

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

FÁBIO DA SILVA MATTOS

**EFEITOS DO TRATAMENTO COMBINADO COM L-ARGININA E BENAZEPRIL
EM ANÉIS DE AORTA DE RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR**

VITÓRIA - ES

2022

FÁBIO DA SILVA MATTOS

**EFEITOS DO TRATAMENTO COMBINADO COM L-ARGININA E BENAZEPRIL
EM ANÉIS DE AORTA DE RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

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

Co-orientador: Prof.Dr. Vinicius Mengal

VITÓRIA – ES

2022

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

M435e Mattos, Fábio da Silva, 1981-
Efeitos do tratamento combinado com L-arginina e Benazepril em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular / Fábio da Silva Mattos. - 2022.
73 f.

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

Coorientador: Prof^o. Dr. Vinicius Mengal.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. L-arginina. 2. Benazepril. 3. Hipertensão Renovascular. 4. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona. I. Gouvea, Prof^a. Dr^a. Sonia Alves. II. Mengal, Prof^o. Dr. Vinicius. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 612

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus, pelo seu cuidado, zelo, paciência e amor pela minha vida! Por ter me ajudado em todos os momentos.

Agradeço a minha esposa Roberta pelo apoio, paciência, palavras de ânimo, quando muitas vezes queria desistir e ela sempre me incentivando. Te amo minha Vida! Aos meus filhos Davi e Isaque pelas minhas ausências durante a semana e nos finais de semana e feriados, muitos deles fazendo experimentos e estudando, para conclusão desse mestrado. Saibam que fiz isso por amor a vocês e buscando uma vida melhor para nós. Amo vocês! Agradeço aos meus pais Fábio e Lucimar, pelo apoio e orações, a minha irmã Mariana por cada palavra de incentivo e ânimo, aos meus sogros Almir e Zoé pelo incentivo e apoio em tudo!

A minha orientadora, Professora Dra. Sônia Alves Gouvea, por ter me aceito como aluno de mestrado, e por ter me dado a oportunidade de fazer parte desse grupo. Sou grato por ter me concedido este projeto e por me motivar através da responsabilidade, em concluir o meu mestrado.

Ao meu co-orientador, Dr. Vinicius Mengal pela paciência, ensinamentos e conselhos. Muito obrigado pela ajuda em diversos experimentos! Saiba que você é uma inspiração para mim!

Aos meus colegas do LOCE e dia a dia de UFES: Otávio, Cleide, Victória, Carlos, Rodrigo, Isabela, Maíra pela amizade e apoio nos momentos mais difíceis. Obrigado pelos conselhos e todo auxílio que tiveram comigo! Vocês são os melhores presentes que a UFES me deu! São pessoas excepcionais!

Agradeço aos colegas da Pós-Graduação Karol, Michele, (vocês são especiais, muito obrigado pela ajuda nos experimentos, conversas, desabafos) Rayner, Lais, Felipe, Silas, pela rotina do dia a dia e por compartilhar comigo grandes momentos!

A Dra. Simone, você foi essencial nesse processo! Muito obrigado pelos conselhos e ajuda no desenvolver desse mestrado!

Aos professores da Pós-Graduação, sou grato por todo o conhecimento compartilhado!

Aos funcionários dos Departamentos e Laboratórios da UFES! Vocês fizeram os dias mais alegres e os procedimentos mais tranquilos!

As Dras. Cíntia e Gírlândia, pelas colaborações na minha dissertação!

RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica está relacionada ao risco elevado de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, pois leva a alterações vasculares e a disfunção endotelial. Neste trabalho investigamos os efeitos do tratamento com benazepril e a L-arginina, isoladamente e em combinação sobre a Pressão Arterial Sistólica (PAS) e reatividade vascular em anéis aórticos. A hipertensão renovascular foi induzida em ratos Wistar por redução do fluxo na artéria renal esquerda com um clipe de prata. Os animais foram divididos em Sham, 2 Rim, 1 Clipe (2R1C), 2R1C + L-arginina (L-ARG), 2R1C + Benazepril (Ben) e 2R1C + L-arginina + Benazepril (L-arg+Ben), o tratamento foi por 21 dias. Durante 4 semanas, a PA dos ratos foi monitorada e após foi retirado os anéis da aorta torácica onde foi avaliado a vasoconstrição e relaxamento dependentes e independentes do endotélio. O grupo L-arg+Ben reduziu a PA e a resposta contrátil à fenilefrina e aumentou o relaxamento à acetilcolina. A remoção e a incubação do endotélio com o éster metílico da N-nitro-L-arginina (L-NAME) aumentaram a resposta à fenilefrina em todos os grupos, mas o efeito foi maior no grupo L-arg + Ben. Utilizamos um ensaio de detecção *in situ* de NO mensurada pela sonda DAF-2 fluorescente. A hipertensão 2R1C reduziu a produção de NO *in situ*, quando comparado ao grupo Sham, por outro lado, o grupo L-arg+Ben apresentou maior produção de NO. A análise da fluorescência produzida pelo Dihidroetídeo - DHE na artéria aorta revelou um aumento da produção de EROs nos animais 2R1C e os tratamentos com L-arg, Ben e L-arg+Ben foram efetivos em reduzir seus valores de fluorescência normalizados, corrigindo o aumento da produção de EROs nas artérias gerado pela hipertensão 2R1C. Em conclusão, L-arg + Ben combinado foi eficaz na redução da pressão arterial e na prevenção da disfunção endotelial nos anéis aórticos de ratos hipertensos 2R1C. Os mecanismos responsáveis parecem estar relacionados à modulação do sistema renina-angiotensina local, que está associado à redução do estresse oxidativo endotelial e no aumento da produção de óxido nítrico.

Palavras-chaves: hipertensão 2R1C, benazepril, L-arginina, SRAA e estresse oxidativo.

ABSTRACT

Systemic arterial hypertension is related to a high risk of developing cardiovascular diseases, as it leads to vascular changes and endothelial dysfunction. In this article we investigate treatment with benazepril and L-arginine, alone and in combination, on Systolic Blood Pressure (SBP) and vascular reactivity in aortic rings. Hypertension was induced in male Wistar rats by severing the left renal artery. The animals were divided into groups: Sham, 2-kidney 1 clip (2K1C), hypertension, 2K1C + L-arginine (L-ARG), 2K1C + Benazepril (Ben) and 2K1C + L-arginine + Benazepril (L-arg + Ben), the treatments were for 21 days. For 4 weeks, BP was monitored and endothelium-dependent and endothelium-independent vasoconstriction and relaxation were assessed in aortic rings. L-arg + Ben reduced BP and contractile response to phenylephrine and improved acetylcholine relaxation. Removal and incubation of the endothelium with N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) increased the response to phenylephrine in all groups, but the effect was greater in the L-arg + Ben group. We used an *in situ* detection assay of NO measured by the DAF-2 fluorescent probe. 2K1C hypertension reduced *in situ* NO production when compared to the Sham group. However, the L-arg + Ben group showed higher NO production. The analysis of the fluorescence produced by Dihydroethide - DHE in the aorta artery revealed an increase in the production of ROS in 2K1C animals and that treatments with L-ARG, BEN and L-ARG+BEN were effective in reducing their normalized fluorescence values, correcting the increased production of ROS in arteries generated by 2K1C hypertension. In conclusion, combined L-arg + Ben was effective in lowering blood pressure and preventing endothelial dysfunction in the aortic rings of 2K1C hypertensive rats. The responsible mechanisms seem to be related to the modulation of the local renin-angiotensin system, which is associated with a reduction in endothelial oxidative stress and an increase in nitric oxide production.

