-se muito acima das demais causas entre a população mundial, ou seja, continuam sendo a maior causa de mortes no mundo (Figura 1) (Ritchie; Roser, 2019). O mesmo panorama epidemiológico é observado no Brasil, onde as mortes por DCV correspondem a 30% dos óbitos registrados na população (Malachias *et al.*, 2016).

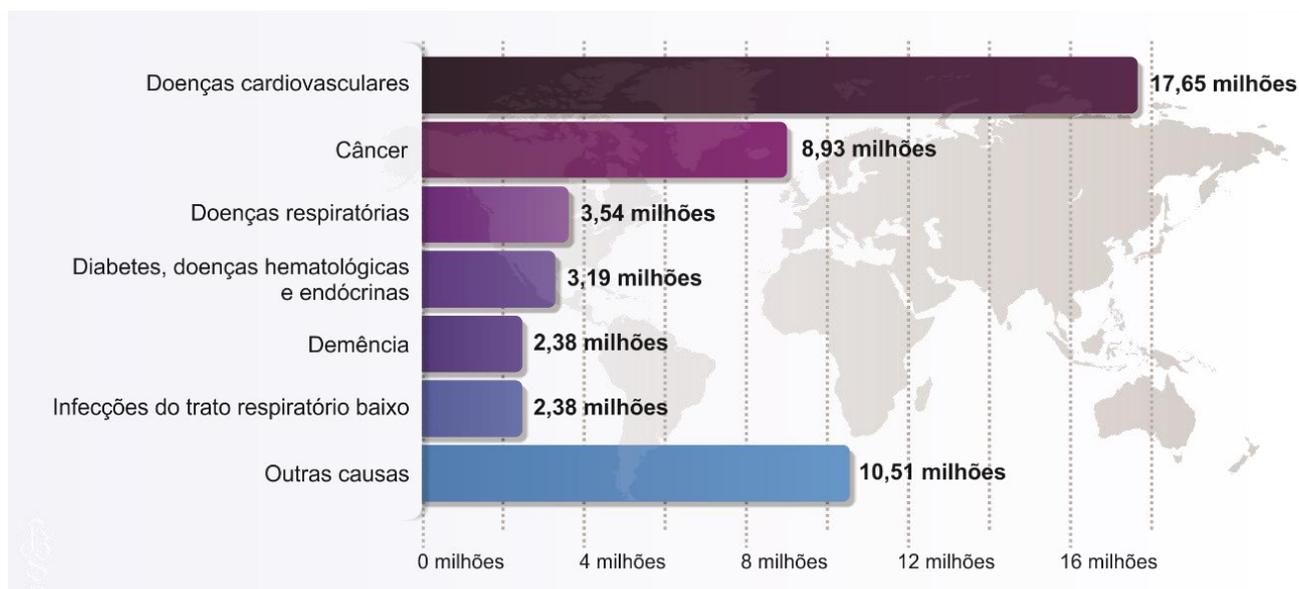


Figura 1. Números de mortes pelas principais causas entre a população mundial, em todas as faixas etárias, no ano de 2018. Dados da *OurWorldInData.org*. Disponível em: <https://ourworldindata.org/causes-of-death>.

Dados atuais mostram que as DCV detêm o título de maior problema de saúde pública no mundo. Em grande parte, eles apoiam-se sobre a complexidade na prevenção e controle dos casos e seu importante potencial incapacitante, quando não letal (Avezum *et al.*, 2017; Saeed *et al.*, 2018). Os grandes investimentos e avanços nas áreas de diagnóstico e tratamento das DCV não foram acompanhados pelo desenvolvimento de estratégias de prevenção, que deveria ser o principal caminho para combater o problema (Bertolami; Bertolami, 2016). Diversos fatores de risco podem ser associados às DCVs, entretanto, a hipertensão arterial se destaca por ser de longe a condição clínica que está mais associada à fisiopatologia das doenças do aparelho circulatório (Rapsomaniki *et al.*, 2014), além de ser a comorbidade presente na maioria das causas de morte (Ritchie; Roser, 2019) (Figura 2).

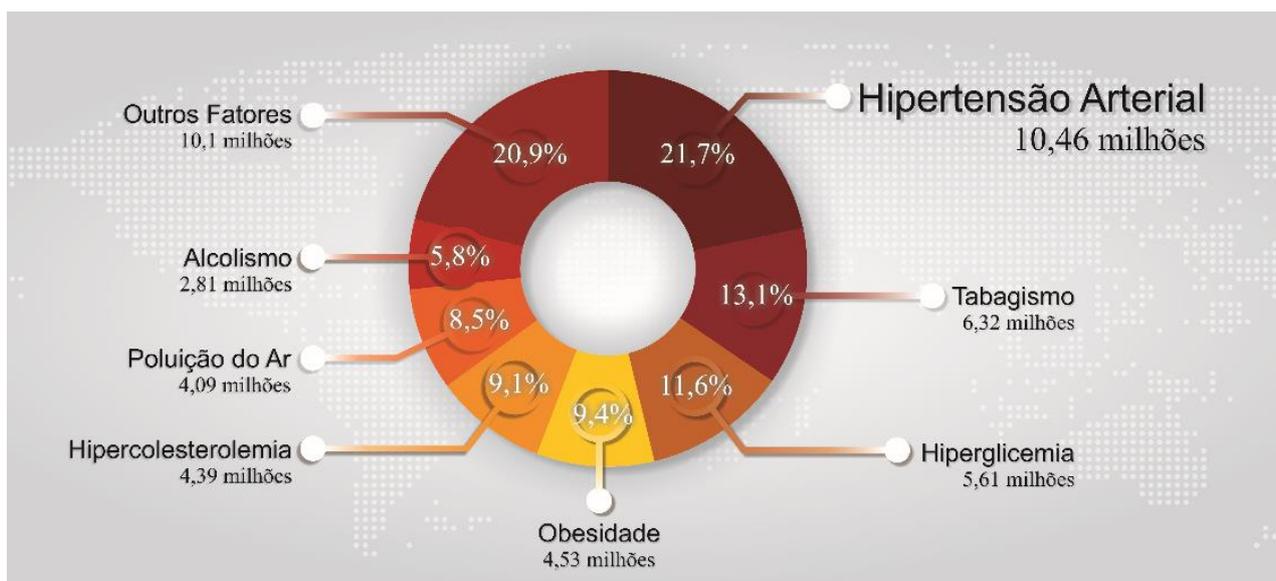


Figura 2. Relação entre os principais fatores e as mortes por doenças cardiovasculares no mundo em 2018. Dados do *Institute for health metrics and evaluation* da *University of Washington*. Disponível em: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/#>.

Atualmente, a Sociedade Brasileira de Cardiologia destaca como fatores de risco para doença cardiovascular a idade superior a 45 anos para homens e 55 anos para mulheres, história familiar de doença arterial coronariana (DAC), tabagismo, hipercolesterolemia, hipertensão arterial sistêmica, diabetes *mellitus*, obesidade, gordura abdominal, sedentarismo, estresse psicossocial e dieta pobre em frutas e vegetais (Précima *et al.*, 2019). Nesse cenário, a hipertensão arterial

atinge 32,5% (36 milhões) de indivíduos adultos, mais de 60% dos idosos, contribuindo direta ou indiretamente para 50% das mortes por DCV (Scala *et al.*, 2015).

1.1. HIPERTENSÃO ARTERIAL

A pressão arterial pode ser definida pela força exercida pelo sangue por unidade de superfície da parede vascular, como um produto resultante da interação do débito cardíaco com a resistência vascular periférica sistêmica, podendo ser considerada como a força motriz necessária para que se mantenha a perfusão sistêmica adequada (Guyton; Hall, 2017). A pressão arterial sistólica (PAS) representa a pressão máxima no interior das artérias, estando associada à sístole ventricular cardíaca, enquanto a pressão arterial diastólica (PAD) representa a menor pressão nas artérias ocasionada pela diástole ventricular cardíaca no momento em que o sangue está preenchendo as cavidades ventriculares. O fluxo de sangue através da circulação sistêmica depende, parcialmente, da diferença de pressão entre a aorta e o átrio direito (Chobanin *et al.*, 2004).

A manutenção da pressão arterial dentro de uma faixa de normalidade é consequência de variações no débito cardíaco, na resistência vascular periférica, ou de ambos (Guyton; Hall, 2017). Sabe-se que diferentes mecanismos participam não só na manutenção como no controle da variação dos níveis pressóricos. O entendimento dos mecanismos de regulação da pressão arterial tem apontado para uma variedade de substâncias e sistemas fisiológicos que interagem de modo a garantir a homeostase pressórica frente às variações em diversas situações (Irigoyen, Consolim-Colombo e Krieger, 2001).

Mudanças fisiopatológicas nestes controles levam ao desenvolvimento de doenças, como a hipertensão arterial, que é uma condição clínica multifatorial, caracterizada por elevação sustentada dos níveis sistólicos igual ou superior a 140 mmHg e diastólicos igual ou superior a 90 mmHg, sendo associada a alterações funcionais e até mesmo estruturais de órgãos como o coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos, assim como alterações metabólicas que levam ao consequente aumento do risco de doenças cardiovasculares (Malachias *et al.*, 2016).

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento da hipertensão arterial, tem-se a idade, o gênero, a etnia, o nível socioeconômico, a obesidade, a taxa de ingestão de sal, o consumo de bebidas alcoólicas, o tabagismo e o sedentarismo. Quando os níveis pressóricos já se encontram elevados, tornam-se um importante fator de risco para manifestação de doenças coronárias, insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular cerebral e doenças renais, que podem estar ou não associadas e apresentam assim uma alta morbimortalidade. Essa multiplicidade de consequências a caracteriza como uma das causas de maior redução da expectativa e da qualidade de vida dos indivíduos (Duncan, Schmidt e Giugliani, 2006; Malachias *et al.*, 2016).

Apesar dos esforços para desvendar os mecanismos envolvidos na patogênese da hipertensão arterial, sua causa permanece desconhecida em 90 a 95% dos indivíduos que apresentam a elevação da pressão arterial sistêmica, caracterizando a hipertensão como essencial ou primária. A hipertensão arterial secundária apresenta prevalência de 5 a 10%, e é caracterizada pela presença de um fator conhecido que esteja atuando na elevação dos níveis pressóricos (Lewandowski, 2003).

Nos casos de hipertensão essencial, as pessoas apresentam um aumento na média da pressão arterial de 40 a 60% e aumento da resistência periférica total, fluxo renal diminuído com a progressão da doença, assim como aumento na resistência ao fluxo sanguíneo renal (embora a filtração glomerular encontre-se próxima ao normal) e prejuízo na excreção renal de sal e água. O desenvolvimento da doença implica ainda em outros fatores, como a ativação de sistemas humorais, como o sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), aumento do estresse oxidativo, decorrente da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), diminuição na produção e/ou biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), redução das vias antioxidantes fisiológicas e alterações do controle reflexo fisiológico da pressão arterial (Montezano e Touyz, 2012; Botelho-Ono *et al.*, 2011).

Entretanto, apesar de corresponder a 5-10% do total de hipertensos, é necessário investigar as hipertensões secundárias. Dentre elas, a hipertensão renovascular (HRV) é considerada a segunda causa de hipertensão secundária precedida pelas doenças renais. Sua prevalência é estimada em 2% da população de hipertensos, entretanto, tem-se observado uma prevalência diferenciada quando

se considera a faixa etária e o perfil clínico dos pacientes, sendo baixa a prevalência em hipertensos leves não-complicados e elevada em hipertensos severos, refratários ou acelerados e em pacientes mais idosos (Praxedes, 2002).

A HRV possui fisiopatologia intimamente relacionada ao mecanismo fisiológico de controle da pressão arterial exercido pelo SRAA e regulador da homeostase eletrolítica renal e decorre de uma resposta à hipoperfusão renal e hipoplasia renal (Navar *et al.*, 1998). A hipoperfusão renal é responsável por ativar vias inflamatórias nos rins, causando rarificação microvascular nos quadros mais avançados, estresse oxidativo e disfunção endotelial, evoluindo para nefropatia isquêmica e conseqüentemente para fibrose intersticial do parênquima renal (Textor, 2014; Textor, 2015).

A estenose renal é definida como um estreitamento luminal superior a 50%, tendo a aterosclerose como a principal causadora da HRV (90% dos casos), seguida pela displasia fibromuscular, arterite de Takayasu e síndromes raras com um percentual de 10% (Oliveira-Sales *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2013).

Diante disto, é possível simular experimentalmente este tipo de hipertensão em ratos, resultando em um modelo de hipertensão desenvolvido por Goldblatt (1934) e conhecido como dois rins, um clipe (2K1C), uma vez que este modelo se assemelha em muitos aspectos à hipertensão renovascular humana (Navar *et al.*, 1998).

1.2. HIPERTENSÃO DE GOLDBLATT DOIS RINS, UM CLIPE

O modelo de hipertensão experimental 2K1C é um clássico modelo experimental de hipertensão renovascular cuja redução da pressão de perfusão renal, em decorrência de estenose uni ou bilateral, causa hipertensão arterial por causa de uma exacerbação na atividade do SRAA, prejudicando a excreção de sódio e água (Goldblatt, 1934).

Estudos experimentais com o modelo de hipertensão 2K1C que muito se assemelha à hipertensão renovascular humana, apontam três mecanismos principais para o desenvolvimento da hipertensão. Na fase I (inicial) o aumento nos níveis pressóricos surge imediatamente após a estenose da artéria renal, através da inserção de um clipe de prata a partir do aumento da atividade plasmática de

renina e conseqüentemente, de angiotensina II (Ang II). A fase II inicia-se com o passar das semanas e há uma diminuição nas concentrações de renina e Ang II, sendo contrabalanceado por um aumento na retenção de água e sal, com persistência da hipertensão. Na fase III existe uma manutenção dos níveis pressóricos elevados, por meio de mecanismos ainda não muito bem elucidados, sendo que fatores neurogênicos e humorais, disfunção endotelial, alteração da atividade barorreflexa e secreção de substâncias pressóricas estão relacionados (Davis, 1977).

No modelo de hipertensão 2K1C há uma inserção de um clipe de prata pré-calibrado com uma abertura pré-estabelecida na artéria renal do animal, cujo objetivo é causar diminuição do fluxo sanguíneo para um dos rins (clipado). Essa redução do fluxo sanguíneo renal ativa as células do aparelho justaglomerular e desencadeia aumento na liberação da enzima renina por este rim. Existem três estímulos para secreção de renina: a estimulação simpática, a diminuição da tensão vascular na arteríola aferente renal e redução da carga filtrada de sódio que alcança a mácula densa.

A renina liberada para a circulação age sobre o angiotensinogênio, uma α -globulina sintetizada pelo fígado, clivando uma sequência de 10 aminoácidos e levando a formação da angiotensina I (Ang I); que por sua vez é clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECA), tecidual ou circulante, formando um octapeptídeo, a angiotensina II, que é responsável pelas principais ações do SRAA no controle da pressão arterial, uma vez que eleva a resistência vascular periférica, aumentando assim os níveis pressóricos. Adicionalmente, o aumento na circulação de Ang II inibe a produção de renina no rim que não teve o fluxo sanguíneo diminuído (não clipado), assim como aumenta a produção de aldosterona pela glândula adrenal e da atividade do sistema nervoso simpático (Pickering, 1989; Flohr *et al.*, 1976; Navar *et al.*, 1998).

O rim não clipado, por sua vez, apresenta baixos níveis de renina e desenvolve hipertrofia compensatória, ao contrário do rim clipado que apresenta atrofia por redução do fluxo sanguíneo renal. Nesse contexto, a manutenção da hipertensão 2K1C se baseia na inabilidade do rim não clipado de excretar o excesso de sódio, assim, a volemia é aumentada e, conseqüentemente mantém-se o aumento dos níveis pressóricos. O rim não clipado, por sua vez, não consegue

excretar o excesso de sódio por consequência do aumento de Ang II intra-renal. Esta por sua vez se liga a receptores AT1 sendo internalizadas e acumuladas dentro do rim (Navar *et al.*, 1998).

É importante ressaltar que a Ang II não é apenas um hormônio vasoativo que regula a pressão arterial e a homeostase eletrolítica através de seus efeitos hemodinâmicos. Além dessas ações clássicas, a Ang II possui efeitos pleiotrópicos em diferentes tecidos, incluindo o rim, os vasos sanguíneos, o coração e o sistema nervoso, sendo considerado o efetor primário de uma variedade de ações fisiológicas e fisiopatológicas induzidas pelo SRAA. Apesar de sua ação fisiológica, quando o SRAA encontra-se exacerbado pode causar efeitos deletérios aos rins e contribuir para uma perda progressiva da função renal.

A ativação contínua do SRAA desencadeia constrição das arteríolas renais, levando ao aumento na resistência vascular periférica ou renal, aumento da pressão dos capilares glomerulares, quadros de proteinúria e aumento do estresse oxidativo, via ativação da NADPH oxidase (Roscioni, Heerspink e de Zeeuw, 2013). Adicionalmente, atua como um fator de crescimento influenciando a proliferação/apoptose das células musculares lisas, aumenta o estresse oxidativo levando a disfunção endotelial e como um imunomodulador participando de respostas inflamatórias de forma não-hemodinâmica (Davis, 1977; Wolf, 1998; Luft, 2001; Ruiz-Ortega *et al.*, 2001; Higashi *et al.*, 2002).

O SRAA desempenha um papel fisiológico importante na regulação da função vascular e em condições patológicas contribui para lesão vascular, principalmente por intermédio de condições que levam a disfunção endotelial, remodelamento vascular e inflamação vascular (Touys, 2003). Dentre os muitos fatores humorais envolvidos nas alterações vasculares advindos da hipertensão, a Ang II parece ser um dos mais importantes. A Ang II é um peptídeo multifuncional que possui inúmeras ações no músculo liso vascular: modula o tônus vasomotor através de seus potentes efeitos vasoconstritores, regula o crescimento e a apoptose das células, influencia a migração celular e a deposição extracelular da matriz e estimula a produção de fatores de crescimento e pró-inflamatórios, além de agir como um direto e potente agente vasoativo (Touys, 2000).

1.3. 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 (Hillebrands *et al.*, 2001).

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).

Além da modificação da geometria arterial, na presença de níveis elevados e sustentados da pressão arterial, o remodelamento vascular também está associado ao aumento da rigidez da parede vascular (Arribas *et al.*, 2006; Intengan; Schiffrin, 2000). Essa alteração é resultado 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 intrínsecas, principalmente das fibras de colágeno e de elastina presentes na matriz extracelular (Briones *et al.*, 2010).

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, remodelamento no sentido interno ou externo do diâmetro do lúmen vascular (Mulvany *et al.*, 1996).

A hiperativação do SRAA contribui para a hipertensão e promove remodelamento vascular (Bader, 2010). Evidências crescentes indicam que um desequilíbrio proteolítico envolvendo metaloproteinases de matriz (MMPs), especialmente a MMP-2 (Martinez-Lemus *et al.*, 2011), desempenha um papel importante nessas alterações, especialmente no modelo de hipertensão 2K1C

(Guimarães *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2008). De fato, a Ang II aumenta a expressão e a atividade da MMP-2 através da ativação de receptores AT1 (Walter *et al.*, 2008) e, portanto, promove remodelamento vascular (Martinez-Lemus *et al.*, 2011).

O remodelamento vascular é uma condição intimamente relacionada à disfunção endotelial, e juntos são importantes constituintes da fisiopatologia e agravamento da hipertensão arterial. Outra condição importante para o remodelamento e consequente disfunção endotelial é o estresse oxidativo. Níveis aumentados de EROs nas células do músculo liso vascular (CMLV) desencadeiam vias de sinalização proliferativas que contribuem notavelmente para a proliferação e remodelação patológica na hipertensão (Kyaw *et al.*, 2004; Yoshizumi *et al.*, 2002; Moon *et al.*, 2003). Está associado também ao aumento na regulação da expressão gênica e a ativação de MMPs (Castro *et al.*, 2009; Grote *et al.*, 2003; Viappiani *et al.*, 2009), responsáveis pela proteólise de proteínas extra e intracelulares, resultando em alterações progressivas na estrutura e função vascular, principalmente hipertrofia (Belo *et al.*, 2015).

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 (Grote *et al.*, 2003; Guimaraes *et al.*, 2011).

1.4. DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E HIPERTENSÃO ARTERIAL

Durante um tempo o endotélio vascular foi considerado uma mera barreira física entre o lúmen e as demais camadas dos vasos e os tecidos por eles assistidos. No entanto, evidências contundentes transcenderam este conceito provando ser este um conjunto de células altamente ativas, com o *status* de órgão endócrino/parácrino capaz de influenciar inúmeros processos homeostáticos, como o controle do tônus vascular, do trânsito de células e nutrientes, a manutenção da viscosidade sanguínea e a formação de novos vasos (Cines *et al.*, 1998; Rehman, 2001).

De fato, o endotélio, além de descrito como uma estrutura dinâmica é considerado um órgão heterogêneo, dada sua diversidade fenotípica nos espaços

que ocupa e no tempo de maturação de suas células, de propriedades não lineares e complexas que não podem ser desassociadas do contexto de todo organismo, comparando-se a um sistema que capta estímulos do microambiente local e respondem de maneira a não apenas manter a saúde, mas também ditar a natureza focal de doenças vasculares ou de órgãos adjacentes (Figura 3). Desta forma, é permissível dizer que o endotélio está envolvido com todos os processos fisio/patológicos, seja como um determinante primário ou como uma fonte de estímulos colaterais (Aird, 2004).

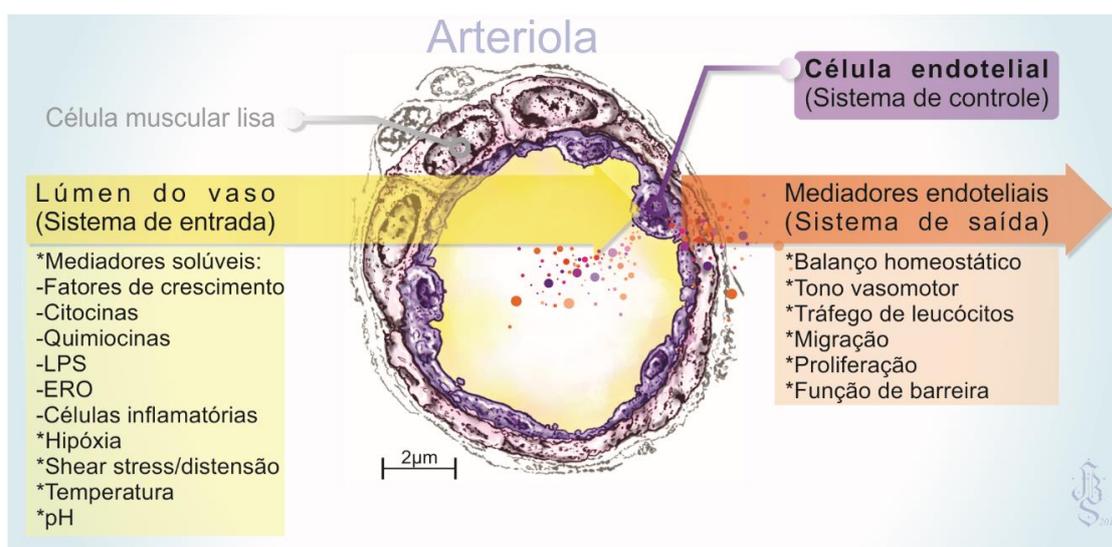


Figura 3. Endotélio como um dispositivo de entrada-saída. Os estímulos (sistema de entrada) surgem do ambiente extracelular; e as respostas (sistema de saída) manifestam-se como o fenótipo celular; o ponto de ajuste representa as propriedades intrínsecas da célula endotelial (sistema de controle). LPS, lipopolissacarídeo; EROs, espécies reativas de oxigênio. Adaptado: Aird, 2004.

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 no tônus do músculo liso vascular, ação fundamental para a manutenção da pressão sanguínea em níveis normais. É responsável também pela manutenção do balanço entre a promoção e a inibição da proliferação e migração das células do músculo liso vascular, além de prevenir a agregação plaquetária e a trombose. 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; Frolich; Forstermann, 1989; Furchgott; Zawadzki, 1980).

Os principais fatores relaxantes do endotélio são: NO, fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Furchgott; Zawadzki, 1980) e a prostaciclina (Moncada *et al.*, 1977). Dentre as substâncias vasoconstritoras, as principais são: a Ang II (Skeegs, 1954), endotelina-1 (ET-1), ânion superóxido (Rubany; Vanhoutte, 1986) e derivados da via do ácido araquidônico, o tromboxano (TXA2) e prostaglandina F2 α (PGF2 α) (Frolich; Forstermann, 1989). 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 (Paravicini; Touyz, 2008). O equilíbrio na produção desses mediadores é importante para regulação do tônus vascular.

O NO é um radical livre inorgânico altamente reativo, em estado gasoso, o que o permite difundir facilmente pelas membranas celulares promovendo vasodilatação. Dentre os componentes vasodilatadores do endotélio, o NO é um dos mais importantes participantes, sendo um componente fundamental na manutenção da homeostase dos vasos, incluindo a modulação do tônus vascular através do seu potente efeito vasodilatador. Este radical livre está envolvido na regulação do crescimento celular, além de possuir ação inibitória sobre a adesão e agregação plaquetária (Figura 4) (Moncada *et al.*, 1991; Cannon, 1998).