Key words: 2K1C hypertension, benazepril, L-arginine, RAAS and oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Taxa de Mortalidade no Brasil por DVC e distribuição por causas no ano de 2017. HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; AVE: Acidente Vascular Encefálico; IAM: Infarto Agudo do Miocárdio; IRC: Insuficiência Renal Crônica. Fonte: Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2020.	14
Figura 2 Procedimento de clipagem da artéria renal. (A) Anestesia com Ketamina e Xylazina intraperitoneal (B) Laparotomia com exposição do pedúnculo renal (C) Separação da artéria renal esquerda (D) Inserção do clipe de prata (diâmetro interno de 0,2 mm). (Santuzzi et al., 2014).	27
Figura 3 Organograma do Protocolo Experimental	28
Figura 4 Aorta torácica em uma placa de Petri imersa em solução de Krebs após retirada dos tecidos, sendo dividida em segmentos cilíndricos de aproximadamente 4 mm (Angeli, 2009).	29
Figura 5 Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “in vitro”. Sistema de aquisição de dados <i>LabChart Systems</i>	30
Figura 6 Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl	31
Figura 7 Análise dos valores da PAS (mmHg) medidas por meio da pletismografia de cauda em ratos dos grupos Sham, L-arginina+Benazepril, Benazepril, L-arginina e 2R1C, antes da cirurgia (0), 7 dias após a cirurgia e 28 dias após o procedimento..	36
Figura 8 Avaliação da função muscular lisa dos segmentos de aorta (Δ Contração ao KCl) com endotélio.	37
Figura 9 Avaliação da função muscular lisa dos segmentos de aorta (Δ Contração ao KCl) sem endotélio.	37
Figura 10 Curvas concentração resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar nos grupos 2R1C, tratados L-Arginina, Benazepril e associação de L-arginina + Benazepril.....	38
Figura 11 Efeito da remoção do endotélio (E-) na curva concentração resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos Sham (Sham E-), dois rins um clipe (2R1C E-), tratado com L-arginina (L-arg E-), tratado com Benazepril (Benazepril E-) e tratado com L-arginina+Benazepril (L-arg+Ben E-).	39

Figura 12 Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos	41
Figura 13 Curvas concentração-resposta à acetilcolina para a avaliação do relaxamento dependente do endotélio em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos 2R1C, tratados L-Arginina, Benazepril e associação de L-arginina + Benazepril.....	43
Figura 14 Curvas concentração-resposta ao NPS para a avaliação do relaxamento independente do endotélio em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos Sham (Sham E-), dois rins um clipe (2R1C E-), tratado com Benazepril (Bem E-), tratado com L-arginina (L-arg E-) e tratado com L-arginina+Benazepril (L-arg+Bem E-).....	44
Figura 15 Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (A) Sham (Sham E+) e após a incubação com L-NAME (Sham L-NAME); (B) 2R1C (2R1C E+) e após a incubação com L-NAME (2R1C L-NAME); (C); L-arginina (L-arg E+) e após a incubação com L-NAME (L-arg L-NAME); (D) Benazepril (Ben E+) e após a incubação com L-NAME (Ben L-NAME); (E) L-arginina + Benazepril (L-arg+Ben E+) e após a incubação com L-NAME (L-arg+Ben L-NAME).....	46
Figura 16. Imagens de microscopia apresentam a fluorescência emitida por 4,5 diaminofluoresceína (DAF-2) na artéria aorta dos ratos Sham (A), 2R1C (B), L-ARG (C), BEN (D) e L-ARG+BEN (E). Gráfico com valores da fluorescência emitida por diaminofluoresceína (DAF-2) (F).....	47
Figura 17 Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (A) Sham (Sham E+) e após a incubação com Indometacina (Sham Indo); (B) 2R1C (2R1C E+) e após a incubação com Indometacina (2R1C Indo); (C) Benazepril (Ben E+) e após a incubação com Indometacina (Ben Indo); (D) L-arginina (L-arg E+) e após a incubação com Indometacina (L-arg Indo); (E) L-arginina + Benazepril (L-arg+Ben E+) e após a incubação com Indometacina (L-arg+Ben Indo).....	49
Figura 18 Imagens histológicas representativas de seções arteriais microscópicas coradas utilizando hematoxilina e eosina (HE) (SHAM: A; 2R1C: B; L-ARG: C; BEN: D; LARG+BEN: E) obtidas de artérias aortas de ratos sham e 2R1C tratados com L-arginina e benazepril. Quantificação da espessura do vaso (F).....	50

Figura 19 Imagens histológicas representativas de seções arteriais microscópicas coradas utilizando picrosirius red (PR) (SHAM: A; 2R1C: B; L-ARG: C; BEN: D; LARG+BEN: E) obtidas de artérias aortas de ratos sham e 2R1C tratados com L-arginina e benazepril. Quantificação do conteúdo de colágeno (F).51

Figura 20 Detecção “*in situ*” da produção de ânion superóxido em segmentos de aorta. Microfotografias de fluorescência representando secções transversais de aorta torácica na presença de DHE dos ratos SHAM (A), 2R1C (B), L-ARG (C), BEN (D) e L-ARG+BEN (E). Gráfico de barras demonstrando a análise quantitativa (F).....52

LISTA DE TABELA

Tabela 1 Valores de resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, g) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração - resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas intactos de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: Sham, 2R1C, tratado com L-arginina, tratado com Benazepril e tratado com L-arginina + Benazepril.....	38
Tabela 2 Valores de resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração- resposta à fenilefrina em anéis (intactos e desnudos) de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos diferentes grupos estudados.....	40
Tabela 3 Valores de resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, g) e sensibilidade (pD_2) induzidas pela acetilcolina em anéis isolados de aortas intactos de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: Sham, 2R1C, tratado com tratado com L-arginina, tratado com Benazepril e tratado com L-arginina + Benazepril. A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contração com fenilefrina....	42
Tabela 4 Valores da resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, g) e sensibilidade (pD_2) induzidas pelo Nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis desnudos de aortas de ratos com hipertensão renovascular dos diferentes grupos estudados. A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contração com fenilefrina.	43
Tabela 5 Valores de resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, g) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas de ratos com hipertensão renovascular dos diferentes grupos estudados, na presença e na ausência de L-NAME.	45
Tabela 6 Valores de resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, g) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas de ratos com hipertensão renovascular dos diferentes grupos estudados, na presença e na ausência de Indometacina (INDO).	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Doenças Cardiovasculares	14
1.2 Hipertensão Arterial Sistêmica	15
1.3 Hipertensão Renovascular	16
1.4 Endotélio Vascular	17
1.5 Disfunção endotelial e estresse oxidativo na hipertensão.....	20
1.6 Prostanóides derivados da ciclooxigenase	20
1.7 Estratégias Terapêuticas na Hipertensão Renovascular	21
2 JUSTIFICATIVA	24
3 OBJETIVOS	25
4 MATERIAS E MÉTODOS	26
5 RESULTADOS	35
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÃO	61
REFERENCIAS	62

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

2R1C - 2 rins, 1 clipe

Ang I Angiotensina I

Ang II Angiotensina II

AVE Acidente Vascular Encefálico

BH4 Tetrahidrobiopterina

BRAs bloqueadores do receptor AT1

CMLV Célula muscular lisa vascular

CMLV célula muscular lisa vascular

COX ciclooxigenase

DCV's Doenças Cardiovasculares

ECA Enzima Conversora da Angiotensina

EDHF fator hiperpolarizante derivado do endotélio

eNOS enzima óxido nítrico sintase endotelial

EROs espécies reativas de oxigênio

FAD Flavina Adenina Dinucleotídeo

FMN Flavina Mononucleotídeo

HAS Hipertensão Arterial Sistêmica

IAM Infarto Agudo do Miocárdio

IECAs inibidores da enzima conversora da angiotensina

KCl Cloreto de Potássio

L-NAME L-NG-nitro arginina metil éster

MLC20 cadeia leve da miosina

MLCK quinase de cadeia leve da miosina

NADPH Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NO Óxido Nítrico

NPS Nitroprussiato de sódio

O₂⁻ ânion superóxido

pD₂ avaliação da sensibilidade

Rmax resposta máxima

ROCs canais de Ca^{2+} operados por receptores

SAC canais de Ca^{2+} ativados pelo estiramento

SOC canais de Ca^{2+} operados por estoque

SRAA Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

VOCC canais de Ca^{2+} operados por voltagem tipo L

VOCs canais de Ca^{2+} operados por voltagem

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCVs) tem liderado as estatísticas de morbimortalidade do mundo moderno, sendo a principal causa de mortes, hospitalizações e atendimentos ambulatoriais, matando mais do que qualquer outra doença (GBD, 2017).

Entre as DCVs, temos o infarto agudo do miocárdio (IAM), o acidente vascular encefálico (AVE), insuficiência cardíaca, doença arterial periférica e doença renal crônica, que estão associadas a fatores comportamentais, como o uso de tabaco, a alimentação não saudável, o consumo de álcool, o sedentarismo, a obesidade, a hipertensão arterial sistêmica (HAS), a hipercolesterolemia e o diabetes, e estes, por sua vez, moldados por particularidades étnicas e culturais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO, 2020).