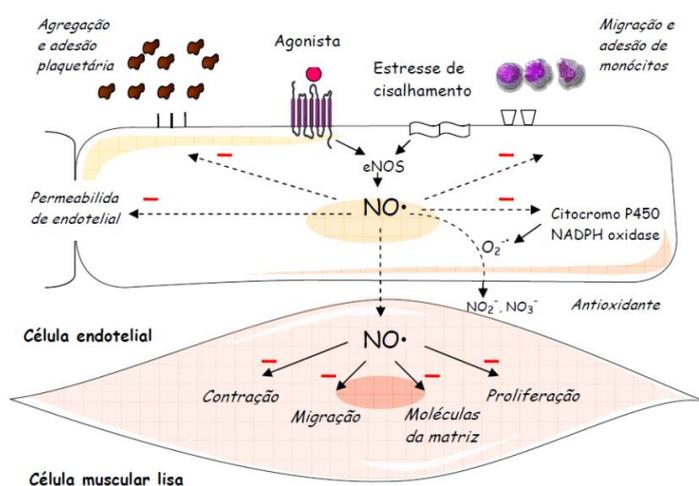


Figura 4: Efeitos do NO endotelial. A estimulação de receptores endoteliais e o estresse de cisalhamento estimulam a produção do NO, o qual age na própria célula endotelial ou em células adjacentes, como as células musculares lisas, leucócitos e plaquetas encontrados na corrente sanguínea, resultando em numerosos efeitos envolvidos na homeostase vascular (modificado de Rattmann, 2009).

O NO é produzido nas células endoteliais a partir da oxidação do aminoácido L-arginina, que é transformado então em NO e L-citrulina por ação das enzimas óxido nítrico sintases (NOS) (Palmer *et al.*, 1987; Moncada *et al.*, 1991; Triggle *et al.*, 2003; Michel; Vanhoutte, 2010). Para gerar NO é necessária a presença de L-arginina, oxigênio, NAD(P)H oxidase, grupo heme e tetrahidrobiopterina (BH4) (Andrew; Mayer, 1999).

Existem três diferentes isoformas de NOS que podem ser divididas em duas classes funcionais. Uma classe é a constitutiva e inclui a isoforma endotelial (eNOS), e uma neuronal encontrada no sistema nervoso central e periférico (nNOS). Estas são duas isoformas constitutivas dependentes do complexo Ca^{+2} /calmodulina, produzindo NO em episódios curtos e em baixas concentrações para finalidades fisiológicas (Andrew; Mayer, 1999). A outra classe de NOS é formada pela isoforma induzível (iNOS). Esta isoforma é regulada em nível transcriptional e a sua ativação é independente da interação Ca^{+2} /calmodulina. Quando sintetizada, na presença L-arginina e NADPH, a iNOS irá gerar NO por todo o tempo durante o qual a enzima permanecer ativada e em altas concentrações para garantir as atividades antimicrobiana, citostática e imunoregulatória (Forstermann *et al.*, 1994; Andrew; Mayer, 1999). Em situações fisiológicas, a expressão da iNOS não tem grande impacto sobre o sistema cardiovascular. Entretanto, o aumento de sua expressão pode ser induzida em resposta a citocinas e outros mediadores inflamatórios (Alvaréz *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2010).

1.5 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

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

sendo as de maior relevância: ânion superóxido, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($-OH$) (Yuyun *et al.*, 2018).

A produção de EROS no metabolismo celular é proveniente de diversos mecanismos, entre eles: geração oxidativa de energia pela cadeia mitocondrial (Lee; Wei, 2007), produção de radicais livres pelo citocromo P-450, mecanismo de defesa dos fagócitos que produzem radical superóxido, a xantina oxidase, mieloperoxidases, ciclooxigenases, lipooxigenases, NOS e as enzimas da família das NADPH oxidases (Bedard; Krause, 2007; Muller *et al.*, 2005; Weseler; Bast, 2010).

Por meio dos exemplos anteriores podemos constatar que a disfunção endotelial na hipertensão também está fortemente relacionada a outra condição de instabilidade orgânica, o estresse oxidativo (Pisoschi, 2015; Griendling *et al.*, 2000).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a capacidade do organismo de controlá-las (Finkel; Holbrook, 2000; Barreiros; David, 2006). Inúmeras são as fontes e os tipos de espécies reativas (Halliwell, 2006; Giles *et al.*, 2017; Vasconcelos *et al.*, 2007) e erroneamente são rotuladas como nocivas, mas fato é que elas são parte de processos inerentes aos organismos aeróbicos, principalmente as derivadas do oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERN), produzidas naturalmente durante o metabolismo celular ou em resposta a algum estímulo biológico (Li *et al.*, 2014; Davies, 2016). A regulação de suas concentrações é feita pelo sistema antioxidante enzimático (superóxido dismutase [SOD]; catalase; glutathione peroxidase [GPx] e glutathione redutase [GR]) e não enzimático (glutathione [GSH]; coenzima Q10, ácido alfa lipóico, entre outros), presentes no próprio organismo ou adquiridos pela dieta (α -tocoferol, β -caroteno, flavonoides elagitaninos e outros) (Evans; Halliwell, 2001; Barbosa *et al.*, 2010; Salazar, 2018).

A evolução adaptativa do organismo ao estresse oxidativo depende do equilíbrio dos sistemas de produção e controle das espécies reativas, os quais determinam o ritmo da senescência, senilidade ou desenvolvimento e agravo de doenças (Salazar, 2018; Jia *et al.*, 2019) (Figura 5).

Estruturas e processos biológicos do próprio organismo como a NADPH oxidase, a xantina oxidase, o metabolismo do ácido araquidônico, a oxirredução de metais de transição e a cadeia respiratória mitocondrial são fontes espontâneas de

espécies reativas, que em circunstâncias patológicas sustentam o estresse oxidativo, sendo o $O_2^{\bullet-}$, na maioria das vezes, a molécula primordial na cadeia de eventos oxidantes (Tejero *et al.*, 2019; Madamanchi *et al.*, 2005). A atividade vascular da NADPH oxidase é regulada pelas citocinas, hormônios e forças mecânicas. Além disso, Ang II, trombina, fator de agregação plaquetária, fator de crescimento tumoral (TGF- α) e os metabólitos do ácido araquidônico estão relacionados com aumento da atividade desta enzima e conseqüentemente com a produção de radicais livres (Cai *et al.*, 2000; Griendling *et al.*, 2000). Estudos demonstram que Ang II estimula a produção de radicais livres através da enzima NADPH-oxidoreductase do citocromo P450 (Rajagopalan *et al.*, 1996; Griendling; Ushio-Fukai, 1994; McIntyre *et al.*, 1999).

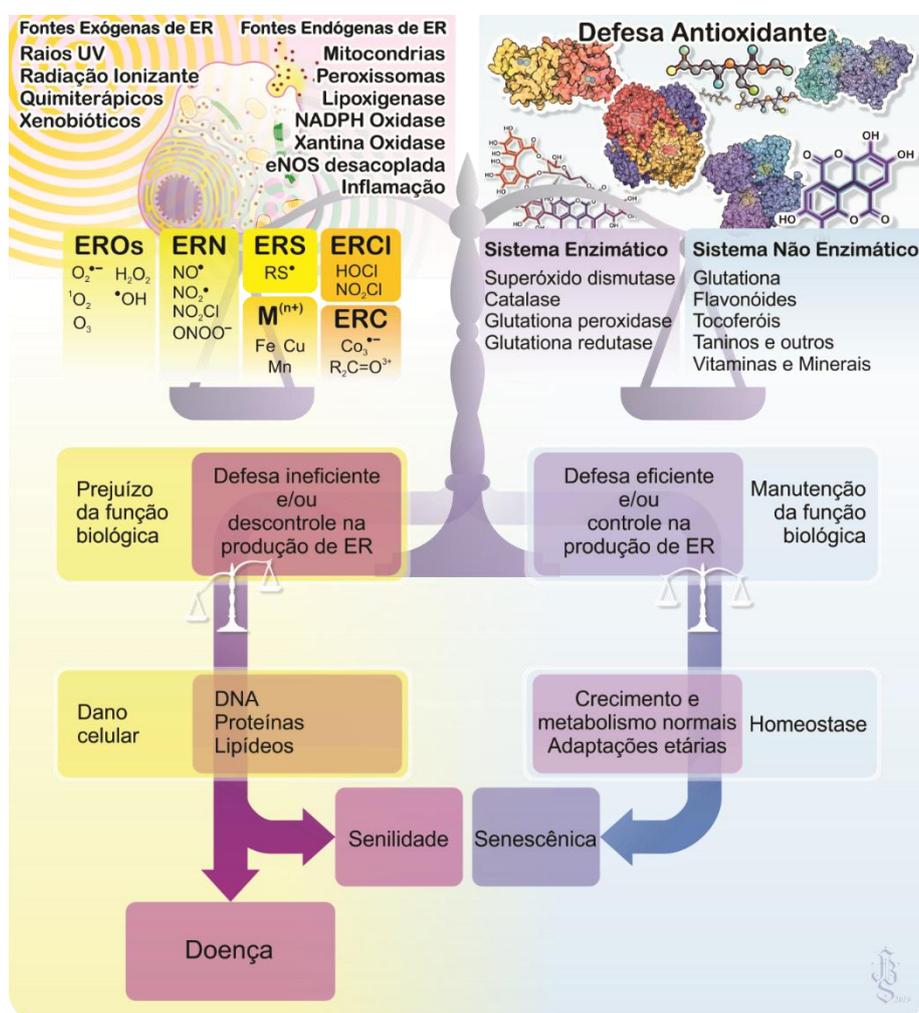


Figura 5. Representação das respostas adaptativas do organismo mediante o balanço entre a produção e controle das espécies reativas (ER). EROs, espécies reativas de oxigênio; ERN, espécies reativas de nitrogênio; ERS, espécies reativas de enxofre, ERCI, espécies reativas de cloro; $M^{(n+)}$, metais de transição; ERC, espécies reativas de carbono. Adaptado: Vasconcelos et al., 2007.

A Ang II aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio em todos os tipos de células da vasculatura, incluindo células musculares lisas, células endoteliais e fibroblastos adventícios. A principal fonte de espécies reativas de oxigênio na parede vascular é a NADPH oxidase não-fibrocítica modulada por Ang II, que encontra-se aumentada na hipertensão (Touyz *et al.*, 2002; Griendling *et al.*, 2000). Nos modelos de hipertensão dependentes de Ang II, a produção vascular de ânions superóxido é aumentada. Este efeito é mediado através da ativação estimulada por Ang II da NADPH oxidase vascular (Laursen *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2001).

O aumento do $O_2^{\bullet-}$ na hipertensão também prejudica o relaxamento vascular dependente do endotélio e aumenta a reatividade contrátil vascular. Esses efeitos podem ser mediados diretamente pelo aumento da concentração citosólica de Ca^{2+} através do aumento do influxo de Ca^{2+} e do aumento da mobilização intracelular, ou indiretamente pela redução das concentrações do vasodilatador NO (Lounsbury; Hu, 2000).

Uma vez estando biodisponíveis no meio, as EROs podem interagir com diferentes substâncias, propiciando danos a macromoléculas (ex.: proteínas, lipídeos e DNA) e perturbando os processos de sinalização dependentes de oxirredução na parede vascular (Pisoschi, 2015). Neste ponto, fica a cargo do sistema antioxidante o controle das EROs que, em coordenação, transformam estas moléculas em substratos menos nocivos ou inócuos. Dentre as principais enzimas antioxidantes vasculares podemos citar: a catalase, a glutathiona peroxidase (GPx), a tioredoxina redutase e as SODs (Cobre-zinco superóxido dismutase citosólica [SOD1], superóxido dismutase mitocondrial [SOD2] e a superóxido dismutase extracelular [SOD3]).

A glutathiona peroxidase e a catalase são as enzimas envolvidas na degradação do peróxido de hidrogênio. A catalase transforma a H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio (O_2). A glutathiona peroxidase transforma o H_2O_2 em água (Griendling; Ushio-Fukai, 2000). A SOD é responsável por catalisar a reação do $O_2^{\bullet-}$ com um elétron e dois prótons formando o H_2O_2 . Em suma, a redução da atividade das enzimas antioxidantes resulta em aumento da formação de EROs, levando a ações danosas aos vasos (Touyz; Schinffrin, 2004) (Figura 6).

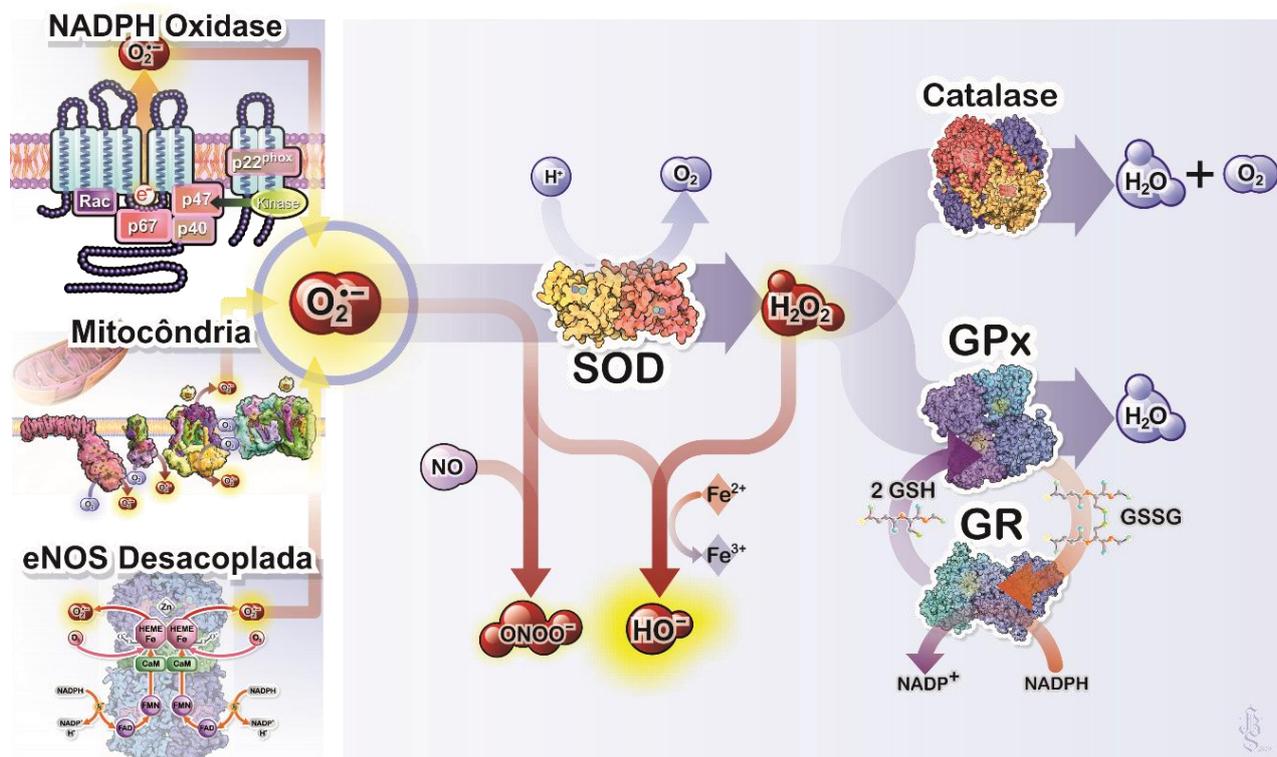


Figura 6. Ação esquemática do sistema antioxidante enzimático sobre as espécies reativas de oxigênio. O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) gerado a partir dos processos fisiológicos ou patológicos de estruturas como a NADPH oxidase, cadeia respiratória mitocondrial e eNOS desacoplada é então captado pela enzima superóxido dismutase (SOD) que, por transferência de elétron, o transforma em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), liberando uma molécula de oxigênio. Caso a enzima falhe, ou ânion esteja excedente no meio, o $O_2^{\bullet-}$ pode interagir com moléculas de óxido nítrico (NO) para formar peroxinitrito ($ONOO^-$) e/ou participar no ciclo de oxirredução do ferro (Fe^{n+}) e gerar radicais hidroxilas (HO^{\bullet}), potente agente oxidante. O H_2O_2 quando não recrutado a exercer funções essenciais será dismutado em uma molécula inócua de água (H_2O), seja pela ação da catalase (e neste processo uma molécula de O_2 também será formada) ou pela glutatona peroxidase (GPx). Esta última, catalisa o H_2O_2 necessitando de duas moléculas de glutatona (GSH) e neste processo a glutatona oxidada (GSSG) será restaurada ao seu estado natural pela atividade da glutatona redutase (GR), que oxida uma molécula de NADPH.

Embora o estresse oxidativo na hipertensão seja um tema em franca expansão, muito se evidencia que sua principal influência sobre a pressão arterial se dê em nível vascular, onde, além de discorrer sobre a disfunção endotelial e sua influência no balanço de substâncias vasoativas, também incita a produção de fatores de crescimento e fibrose através da ativação de metaloproteínas de matriz (enzimas de reparação tecidual), o aumento do cálcio intracelular, a ativação do crescimento e vias de sinalização inflamatória e aumento da deposição de matriz extracelular, que redundam no remodelamento estrutural dos vasos, incrementando a disfunção endotelial (Briones, 2010).

Mediante não só ao desaparecimento do sistema antioxidante endógeno, mas também os efeitos globais do estresse oxidativo nos organismos vivos houve um aumento do interesse científico em pesquisas sobre substâncias antioxidantes exógenas, com um potencial apelo na descrição do seu auxílio no restabelecimento das funções orgânicas, seja na busca do entendimento de seu papel coadjuvante/essencial neste processo ou como propostas terapêuticas de fato (Kawabata *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2018).

Alguns estudos demonstram que a hipertensão renovascular aumenta a produção de radicais livres principalmente devido a ação da Ang II vascular. Nos vasos, a ativação dos receptores AT1 promove aterogênese e induz estresse oxidativo (Goodfriend *et al.*, 1996). De fato, a Ang II em células vasculares endoteliais humanas provoca a formação de espécies reativas de oxigênio como o $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , via ativação da NADH/NADPH oxidase. Como consequência aparecem hiperplasia e hipertrofia da célula muscular lisa (Zhang *et al.*, 1999). A atividade das oxidases vasculares é aumentada de modo substancial pela Ang II que, via NADH e NADPH, aumenta a produção de $O_2^{\bullet-}$ em cultura de células musculares lisas (Rajagoplan *et al.*, 1996) bem como em células endoteliais (Lang *et al.*, 2000).

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, os efeitos vasodilatadores e antiinflamatórios do óxido nítrico, além da formação de peroxinitrito, que contribui para o estresse oxidativo (Zhang *et al.*, 2012). É bem conhecido que o desequilíbrio na produção dos fatores vasodilatadores e vasoconstritores derivados do endotélio promovem alterações na função endotelial e aumentam o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. O termo disfunção endotelial refere-se à redução da produção e/ou biodisponibilidade de substâncias vasodilatadoras, em especial do NO ou o aumento de substâncias vasoconstritoras (Cannon, 1998; Triggle *et al.*, 2003). Além disso, o ânion superóxido também contribui para o processo inflamatório, participando do aumento da expressão de COX-2, presente na hipertensão arterial (Alvarez, *et al.*, 2008; Tanito *et al.*, 2004).

1.5 CICLOOXIGENASE-2

Os prostanóides derivados da via da ciclooxigenase (COX) são substâncias liberadas pelo endotélio com poder vasomotor, os quais desempenham importante função na regulação do tônus vascular e participam das respostas vasculares deletérias (Alvarez *et al.*, 2005; 2007). Estas substâncias são importantes moduladores do tônus vascular tanto em condições fisiológicas como patológicas (Frolich; Fortermann, 1989).

O ácido araquidônico é formado por fosfolipídeos da membrana através da ação da enzima fosfolipase A2 (PLA2). Uma vez liberado, o ácido araquidônico pode ser metabolizado pela ciclooxigenase e, posteriormente, convertido em prostaglandina H2 (PGH2) pela prostaglandina endoperóxido-H sintase (PGHS). A PGH2 é a precursora das demais prostaglandinas e possui atividade direta sobre o músculo liso vascular. Por ação de sintases específicas, PGH2 é convertida em prostaglandina E2 (PGE2), prostaglandina I2 (PGI2), prostaglandina D2 (PGD2), prostaglandina F2 α (PGF2 α) e tromboxano (TXA2). As PGF2 α e TXA2 são substâncias vasoconstritoras enquanto as demais são vasodilatadoras (Figura 7) (Mardini; FitzGerald, 2001).

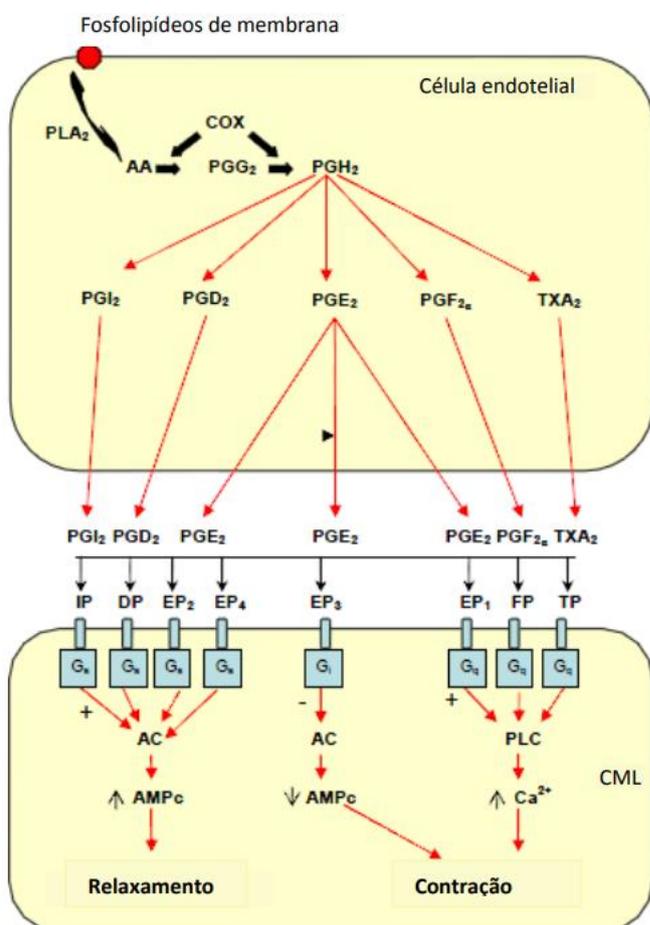


Figura 7: Síntese de prostanóides e mecanismos de sinalização. AA: ácido araquidônico; AC: adenilato ciclase; AMPc: adenosina monofosfato cíclico; CML: célula muscular lisa; COX: ciclooxigenase; PLA2: fosfolipase A2; PLC: fosfolipase C.

Nos anos 90, duas isoformas da ciclooxigenase foram identificadas, a do tipo 1 (COX-1) e do tipo 2 (COX-2), que realizam a síntese das prostaglandinas e do tromboxano A₂ (Smith *et al.*, 1996). A COX-1 é a isoforma constitutiva, expressa em vários tecidos e está relacionada com as funções fisiológicas. A COX-2 é a isoforma induzida pelas citocinas, fatores mitogênicos e por estímulos pró-inflamatórios em vários tipos de células. A expressão da COX-2 está relacionada com processos inflamatórios e ao estresse de cisalhamento (shear stress) (Antman *et al.*, 2005; Patrono, Carlo, 2016).

A participação da COX é importante na manutenção do tônus vascular. Entretanto, um desequilíbrio na formação destes prostanóides pode contribuir na fisiopatologia de várias doenças que cursam com processo inflamatório, como a hipertensão arterial, arteriosclerose e diabetes Mellitus (Davidge, 2001). Diversos estudos têm demonstrado aumento na expressão da COX-2 em modelos experimentais de hipertensão, assim como evidências sugerem que o estresse oxidativo age como um promotor do aumento da atividade de COX-2, e que a prostaglandina 2 α (PGF₂ α) derivada da COX-2 desempenha um papel importante na mediação de disfunção endotelial observada na hipertensão renovascular 2K1C (Alvaréz *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2012).

A prostaciclina (prostaglandina I₂; PGI₂) é um importante componente produzido pelo endotélio vascular, atuando nos receptores de prostaciclina (IP) do músculo liso para mediar a vasodilatação e proteger os vasos contra processos patológicos. No entanto, estudos também indicam que o PGI₂ pode ativar os receptores de tromboxano prostanóide (TP) do músculo liso para mediar a vasoconstrição e funcionar como um EDCF (Félétoú *et al.*, 2009; Xavier *et al.*, 2008). De fato, a reação vasomotora da PGI₂ pode ser modulada pelos receptores TP e IP, e uma ação semelhante ao EDCF da PGI₂ pode resultar de uma função limitada dos receptores IP, o que leva à descoberta da atividade vasoconstritora derivada da ativação concomitante de um receptor TP (Zhao *et al.* 1996; Liu; Zhou, 2014).

Sob condições patológicas, incluindo a hipertensão, a expressão de COX-2 é considerada aumentada (Cosentino *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2008) e seu metabolismo está ligado à disfunção endotelial e, atividades vasoconstritoras derivadas do endotélio (Wong *et al.*, 2013; Chenevard *et al.*, 2003). Tem sido proposto que os

receptores IP se tornem disfuncionais na hipertensão, levando o PGI₂ a agir como um EDCF sob a condição patológica (Gluais *et al.*, 2005; Vanhoutte, 2011).

Além disso, embora a COX-2 seja geralmente considerada um dos principais mediadores da síntese de PGI₂ (Ricciotti *et al.*, 2013; Grosser *et al.*, 2010), um número crescente de estudos indica que a COX-1 também atua como importante componente no controle vascular (Kirkby *et al.*, 2012; Bolego *et al.*, 2009), uma vez que medeia contração (Liu, *et al.*, 2012; Ansari *et al.*, 2007) ou relaxamento (Sun *et al.*, 2006) regulados pelo endotélio em condições fisiológicas normais. Assim, o papel e as vias da COX-1 na regulação de vasos em condições patológicas ainda permanecem controversos.

Nesse contexto, estudos relatam a interação entre a Ang II e a via da COX na patogênese das injúrias vasculares, relacionando a produção de EROs por indução da Ang II e estimulação da atividade da COX-1, que ao produzir prostanóides contráteis como o TXA₂, mediando dessa forma a disfunção endotelial e vascular e importante participação na fisiopatologia da hipertensão. A participação da Ang II na estimulação da COX pode também ser constatada pela utilização do antagonista AT₁, onde se observou a abolição no aumento da expressão gênica da COX-2 induzida pela Ang II (Viridis, Taddei, 2011).