Figura 1 Taxa de Mortalidade no Brasil por DVC e distribuição por causas no ano de 2017. HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; AVE: Acidente Vascular Encefálico; IAM: Infarto Agudo do Miocardio; IRC: Insuficiência Renal Crônica. Fonte: Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2020.

As complicações da HAS (cardíacas, renais, vasculares e AVE) contribuem direta ou indiretamente para o elevado percentual de mortes por DCV. Conforme observado na figura 1, em 2017 ocorreram 1.312.663 óbitos no Brasil, dos quais 10% estavam relacionados a HAS. Vale ressaltar que a HAS mata mais por suas lesões nos órgãos-alvos (DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO, 2020).

1.2 Hipertensão Arterial Sistêmica

A HAS é uma doença crônica não transmissível sendo definida como o resultado do descontrole crônico da pressão arterial, que se mantém com valores pressóricos ≥ 140 e/ou 90 mmHg, que alteram de forma complexa as estruturas e funções dos órgãos-alvo. Ela é responsável por 45% das mortes por doenças cardiovasculares no mundo. Em 2017, 69% dos pacientes norte-americanos que tiveram seu primeiro episódio de infarto, tinham HAS. Além da diminuição da produtividade laboral e renda familiar, a HAS tem impactos grandiosos nos custos médicos e socioeconômicos, devido à alta frequência de internações (GBD, 2017; DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO, 2020).

Por ser uma doença crônica, a HAS levará a lesão dos vasos sanguíneos dos órgãos alvos, tais como coração, rins, cérebro, entre outros (BRUNNER & SUDDARTH, 2015).

Com relação aos fatores de risco para a HAS podemos destacar os fatores genéticos, ambientais, vasculares, hormonais, renais e neurais. Os principais mecanismos envolvidos na HAS são a constrição vascular e a disfunção endotelial. A hipertrofia da parede vascular encontrada em indivíduos hipertensos leva ao aumento da resistência vascular periférica e conseqüentemente ao aumento da contratilidade da musculatura lisa dos vasos (NOBRE et al., 2013; DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO, 2020).

Apesar de muitos esforços para desvendar os mecanismos relacionados na patogênese da HAS eles ainda não são bem compreendidos e, na maioria dos casos, não resulta apenas de uma única causa, sendo esta doença classificada de dois tipos: hipertensão arterial essencial ou primária e hipertensão secundária. A hipertensão essencial, considerada como uma doença complexa e multifatorial, resultante da interação entre diversos fatores genéticos e ambientais, sendo responsável por acometer cerca de 90 a 95% das pessoas hipertensas e a sua manifestação não pode ser atribuída à existência de outra doença precedente (BOLÍVAR, 2013; MONTEZANO, 2012). Já a HAS secundária atinge cerca de 10 a 20% dos indivíduos hipertensos e está associada a outros distúrbios como, por exemplo, aldosteronismo primário, feocromocitoma (um tumor neuroendócrino das glândulas supra-renais ou

outros tecidos neuroendócrinos) ou estenose da artéria renal (hipertensão renovascular) (PRAXEDES, 2002; KHANGURA et al., 2013; DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO, 2020).

1.3 Hipertensão Renovascular

A hipertensão renovascular é uma das principais causas de hipertensão secundária e resistente ao tratamento. A sua prevalência é estimada em 2% dos hipertensos, mas a sua prevalência pode chegar a 6,8% na população com 65 anos ou mais e 5,8% nos casos de hipertensão secundária em adultos jovens (HERRMANN, 2018).

A hipertensão renovascular é uma condição secundária gerada pela estenose e/ou oclusão parcial de uma artéria renal ou ambas, podendo estar associada a doenças ateroscleróticas. É muito comum o aumento da pressão arterial sanguínea em pacientes com doença renal crônica e com hipertensão renovascular, e normalmente os pacientes são resistentes a tratamentos farmacológicos (KHANGURA et al., 2013).

O modelo experimental dois rins, um clipe (2R1C) é um modelo clássico de hipertensão renovascular que foi desenvolvido por Goldblatt e colaboradores em 1934. O modelo consiste na obstrução parcial de uma das artérias renais com um clipe de prata (GUAN et. al., 1992; GUIMARÃES et. al., 2010).