1.6 ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS NA HIPERTENSÃO RENOVASCULAR

Dentre os objetivos do tratamento da hipertensão arterial, o primordial é a redução da morbidade e da mortalidade cardiovasculares (Weber *et al.*, 2014; Thomopoulos *et al.*, 2015). Os medicamentos anti-hipertensivos utilizados no tratamento farmacológico da hipertensão arterial são prescritos isoladamente (monoterapia) ou em uso associado (Malachias *et al.*, 2016).

Segundo a VII diretriz brasileira de hipertensão arterial (2017) os objetivos principais do tratamento da hipertensão arterial renovascular são a cura ou a melhora da hipertensão arterial e/ou a melhora ou a preservação da função renal.

O tratamento da hipertensão arterial renovascular pode ser clínico, cirúrgico ou por meio de revascularização percutânea com ou sem a colocação de próteses endovasculares (stents). Em relação ao tratamento clínico, os inibidores da ECA, os bloqueadores dos canais de cálcio e os betabloqueadores são medicamentos

apontados como efetivos para o tratamento da hipertensão arterial associada à estenose unilateral de artéria renal, assim como os bloqueadores dos receptores AT1 também têm apresentado resultados efetivos para o tratamento da hipertensão arterial associada à estenose de artéria renal. Em diferentes contextos clínicos e investigativos, as medicações estão sendo investigadas quanto à sua capacidade de aumentar a disponibilidade de NO e diminuir o estresse oxidativo de modo a contrabalancear dois importantes componentes na gênese, manutenção e agravamento das condições hipertensivas advindas da estenose da artéria renal.

Devido à relevância em reestabelecer a função endotelial para impedir a hipertensão e seus danos aos órgãos, vários estudos têm investigado os efeitos do precursor do NO, L-arginina, em diferentes modelos de hipertensão (Harrison, 2010; Carlstrom, 2010; Gouvea *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2011). A administração exógena de L-arginina na hipertensão renovascular promove aumento na produção de NO com conseqüente redução da pressão arterial e restauração da disfunção endotelial (Kopp; Jones; DiBona, 2008). Corroborando esses achados, estudos prévios do nosso laboratório demonstraram que os animais com hipertensão renovascular que receberam L-arginina tiveram uma redução nos níveis hipertensores da ordem de 25% após sete dias de tratamento. Além do efeito sistêmico sobre a pressão arterial, a L-arginina promoveu diurese e natriurese nos hipertensos tratados, reverteu a hipertrofia cardíaca, aumentou a massa do rim clipado e reduziu significativamente a atividade da ECA no plasma, coração e rim cuja artéria renal recebeu o clipe (Gouvea *et al.*, 2003; Gouvea *et al.*, 2004).

O uso de bloqueadores do SRAA também tem demonstrado uma significativa proteção renal comparado com efeito de outras drogas anti-hipertensivas, apontando para um importante papel desse sistema nas doenças renais (Kobori *et al.*, 2007). Existem diferentes grupos farmacológicos sendo utilizados com o intuito de contrapor-se ao SRAA, como os inibidores da ECA (IECAs), bloqueadores do receptor AT1 (BRAs) e o alisquireno, um inibidor direto da renina (Wood *et al.*, 2003; Gradman; Kad, 2008). Tratamentos com IECAs e BRAs apontam para um papel fundamental da Ang II sobre a patogênese da hipertensão e lesão renal por ativação inapropriada dos receptores AT1 (Timmesmans *et al.*, 1993; Navar *et al.*, 2000).

A introdução no mercado em 2007 do alisquireno (Novartis), medicamento oral que atua como inibidor direto seletivo da renina e consequentemente do SRAA, através da ligação no sítio ativo da renina impedindo a clivagem da Ang I em Ang II a partir do angiotensinogênio (Lizakowski; Tylicki; Rutkowski, 2013) trouxe respostas positivas na redução da pressão arterial em pacientes com hipertensão arterial leve a moderada. Verificou-se que o uso deste medicamento apresentava segurança e tolerabilidade semelhantes a BRAs nos pacientes com hipertensão (Musini *et al.*, 2008; Robles; Cerezo; Hernandez-Gallego, 2014; Angeli *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2012).

O fato de a renina ser a primeira enzima envolvida na cascata enzimática do SRAA e ter notavelmente alta especificidade por apenas um substrato, o angiotensinogênio, era esperado que o alisquireno apresentasse alta eficácia anti-hipertensiva com menores efeitos colaterais do que os IECAs (Friedrich; Schmieder, 2013; Angeli *et al.*, 2014). Por outro lado, o aumento da concentração plasmática de renina que ocorre numa extensão maior com o uso do alisquireno do que com o uso de IECAs ou BRAs, pode ser um problema importante, visto que a (pro)renina e renina parecem estimular o receptor de (pro)renina e induzir fibrose, apoptose e hipertrofia de órgãos em animais experimentais. No entanto, o significado clínico deste achado ainda não está claro (Danser, 2009).

O uso do alisquireno está associado ao tempo, à dose e ao grau de hipertensão. Nosso laboratório iniciou o tratamento por 21 dias nos ratos com hipertensão 2K1C e os resultados mostraram uma redução na pressão (Santuzzi *et al.*, 2014) mas não houve normalização da pressão. Isso nos leva a afirmativa de que o tratamento da hipertensão renovascular não está associado somente a renina. De fato, os estudos de Santuzzi *et al.* (2014), Tiradentes *et al.* (2015) e Mengal *et al.*, 2015 apontaram para efeitos benéficos aditivos da associação de L-arginina ao tratamento com alisquireno, uma vez que o mesmo foi capaz de normalizar os níveis pressóricos encontrados nos animais 2K1C, prevenir a disfunção endotelial em anéis de aorta, reduzir a hiperexcitabilidade simpática e melhorar o controle barorreflexo nesses animais.

No entanto, apesar destes achados, ainda não está totalmente esclarecido de que maneira estas drogas estariam atuando sobre o sistema cardiovascular. Portanto a proposta é investigar de forma inédita o papel do alisquireno e L-arginina

combinados sobre a reatividade vascular de artérias de resistência e sua associação com possíveis vias oxidantes ou antioxidantes e inflamatórias.

2. JUSTIFICATIVA

Existe uma significativa taxa de morbidade e mortalidade associada à hipertensão renovascular, uma condição que muitas vezes apresenta difícil controle. No passado, a hipertensão resistente associada com estenose da artéria renal era tratada com cirurgia de revascularização renal. No entanto, isto foi associado com alta mortalidade e morbidade, com um estudo mostrando uma taxa de mortalidade de 10%. Isto levou a uma mudança a favor de intervenções baseadas em cateter percutâneo ao invés dos cirúrgicos, mas o tratamento da hipertensão renovascular com a revascularização também tem sido decepcionante, com risco substancial de complicações graves, incluindo mortes e amputações de membros inferiores (Pradhan; Rossi, 2013). Em vista desta dificuldade, há um interesse cada vez maior em compreender plenamente os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da hipertensão renovascular a fim de desenvolver terapias mais seguras e eficientes, como o tratamento farmacológico.

Sabe-se que o principal mediador da hipertensão renovascular é o SRAA, com consequente disfunção endotelial, levando a danos nos principais órgãos-alvo da hipertensão. No entanto, os mecanismos pelos quais a disfunção vascular medeia a gênese, progressão e complicação dos elevados níveis de pressão arterial ainda não são totalmente elucidados. Assim, medicamentos que sejam capazes de bloquear o SRAA, restaurar a disfunção endotelial e que ainda sejam capazes de minimizar importantes fatores contribuintes para esse processo, como o estresse oxidativo e a inflamação seriam importantes para reduzir a hipertensão e suas consequências neste modelo experimental. Diante disto, escolhemos um medicamento que atua bloqueando o SRAA, o alisquireno, e o aminoácido L-arginina, precursor da síntese do principal vasodilatador derivado do endotélio, o NO, para avaliar seus efeitos isolados e associados sobre a reatividade vascular mesentérica de ratos com hipertensão renovascular, de modo a melhor compreender o papel do NO, estresse oxidativo e prostanoídes, o que poderia trazer, pelo menos em parte, uma nova proposta no tratamento da hipertensão renovascular considerando que a associação se mostrou eficiente em reduzir a pressão arterial.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do alisquireno e L-arginina administrados de maneira isolada ou associada sobre as alterações vasculares em ratos com hipertensão renovascular.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o efeito dos tratamentos sobre a pressão arterial sistólica, através de medida indireta;
- ✓ Analisar o efeito dos tratamentos sobre os parâmetros hemodinâmicos, tais como a pressão arterial sistólica, diastólica e média e, frequência cardíaca;
- ✓ Investigar os efeitos dos tratamentos sobre a reatividade vascular do leito mesentérico na presença de agentes vasoativos (Noradrenalina e Acetilcolina);
- ✓ Avaliar o papel do endotélio vascular sobre a resposta da Noradrenalina (NA) e Acetilcolina (Ach) no leito mesentérico isolado, por meio da avaliação da participação dos produtos das reações enzimáticas catalisadas pela óxido nítrico sintase (NOS) e das ciclooxigenases;
- ✓ Verificar a influência dos tratamentos sobre parâmetros estruturais da artéria mesentérica superior;
- ✓ Quantificar o conteúdo de colágeno da artéria mesentérica superior após os tratamentos;
- ✓ Detectar a produção in situ de ânion superóxido em artéria mesentérica superior e de resistência após os tratamentos;
- ✓ Mensurar a produção in situ de óxido nítrico em artéria mesentérica superior e de resistência após os tratamentos;
- ✓ Investigar a expressão proteica das isoformas endotelial e induzível de óxido nítrico sintase (eNOS e iNOS), dos receptores AT1, de Mn SOD2, Catalase, COX-2 e TNF- α após os tratamentos;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados ratos macho da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), pesando entre 120 e 160 g, cedidos pelo biotério da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais sob condições de controle de temperatura e umidade (22–24 °C e umidade relativa do ar de 40–60 %) em ambiente com ciclo claro/escuro de 12 h, tendo livre acesso à água e à ração (dieta padrão para animais alojados, Purina Labina, SP, Brasil).

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

4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.2.1 Tratamento

Os ratos foram divididos em cinco grupos experimentais (n= 8 por grupo): SHAM (normotensos controle); Dois rins, um clipe (2K1C; hipertensos); Dois rins, um clipe tratado com alisquireno (Rasilez®; Novartis, Itália) (ALSK; alisquireno 50 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ diluído em água, por gavagem, 0,3 ml); Dois rins, um clipe tratado com L-arginina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) (L-ARG; L-arginina 10 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ diluído em água, por gavagem, 0,3 ml) e Dois rins, um clipe tratados com alisquireno associado à L-arginina (ALSK+L-ARG; alisquireno 50 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ e L-arginina 10 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ diluído em água, por gavagem, 0,6 ml).

Todos os tratamentos foram iniciados após sete dias do procedimento cirúrgico para produção da hipertensão 2K1C, com duração de vinte e um dias consecutivos, totalizando 28 dias de hipertensão renovascular (Figura 8).

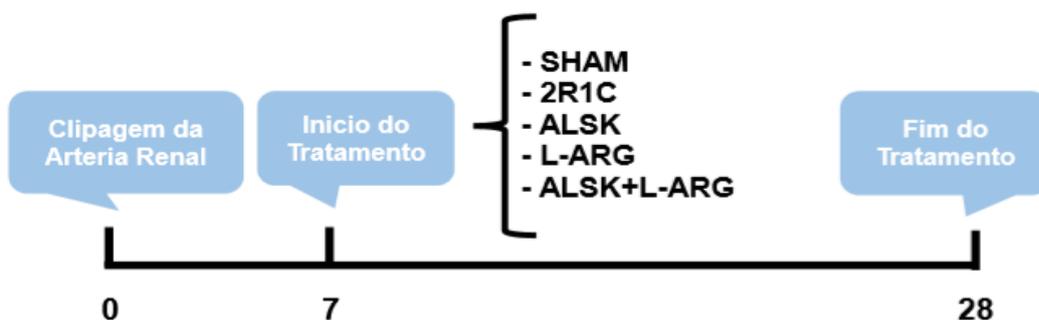


Figura 8. Organograma de protocolo experimental

4.2.2 Modelo de hipertensão renovascular (Hipertensão 2K1C)

A hipertensão renovascular foi induzida pelo método desenvolvido por Goldblatt (2K1C). Sob anestesia com quetamina (80 mg.kg^{-1}) e xilazina (5 mg.kg^{-1}) por via intraperitoneal, foi realizada tricotomia, com posterior assepsia com álcool à 70% na região mediana e do flanco esquerdo do animal. Foi realizada uma incisão no flanco esquerdo com exposição do pedúnculo renal. A artéria renal foi isolada da veia renal e posteriormente colocado um clipe de prata pré-calibrado com um grau de constrição equivalente ao diâmetro interno de 0,2 mm na artéria renal esquerda do animal para indução da hipertensão renovascular 2K1C. Após o procedimento, a incisão foi suturada e o animal foi acondicionado em gaiola individual e mantido no biotério sob observação constante durante sete dias. Os ratos SHAM foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, com manipulação da artéria renal esquerda, porém não foi implantado o clipe de prata. O critério de inclusão para a hipertensão, no presente estudo, foi uma pressão arterial sistólica (PAS) maior que 160 mmHg após sete dias da cirurgia.

4.2.3 Medida direta e indireta da pressão arterial sistólica (PAS)

A medida indireta da PAS foi realizada de acordo com Buñag (1973) e modificada segundo Grizzo et al. (2008). As medidas foram realizadas nos animais de todos os grupos estudados, no tempo zero (antes do procedimento cirúrgico para produção da hipertensão renovascular), após sete (7), quatorze (14) e vinte

e um (21) dias do procedimento cirúrgico, através de um pletismógrafo de cauda (IITC Life Science– 23924 Victory Blvd, Woodland Hills, CA). Os animais foram previamente climatizados, durante três dias antes da mensuração, para adaptarem-se ao pletismógrafo, e desta forma, prevenir alterações pressóricas devido ao estresse do animal frente ao procedimento. Após calibração do aparelho, os animais foram acondicionados em contentores de acrílico, selecionados de acordo com o tamanho do animal e mantidos em temperatura aproximada de 32°C por aproximadamente 20min para obtenção de uma adequada vasodilatação caudal, sendo que a medida indireta é aferida por meio de um transdutor fotoelétrico colocado na porção proximal da cauda e posterior insuflação do manguito e registro da onda de pulso. A média de três medidas foi utilizada.

A medida direta da PAS foi feita após 3 semanas de tratamento, os animais foram submetidos a anestesia com quetamina (80 mg.kg⁻¹) e xilazina (5 mg.kg⁻¹) por via intraperitoneal, para cateterização da artéria femoral. Inicialmente, foi realizada a tricotomia da superfície da região da pata esquerda, na sua porção ventral e região cervical dorsal interescapular. Foi realizado uma incisão de aproximadamente 2 cm e em seu maior diâmetro foi feita a exposição do plexo femoral para permitir o isolamento dos vasos femorais. Foram utilizados cateteres de polietileno PE-10 previamente unidos a cateteres de polietileno PE-50, tendo o seu comprimento ajustado de acordo com o tamanho do animal. A artéria femoral dos ratos foi cateterizada, inserindo um cateter preenchido com salina-heparina (100:1/UI) para registro de pressão arterial média (PAM) e FC 24 horas após inserção do cateter. Após o implante, os cateteres foram exteriorizados no dorso do animal, através de um trocâter, para permitir os registros de PAM e FC em animais não anestesiados e com livre movimentação.

4.2.4 Reatividade do leito vascular mesentérico

Foi utilizado o leito vascular mesentérico (LVM) isolado, segundo a descrição de McGregor (1965). Após a anestesia com quetamina (80 mg.kg⁻¹) e xilazina (5 mg.kg⁻¹) por via intraperitoneal, a artéria mesentérica superior foi isolada através de uma incisão abdominal com aproximadamente 6 cm transversalmente e nesse vaso foi introduzida uma cânula de polietileno (PE50) (Figura 9). Imediatamente o

leito foi perfundido com solução nutritora, cuja composição consistia de: NaCl 130 mM; KCl 4,7 mM; MgSO₄.H₂O 1,17 mM; CaCl₂.2H₂O 1,6 mM; KH₂PO₄ 1,18 mM; NaHCO₃ 14,9 mM; EDTA 0,026 mM; Glicose 11,1 mM mantida por um banho Maria a 37°C e aerada constantemente através do borbulhamento da mistura carbogênica de 95% de O₂ e 5% de CO₂, sendo o pH mantido a 7,5. Por meio de uma bomba rolete (Ismatec AS Laboratorium Technik, Switzerland), foi mantido um fluxo pulsátil de aproximadamente 4,0 ml/min e uma pressão de perfusão média variando de 30 ± 5 mmHg. O leito como um todo foi cuidadosamente removido, liberado em sua borda dos intestinos, desprovido dos tecidos linfáticos aderentes e colocado num banho de órgão isolado. A pressão de perfusão foi medida através de um transdutor de pressão (Spectramed P23XL) e os dados foram digitalizados (Acqknowledge for Windows; Biopac Inc.) e armazenados em disco rígido do computador para análise. Após um período de estabilização (30 minutos) foram construídas curvas dose-resposta às substâncias vasoativas.

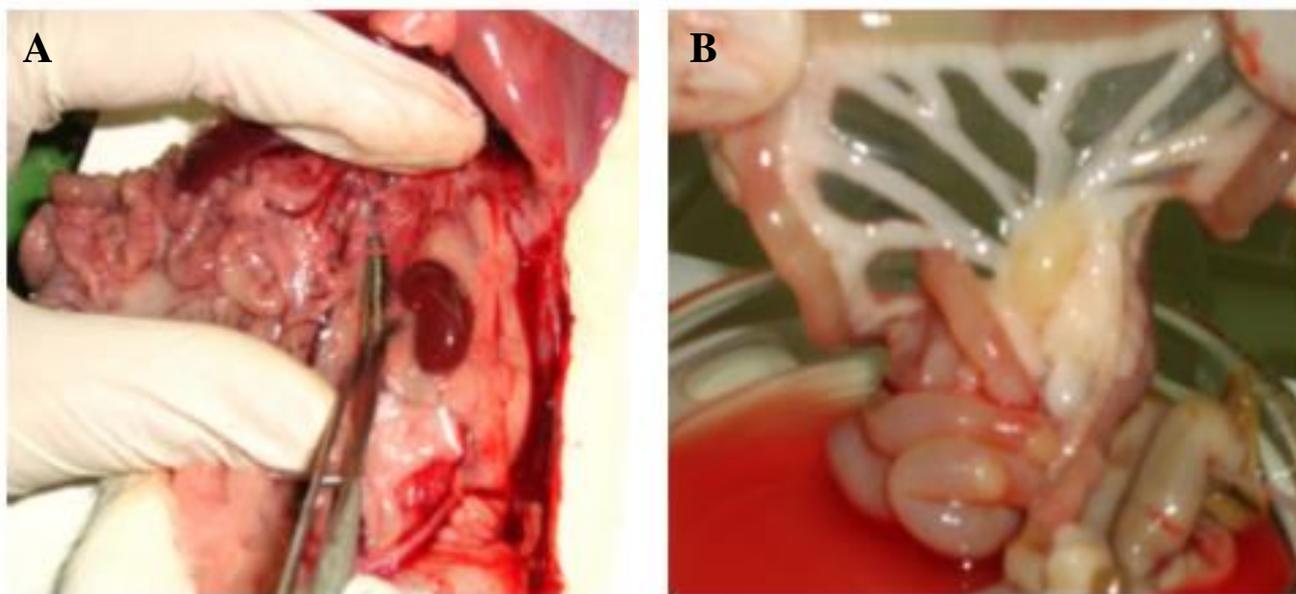


Figura 9. Reatividade do leito mesentérico. Em (A) fotografia de artéria mesentérica superior. Em (B) fotografia do leito mesentérico, após canulação da artéria mesentérica sendo perfundido pela solução nutritora.

Foi utilizado um vasoconstritor, noradrenalina (NA), nas doses de 0,12 µg/ml a 2000 µg/ml de forma crescente, e um agonista vasodilatador dependente do endotélio, Acetilcolina (Ach), nas doses de 2,46x10⁻⁸ a 2,46 mg/ml de forma

crescente, na ausência e na presença de bloqueadores indometacina $2,8 \times 10^{-6}M$ (Sigma, St. Louis, USA) e N ω -nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) $10^{-4}M$ (Sigma, St. Louis, USA) adicionados simultaneamente na solução nutritora para bloqueio da ciclooxygenase e da óxido nítrico sintase, respectivamente.

Para a obtenção da curva de relaxamento, a pressão de perfusão do LVM foi elevada com a adição de solução de noradrenalina 0,008 mg/ml à solução nutritora, capaz de promover um aumento de 112 ± 5 mmHg no tônus vascular.

4.2.4.1 Protocolos do Estudo da Reatividade Vascular:

4.2.4.1.1 Reatividade vascular ao agente vasoconstrictor (NA) e ao agente vasodilatador (Ach)

Em primeiro lugar, o leito mesentérico era perfundido durante 30 minutos com solução nutritora para a obtenção da estabilização do registro. Em seguida eram aplicadas doses crescentes de NA, in bolus, para obtenção da curva dose-resposta ao agente vasoconstrictor. Posteriormente, foi realizada a curva dose-resposta à Ach. Adicionou-se à solução nutritora NA (0,008mg/ml) para promover um aumento no tônus vascular, após a obtenção do platô de contração, doses crescentes de Ach eram administradas, in bolus, para se obter a curva dose-resposta a esse agente vasodilatador usado para o estudo da função endotelial.

4.2.4.1.2 Avaliação da participação do endotélio sobre a resposta vascular ao agente vasoconstrictor (NA) e ao agente vasodilatador (Ach)

O endotélio tem a habilidade de gerar respostas a alterações de fluxo e de pressão arterial que proporcionam a liberação de agentes vasodilatadores, como o NO, os derivados da ciclooxygenase (PGI₂) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), promovendo um relaxamento do vaso (Vanhoutte, 1996). Diante do bloqueio simultâneo de NO e das ciclooxygenases, o endotélio quando estimulado por agonistas, como por exemplo, a acetilcolina, ainda é capaz de promover o relaxamento em algumas preparações vasculares, propõe-se que esteja ocorrendo à liberação de um fator denominado EDHF (Taylor; Weston,

1988). A contribuição relativa de cada um desses mediadores de relaxamento derivado do endotélio é inversamente proporcional ao calibre do vaso, sendo o NO e a PGI₂ predominantes em vasos de condutância e o EDHF em vasos de resistência (Shimokawa et al., 1996). O leito mesentérico é considerado um grande contribuinte da resistência periférica total (Christensen & Mulvany, 1993).

Para avaliarmos a participação do endotélio vascular sobre os dois agentes utilizados, o leito mesentérico era perfundido durante 30 minutos com o duplo bloqueio da L-NAME + indometacina. Diante deste bloqueio simultâneo, era avaliada a participação do EDHF na reatividade vascular.

Primeiro repetimos a curva de NA na presença dos bloqueios para obtenção da curva dose-resposta ao agente vasoconstrictor. Em seguida, era adicionado à solução nutritora NA (0,008mg/ml) para promover o aumento no tônus vascular, após obtenção do platô de contração, doses crescentes de Ach eram administradas para se obter a curva dose-resposta a esse agente vasodilatador usado para o estudo da função endotelial.

4.2.5 Estudos da expressão proteica

4.2.5.1 Western Blot para detecção de proteínas em artérias mesentéricas

A técnica de Western Blot foi utilizada para determinar a influência do tratamento com alisquireno e L-arginina de ratos com hipertensão renovascular sobre a expressão proteica de eNOS, iNOS, SOD-2, catalase, COX-2, TNF- α e AT1R e β -actina, em artérias mesentéricas de ratos dos grupos Sham, 2R1C, 2R1C tratado com alisquireno, 2R1C tratado com Larginina e 2R1C tratado com a associação de alisquireno e L-arginina.

4.2.5.2 Preparação dos tecidos e quantificação de proteínas

As amostras foram preparadas utilizando amostras das artérias mesentéricas de todos os grupos. Os leitos mesentéricos foram mantidos a -80° C até o momento da extração proteica, que foi realizada em 4000 μ L de tampão de lise (10mM Tris – HCl pH 7,4; 1mM Metavanadato de sódio [NaVO₃]; 1% Dodecil sulfato de sódio [SDS]; 0,5mM Ditioneitol [DTT]; 5 mM ácido etilenodiamino tetra-

acético [EDTA]; 1mM fluoreto de fenilmetilsulfonil [PMSF]), ao qual se adicionou 10µg/mL coquetel inibidor de proteases. A homogeneização foi realizada com auxílio de sonicador ultra-sônico, sendo seguida de centrifugação a 6000 rpm, 4°C por 15 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos, aliquotados e armazenados a -80 °C. Este extrato total foi utilizado para avaliação da expressão de eNOS, iNOS, SOD-2, catalase, COX-2, TNF- α e AT1R e β -actina.

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

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

4.2.5.3 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)

As amostras foram carregadas em géis de SDS-poliacrilamida 10% para *SOD-2*, *Catalase* e *NADPH oxidase (gp91phox)* (1,5 M Tris HCl pH: 8.8, acrilamida 40%, glicerol 100%, SDS 10%, persulfato de amônio [APS] 10% e Tetrametiletenodiamina [Temed]) previamente imersos em um tampão para eletroforese (25mM de Tris HCl, 190 mM de glicina e 0,1% de SDS). Antes da sua

aplicação no gel as amostras foram aquecidas a 100 °C durante 5 min. A eletroforese foi conduzida com o tampão (25 mM de tris-HCl pH 8,3, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS), a 80 volts por aproximadamente 2 horas e 30 minutos (PowerPac™ HC, BioRad, Singapura). Os procedimentos relativos a eletroforese foram realizados segundo o sistema descrito por Laemmli (1970).

4.2.8.4 Transferência das proteínas

Depois de separadas, as proteínas das amostras para avaliar a expressão da eNOS, iNOS, SOD-2, catalase, COX-2, TNF- α e AT1R e β -actina foram transferidas para uma membrana de PVDF utilizando uma cuba molhada (Biorad), por 2:00 hs, 60 volts a 4°C, com tampão de transferência constituído de 25 mM de tris-HCl pH 8,3, 192 mM de glicina e 20% (v/v) de metanol.

4.2.5.4 Incubação dos anticorpos

Após a transferência, as membranas de PVDF foram incubadas por 2:30 horas em uma solução constituída de leite em pó desnatado (5%) em tampão TBS-tween 0,1% (20 mM de tris-HCl pH 7,4 e 150 mM de NaCl), à temperatura ambiente sob agitação leve, para evitar ligações inespecíficas com reativos não imunológicos. Em seguida, as membranas foram incubadas por 4 horas a temperatura ambiente, sob agitação, em TBS-tween adicionado mais os seguintes anticorpos primários: eNOS, iNOS, SOD-2, catalase, COX-2, TNF- α e AT1R e β -actina Mn SOD 2 (1: 1000, Santa Cruz Biotechnology, California, EUA) e para β -actina (1:1500, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Após este período, as membranas foram lavadas em tampão TBS-tween 0,1%, sob agitação leve em temperatura ambiente e incubadas com o anticorpo secundário (IgG, anti-mouse conjugado para fosfatase alcalina - 1:3000, Abcam Inc. e IgG, anti-Rabbit conjugado para fosfatase alcalina – 1:7000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) por 1:30 horas, à temperatura ambiente, sob agitação suave, seguida de lavagem com tampão TBS-tween 0,1%, e posteriormente com tampão TBS.

Os imunocomplexos foram detectados por reação de quimioluminescência por meio da exposição da membrana, durante 5 min a um sistema de detecção (ECL Plus, Amersham™, GE Healthcare, UK). As membranas, então, foram

expostas a autorradiografia (Medical Film, Konica Minolta Medical Imaging, Wayne, EUA /Hyperfilm, AmershamTM, UK), sendo as bandas impregnadas posteriormente reveladas. O programa ImageLab foi utilizado para quantificação da área e da densidade das bandas.

4.2.6 Estudo da geração de espécies reativas de oxigênio – Dihidroetídeo (DHE)

A geração de EROs foi determinada utilizando-se um método que envolve o DHE, um precursor não fluorescente do brometo de etídeo, e que permite analisar a produção “in situ” de radicais livres. Na presença de EROs o hidretídeo é oxidado dentro da célula, produzindo os compostos fluorescentes etídeo (E) e 2hidroxietídeo (EHO) que tem afinidade pelo DNA nuclear. A formação do etídeo se deve principalmente a oxidação da DHE pelo ânion superóxido, enquanto o EHO é formado pela oxidação da DHE por outras EROs como o peróxido de hidrogênio.

Os ratos foram anestesiados, a artéria mesentérica superior e artérias mesentéricas foram rapidamente dissecadas e imersas em solução de Krebs (8 mM HEPES, 2mM CaCl₂.2H₂O, 130mM NaCl, 5mM KCl, 2,45mM MgCl₂.6H₂O, 11,1mM glicose, pH 7,4) por um período de 2:00 hs. Após, estas foram congeladas em oacetato (Tissue-Tek OCT Compound, Sakura) e mantidas a -80°C até o momento da análise. Utilizando-se um criostato (CM 1850, Leica Microsystems, Alemanha), cortes transversais da artéria mesentérica superior e artérias mesentéricas (8 µm) foram obtidos e colocados em lâminas silanizadas e secos em estufa a 37°C por 20 minutos. Após, as lâminas contendo os cortes foram lavadas e incubadas com Krebs por 30 minutos a 37°C.

Decorrido o tempo, as lâminas tiveram o excesso de líquido removido e, em seguida, foi realizada a incubação DHE 2 µM (30 minutos, 37°C) em câmara úmida e protegidos da luz (Camporez et al., 2011). A fluorescência emitida foi visualizada em microscópio de fluorescência invertido (DM 2500, Leica Microsystems, Alemanha) equipado com câmera fotográfica, utilizando uma objetiva de fluorescência com aumento de 100X. O etídeo unido ao núcleo das células foi visualizado com λ_{exc} : 515-560 nm e detectado com λ_{em} :590 nm. As imagens foram quantificadas pelo programa Image Pro Plus, sendo o resultado expresso como

intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias), normalizado pela intensidade do background.

4.2.7 Detecção da produção de óxido nítrico

A disponibilidade local de NO foi determinada utilizando 4,5diaminofluoresceína (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 M) contendo CaCl₂ (0,45M) em estufa a 37°C por 30 minutos para remover o meio de inclusão. Em seguida, as lâminas foram secas e incubadas com DAF-2 (8 µM) diluído em solução tampão nas mesmas condições de tempo e temperatura. A intensidade da fluorescência foi detectada a 515 nm e 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 grupos tratados. A densidade de fluorescência média foi calculada usando o software MetaMorph.

4.2.8 Análise histológica de artérias mesentéricas superiores

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 no modelo experimental do presente estudo, os segmentos da artéria mesentérica superior foram removidos e transferido para um meio de inclusão (Tissue-Plus® OCT Compound) e, em seguida, congelados. Após obtenção dos cortes em criostado (10 µm), as secções arteriais foram coradas utilizando hematoxilina e eosina e picrossirius red.

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.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores são apresentados como médias \pm erro-padrão das médias (EPM).

Para cada curva dose-resposta a sensibilidade do agonista foi calculada através de análise de regressão não-linear na qual $pD_2 = [-\log(EC_{50})]$. A fim de comparar os efeitos dos inibidores farmacológicos sobre respostas vasodilatadoras alguns resultados foram expressos como área abaixo da curva dose-resposta (AUC) ou como diferenças entre as AUC (dAUC) antes e durante o uso do inibidor farmacológico. As AUC e dAUC foram calculadas a partir das curvas dose-respostas individuais de cada animal em determinado grupo, sendo AUC expressa como valor absoluto (indica a magnitude do envolvimento de uma via) e dAUC expressa em porcentagem (mostra o envolvimento do mecanismo relativo a resposta global).

Para a expressão de proteínas, os dados foram expressos como a razão entre as densidades de imunotransferência correspondente à proteína de interesse e β -actina.

Cada variável dependente foi analisada usando ANOVA uma ou duas vias regular ou de medidas repetidas seguido por um pós-teste de Tukey para comparações múltiplas sempre que adequado. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism (v. 6.0, GraphPad Software, Inc). A significância estatística foi definido como $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 EFEITOS DOS TRATAMENTOS COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE A PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA DE RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR

No início do estudo (dia 0), antes da cirurgia para implantação do clipe na artéria renal, os valores de PAS foram semelhantes em todos os grupos experimentais. Após uma semana da colocação do clipe (dia 7) houve um aumento nos níveis pressóricos de maneira semelhante em todos os ratos 2K1C em comparação com ratos SHAM. Após 21 dias de tratamento (dia 28), o alisquireno foi capaz de induzir uma diminuição de 7% (15 mmHg) na PAS, em comparação com ratos 2K1C. Uma redução de 11% (21 mmHg) no grupo tratado com L-arginina e de 29% no grupo tratado com a associação de alisquireno e L-arginina na PAS foi observada em comparação com ratos 2K1C. Este resultado demonstra que a monoterapia foi menos eficaz do que a combinação das drogas (Tabela 1).

Tabela 1: Efeitos do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre a pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) em ratos com hipertensão renovascular 2K1C.

	SHAM	2K1C	ALSK	L-ARG	ALSK+L-ARG
PAS dia 0	122,2±3,45	121,6±3,1	118,8±3,14	121,8±2,2	120,2±2,31
PAS dia 7	120,2±3,64	214,4±11,8*	217,8±10,24*	197,5±8,92*	198,14±6,45*
PAS dia 14	118,3±5,21	210,25±4,75*	205,8±8,23*	182,2±7,21*	152,52±8,12**
PAS dia 28	112,9,4±2.22	201,9±9.79*	201,9±14.81*	175,6±9,14*	137,9±4,42**

PAS aferida nos dias 0, 7, 14 e 28 foram mensuradas por pletismografia de cauda. *P <0,05 em relação ao grupo SHAM; #P <0,05 em relação ao grupo 2K1C; +P <0,05 em relação ao grupo ALSK. Dados estão expressos como média ± EPM, n=8 por grupo; ANOVA (uma e duas vias) seguido de Tukey. *p< 0,05.

No intuito de validar os dados obtidos por pletismografia, ao final do protocolo experimental, os animais foram cateterizados e foi aferida a pressão arterial direta nos ratos acordados. A PAS direta demonstrou valores semelhantes aos obtidos por pletismografia de cauda no final do tratamento, assim como as alterações apresentadas na PAS foram acompanhadas da mesma forma quando avaliamos

a PAM. Por outro lado, todos os tratamentos foram capazes de reduzir a PAD quando comparado ao grupo 2K1C. Em relação a frequência cardíaca não houve diferença entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2: Efeitos do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre a pressão arterial direta (mmHg) e frequência cardíaca em ratos com hipertensão renovascular 2K1C.

	SHAM	2K1C	ALSK	L-ARG	ALSK+L-ARG
PAS	117,02±5,12	202,21±4,63	195,058±6,01	152,19±5,56	123,91±1,69
PAD	82,12±1,21	132,21±7,45*	105,61±10,61#	103,62±4,20#	87,29±3,2#
PAM	107,21±2,54	172,31±5,85*	160,24±9,65*	135,23±5,54*##	108,87±8,18##¥
FC	380,10±23,12	371,82±26,02	401,02±23,85	367,40±11,52	368,48±9,15

PAS, PAD, PAM e FC diretas foram mensuradas por cateterização da artéria femoral. *P <0,05 em relação ao grupo SHAM; #P <0,05 em relação ao grupo 2K1C; +P <0,05 em relação ao grupo ALSK; ¥ P < 0,05 vs L-ARG. Dados estão expressos como média ± EPM, n=8 por grupo; ANOVA (uma e duas vias) seguido de Tukey. *p< 0,05.

5.2 EFEITOS DO TRATAMENTO COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE FUNÇÃO VASCULAR DO LEITO MESENTÉRICO ISOLADO

Em relação à curva dose-resposta a Noradrenalina (NA) que está representada na tabela 3 e figura 10A no leito vascular mesentérico, observa-se que a hipertensão renovascular (grupo 2K1C) aumentou as respostas contráteis induzidas pela NA nas artérias mesentéricas (Figura 10A), embora não tenha produzido diferença na resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (pD2) quando comparado ao grupo SHAM e aos demais grupos que receberam tratamento (Tabela 3).

Após 21 dias de tratamento observou-se uma resposta vascular diminuída significativa em todos os grupos quando comparado ao grupo 2K1C, no entanto essa magnitude foi maior nos grupos L-ARG e ALSK+L-ARG assim como observado na área abaixo da curva (AAC) (Figura 10B).

Para avaliar se os tratamentos com L-arginina e alisquireno foram capazes de alterar o relaxamento dependente do endotélio, foi realizada curva dose-resposta à ACh, sendo representada na figura 10C e tabela 4.

A resposta mediada por este agonista vasodilatador produziu um relaxamento dependente da dose da droga em todos os grupos estudados. No entanto, a responsividade vascular à ACh foi significativamente prejudicada no grupo 2K1C e os tratamentos melhoraram o relaxamento mediado pela ACh, mostrando valores semelhantes ao grupo SHAM (Figura 10C e Tabela 4).

A resposta máxima de relaxamento dependente do endotélio induzida pela ACh nos LVMs foi significativamente menor nos animais do grupo 2K1C quando comparada a resposta dos grupos SHAM e dos tratamentos isolados ou em associação.

O efeito dos tratamentos com alisquireno, L-arginina e a associação de ambos sobre a resposta vasodilatadora também pode ser observada por meio da análise da AAC ou Rmax induzida pela ACh. Não houveram diferenças entre os grupos tratados em relação a sensibilidade a ACh (pD₂), apenas na comparação do grupo 2K1C com o SHAM (Tabela 4).

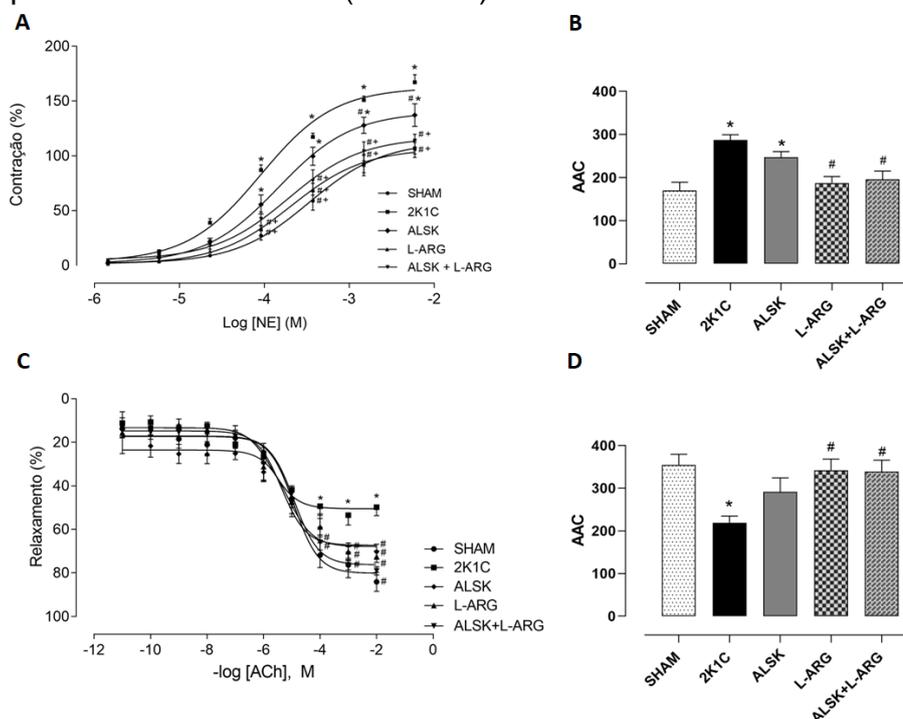


Figura 10: Curva dose-resposta à NE (A) e ACh (B) nos LVMs na ausência de inibidores de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (●) SHAM, (■) 2K1C, (◆) ALSK, (▲) L-ARG e (▼) ALSK+L-ARG (B; D) Área abaixo da curva (AAC) entre os grupos. Dados estão expressos como média \pm EPM, n=8 por grupo. Os símbolos representam média \pm EPM; ANOVA (uma e duas vias) seguido de Tukey. *p < 0,05.

L-NAME (100 μ M) foi usado para investigar o papel putativo do NO nos efeitos do tratamento com alisquireno e L-arginina na resposta contrátil induzida pela NA. A curva de dose-resposta para a NA foi deslocada para a esquerda nas artérias mesentéricas de todos os grupos (Figura 11 A-E). No entanto, esse efeito foi menor no leito das artérias mesentéricas do grupo 2K1C e ALSK, conforme indicado pelos valores da AAC (Figura 11 F).

Na resposta vasodilatadora, notamos efeitos semelhantes. Todos os grupos apresentaram resposta vasodilatadora prejudicada à acetilcolina após bloqueio com L-NAME (Figura 12 A-E).

Observou-se maior magnitude nas artérias mesentéricas de animais tratados com L-arginina e com a associação de alisquireno e L-arginina, sugerindo um possível aumento da modulação/biodisponibilidade do NO.

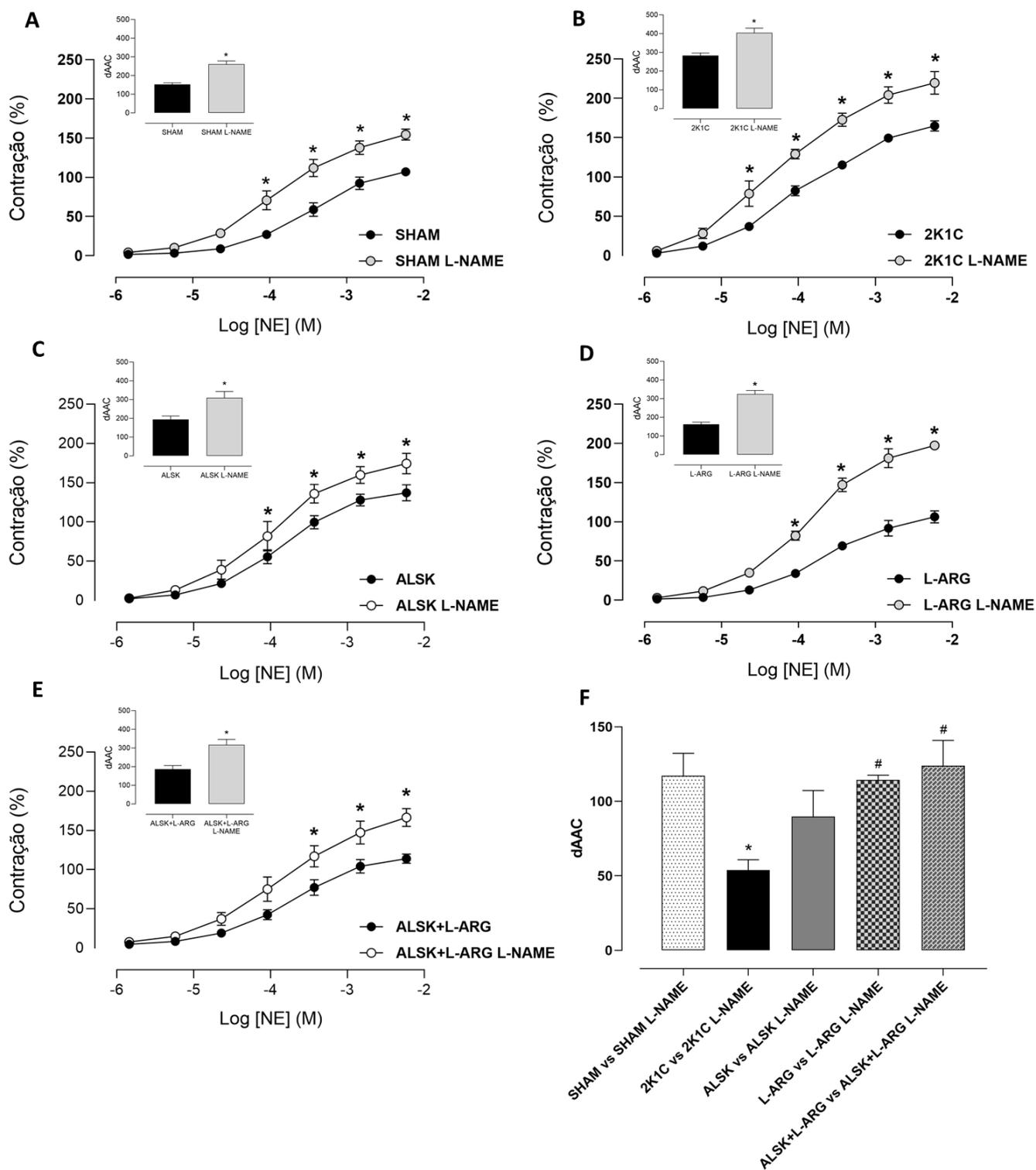


Figura 11: Curva dose-resposta à NE nos LVMs de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (A) SHAM e após a incubação com L-NAME (SHAM L-NAME); (B) 2K1C e após a incubação com L-NAME (2K1C L-NAME); (C) ALSK e após a incubação com L-NAME (ALSK L-NAME); (D) L-ARG e após a incubação com LNAME (L-ARG L-NAME); (E) ALSK+L-ARG e após a incubação com L-NAME (ALSK+L-ARG L-NAME); (F) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAAC%) dose-resposta à NE antes (ausência de inibidores farmacológicos) e após a inibição com L-NAME. Dados estão expressos como média \pm EPM, n=8 por grupo. Os símbolos representam média \pm EPM; ANOVA (uma e duas vias) seguido de Tukey. *p < 0,05.

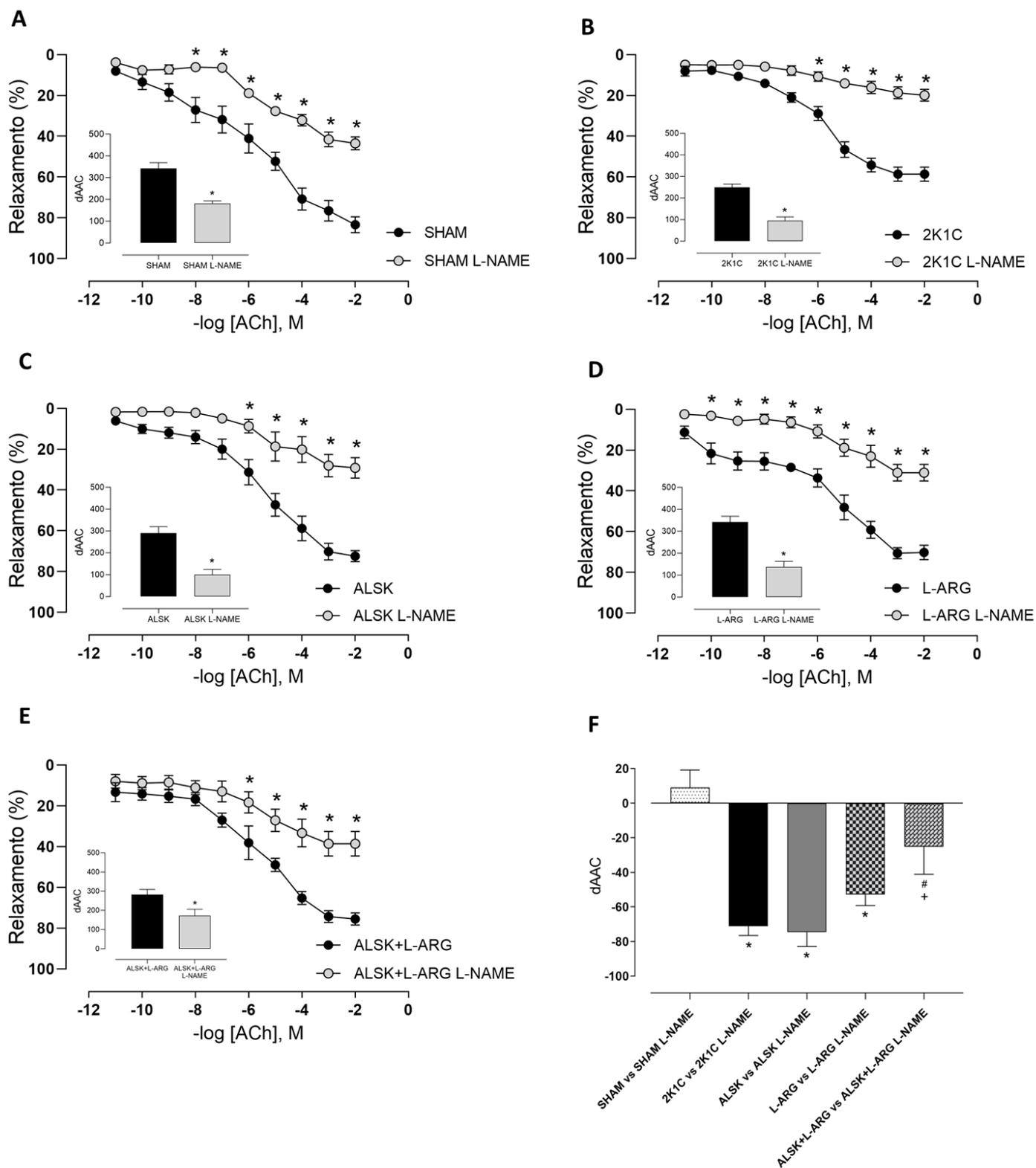


Figura 12. (A) Curva dose-resposta à ACh nos LVMs de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (A) SHAM e após a incubação com L-NAME (SHAM L-NAME); (B) 2K1C e após a incubação com L-NAME (2K1C L-NAME); (C) ALSK e após a incubação com L-NAME (ALSK L-NAME); (D) L-ARG e após a incubação com LNAME (L-ARG L-NAME); (E) ALSK+L-ARG e após a incubação com L-NAME (ALSK+L-ARG L-NAME); (F) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAAC%) dose-resposta à ACh antes (ausência de inibidores farmacológicos) e após a inibição com L-NAME. As respostas de relaxamento estão expressas como porcentagem na redução da pressão de perfusão relativa a contração induzida pela NE. Dados estão expressos como média \pm EPM, $n=8$ por grupo. Os símbolos representam média \pm EPM; ANOVA (uma e duas vias) seguido de Tukey. * $p < 0,05$.

Para investigar o papel dos prostanóides na resposta à NA produzida pelos tratamentos, as artérias mesentéricas foram incubadas com um inibidor não seletivo da ciclooxigenase, indometacina (10 μ M) mais L-NAME (100 μ M).

As respostas vasoconstritoras à NA diminuíram nas artérias de resistência mesentérica do grupo ALSK+L-ARG quando comparado ao grupo 2K1C (Figura 13 E). Por outro lado, no grupo 2K1C e ALSK houve um aumento na resposta vasoconstritora induzida pela NA (Figura 13 B e C), e no grupo L-ARG não observou-se diferença com o duplo bloqueio (Figura 13 D).

O bloqueio duplo com L-NAME e indometacina promoveu uma redução significativa na resposta vasodilatadora em todos os grupos (Figura 14 A-E). Resposta semelhante ao bloqueio apenas com L-NAME. Esses resultados indicam que a associação terapêutica entre L-arginina e alisquireno melhora a função endotelial nas artérias mesentéricas resistentes, reduzindo a resposta contrátil moduladas pela noradrenalina, e que, possivelmente essa resposta é pela via dos prostanóides vasoconstritores.

Quando avaliamos a Rmax nos efeitos da NA em LVM observamos diferença apenas no grupo 2K1C quando comparado ao grupo SHAM. Entretanto, às repostas mediadas pela Ach apresentaram diferença após o duplo bloqueio com L-NAME e indometacina quando comparadas as curvas sem bloqueio. Em relação ao pD2 não houve diferença significativa entre os grupos.

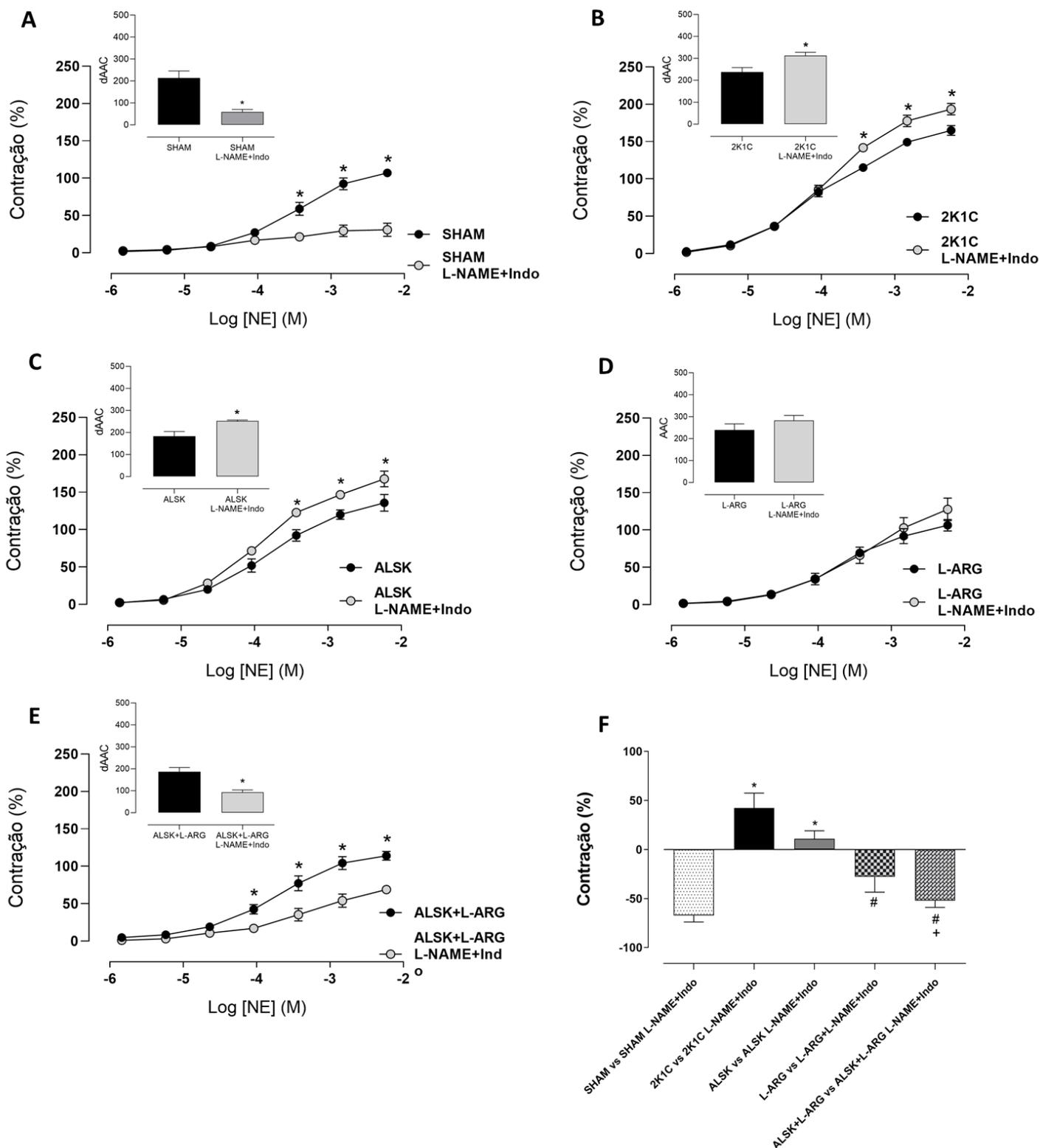


Figura 13: Curva dose-resposta à NE nos LVMs de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (A) SHAM e após a incubação com L-NAME+Indo (SHAM L-NAME+Indo); (B) 2K1C e após a incubação com L-NAME+Indo (2K1C L-NAME+Indo); (C) ALSK e após a incubação com L-NAME+Indo (ALSK L-NAME+Indo); (D) L-ARG e após a incubação com LNAME+Indo (L-ARG L-NAME+Indo); (E) ALSK+L-ARG e após a incubação com L-NAME+Indo (ALSK+L-ARG L-NAME+Indo); (F) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAAC%) concentração-resposta à NE antes (ausência de inibidores farmacológicos) e após a inibição com L-NAME e Indometacina. Dados estão expressos como média \pm EPM, $n=8$ por grupo. Os símbolos representam média \pm EPM; ANOVA (uma e duas vias) seguido de Tukey. * $p < 0.05$

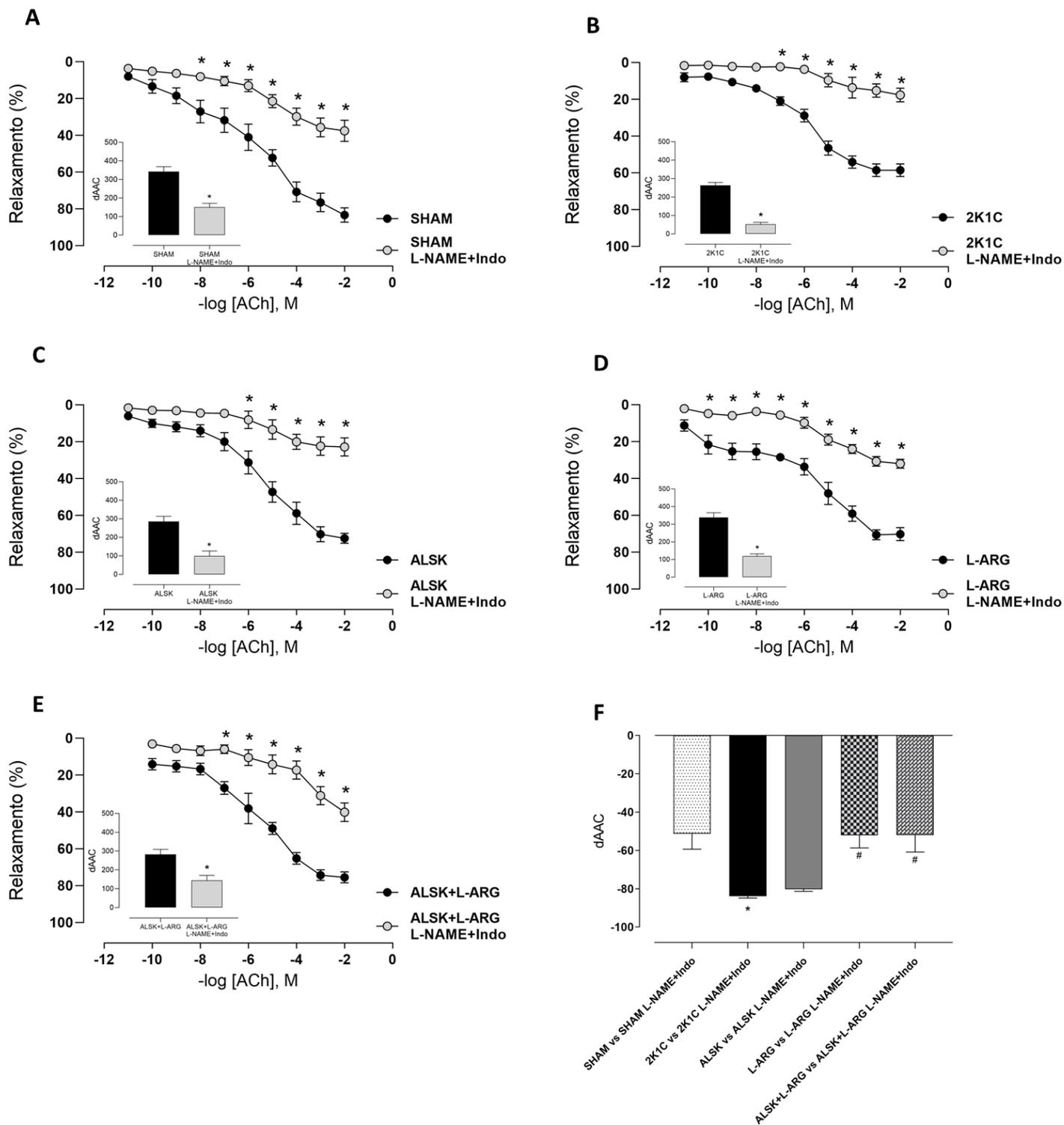


Figura 14. (A) Curva dose-resposta à ACh nos LVMs de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (A) SHAM e após a incubação com L-NAME+Indo (SHAM L-NAME+Indo); (B) 2K1C e após a incubação com L-NAME+Indo (2K1C L-NAME+Indo); (C) ALSK e após a incubação com L-NAME+Indo (ALSK L-NAME+Indo); (D) L-ARG e após a incubação com LNAME+Indo (L-ARG L-NAME+Indo); (E) ALSK+L-ARG e após a incubação com L-NAME+Indo (ALSK+L-ARG L-NAME+Indo); (F) Diferença percentual da área abaixo da curva (dAAC%) dose-resposta à ACh antes (ausência de inibidores farmacológicos) e após a inibição com L-NAME e Indometacina. As respostas de relaxamento estão expressas como porcentagem na redução da pressão de perfusão relativa a contração induzida pela NE. Dados estão expressos como média \pm EPM, $n=8$ por grupo. Os símbolos representam média \pm EPM; ANOVA (uma e duas vias) seguido de Tukey. * $p < 0,05$.

Tabela 3: Efeitos do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre os valores de resposta máxima (R_{max} , g) e sensibilidade (pD_2) das curvas dose-resposta à NE em leito mesentérico de ratos com hipertensão renovascular 2K1C.

	Sham		2K1C		ALSK		L-ARG		ALSK+L-ARG	
	R_{max}	pD_2	R_{max}	pD_2	R_{max}	pD_2	R_{max}	pD_2	R_{max}	pD_2
NOR	117.0 ± 5.71	-3.45 ± 0.23	150.3 ± 10.41	-3.81 ± 0.11	133.1 ± 8.23	-3.78 ± 0.08	133.5 ± 6.73	-3.74 ± 0.09	121.0 ± 3.83	-3.76 ± 0.16
L-NAME	149.6 ± 8.74†	-3.94 ± 0.09	223.8 ± 24.73†	-4.44 ± 0.29	146.2 ± 15.63	-4.09 ± 0.17	172.0 ± 13.9	-3.91 ± 0.03	150.08 ± 5.11	-4.12 ± 0.11
L-NAME + INDO	40.59 ± 9.62†	-3.95 ± 0.34	193.7 ± 14.15	-3.79 ± 0.03	133.69 ± 11.46	-3.68 ± 0.18	142.83 ± 22.36	-3.33 ± 0.09	115.00 ± 14.4	-3.76 ± 0.18

Valores expressos em média ± EPM; (n = 8 por grupo). PAS, PAD, PAM e FC diretas foram mensuradas por cateterização da artéria femoral. *P <0,05 em relação ao grupo SHAM; #P <0,05 em relação ao grupo 2K1C; +P <0,05 em relação ao grupo ALSK; † p<0,05; Rmax e pD2 entre os bloqueios.

Tabela 4: Efeitos do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre os valores de resposta máxima (R_{max} , g) e sensibilidade (pD_2) das curvas dose-resposta à ACh em leito mesentérico de ratos com hipertensão renovascular 2K1C.

	Sham		2K1C		ALSK		L-ARG		ALSK+L-ARG	
	R_{max}	pD_2	R_{max}	pD_2	R_{max}	pD_2	R_{max}	pD_2	R_{max}	pD_2
Ach	84.1 ± 5.11	-4.83 ± 0.08	53.9 ± 5.06*	-5.93 ± 0.14*	77.3 ± 3.01#	-4.62 ± 0.38	71.8 ± 2.7#	-5.02 ± 0.28	75.5 ± 2.76#	-5.04 ± 0.33
L-NAME	46.6 ± 4.27 †	-5.40 ± 0.11	22.3 ± 3.09* †	-5.82 ± 0.65	29.9 ± 4.15* †	-4.59 ± 0.69	33.02 ± 2.94# †	-4.91 ± 0.34	46.4 ± 3.66+ †	-6.03 ± 0.44
L-NAME + INDO	48.9 ± 3.66 †	-5.68 ± 0.61	21.1 ± 4.8* †	-4.29 ± 0.34	25.49 ± 6.70* †	-5.36 ± 0.67	35.0 ± 1.56# †	-4.94 ± 0.43	47 ± 10.6+ †	-4.44 ± 0.47

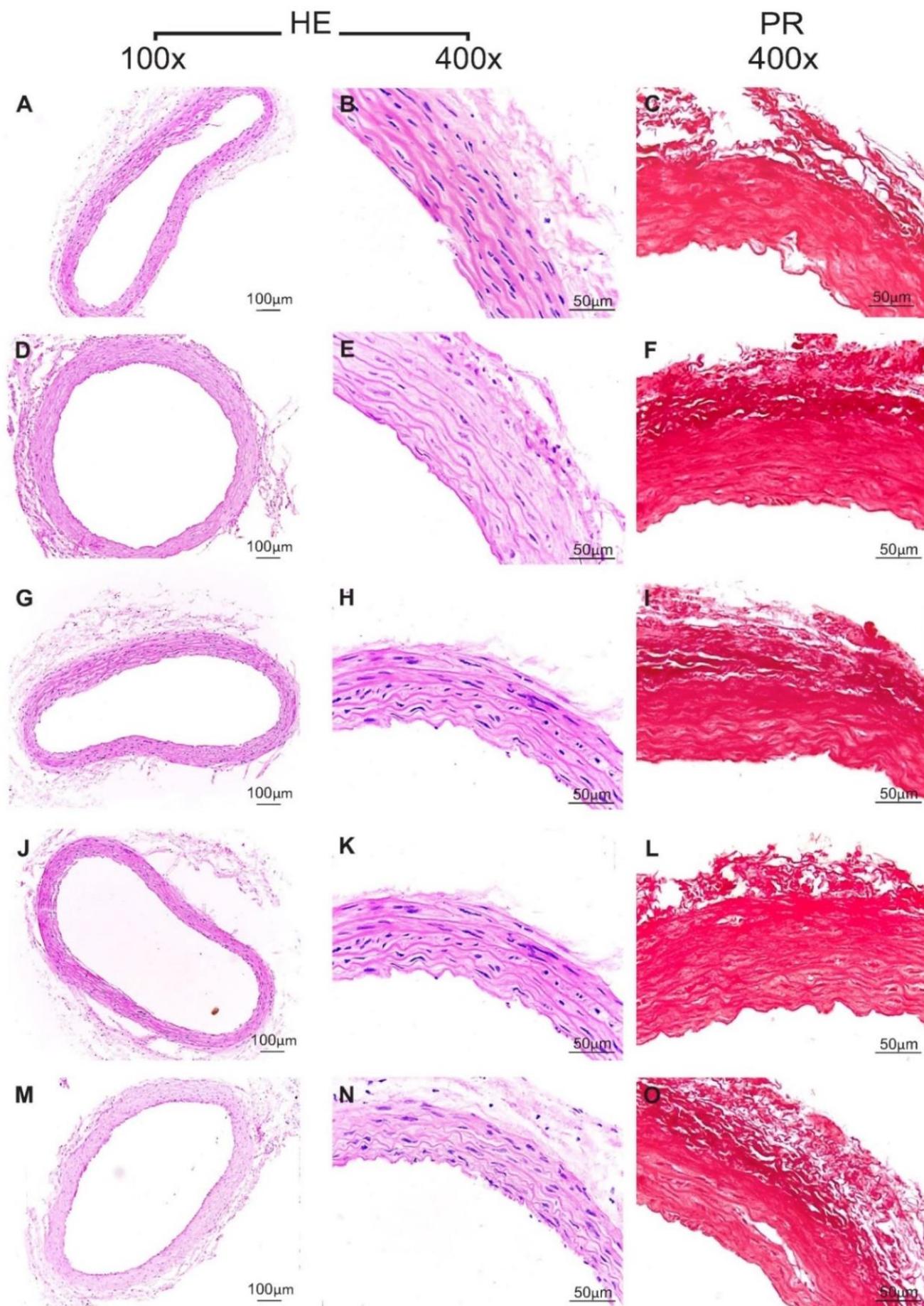
Valores expressos em média ± EPM; (n = 8 por grupo). PAS, PAD, PAM e FC diretas foram mensuradas por cateterização da artéria femoral. *P <0,05 em relação ao grupo SHAM; #P <0,05 em relação ao grupo 2K1C; +P <0,05 em relação ao grupo ALSK; † p<0,05; Rmax e pD2 entre os bloqueios.

5.3 EFEITOS DO TRATAMENTO COM ALISQUIRENO E L-ARGININA SOBRE A DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO E ESPESSAMENTO DA PAREDE DA ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR

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 morfologia e a rigidez vascular (Arenas; Zurbarán, 2002). Sendo assim, a espessura da parede do vaso e a deposição de colágeno foram quantificadas em segmentos de artéria mesentérica superior dos grupos experimentais.

A redução do diâmetro interno, que ocorre na hipertensão, está associada ao espessamento da parede do vaso (Christensen; Mulvany, 2001). Em nosso estudo, observamos alterações estruturais nas artérias mesentéricas promovidas pelo modelo 2K1C, aumentando a espessura da parede do vaso. Os tratamentos com L-arginina e a associação com alisquireno foram capazes de reduzir essas alterações (figura 15 P).

A coloração por picrossírius é empregada na histologia como específica para o colágeno (Constantine; Mowry, 1968). A medida do conteúdo de colágeno pela coloração com picrossírius red mostrou um aumento da deposição de colágeno promovida pelo modelo 2K1C quando comparado ao grupo SHAM. Os tratamentos com L-ARG, ALSK e a associação de ambos (ALSK+L-ARG) foram capazes em reduzir o conteúdo de colágeno, principalmente no grupo L-ARG e a associação entre os tratamentos (ALSK+L-ARG), que apresentaram valores semelhantes aos do grupo SHAM (Figura 15 Q).



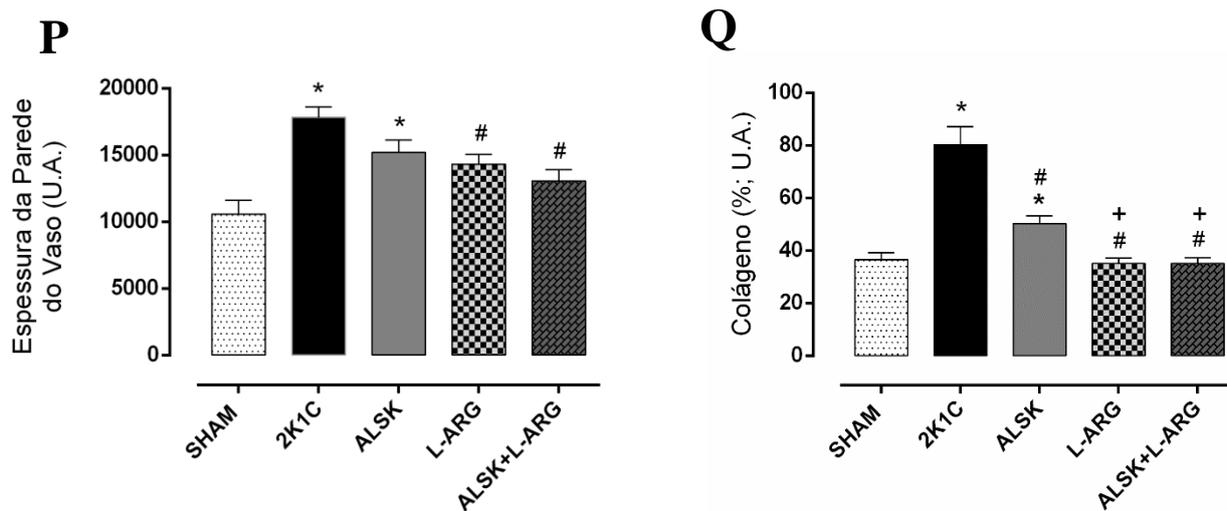


Figura 15. Imagens histológicas representativas de seções arteriais microscópicas coradas utilizando hematoxilina e eosina (HE) (SHAM:A-B; 2K1C:D-E; ALSK:G-H; L-ARG:J-K; ALSK+L-ARG:M-N) e picrossirius red (PR) (SHAM:C; 2K1C:F; ALSK:I; L-ARG:L; ALSK+L-ARG:O) obtida de artérias de resistência mesentérica de ratos controle e tratados com alisquireno e L-arginina. Quantificação da espessura da parede do vaso (P) e quantificação do conteúdo de colágeno (Q). Valores expressos em média \pm EPM; (n = 7 por grupo). *P < 0.05 em relação ao grupo SHAM; #P < 0.05 em relação ao grupo 2K1C.

5.4 QUANTIFICAÇÃO DA DISPONIBILIDADE LOCAL DE ÓXIDO NÍTRICO UTILIZANDO 4,5DIAMINOFLORESCEÍNA (DAF-2) EM ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR E LEITO VASCULAR MESENTÉRICO DE RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR

A disponibilidade local de NO foi determinada nas artérias mesentéricas superior e de resistência dos grupos experimentais (Figura 16).

A hipertensão 2K1C reduziu a produção de NO *in situ* em artéria mesentérica superior e leito vascular mesentérico quando comparado ao grupo SHAM (16B e G). Entretanto, os segmentos arteriais do grupo L-ARG e ALSK+L-ARG apresentaram maior produção local de NO tanto nas artérias mesentéricas superior como nos segmentos de resistência, corroborando os dados obtidos após o bloqueio farmacológico com L-NAME. No entanto, o tratamento em monoterapia com o alisquireno foi capaz de aumentar a produção de NO apenas em segmentos de artéria mesentérica superior (Figura 16C).

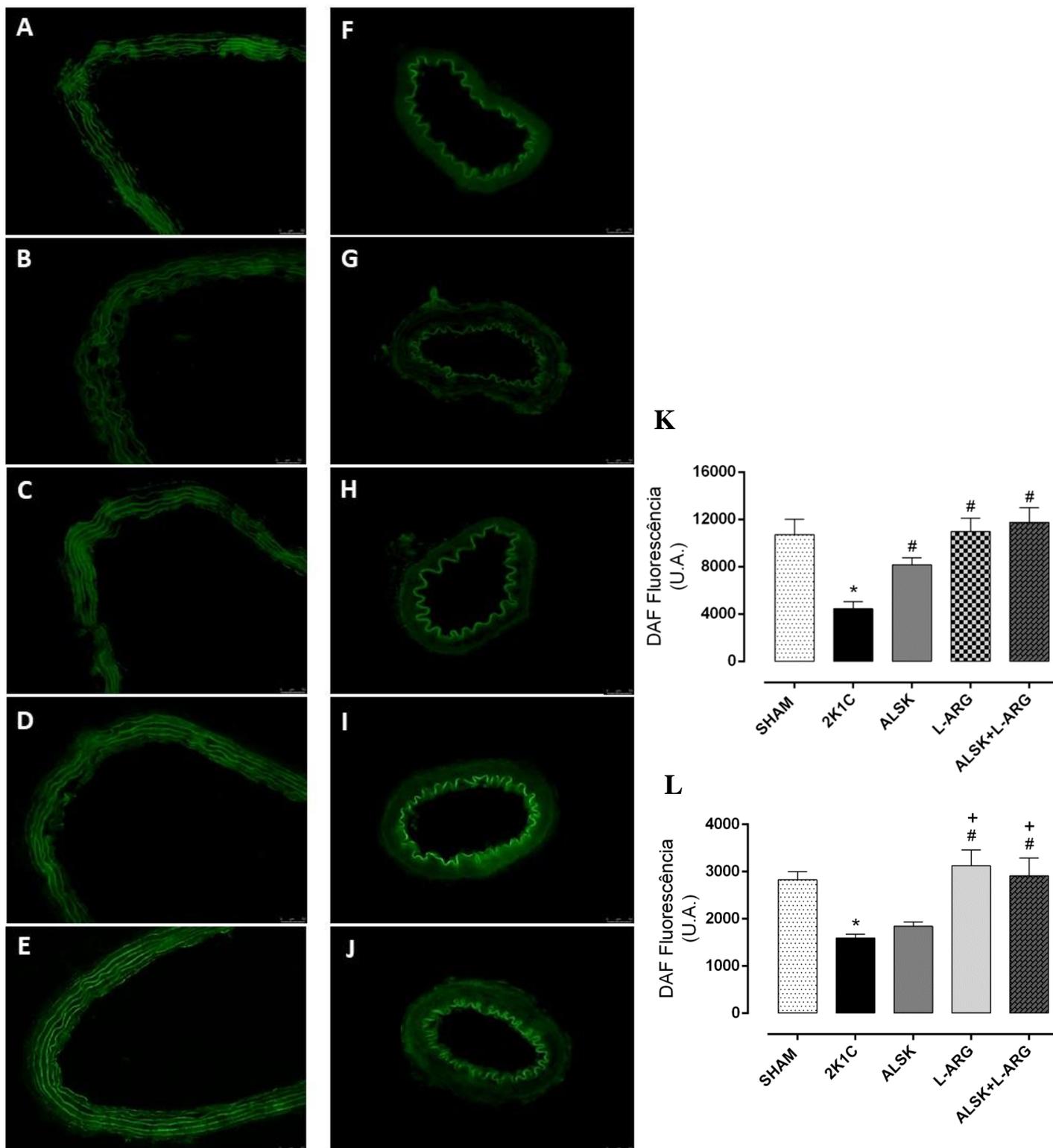


Figura 16. Imagens de microscopia apresentam a fluorescência emitida por 4,5 diaminofluoresceína (DAF-2) na artéria mesentérica superior e artérias mesentérica de resistência dos ratos Sham (A;F), 2K1C (B;G), ALSK (C;H), L-ARG (D;I) e ALSK+L-ARG (E;J). Gráfico com valores da fluorescência emitida por diaminofluoresceína (DAF-2) em artéria mesentérica superior (K) e leito vascular mesentérico (L). Valores expressos em média \pm EPM; (n = 7 por grupo). * P < 0.05 em relação ao grupo SHAM; # P < 0.05 em relação ao grupo 2K1C.

5.5 QUANTIFICAÇÃO DA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO PELA OXIDAÇÃO DO DIHIDROETÍDEO (DHE) EM ARTÉRIA MESENTÉRICA SUPERIOR E LEITO VASCULAR MESENTÉRICO DE RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR

Em condições basais, a análise da fluorescência produzida pelo DHE na artéria mesentérica superior e artéria mesentérica de resistência revelou um aumento da produção de EROs nos animais 2K1C (17 B e G), e que os tratamentos com ALSK, L-ARG e ALSK+L-ARG foram efetivos em reduzir seus valores de fluorescência normalizados, corrigindo o aumento da produção de EROs em artéria mesentérica superior (Figura 16 C, D e E respectivamente). No entanto, em artéria mesentérica de resistência apenas os grupos L-ARG e ALSK-ARG (Figura 16 I e J) foram capazes de normalizar os valores de fluorescência.

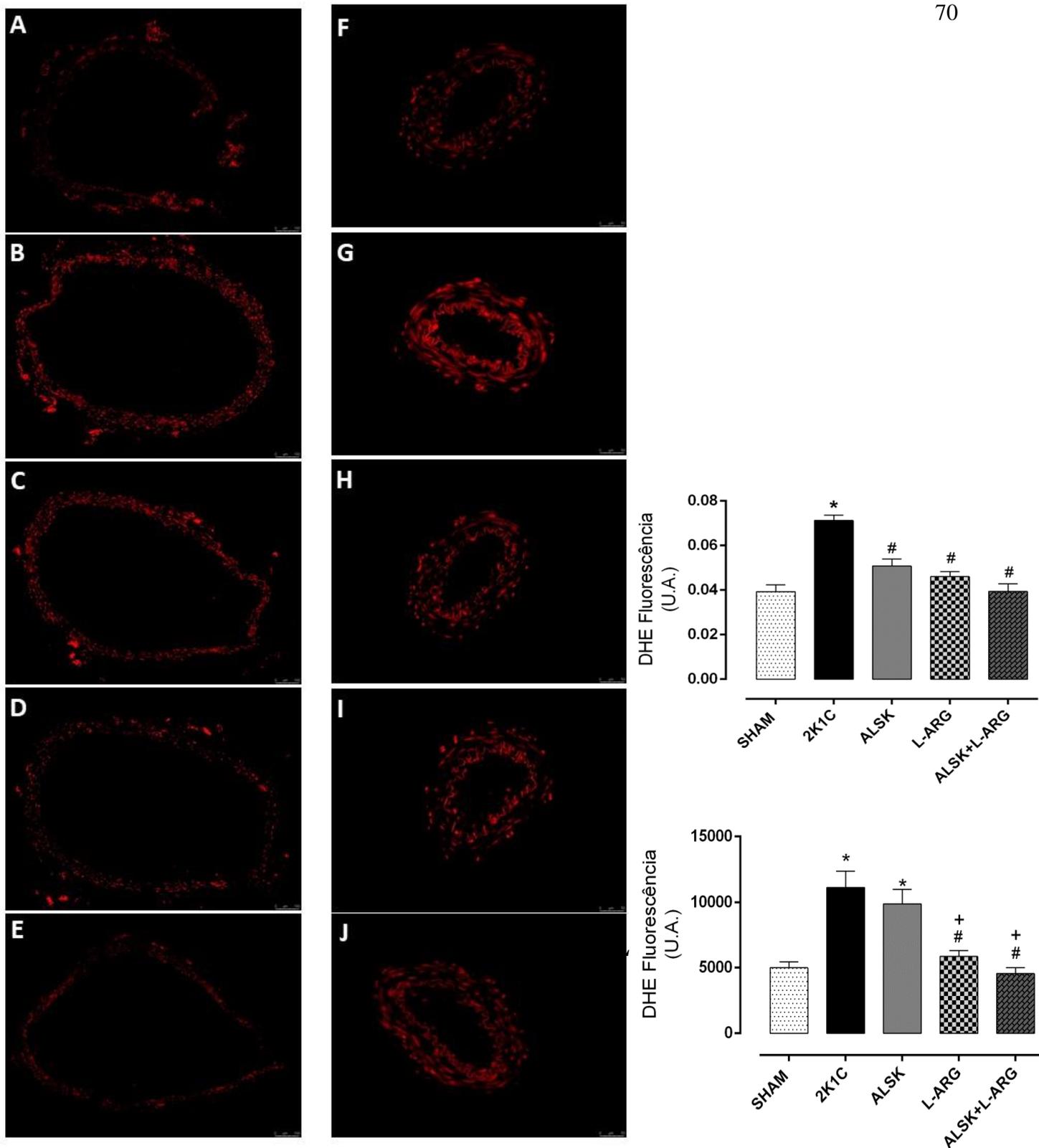


Figura 17. Imagens de microscopia apresentam a fluorescência emitida por dihidroetídeo na artéria mesentérica superior e artérias mesentérica de resistência dos ratos SHAM (A;F), 2K1C (B;G), ALSK (C;H), L-ARG (D;I) e ALSK+L-ARG (E;J). Gráfico com valores da fluorescência emitida por dihidroetídeo em artéria mesentérica superior (K) e leito vascular mesentérico (L). Valores expressos em média \pm EPM; (n = 8 por grupo). * P < 0.05 em relação ao grupo SHAM; # P < 0.05 em relação ao grupo 2K1C.

5.6 EXPRESSÃO PROTEICA DO ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO NO LEITO VASCULAR MESENTÉRICO DE RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR TRATADOS COM ALISQUIRENO E L-ARGININA

Visando melhor elucidar qual mecanismo estaria atuando no processo de melhora na função vascular nos ratos tratados com alisquireno, L-arginina e com a associação de ambas as terapias, a expressão de eNOS, iNOS, SOD-2, catalase, COX-2, TNF- α e AT1R foram avaliadas de modo a melhor compreender a participação do estresse oxidativo e inflamação nesse processo.

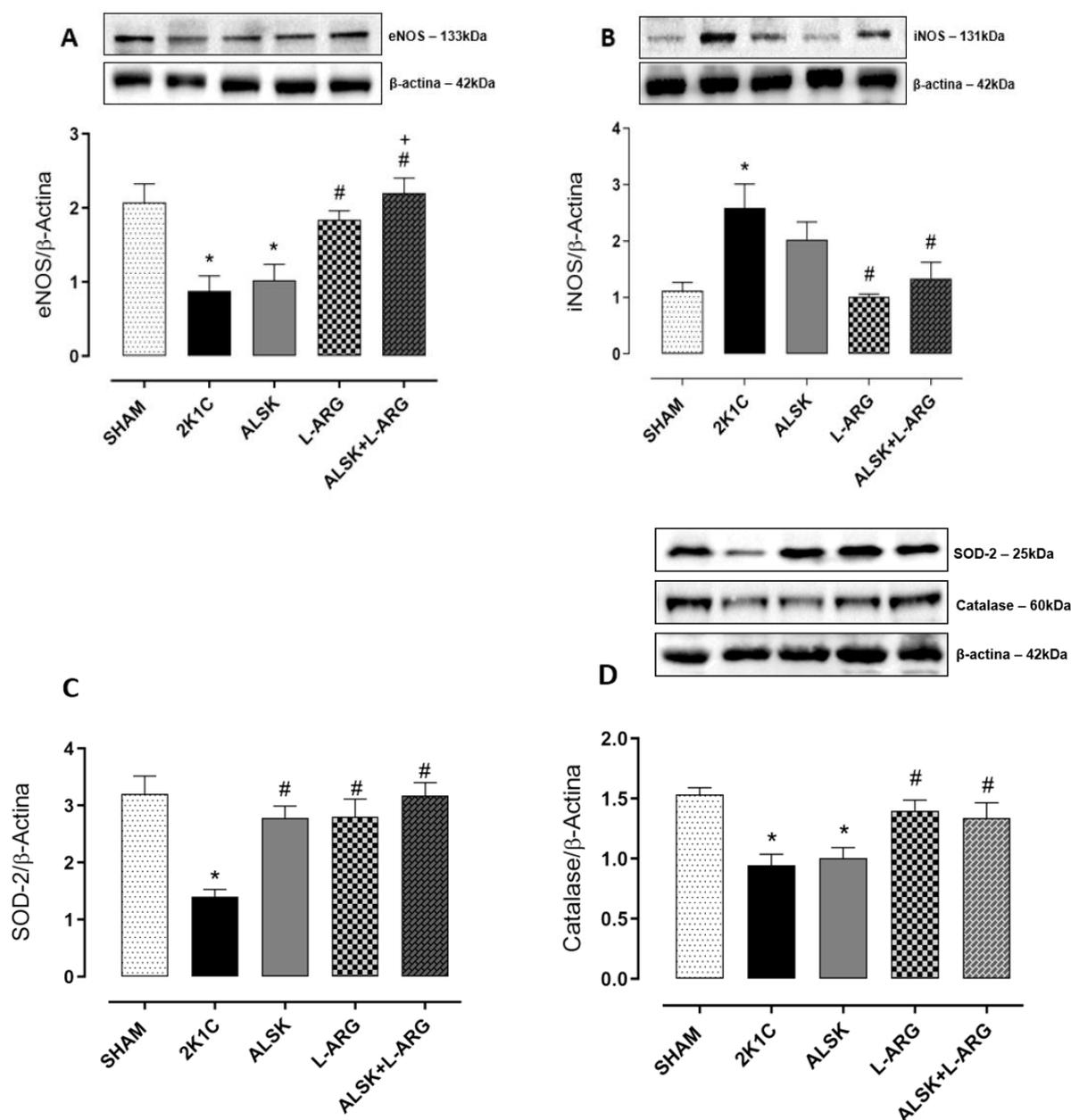
Assim, em condições basais (o leito vascular mesentérico foi retirado logo após a eutanásia do animal) a expressão da eNOS, iNOS, SOD-2, catalase, COX-2, TNF- α e AT1R e β -actina foram detectadas através da técnica de Western Blot nos diferentes grupos estudados (Figura 18 – A-G).

Visando explicar por qual mecanismo estaria ocorrendo o aumento da modulação endotelial pelo NO nos ratos tratados com a terapia associada de alisquireno e L-arginina, a expressão proteica da isoforma endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) da síntese do óxido nítrico foram avaliadas. Foi observado que o tratamento isolado com L-arginina e sua associação com o alisquireno aumentou a expressão proteica da eNOS quando comparado aos grupos 2K1C e tratado com alisquireno (ALSK) (Figura 18 A). Adicionalmente, ao avaliarmos a expressão proteica de iNOS nos segmentos arteriais observamos um aumento na expressão proteica da iNOS no grupo 2R1C e ALSK comparados aos demais grupos estudados (SHAM, L-ARG e ALSK+L-ARG) (Figura 18 B).

Sabe-se que a superóxido dismutase (Mn SOD2) catalisa a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio e que a catalase decompõe o peróxido de hidrogênio, impedindo este radical livre de reagir com o NO, assim aumentando sua biodisponibilidade. Por este motivo, analisamos a expressão da Mn SOD2 e catalase. A expressão da SOD-2 e Catalase foram reduzidas nos animais 2K1C quando comparado ao grupo SHAM (Figura 18 C e D). Os tratamentos com L-arginina, alisquireno e a associação de ambos foram efetivos em aumentar a expressão de SOD-2 (Figura 18 C). Entretanto, apenas os tratamentos com L-arginina e sua associação com o alisquireno foram efetivos em aumentar a expressão de Catalase (Figura 18 D).

A expressão de COX-2 foi significativamente maior no grupo 2K1C. Os grupos L-ARG e ALSK+L-ARG foram efetivos em reduzir essa expressão. Entretanto, a monoterapia com alisquireno manteve níveis elevados da expressão de COX-2 (Figura 18 E). Achado esse que se relaciona com um aumento na expressão de TNF- α nos grupos 2K1C e ALSK quando comparados aos grupos SHAM, L-ARG e ALSK+L-ARG (Figura 18 F).

A expressão dos receptores AT1 foi significativamente maior no grupo 2K1C quando comparado ao grupo SHAM. Todos os tratamentos foram efetivos na redução da expressão de receptores AT1, no entanto apenas os grupos L-ARG e ALSK+L-ARG se aproximando a valores semelhantes ao grupo SHAM (Figura 18 G).



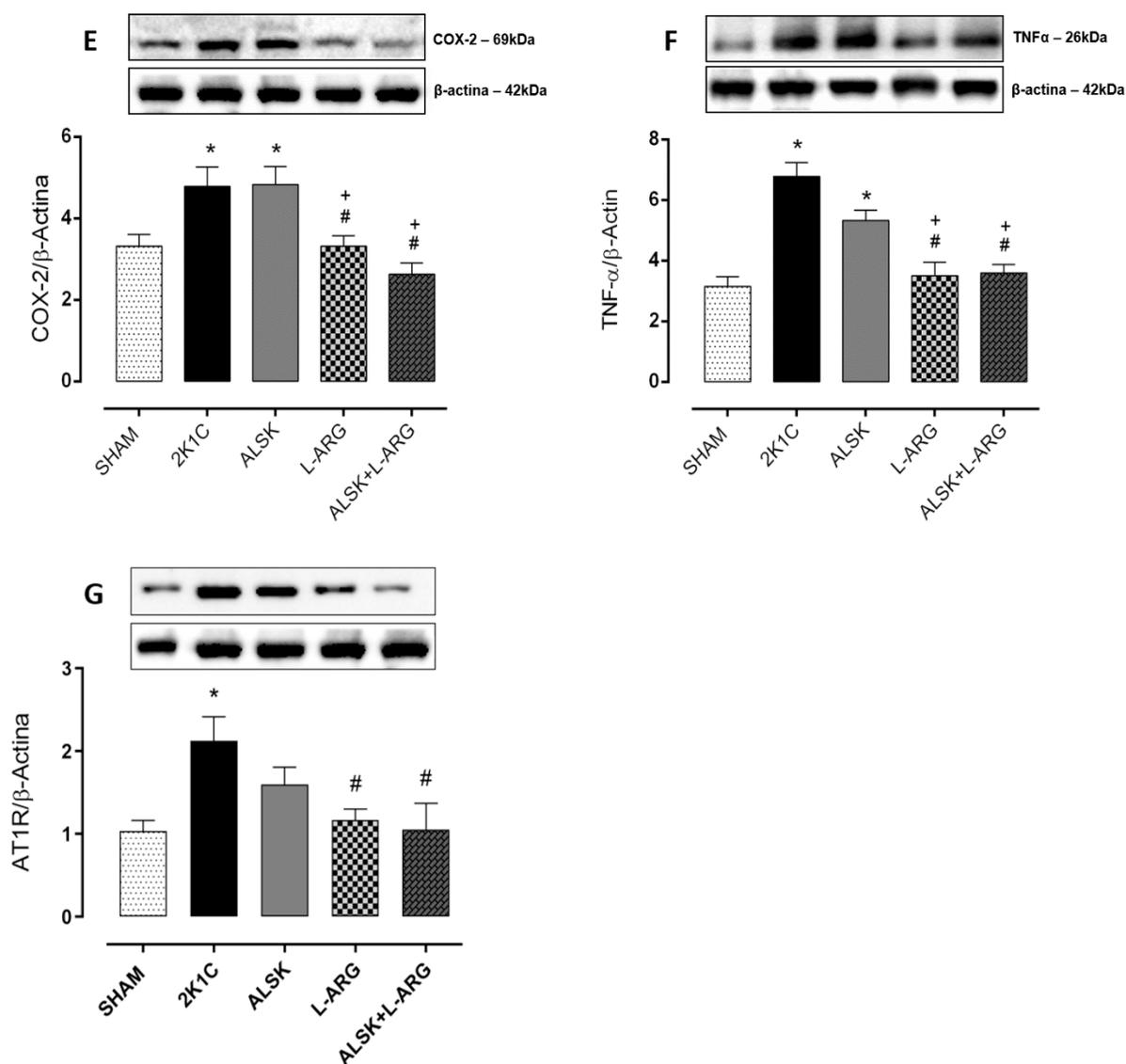


Figura 18. Efeitos do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e a associação de alisquireno e L-arginina (ALSK+L-ARG) sobre a expressão proteica da eNOS (A), iNOS (B), SOD-2 (C), catalase (D), COX-2 (E), TNF- α (F) e AT1R (G) no leito vascular mesentérico. Na parte lateral estão as bandas representativas da expressão proteica. Valores expressos em média \pm EPM entre a densidade das bandas de eNOS, iNOS, SOD-2, catalase, COX-2, TNF- α e AT1R corrigidos pela β -actina; (n = 8 por grupo). * P < 0.05 em relação ao grupo SHAM; # P < 0.05 em relação ao grupo 2K1C; + P < 0.05 em relação ao grupo ALSK.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo forneceu três novas descobertas importantes que são relevantes para a consideração do uso da associação de ALSK+L-ARG para a farmacoterapia do tratamento da hipertensão renovascular. O primeiro achado foi uma significativa melhora nas respostas vasculares após 21 dias de tratamento, atingindo valores estatisticamente semelhantes ao grupo SHAM. O segundo achado foram os benefícios no remodelamento vascular da artéria mesentérica superior. O terceiro achado foi a redução do estresse oxidativo e aumento da produção e/ou biodisponibilidade do NO no leito mesentérico.

Existem diferentes grupos farmacológicos sendo utilizados na prática clínica de modo a contrapor-se ao SRAA, como os IECA, BRAs e o alisquireno, um inibidor direto de renina (Gradman; Kad, 2008). Adicionalmente, tem se investigado a capacidade do fármaco em aumentar a biodisponibilidade de NO e diminuir o estresse oxidativo. Diante disto, escolhemos um medicamento que atua bloqueando o SRAA, o alisquireno, e o aminoácido L-arginina, precursor da síntese do principal vasodilatador derivado do endotélio, o NO, para avaliar seus efeitos isolados e associados sobre a reatividade vascular mesentérica, remodelamento vascular e a participação do sistema antioxidante e inflamatório de ratos com hipertensão renovascular, o que poderia propor uma nova abordagem terapêutica contra a progressão da doença, ou pelo menos contribuir para uma melhor elucidação dos componentes que envolvem a fisiopatologia da hiper-ativação do SRAA. Mediante estas informações, a importância desse estudo reside no fato de avaliar e tornar mais conhecido o efeito do tratamento por 21 dias de alisquireno e L-arginina de forma isolada e associada na hipertensão renovascular sobre o sistema cardiovascular.

6.1 EFEITOS SOBRE OS NÍVEIS PRESSÓRICOS

Os resultados mostraram que o tratamento com alisquireno de forma isolada não promove efeitos anti-hipertensivos no modelo de hipertensão 2K1C; achado esse que se repete em outros trabalhos do laboratório. Uma provável explicação para esse achado poderia se relacionar ao fato de que existem vias alternativas para a formação de Ang II, não dependentes de ECA, que estão envolvidas na

ativação do SRAA (Strasser *et al.*, 2007). Além da ECA, a quimase pode atuar sobre a Angio I e formar Angio II, que também pode ser formada a partir do angiotensinogênio pela via da catepsina G e da tonina (Atlas, 2007). Sendo assim, depois de formada a Ang II pode se ligar a seus receptores AT1 e promover sua ação.

Adicionalmente, uma ação intermediária de outras enzimas da família das angiotensinas podem estar atuando na manutenção dos níveis pressóricos elevados como na retenção de sódio e água por intermédio da Angiotensina III (Martins *et al.*, 2013; Bader, 2010). No entanto, não podemos contestar a hipótese de que uma dose mais elevada de alisquireno do que a utilizada neste estudo poderia provocar redução da pressão arterial. Como demonstrado no estudo desenvolvido por Hermanowicz *et al.* (2013) que utilizou alisquireno nas doses de 10, 30 e 100mg.kg⁻¹.dia⁻¹ por 10 dias em ratos 2K1C e só com a maior dose houve redução da PAS. Além disso, o estudo de Martins *et al.* (2013) utilizou a mesma dose utilizada em nosso estudo e observou que após 3 semanas de tratamento, a PAS não foi reduzida, porém após 4 semanas houve uma redução significativa da PAS. Rashikh *et al.* (2012) demonstraram que a terapia apenas com alisquireno foi capaz de reduzir o aumento da frequência cardíaca e pressão arterial justificando o uso do mesmo como fármaco anti-hipertensivo, porém, em doses mais elevadas. Adicionalmente, a ativação do SRAA aumenta o estresse oxidativo principalmente pelo aumento das concentrações de Ang II circulante (Braga *et al.*, 2008; Botelho-Ono *et al.*, 2011). O bloqueio do SRAA pode reduzir o estresse oxidativo, reduzindo assim o dano oxidativo celular, corroborando com alguns estudos anteriores que apontam para um possível efeito antioxidante do alisquireno (Rashikh *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2013).

Por outro lado, a administração isolada de L-arginina foi capaz de reduzir, apesar de não normalizar, a PAS de ratos com hipertensão renovascular (Gouvea *et al.*, 2004; 2008; Santuzzi *et al.*, 2014; Tiradentes *et al.*, 2015), corroborando com nossos achados, demonstrando dessa forma que o tratamento com L-arginina apresenta significativo efeito sobre a redução dos níveis pressóricos, e sobretudo, na proteção de órgãos-alvo, considerando sua capacidade de aumentar a disponibilidade de NO e diminuir o estresse oxidativo (Deng *et al.*, 1995; Ackermann

et al., 1998; Mengal *et al.*, 2015). Esse fato aponta para o tratamento com L-arginina como promissor na redução da hipertensão arterial.

Vários mecanismos poderiam justificar as ações do tratamento com L-arginina, um deles seria o aumento na formação de NO no rim. O aumento na formação de NO pode ser um componente importante na reversão da hipertensão renovascular 2K1C por facilitar a reperfusão renal, cardíaca e promover vasodilatação sistêmica. Assim como tem sido demonstrado que o NO contribui para ambas as fases, inicial e crônica da hipertensão 2K1C, uma vez que o seu efeito vasodilatador é capaz de reduzir a hipertensão e manter a perfusão para ambos os rins por contrabalancear a vasoconstrição independente da Ang II (Sigmon; Beierwaltes, 1998). Adicionalmente, existe um efeito benéfico na L-arginina sobre o controle da pressão arterial, uma vez que o aumento da biodisponibilidade de NO está relacionado a ações antioxidantes, por interações diretas entre NO e EROs.

Achados anteriores do nosso laboratório mostram que a combinação destas terapias resultou não apenas na redução significativa da hipertensão arterial, mas também melhorando a diurese e natriurese nos animais hipertensos tratados, reversão da hipertrofia cardíaca, aumento da massa do rim clipado e redução significativa da atividade da ECA no plasma, coração e rim cuja artéria renal recebeu o clipe e melhora na função barorreflexa (Santuzzi *et al.*, 2014; Tiradentes *et al.*, 2015; Mengal *et al.*, 2015).

6.2 EFEITOS SOBRE A MORFOLOGIA VASCULAR

A hipertensão arterial é considerada uma doença inflamatória crônica que apresenta elevada prevalência em nível mundial. Normalmente, é associada a 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, 2012), que resultam no desenvolvimento de doenças e complicações cardiovasculares (Perticone *et al.*, 2001; Schiffrin, 2018).

Os níveis elevados da pressão arterial são decorrentes de diversos fatores, inclusive do aumento da resistência vascular de artérias localizadas na parte distal

da vasculatura arterial, e o diâmetro dessa vasculatura tem fundamental importância no aumento da resistência (Christensen; Mulvany, 2001).

Em nosso estudo, observamos alterações estruturais e mecânicas na artéria mesentérica superior de ratos com hipertensão 2K1C. Esses achados foram acompanhados pela diminuição da deposição de colágeno na parede das artérias mesentéricas após os tratamentos, que é, pelo menos em parte, responsável pela rigidez arterial. Entretanto sobre a espessura da parede do vaso, apenas os tratamentos com L-arginina (L-ARG e ALSK+L-ARG) foram efetivos em reduzir a hipertrofia causada pela hipertensão renovascular.

Através do aumento da produção de Ang II, a ativação do SRAA desempenha um papel importante no desenvolvimento das alterações funcionais e estruturais das artérias resistentes em hipertenso (Savoia et al., 2011). Estudos experimentais e clínicos demonstraram que o remodelamento vascular de pequenas artérias de resistência pode ser normalizado pelo tratamento com drogas que antagonizam o SRAA (IECA e BRA) (Agabiti-Rosei et al., 2009). Isso pode ser devido em parte à redução da pressão arterial, bem como ao antagonismo dos efeitos mediados por Ang II na vasculatura, incluindo vasoconstrição, crescimento celular e inflamação (Sharifi et al., 1998; Li et al., 1997). Em particular, foi demonstrado que a ECA melhora o remodelamento vascular em pacientes hipertensos, independentemente do controle da pressão arterial (Sharifi et al., 1998).

O remodelamento vascular induzido pela hipertensão está associado a uma resposta pró-inflamatória aumentada, crescimento celular e fibrose na parede vascular (Schiffrin, 2004; Mulvany, 2002). A ang II pode promover fibrose vascular e remodelamento através de vários mecanismos, incluindo a inibição da atividade da eNOS (Cai; Harrison, 2000). Dados de estudos clínicos e experimentais indicam que os medicamentos que aumentam a atividade da eNOS desempenham um papel protetor no sistema cardiovascular através do aumento da produção de NO (Forstermann; Munzel, 2006; Schmerbach et al., 2010). Esse resultado também foi encontrado em nossos achados. A inflamação vascular e a remodelação induzidas por sistemas neuro-hormonais, incluindo o SRAA, podem envolver a ativação da sinalização intracelular relacionada ao aumento da produção de EROs (Touyz; Briones, 2011).

Em ratos hipertensos dependentes de Ang II, o tratamento com superóxido dismutase (SOD) encapsulado em lipossomos, miméticos de SOD ou vitaminas antioxidantes reduziu a produção de espécies reativas vasculares de oxigênio, diminuição da pressão arterial, remodelamento vascular regressado e melhora da função endotelial (Laursen et al., 1997; Chen et al., 2001). $O_2^{\bullet-}$ gerado por NAD(P)H oxidase contribui para o aumento do crescimento de células do músculo liso vascular mediado por Ang II na hipertensão (Touyz et al., 2002; Griendling et al., 2000a). Ambos $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 são mitógenos potentes que provocam efeitos via MAP cinases (p38 MAP cinase, JNK, ERK-5) e tirosina cinases (Src, JAK2, STAT, p21Ras, Pyk2 e Akt), através da transativação de tirosina cinases receptoras e aumentando expressão de genes indutores de crescimento (Griendling et al., 2000b). O bloqueio da atividade da NAD(P)H oxidase inibe a hipertrofia das células musculares lisas induzidas por Ang II e diminui o remodelamento vascular (Touyz et al., 2002; Griendling et al., 2000a), apoiando um papel importante das espécies reativas de oxigênio como indutores do remodelamento vascular patogênico encontrado na hipertensão.

Nesse contexto, o NO desempenha um papel antioxidante ao neutralizar o estresse oxidativo (Giordano, 2005; Gamboa et al., 2007) e, portanto, pode contribuir para a melhora do remodelamento cardiovascular e da função endotelial.

6.3 EFEITOS SOBRE A DISFUNÇÃO VASCULAR

Além das alterações estruturais, alterações na regulação vasomotora devido ao aumento da vasoconstrição e/ou diminuição da vasodilatação, podem estar contribuindo para o aumento da resistência periférica e, conseqüentemente, para a elevação da pressão arterial em resposta a múltiplos estímulos.

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 $O_2^{\bullet-}$ (Tang; Vanhoutte, 2010). Portanto, a consequência final pode ser aumento das respostas contráteis e/ou diminuição das respostas vasodilatadoras.

Conforme observado em nossos resultados, os animais do grupo 2K1C apresentaram uma hipercontratibilidade em relação aos demais grupos. Sugere-se

que a hipertensão 2K1C pode desencadear um desequilíbrio na síntese e/ou na liberação de fatores endoteliais responsáveis pela vasomotricidade.

Dos muitos agonistas vasoconstritores envolvidos na hiper-responsividade vascular na hipertensão, a Ang II parece ser uma dos mais importantes, uma vez que a reatividade vascular à Ang II foi, na maioria das vezes, aumentada em modelos de hipertensão experimental e humana (Touyz; Tolloczko; Schiffrin, 1994; Schiffrin; Deng, Laroche, 1993). Esses efeitos podem ser diretos ou indiretos através do aumento da atividade simpática (Dendorfer et al., 2002). A regulação da contração vascular induzida por Ang II é geralmente atribuída a um aumento mediado pela proteína G na concentração de Ca^{2+} citoplasmático livre, que é o mecanismo de ativação da maquinaria contrátil das células do músculo liso vascular. Estudos em artérias intactas e células musculares vasculares isoladas de ratos hipertensos experimentalmente demonstraram que muitos dos eventos mediados por Ang II são regulados e contribuem, pelo menos em parte, para o aumento da reatividade, vasoconstrição exagerada e aumento do tônus vascular na hipertensão.

Por outro lado, no presente estudo, observou-se que os tratamentos com L-arginina ou sua associação com alisquireno (ALSK+L-ARG) promoveram uma diminuição, dose dependente, da reatividade à norepinefrina no leito mesentérico comparado ao grupo 2K1C.

Uma vez que o endotélio funciona como importante regulador do tônus vascular através da liberação de substâncias vasoconstritoras e vasodilatadoras, estudos apontam para um desequilíbrio em diversas condições patológicas no controle vasomotor, inclusive na hipertensão (Luscher *et al.*, 1992; Triggle *et al.*, 2003). No presente trabalho pode-se pressupor que há alteração endotelial advinda da hipertensão renovascular e que os tratamentos, principalmente os tratamentos com L-arginina (L-ARG e ALSK+L-ARG), sejam capazes de restaurar o desequilíbrio na síntese, na liberação e/ou no efeito de algum desses mediadores capazes de relaxar ou contrair o músculo liso vascular, tendendo a uma melhora nesses componentes e conseqüentemente no controle da pressão arterial.

A partir das alterações observadas nas respostas contráteis, que demonstram um desequilíbrio na função endotelial, foi investigado como a hipertensão 2K1C e os diferentes tratamentos propostos alterava o relaxamento

vascular dependente do endotélio. Para isto, foram realizadas curvas dose-resposta a acetilcolina, que promove relaxamento dependente do endotélio, no leito mesentérico. Nossos achados demonstram que todos os tratamentos foram capazes de restaurar o relaxamento dependente do endotélio, sugerindo uma preservação na resposta vasodilatadora dependente do endotélio, ou seja, foi capaz de prevenir o prejuízo na produção e/ou liberação de NO pela acetilcolina promovida pela hipertensão renovascular.

No modelo experimental de hipertensão 2K1C ocorre disfunção endotelial com geração de espécies reativas de oxigênio e menor biodisponibilidade de NO (Arruda *et al.*, 2005). Neste sentido, nossos resultados demonstram que os tratamentos foram eficientes em aumentar a produção *in situ* de NO em artérias mesentéricas superior e de resistência. No entanto, a monoterapia com alisquireno foi capaz de reduzir o estresse oxidativo apenas na artéria mesentérica superior, o que em parte pode contribuir para a melhora do remodelamento vascular observado nesse grupo e conseqüentemente nas respostas vasculares.

O peróxido de hidrogênio produzido na reação dismutase de O₂ pela superóxido dismutase (SOD) tem sido extensivamente estudado (Rubanyi, 1988, Touyz *et al.*, 2018). Dependendo da sua concentração, o H₂O₂ pode ativar as vias de sinalização que levam ao relaxamento vascular (Sato *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2012). Nesse sentido, o tratamento com L-arginina e alisquireno aumentou os níveis de SOD o que poderia estar contribuindo na redução das respostas contráteis à norepinefrina e melhora da função vascular. Observamos também aumento da expressão da catalase nos grupos tratados com L-arginina determinando um importante efeito antioxidante produzido pela L-arginina e uma potencialização do efeito quando associado ao alisquireno.

6.3.1 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).

Neste estudo, o L-NAME, em leito mesentérico de ratos 2K1C tratados com alisquireno, L-arginina ou a combinação de ambos potencializou a resposta vasoconstritora à norepinefrina em todos os grupos analisados, entretanto, essa resposta foi potencializada em maior proporção nos grupos tratados com L-arginina (L-ARG e ALSK+L-ARG) quando comparado ao grupo 2K1C. Esse fato sugere que o tratamento com L-arginina em leito mesentérico além de diminuir a reatividade vascular, aumenta a modulação endotelial na resposta contrátil a norepinefrina por aumentar a biodisponibilidade de NO, mostrando efetividade na melhora das respostas contráteis e inclusive dilatadora. Corroborando com os dados funcionais, os resultados obtidos através da produção local de NO também se mostrou aumentada nos grupos tratados com L-arginina, assim como na expressão proteica de eNOS e redução de iNOS em artérias mesentéricas desses grupos. A iNOS, cuja expressão é dificilmente detectada em células endoteliais vasculares e de músculo liso em condições fisiológicas (Wu; Tyml; Wilson, 2008), pode ter sua expressão aumentada após estimulação inflamatória ou de citocinas, o que contribui para lesão vascular e aumento do estresse oxidativo (Xia; Zweier, 1997; Chatterjee; Catravas, 2008). Nesse contexto, o tratamento isolado com alisquireno não foi capaz de aumentar a expressão proteica de eNOS, assim como não foi eficiente em reduzir a expressão proteica de iNOS e de proteínas inflamatórias. Respondendo na mesma ineficiência em diminuir o estresse oxidativo local de artérias de resistência. Esses resultados podem explicar, pelo menos em parte os níveis pressóricos que permanecem altos nos animais tratados em monoterapia com alisquireno.

Além disso, estudos anteriores demonstraram que a iNOS é capaz de gerar o superóxido independente da produção de NO (Rochette *et al.*, 2013; Amaral *et al.*, 2013). Sendo assim, parece que os tratamentos propostos nesse estudo são capazes de controlar o aumento da isoforma iNOS no leito mesentérico de ratos com hipertensão renovascular e possivelmente por reduzir respostas inflamatórias locais e estresse oxidativo.

Evidências corroboram com os nossos achados, mostrando que o tratamento com alisquireno aumenta a biodisponibilidade de NO e ainda melhora a

aterosclerose em modelos animais (Imanishi *et al.*, 2008; Nussberger *et al.*, 2008). Adicionalmente, a suplementação oral de L-arginina vem demonstrando ser efetiva no aumento substancial dos níveis de NO e do status antioxidante, tanto em ratos como em humanos (Jablecka *et al.*, 2004; Senbel *et al.*, 2014), dados estes também demonstrados em nossos estudos. Diante destas evidências, podemos sugerir que a redução no estresse oxidativo e conseqüentemente aumento na produção de NO podem ser importantes ferramentas para a melhora nos parâmetros vasculares e, inclusive, na redução da pressão arterial. Resultados esses que parecem ser mediados principalmente pela L-arginina e potencializado quando associado ao alisquireno.

Estudos anteriores corroboram com nossos achados, mostrando que o tratamento com alisquireno aumenta a biodisponibilidade de NO e melhora arteriosclerose em modelos animais (Imanishi *et al.*, 2008; Nussberger *et al.*, 2008), assim como a suplementação oral de L-arginina vem demonstrando ser efetiva no aumento substancial dos níveis de NO e do status antioxidante, tanto em ratos como em humanos (Gouvea *et al.*, 2004; Jablecka *et al.*, 2004).

6.3.2 Modulação da vasomotricidade pelos prostanóides derivados da via da ciclooxigenase (COX)

O efeito inibitório do L-NAME no relaxamento induzido pela ACh não foi modificado pelo bloqueio das PGs derivadas da COX, com base na análise farmacológica utilizando o bloqueio simultâneo com L-NAME e Indo. Entretanto nas respostas vasoconstritoras após o bloqueio com L-NAME+Indo podemos observar um aumento na resposta vasoconstritora induzida pela hipertensão renovascular, resposta essa que foi reduzida apenas no grupo tratado em associação de L-arginina e alisquireno.

Em modelos experimentais de hipertensão foi notada maior expressão da COX-2 e maior participação dos prostanóides contráteis derivados desta via na resposta vascular (Alvarez *et al.*, 2005). Assim, 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; Touyz, 2010b; Martínez-Revelles *et al.*,

2013a; Taddei *et al.*, 1997b). O aumento do estresse oxidativo também 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).

O endotélio vascular é particularmente afetado também pela ação do TNF- α . Após a estimulação pelas citocinas, as células endoteliais sofrem alterações morfológicas resultando num quadro pró-trombótico e pró-inflamatório. O TNF- α é uma citocina pleiotrópica envolvida de forma ampla em atividades biológicas, incluindo inflamação, sobrevivência celular, proliferação celular e, paradoxalmente, morte celular. Há evidências de uma regulação positiva COX-2, após estímulos pró-inflamatórios por intermédio do TNF- α (Quan *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999).

6.4 SUMARIZAÇÃO DOS RESULTADOS

Assim, o efeito antioxidante do alisquireno e sua capacidade em reduzir o estresse oxidativo em artéria mesentérica superior pode ser um importante mecanismo para a melhora no remodelamento vascular encontrado em nossos estudos. Em contrapartida, o aumento da biodisponibilidade de NO e a redução do estresse oxidativo proporcionado pela L-arginina, associada a redução de COX-2 e TNF-alpha pode ser o principal mecanismo pelo qual essa terapêutica além de melhorar função vascular, reduz também os níveis pressóricos. E que, quando associados se potencializam e melhoram todos os parâmetros avaliados, mostrando valores muito semelhantes ao nosso grupo normotenso.

Ao avaliar a expressão proteica do receptor AT1 e os dados na literatura científica, podemos sugerir que a resposta reduzida produzida pelos tratamentos responde aos parâmetros morfológicos e estruturais apresentados nesse trabalho, uma vez que a redução (mas não normalização quando comparado ao grupo SHAM) produzida pelo ALSK mostra-se efetiva em reduzir deposição de colágeno, estresse oxidativo em artéria mesentérica superior e melhora parcial da reatividade vascular. O tratamento com L-ARG e ALSK+L-ARG mostram valores de expressão de AT1 muito parecidos ao grupo SHAM e todas as respostas com esses tratamentos apresentaram melhora quando comparado ao 2K1C. Assim, o papel

da Ang II nos efeitos deletérios proporcionados pela hipertensão 2K1C pode ser, pelo menos em parte atribuídos a disfunção homeostática na modulação sobre a biodisponibilidade do NO e da inflamação/prostanóides.

7. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo revelam que a hipertensão renovascular promove disfunção endotelial e que, provavelmente essa disfunção é resultado de um desbalanço entre o estresse oxidativo, inflamação e redução da produção e/ou da biodisponibilidade de óxido nítrico. A angiotensina II é reconhecidamente capaz de estimular processos biológicos que desencadeiam aumento de estresse oxidativo e inflamação, que em conjunto se potencializam na degradação do óxido nítrico. Assim, o tratamento com alisquireno foi efetivo em impedir o aumento da deposição de colágeno e reduzir o estresse oxidativo em artéria mesentérica superior. O tratamento com L-arginina mostra-se eficiente na redução do estresse oxidativo e inflamação e aumenta a biodisponibilidade de óxido nítrico. Quando associados, são eficientes em melhorar padrões estruturais, funcionais e moleculares de animais com hipertensão renovascular, possivelmente por uma amplificação de seus efeitos isolados.

A melhora da resposta vasodilatadora apresentada pelo alisquireno não foi correspondente às respostas contráteis no leito mesentérico, provavelmente decorrente de um aumento na expressão proteica de Catalase, iNOS, COX-2 e TNF- α e consequente prejuízo nos fatores homeostáticos derivados do endotélio. A melhora na reatividade vascular após o tratamento com L-arginina é acompanhado de aumento das expressões proteicas de eNOS, SOD e Catalase, assim como uma redução na iNOS, COX, TNF- α e AT1 sugerindo que, os efeitos vasculares da hipertensão 2K1C são dependentes do endotélio e envolvem a redução da produção e/biodisponibilidade do NO.

A associação terapêutica de alisquireno e L-arginina mostra uma potencialização desses efeitos, demonstrando uma clara melhora nos parâmetros avaliados nesse trabalho. Portanto, nossos dados revelam os efeitos benéficos do alisquireno associado a L-arginina e que essa nova proposta de tratamento, além de reduzir os níveis pressóricos, também é capaz de melhorar a reatividade vascular mesentérica, a parâmetros morfológicos e funcionais do artéria mesentérica e a uma redução no estresse oxidativo e inflamação com consequente aumento da produção/biodisponibilidade de NO, o que levaria a proteção de órgãos-alvo.

REFERÊNCIAS

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

Aird W.C. Endothelium as an organ system. *Critical Care Medicine*, 32(5): p.271-279, 2004.

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

Alvaréz Y., Briones A.M., Hernanz R., Pérez G.J.V., Alonso M.J., Salaceis M. Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. *British Journal of Pharmacology*, 153: p.926-935, 2008.

Alvaréz Y., Pérez G.J.V., Hernanz R., Briones A.M., Garcíaedondo A., Beltrán A., Alonso M.J., Salaceis M. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2-derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 321 (1): p.381-388, 2007.

Amaral L.M., Pinheiro L.C., Guimaraes D.A., Palei A.C., Sertório J.T., Portella R.L., *et al.* Antihypertensive effects of inducible nitric oxide synthase inhibition in experimental pre-eclampsia. *J. Cell. Mol. Med.*, 17(10): p.1300-1307, 2013.

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

Angeli F., Reboldi G., Poltronieri P., Angeli E., De Filippo V., Crocetti A., Bartolini C., D'Ambrosio C., Verdecchia P. Efficacy and Safety Profile of Aliskiren: Practical Implications for Clinicians. *Current. Drug. Safety*, 9: p.106-117, 2014.

Ansari H.R., Nadeem A., Tilley S.L., Mustafa S.J. Involvement of COX-1 in A3 adenosine receptor-mediated contraction through endothelium in mice aorta. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 293: p.3448-3455, 2007.

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

Arenas L.A.S., Zurbarán C.B. La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. *Salud Uninorte*, 16: p 9-18, 2002.

Arribas, S.M., Hinek A., González, M.C. Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacology & Therapeutics*, 111(3): p.771-791, 2006.

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

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

Avezum Á., Perel P., Oliveira G.B.F., Lopez-jaramillo P., Restrepo G., Loustalot F., Srur A., Noval R.D. La, Connell K.I., Cruz-flores S., Moura L. De, Castellac G., Mattos A.C., Ordunez P. Challenges and Opportunities to Scale Up Cardiovascular Disease Secondary Prevention in Latin America and the Caribbean. *Global Heart*, p.1-9, 2017.

Bader M. Tissue renin–angiotensin–aldosterone systems: targets for pharmacological therapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 50: p.439–465, 2010.

Barbosa K.B.F., Costa N.M.B., Alfenas R. de C.G., Paula S.O. DE, Minim V.P.R., Bressan J. Estresse oxidativo : conceito, implicações e fatores modulatórios Oxidative stress : concept , implications. *Rev. Nutr.*, 23(4): p.629-643, 2010.

Barreiros A.L.B.S., David J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quimica Nova*, 29(1): p.113-123, 2006.

Bedard K., Krause K.H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*, 87(1): p.245-313, 2007.

Belo V.A., Guimarães D.A., Castro M.M. Matrix metalloproteinase 2 as a potential mediator of vascular smooth muscle cell migration and chronic vascular remodeling in hypertension. *Journal of Vascular Research*, 52(4): p.221-231, 2015.

Benjamin E.J., Virani S.S., Callaway C.W., Chamberlain A.M., Chang A.R., Cheng S., et al. Heart disease and stroke statistics - 2018 update: A report from the American Heart Association. *Circulation*, 137(12): e67-e492, 2018.

Bertolami M.C., Bertolami A. Epidemiologia das dislipidemias. *Rev. Soc. Cardiol.*, 16(1): p.24-30, 2006.

Blacher J., Levy B.I., Mourad J., Safar M.E., Bakris G. From epidemiological transition to modern cardiovascular epidemiology : hypertension in the 21st century. *The Lancet*, 6736(16): p.5-7, 2016.

Bolego C., Buccellati C., Prada A., Gaion R.M., Folco G., Sala A. Critical role of COX-1 in prostacyclin production by human endothelial cells under modification of hydroperoxide tone. *Faseb J.*, 23: p.605-612, 2009.

Bortolotto L.A., Malachias M.V.B. Novos medicamentos na hipertensão resistente. *Rev. Bras. Hipertens.*, 16(supl. 1): p.13-5, 2009.

Botelho-Ono M.S., Pina H.V., Sousa K.H.F., Nunes F.C., Medeiros I.A., Braga V.A. Acute superoxide scavenging restores depressed baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. *Auton. Neurosci.*, 159: p.38-44, 2011.

Braga V.A., Burmeister M.A., Zhou Y., Sharma R.V., Davisson R.L. Selective ablation of AT1a receptors in rostral ventrolateral medulla (RVLM) prevents chronic angiotensin-II-dependent hypertension in part by reducing oxidant stress in this region. *Hypertension*, 52(36), 2008.

Briones A. M., Touyz R.M. Oxidative Stress and Hypertension: Current Concepts. *Current Hypertension Reports*, 12(2): p. 135-142, 2010.

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

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

Campos R.R., Oliveira-Sales E.B., Nishi E.E., Boim M.A., Dolnikoff M.S., Bergamaschi C.T. The role of oxidative stress in renovascular hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 38(2): 144-152, 2011.

Cannon R. O. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin. Chem.*, 44(8 Pt 2): p. 1809-1819, 1998.

Carlstrom M. Causal link between neonatal hydronephrosis and later development of hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 37(2): p.14-23, 2010.

Carvalho R.A., Sousa R.P.B., Cadete V.J.J., Lopaschuk G.D., Palmeira C.M.M., Bjork J.A., Wallace K.B. Metabolic remodeling associated with subchronic doxorubicin cardiomyopathy. *Toxicology*, 270(2-3): p.92-8, 2010.

Castro M.M., Rizzi E., Figueiredo-Lopes L., et al. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. *Atherosclerosis*, 198: p.320-331, 2008.

Castro M.M., Rizzi E., Rodrigues G.J., et al. Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(9): p.1298-1307, 2009.

Chatterjee A., Catravas J.D. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascular pharmacology*, 49(4-6): p.134-40, 2008.

Chen G., Madeira E.G., Wang S.H., Warner T.D. A expressão de ciclooxygenase-2 em células do músculo liso vascular de rato não está relacionada à ativação do fator-kappaB nuclear. *Life Sci.*, 64: p.1231-1242, 1999.

Chen X., Touyz R.M., Park J.B., Schiffrin E.L. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension*, 38(3 Pt 2): p.606-611, 2001.

Chenevard R., Hurlimann D., Bechir M., Enseleit F., Spieker L., Hermann M., *et al.* Selective COX-2 inhibition improves endothelial function in coronary artery disease. *Circulation*, 107: p.405-409, 2003.

Chobanian A.V., Bakris G.L., Black H.R., Cushman W.C., Green L.A., Izzo J.L.Jr., Jones D.W., Materson B.J., Oparil S., Wright J.T.Jr., Roccella E.J., National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure, National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the J.N.C. 7 report. *JAMA*, 289(19): p.2560-2572, 2004.

Christensen, K.L. Location of Resistance Arteries. *Journal of Vascular Research*, 38(1): p.1012, 2001.

Cines B.D.B., Pollak E.S., Buck C.A., Loscalzo J., Zimmerman G.A., Mcever R.P., Pober J.S., Wick T.M., Konkle B.A., Schwartz B.S., Barnathan E.S., Mccrae K.R., Hug B.A., Schmidt A., Stern D.M. Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. *The American Society of Hematology*, 91(10): p.3527-3561, 1998.

Constantine V.S., Mowry R.W. The Selective Staining of Human Dermal Collagen. II – the use of Picrosirius Red F3BA with Polarization Microscopy. *Journal of Investigative Dermatology*, 50: P.419-424, 1968.

Cosentino F., Eto M., Paolis P., Van Der Loo B., Bachschmid M, Ullrich V., *et al.* High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation*, 107: p.1017-1023, 2003.

Danser A.H. (Pro)renin receptors: Are they biologically relevant? *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 18(1): p.74-78, 2009.

Davidge S.T. Prostaglandin H syntase and vascular function. *Circulation Research*, 89: p.650-660, 2001.

Davies K.J.A. The Oxygen Paradox, oxidative stress, and ageing. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 595: p.28-32, 2016.

- Davis J.O. The pathogenesis of chronic renovascular hypertension. *Circ. Res.*, 40(5): p.439-444, 1977.
- Deng X., Welch W.J., Wilcox C.S. Renal vasodilation with L-arginine. *Hypertension.*, 26: p.256- 262, 1995.
- Drummond G. R., *et al.* Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nature reviews. Drug discovery*, 10(6): p.453-71, 2011.
- Duncan B.B., Schmidt M.I., Giugliani E.R.J. Medicina Ambulatorial: condutas de atenção primária baseadas em evidências. *Artmed*, 3: p.269-275, 2006.
- Evans P., Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *The British journal of nutrition*, 85(Suppl. 2): p.67-74, 2001.
- Féléto M., Huang Y., Vanhoutte P.M. Vasoconstrictor prostanoids. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 459(6): p.941-50, 2010.
- Féléto M., Vanhoutte P.M. EDHF: an update. *Clin. Sci.*, 117(4): p.139-155, 2009.
- Féléto M., Verbeuren T.J., Vanhoutte P.M. Endothelium-dependent contractions in SHR: a tale of prostanoid TP and IP receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 156: p.563-574, 2009.
- Finkel T., Holbrook N.J. Biology of Ageing. *Nature*, 408: p.239-247, 2000.
- Flohr H., Breull W., Dahners H.W., Redel D., Conradi H., Stoepel K. Regional distribution of vascular resistance in two models of experimental renovascular hypertension. *Pflugers Arch.*, 362(2): p.157-64, 1976.
- Forstermann U., Closs E.L., Pollock J.S., Nakane M., Schwartz P., Gath I., Kleinert H. Nitric oxide syntase isozymes: characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, 23: p.1121-1131, 1994.
- Friedrich S., Schmieder R.E. Review of direct renin inhibition by aliskiren. *Journal of the Renin-Angiotensin- Aldosterone System*, 14(3): p.193-196, 2013.
- Frolich J.C., Forstermann U. Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance: advanced prostaglandin. *Tromboxane and leukotriene research*, 19: p.211-215, 1989.
- Furchgott R. F., Zawadzki J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789): p. 373-376, 1980.
- Giles G.I., Nasim M.J., Ali W., Jacob C. The Reactive Sulfur Species Concept. *Antioxidants*, 6(2): p.1-29, 2017.

Gluais P., Lonchamp M., Morrow J.D., Vanhoutte P.M., Feletou M. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. *Br. J. Pharmacol*, 146(6): p.834-45, 2005.

Goldblatt H., Lynch J., Hanzal R.F., Summerville W.W. Studies on experimental hypertension. I: the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *Journal of Experimental Medicine*, 59: p.347-380, 1934.

Goodfriend T.L., Elliott M.E., Catt K.J. Angiotensin receptors and their antagonists. *N. Engl. J. Med.*, 334: p.1649-54, 1996.

Gouvea S.A., Bissoli N.S., Moysés M.R., Cicilini M.A., Pires J.G.P., Abreu G.R. Activity of Angiotensin-Converting Enzyme After Treatment with L-Arginine in Renovascular Hypertension. *Clinical and experimental hypertension*, 56: p.569-579, 2004.

Gouvea S.A., Moysés M.R., Bissoli N.S., Pires J.G.P., Cabral A.M., Abreu G.R. Oral administration of L-arginine decreases blood pressure and increases renal excretion of sodium and water in renovascular hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36(7): p.943-949, 2003.

Gradman A.H., Kad R. Renin Inhibition in Hypertension. *JACC*, 51(5): p.519-528, 2008.

Griendling K.K., Minieri C.A., Ollerenshaw J.D., Alexander R.W. Angiotensin II stimulates NADH and NAD(P)H oxidase activity in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, 86: p.494-501, 2000.

Griendling K.K., Sorescu D., Ushio-Fukai M. NADPH oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circulation Research*, 86: p.494-501, 2000.

Griendling K.K., Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in Cardiovascular biology and disease. *Circulation Research*, 74: p.1141-1148, 1994.

Griendling K.K., Ushio-Fukai M. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regulatory Peptides*, 91: p.21-27, 2000.

Grizzo L.T., Cordelline S. Perinatal exposure affects nitric oxide and cyclooxygenase pathways in aorta of weaned rats. *Toxicological Sciences*, 1: p.207-214, 2008.

Grosser T., Yu Y., Fitzgerald G.A. Emotion recollected in tranquility: lessons learned from the COX-2 saga. *Annu. Rev. Med.*, 61: p.17-33, 2010.

Grote, K., Flach, I., Luchtefeld, M., *et al.* Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via

NAD (P) H oxidases-derived reactive oxygen species. *Circulation Research*, 92(11): p.80-86, 2003.

Guimaraes D.A., Rizzi E., Ceron C.S., *et al.* Doxycycline dose-dependently inhibits MMP-2-mediated vascular changes in 2K1C hypertension. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 108: p318-325, 2011.

Guyton & Hall tratado de fisiologia médica. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017
Halliwell, 2006 - Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology*, 141(6): p.312-322, 2006.

Harrinson D.G., Gongora M.C. Oxidative stress and hypertension. *The Medical Clinicals and North America*, 93: p.621-635, 2009.

Harrison J.L., Hildreth C.M., Callahan S.M., Goodchild A.K., Phillips J.K. Cardiovascular autonomic dysfunction in a novel rodent model of polycystic kidney disease. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 152(1-2): p.60-66, 2010.

Hermanowicz J.M., Hermanowicz A., Buczko P., Leszczynska A., Tankiewicz-Kwedlo A., Mogielnicki A., Buczko W.; Aliskiren inhibits experimental venous thrombosis in two-kidney one-clip hypertensive rats. *Thromb. Res.*, 131(1): p.39-44, 2013.

Hermanowicz J.M., Hermanowicz A., Buczko P., Leszczynska A., Tankiewicz-Kwedlo A., Mogielnicki A., Buczko W. Aliskiren inhibits experimental venous thrombosis in two-kidney one-clip hypertensive rats. *Thromb. Res.*, 131(1): p.39-44, 2013.

Hermanowicz J.M., Hermanowicz A., Buczko P., Leszczynska A., Tankiewicz-Kwedlo A., Mogielnicki A., Buczko W. Aliskiren inhibits experimental venous thrombosis in two-kidney one-clip hypertensive rats. *Thromb. Res.*, 131(1): p.39-44, 2013.

Higashi Y., Sasaki S., Nakagawa K., Matsuura H., Oshima T., Chayama K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *The New England Journal of Medicine*, 346: p.1954-1962, 2002.

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

Imanishi T., Tsujioka H., Ikejima H., Kuroi A., Takarada S., Kitabata H., Tanimoto T., Muragaki Y., Mochizuki S., Goto M., Yoshida K., Akasaka T. Renin inhibitor aliskiren improves impaired nitric oxide bioavailability and protects against atherosclerotic changes. *Hypertension*, 52(3): p.563-72, 2008.

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*, 3: p.312-8, 2000.

Irigoyen M.C., Consolim-Colombo F.M., Krieger E.M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. *Rev. Bras. Hipertens.*, 8(1): p.55-62, 2001.

Jabłocka A., Chęciński P., Krauss H., Micker M. Ast J. The influence of two different doses of L-arginine oral supplementation on nitric oxide (NO) concentration and total antioxidant status (TAS) in atherosclerotic patients. *Med. Sci. Monit.*, 10(1): p.29-32, 2004.

Jia G., Aroor A.R., Jia C., Sowers J.R. Endothelial cell senescence in aging-related vascular dysfunction. *Molecular Basis of Disease*, 1865(7): p1802-1809, 2019.

Kawabata K., Yoshioka Y., Terao J. Role of Intestinal Microbiota in the Bioavailability and Physiological Functions of Dietary Polyphenols. *Molecules*, 24(2): p.1-25, 2019.

Kirkby N.S., Lundberg M.H., Harrington L.S., Leadbeater P.D., Milne G.L., Potter C.M., et al. Cyclooxygenase-1, not cyclooxygenase-2, is responsible for physiological production of prostacyclin in the cardiovascular system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 109: p.17597-17602, 2012.

Kobori H., Nangaku M., Navar L.G., Nishiyama A. The intrarenal reninangiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacology Review*, 59(3): p.251-287, 2007.

Kopp U.C., Jones S.Y., DiBona G.F. Afferent renal denervation impairs baroreflex control of efferent renal sympathetic nerve activity. *The American Journal of Physiology: Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 295(6): p.1882-1890, 2008.

Kyaw, M., Yoshizumi, M., Tsuchiya, K. et al. Atheroprotective effects of antioxidants through inhibition of mitogen-activated protein kinases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25(8): p.977-985, 2004.

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

- Laughlin M. H., Newcomer S. C., Bender S. B. Importance of hemodynamic forces as signals for exercise-induced changes in endothelial cell phenotype. *Journal of applied physiology*, 104(3): p.588-600, 2008.
- Laursen J.B., Rajagopalan S., Galis Z., *et al.* Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation*, 95: p.588-593, 1997.
- Lee H.C., Wei, Y.H. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Experimental biology and medicine*, 232(5): p.592-606, 2007.
- Lewandowski J. Renovascular hypertension: is it only the top of the iceberg? *Pol. Merkuriusz Lek*, 15(88): p.371-375, 2003.
- Li H., Horke S., Förstermann U.; Vascular Oxidative Stress, Nitric Oxide and Atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 237(1): p.208-219, 2014.
- Li M., Kuo L., Stallone J.N. Estrogen potentiates constrictor prostanoid function in female rat aorta by upregulation of cyclooxygenase-2 and thromboxane pathway expression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 294: p.2444-2455, 2008.
- Liu B., Luo W., Zhang Y., Li H., Zhu N., Huang D., *et al.* Involvement of cyclooxygenase-1-mediated prostacyclin synthesis in the vasoconstrictor activity evoked by ACh in mouse arteries. *Exp. Physiol.*, 97: p.277-289, 2012.
- Liu B., Zhou Y. Emerging challenges to the existing paradigm of cyclo-oxygenase pathways in regulating vascular function. *Exp. Physiol.*, 99: p.1-2, 2014.
- Lizakowski S., Tylicki L., Rutkowski B. Direct renin inhibition – a promising strategy for renal protection? *Med. Sci. Monit.*, 19: p.451-457, 2013.
- Lounsbury K.M., Hu Q., Ziegelstein R.C. Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature. *Free Radic. Biol. Med.*, 28: p.1362-1369, 2000.
- Luft F.C. Workshop: mechanisms and cardiovascular damage in hypertension. *Hypertension*, 37: p.594-598, 2001.
- Luscher T.F., Boulanger C.M., Dohi Y., Yang Z. Endothelium- derived contracting factors. *Hypertension*, 19: p.117-130, 1992.
- Madamanchi N.R., Vendrov A., Runge M.S. Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(1): p.29-38, 2005.
- Malachias M.V.B., Jardim P.C.V., Almeida F.A., Júnior E. L, Feitosa G.S. 7^a Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial: Capítulo 7 - Tratamento Medicamentoso. *Arq. Bras. Cardiol.*, 107(3 supl.3), 2016.

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

Martínez R., Avendaño M.S., García R.A.B., Alvarez Y., Aguado A., Pérez G.J.V., García R.L., Esteban V., Redondo J.M., Alonso M.J., Briones A.M., Salaices M. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxidants & redox signaling*, 18(1) p.51-65, 2013.

Martinez-Lemus L.A., Hill M. A., Meininger G. A. The plastic nature of the vascular wall: a continuum of remodeling events contributing to control of arteriolar diameter and structure. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 24(1): p.45-57, 2009.

Martinez-Lemus L.A., Zhao G., Galinanes E.L., Boone, M. Inward remodeling of resistance arteries requires reactive oxygen species-dependent activation of matrix metalloproteinases. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 300: p.2005–2015, 2011.

Martins O.A., Castro M.M., Oliveira D.M., Rizzi E., Ceron C.S., Guimaraes D., Reis R.I., Costa-Neto C.M., Casarini D.E., Ribeiro A.A., Gerlach R.F., Tanus-Santos J.E. Contrasting effects of aliskiren versus losartan on hypertensive vascular remodeling. *Int. J. Cardiol.*, 20, 167(4): p.1199-205, 2013.

McGregor D.D. The Effect of Sympathetic Nerve Stimulation on Vasoconstrictor Responses in Perfused Mesenteric Blood Vessels of the Rat. *Journal of Physiology*, 177: p.21–30, 1965.

McIntyre M., Bohr D.F., Dominiczak A.F. Endothelial function in hypertension: The role of superoxide anion. *Hypertension*, 34: p.539-545, 1999.

Mckeown R.E. The Epidemiologic Transition : Changing Patterns of Mortality and Population Dynamics. *Am J. Lifestyle Med.*, 3: p.19-26, 2009.

Mengal V., Silva P.H., Tiradentes R.V., Santuzzi C.H., de Almeida S.A., Sena G.C., Bissoli N.S., Abreu G.R., Gouvea S.A. Aliskiren and l-arginine treatments restore depressed baroreflex sensitivity and decrease oxidative stress in renovascular hypertension rats. *Hypertens. Res.*, 39(11): p.769-776, 2016.

Michel T., Vanhoutte P.M. Cellular signaling and NO production. *Pflügers arch*, 450(6): p.807-16, 2010.

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*, 11(3): p.323-44, 1977.

Moncada S., Palmer R. M., Higgs E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological reviews*, 43(2): p.109-42, 1991.

- Montezano A.C., *et al.* Oxidative Stress and Human Hypertension: Vascular Mechanisms, Biomarkers, and Novel Therapies. *Canadian Journal of Cardiology*, 31(5): p.631-641, 2015.
- Montezano A.C., Touyz R.M. Molecular mechanisms of hypertension--reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician. *Can. J. Cardiol.*, 28(3): p.288-295, 2012.
- Moon S.K., Cho G.O., Jung S.Y., *et al.* Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells: role of ERK 1/2, cell-cycle regulation, and matrix metalloproteinase-9. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 301(4): p.1069-1078, 2003.
- Mueller C.F.H., *et al.* ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 25(2): p.274-8, 2005.
- Mulvany M. J. Small artery remodelling in hypertension: causes, consequences and therapeutic implications. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 46(5): p.461-467, 2008.
- Mulvany M. J., *et al.* Vascular remodeling. *Hypertension*, 28(3): p.505-6, 1996.
- Musini V.M., Fortin P.M., Bassett K., Wright J.M. Blood pressure lowering efficacy of renin inhibitors for primary hypertension. *Cochrane Database Syst. Rev.*, CD007066, 2008.
- Navar L.G., Harrison B.L.M., Imig J.D., Cervenka L., Mitchell K.D. Renal responses to AT1 receptor blockade. *Am. J. Hypertens.*, 13(1 Pt 2): p.45-54, 2000.
- Navar L.G., Zou L., Von Thun A., Tarng Wang C., Imig J.D., Mitchell K.D. Unraveling the Mystery of Goldblatt Hypertension. *News Physiol. Sci.*, 13: p.170-176, 1998.
- Nussberger J., Aubert J.F., Bouzourene K., Pellegrin M., Hayoz D., Mazzolai L. Renin inhibition by aliskiren prevents atherosclerosis progression: comparison with irbesartan, atenolol, and amlodipine. *Hypertension*, 51: p.1306-1311, 2008.
- Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327: p.524-6, 1987.
- Paravicini T.M., Touyz R.M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes care*, 31(supplement 2): p.170-80, 2008.

- Patrono C. Cardiovascular effects of cyclooxygenase-2 inhibitors: a mechanistic and clinical perspective. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 82(4): p.957-964, 2016.
- Perticone F. *et al.* Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation*, 104 (2): p.191-6, 2001.
- Pickering T.G. Renovascular hypertension: etiology and pathophysiology. *Semin Nucl Med.*, 19(2): p.79-88, 1989.
- Pisoschi A.M., Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97: p.55-74, 2015.
- Pradhan N., Rossi N.F. Interactions Between the Sympathetic Nervous System and Angiotensin System in Renovascular Hypertension. *Current Hypertension Reviews*, 9: p.121-129, 2013.
- Praxedes J.N. Hipertensão renovascular: epidemiologia e diagnóstico. *Rev Bras Hiperten.*, 9: p.148-153, 2002.
- Précoma D.B., Oliveira G.M.M., Simão A.F., Dutra O.P., Coelho O.R., Izar M.C.O, *et al.* Atualização da Diretriz de Prevenção Cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia – 2019. *Arq. Bras. Cardiol.*, 2019.
- Quan N., Whiteside. M, Herkenham M. Expressão de mRNA de ciclo-oxigênio-2 no cérebro de ratos após injeção periférica de lipopolissacarídeo. *Brain Res.*, 802: p.189 -197, 1998.
- Rajagopalan S., Kurz S., Munzel T., Tarpey M., Freeman B.A., Griending K.K., Harrison D.G. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/ NADPH oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor tone. *J. Clin. Invest.* , 97: p.1916-23, 1996.
- Rapsomaniki E., Timmis A., George J., Pujades-rodriguez M., Shah A.D., Denaxas S., White I.R., Caulfi M.J. Blood pressure and incidence of twelve cardiovascular diseases : lifetime risks, healthy life-years lost , and age-specific associations in 1 · 25 million people. *The Lancet*, 383(5): p.1899-1911, 2014.
- Rashikh A., Ahmad S.J., Pillai K.K., Kohli K., Najmi A.K. Aliskiren attenuates myocardial apoptosis and oxidative stress in chronic murine model of cardiomyopathy. *Biomed. Pharmacother*, 66: p.138-143, 2012.
- Rattmann Y.D. Mecanismos vasculares envolvidos nos efeitos vasculares da *Dicksonia sellowiana* (PRESL.) HOOK.145f. *Tese de Doutorado em Farmacologia*. Universidade Federal do Paraná, 2009.

- Rehman H.U. Vascular endothelium as an endocrine organ. *Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, 31(2): p.149-154, 2001.
- Ricciotti E., Yu Y., Grosser T., Fitzgerald G.A. COX-2, the dominant source of prostacyclin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110: p.183. 2013.
- Ritchie H, Roser M. Causes of death. *OurWorldInData.org*. 2019.
- Robles N.R., Cerezo I., Hernandez-Gallego R. Renin–Angiotensin System Blocking Drugs. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 19(1): p.14-33, 2014.
- Rochette L., Lorin J., Zeller M., Guillard J.C., Lorgis L., Cottin Y., *et al.* Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets? *Pharmacol Ther*, 140(3): p.239-257, 2013.
- Roscioni S.S., Heerspink H.J.L., de Zeeuw D. The effect of RAAS blockade on the progression of diabetic nephropathy. *Nat. Rev. Nephrol.*, 10(5): p.243, 2013.
- Rosei, A.E. Heagerty, Anthony M. Rizzoni, Damiano; Effects of antihypertensive treatment on small artery remodelling. *Journal of hypertension*, 27(6): p.1107-14, 2009.
- Rubanyi G.M., Vanhoutte P.M. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol*, 250: p.815- 821, 1986.
- Rubanyi, G M. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 22(Suppl 4): p. S1-14, 1993.
- Ruiz-ortega M., Lorenzo O., Suzuki Y., Ruperez M., Egido J. Proinflammatory actions of angiotensins. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 10: p. 321-329, 2001.
- Saeed A., Dabhadkar K., Virani S.S., Jones P.H., Ballantyne C.M. Cardiovascular Disease Prevention: Training Opportunities, the Challenges, and Future Directions. *Curr. Atheroscler. Rep.*, 20(7): p.35, 2018.
- Salazar G. NADPH Oxidases and Mitochondria in Vascular Senescence. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5): p.1-21, 2018.
- Santuzzi C.H., Tiradentes R.V., Mengal V., Claudio E.R., Mauad H., Gouvea S.A., Abreu G.R. Combined aliskiren and L-arginine treatment has antihypertensive effects and prevents vascular endothelial dysfunction in a model of renovascular hypertension. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 48: p. 65-76, 2014.
- Sato H., Sato M., Kanai H., Uchiyama T., Iso T., Ohyama Y., Sakamoto H., Tamura J., Nagai R., Kurabayashi M. Mitochondrial reactive oxygen species and

c-Src play a critical role in hypoxic response in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.*, 67(4), p.714–722.

Scala L.C., Magalhães L.B., Machado A. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica. In: Moreira SM, Paola AV; Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Livro Texto da Sociedade Brasileira de Cardiologia*. 2: p.780-5, 2015.

Schiffrin, E. L. Hypertension in 2017: Novel mechanisms of hypertension and vascular dysfunction. *Nature Reviews Nephrology*, 14 (2): p. 73-74, 2018.

Schiffrin, E. L. Vascular Remodeling in Hypertension: Mechanisms and Treatment. *Hypertension*, 59(2): p. 367-374, 2012.

Sellers, M. M., Stallone, J.N. Sympathy for the devil: the role of thromboxane in the regulation of vascular tone and blood pressure. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 294 (5): p. H1978-86, 2008.

Senbel A.M., Omar A.G., Abdel-Moneim L.M., Mohamed H.F., Daabees T.T. Evaluation of l-arginine on kidney function and vascular reactivity following ischemic injury in rats: protective effects and potential interactions. *Pharmacol Rep.*, 66(6): p. 976-83, 2014.

Sigmon D.H., Beierwaltes W.H. Influence of Nitric Oxide in the Chronic Phase of TwoKidney, One Clip Renovascular Hypertension. *Hypertension*, 31: p.649-656, 1998.

Skeegs L.T. The existence of two forms of hyperensin. *The Journal of Experimental Medicine*. 100: p.363, 1954.

Smith W.L., Garavito R.M., Dewitt D.L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases) -1 and -2. *The Journal of biological chemistry*, 271(52): p. 33157-60, 1996.

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

Sun D., Liu H., Yan C., Jacobson A., Ojaimi C., Huang A., *et al.* COX-2 contributes to the maintenance of flow-induced dilation in arterioles of eNOS-knockout mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 29: p.1429-1435, 2006.

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

- Taddei S., Viridis A., Ghiadoni L., Magagna A., Salvetti A. Cyclooxygenase inhibition restores nitric oxide activity in essential hypertension. *Hypertension*, 29 (1 Pt 2): p.274-9, 1997.
- Tang, E.H., P.M. Vanhoutte. Endothelial dysfunction: a strategic target in the treatment of hypertension? *Pflugers. Arch.*, 459(6), p.995-1004, 2010.
- Tanito M., *et al.* Enhanced oxidative stress and impaired thioredoxin expression in spontaneously hypertensive rats. *Antioxidants & redox signaling*, 6(1): p.89-97, 2004.
- Tejero J., Shiva S., Gladwin M.T. Sources Of Vascular Nitric Oxide And Reactive Oxygen Species And Their Regulation. *Physiological reviews*, 99(1): p.311–379, 2019.
- Thomopoulos C., Parati G., Zanchetti A. Effects of blood pressure lowering on outcome incidence in hypertension: 4. Effects of various classes of antihypertensive drugs-overview and meta-analyses. *J. Hypertens*, 33(2): p.195-211, 2015.
- Tian X.Y., Wong W.T., Leung F.P., Zhang Y., Wang Y., Lee H.K., *et al.* Oxidative stress-dependent cyclooxygenase-2-derived prostaglandin f(2 α) impairs endothelial function in renovascular hypertensive rats. *Antioxid Redox Signal*, 16 (4): p. 363-373, 2012.
- Timmermans P.B., Wong P.C., Chiu A.T., Herblin W.F., Smith R.D. New perspectives in angiotensin system control. *J. Hum. Hypertens*. 7(Suppl 2): p.19-31, 1993.
- Tiradentes R.V., Santuzzi C.H., Claudio E.R., Mengal V., Silva N.F., Neto H.A., Bissoli N.S., Abreu G.R., Gouvea S.A. Combined Aliskiren and L-arginine treatment reverses renovascular hypertension in an animal model. *Hypertens. Res.*, 38(7): p.471-7, 2015.
- Touyz R. M., Schiffrin E. L.; Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochemistry and Cell Biology*, 122(4): p. 339-352, 2004.
- Touyz R.M. The role of angiotensin II in regulating vascular structural and functional changes in hypertension. *Curr. Hypertens Rep.*, 5: p.155-64, 2003.
- Touyz R.M., Alves-Lopes R., Rios F.J., Camargo L.L., Anagnostopoulou A., Arner A., Montezano A.C. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovascular Research*, 114(4): p. 529-539, 2018.
- Touyz R.M., Chen X., He G., *et al.* Expression of a gp91phox-containing leukocyte-type NADPH oxidase in human vascular smooth muscle cells – modulation by Ang II. *Circ. Res.*, 90: p.1205-1213, 2002.

- Touyz R.M., Schiffrin E.L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of Ang II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol. Rev.*, 52: p.639–672, 2000.
- Triggle C.R., Hollenberg M., Anderson T.J., Ding H., Jiang Y., Ceroni L., Wiehler W.B., Ella S.M.N., Ellis A., Andrews K., McGuire J.J., Pannirselvam M. The endothelium in health and disease – A Target for therapeutic intervention. *Journal of Smooth Muscle Research*, 39(6): p.249-267, 2003.
- Vanhoutte P.M. Endothelium-dependent contractions in hypertension: when prostacyclin becomes ugly. *Hypertension*, 57: p.526-531, 2011.
- Vasconcelos S.M., Goulart M.O.F., Moura J.B.F., Manfredini V., Benfato M.S., Kubota L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, 30(5): p.1323-1338, 2007.
- Viappiani S., Nicolescu A.C., Holt A., *et al.* Activation and modulation of 72kDa matrix metalloproteinase -2 by peroxynitrite and glutathione. *Biochem. Pharmacol.*, 77(5): p.826-34, 2009.
- Virdis A., Duranti E., Taddei S. Oxidative stress and vascular damage in hypertension: Role of angiotensin II. *Int. J. Hypertension*, p.1-7, 2011.
- Wang D., Özen C., Abu-reidah I.M., Chigurupati S. Vasculoprotective Effects of Pomegranate (*Punica granatum L.*). *Frontiers in Pharmacology*, 9: p.1-15, 2018.
- Weber M.A., Schiffrin E.L., White W.B., Mann S., Lindholm L.H., Kenerson J.G., *et al.* Clinical practice guidelines for the management of hypertension in the community: a statement by the American Society of Hypertension and the International Society of Hypertension. *J. Clin. Hypertens*, 16(1): p.14-26, 2014.
- Weseler A.R., Bast, A. Oxidative Stress and Vascular Function: Implications for Pharmacologic Treatments. *Current Hypertension Reports*, 12(3): p.154-161, 2010.
- Wolf G. Angiotensin II is involved in the progression of renal disease: importance of non-hemodynamic mechanisms. *Nephrologie*, 19: p.451-456, 1998.
- Wong W.T., Tian X.Y., Huang Y. Endothelial dysfunction in diabetes and hypertension: cross talk in RAS, BMP4, and ROS-dependent COX-2-derived prostanoids. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 61: p.204-214, 2013.
- Wood J.M., Maibaum J., Rahuel J., Grütter M.G., Cohen N.C., Rasetti V., Rüger H., Göschke R., Stutz S., Fuhrer W., Schilling W., Rigollier P., Yamaguchi Y., Cumin F., Baum H.P., Schnell C.R., Herold P., Mah R., Jensen C., O'Brien E.,

Stanton A., Bedigian M.P. Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 308: p. 698-705, 2003.

Wu, F., Tyml, K. & Wilson, J.X. iNOS expression requires NADPH oxidase-dependent redox signaling in microvascular endothelial cells. *J. Cell. Physiol.*, 217(1): p.207-214, 2008.

Xavier F.E., Aras-Lopez R., Arroyo-Villa I., Campo L.D., Salaices M., Rossoni L.V., *et al.* Aldosterone induces endothelial dysfunction in resistance arteries from normotensive and hypertensive rats by increasing thromboxane A2 and prostacyclin. *Br. J. Pharmacol.*, 154: p.1225-1235, 2008.

Xia, Y., Zweier, J.L. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(13): p.6954-8, 1997.

Yoshizumi M., Tsuchiya K., Suzaki Y., *et al.* Quercetin glucuronide prevents VSMC hypertrophy by angiotensin II via the inhibition of JNK and AP-1 signaling pathway. *Elsevier*, 293 (5): p.1458-1465, 2002.

Yuyun M.F, NG, L. L, NG G.A. Endothelial dysfunction, endothelial nitric oxide bioavailability, tetrahydrobiopterin, and 5- methyltetrahydrofolate in cardiovascular disease. *Where are we with therapy? Microvascular research*, 119: p.7-12, 2018.

Zhang D.X., Borbouse L., Gebremedhin D., Mendoza S.A., Zinkevich N.S., Li R., Gutterman D.D. H₂O₂-induced dilation in human coronary arterioles: role of protein kinase G dimerization and large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activation. *Circ. Res.*, 110(3): p.471–480, 2012.

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

Zhao Y.J., Wang J., Tod M.L., Rubin L.J., Yuan X.J. Pulmonary vasoconstrictor effects of prostacyclin in rats: potential role of thromboxane receptors. *J. Appl. Physiol.*, 81: p.2595-2603, 1996.

Zhu J.R., Sun N.L., Yang K., Hu J., Xu G., Hong H., Wang R., Tu Y.M., Ritter S., Keefe D., *et al.* Efficacy and safety of aliskiren, a direct renin inhibitor, compared with ramipril in asian patients with mild to moderate hypertension. *Hypertens. Res.*, 35: p.28-33, 2012.