Esse modelo é dependente da ativação do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) e apontam três fases para o desenvolvimento da hipertensão. Na fase I com a implantação do clipe de prata na artéria renal esquerda ocorrerá a estenose renal, levando ao aumento dos níveis pressóricos e da atividade plasmática da renina. A renina liberada pelas células justaglomerulares atuará sobre o angiotensinogênio, formando a Angiotensina I (Ang I), que após perder 02 aminoácidos terminais é convertida em Angiotensina II (Ang II) pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA). Já a fase II terá o seu início entre cinco e oito semanas ocorrendo a diminuição nas concentrações de renina e aumento da sensibilidade a Ang II, que contribui para a retenção de água e sódio, e a pressão normalmente para de aumentar e se mantém os níveis hipertensivos. Na fase III os

níveis pressóricos permanecem elevados, por meio de mecanismos ainda não esclarecidos, sendo que fatores neurogênicos e humorais, disfunção endotelial, alteração da atividade barorreflexa e secreção de substâncias pressóricas estão relacionadas (DAVIS, 1977; NAVAR et al., 2002; GUIMARÃES, *et. al.*, 2010).

Alguns estudos demonstraram que o aumento da Ang II e da aldosterona, no modelo 2R1C, pode levar a modificações vasculares funcionais e estruturais, incluindo a disfunção endotelial, hipertrofia e deposição de matriz extracelular. Essas alterações são causadas principalmente pela elevação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e do *up-regulation* das metaloproteinases de matriz (CERON *et. al.*, 2010).

A Ang II é um peptídeo multifuncional que possui inúmeras ações nos vasos sanguíneos, nos sistemas renal e nervoso. Quando o SRAA é ativado de maneira exacerbada, como acontece na hipertensão renovascular, isso produz efeitos nocivos aos rins, podendo contribuir para uma perda da função renal, devido a constrição das arteríolas renais, levando ao aumento na resistência vascular periférica ou renal, aumentos da pressão dos capilares glomerulares, quadros de proteinúria e aumento do estresse oxidativo, via ativação da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato NADPH oxidase. No músculo liso vascular, a tirosina quinase Src regula a atividade da NADPH oxidase estimulada pela Ang II. Essa ativação leva a disfunção endotelial, proliferação de células mesenquiais, processos inflamatórios e profibróticos devido a fosforilação da Src (ROSCIONI, 2013).

O tônus do músculo liso vascular é um fator determinante da resistência vascular e a sua regulação é realizada pelos fatores derivados do endotélio, pressão sanguínea, inervação e por estímulos hormonais (LINCOLN *et. al.*, 2001).

Alguns estudos vêm demonstrando que o SRAA hiperativo altera negativamente a integridade do músculo liso vascular e do endotélio vascular. Estas alterações estão relacionadas à redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e à produção de radicais livres (SUN, 2010).

1.4 Endotélio Vascular

O endotélio vascular é um conjunto de células altamente ativas, que pode ser controlado através de estímulos químicos e físicos. Conta com uma vasta distribuição,

contribuindo para a realização de diversas funções relacionadas a homeostase vascular (Furchgott *et. al.*, 1980).

Um endotélio vascular saudável é caracterizado pelo equilíbrio de agentes pró e antioxidantes, vasodilatadores e vasoconstritores e moléculas pró e anti-inflamatórias (DONATO *et al.*, 2009). Dentre as substâncias vasoconstritoras estão: a Ang II (SKEGGS *et al.*, 1954), o ânion superóxido (RUBANYI; VANHOUTTE, 1986), a Endotelina-1 (ET-1) (YANAGISAWA *et al.*, 1988), e produtos derivados do ácido araquidônico como Prostaglandinas H_2 (PGH_2) e $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) e o Tromboxano A2 (TXA2) (FRÖLICH; FÖRSTERMANN, 1989).

Na célula muscular lisa vascular (CMLV), para que ocorra a contração é necessário um aumento da concentração de Ca^{2+} citosólico, gerada através do influxo deste íon por meio de canais de Ca^{2+} operados por voltagem (VOCs), por estoque (SOC), por receptores (ROCs), ou ativados pelo estiramento (SAC), e também pela liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares (retículo sarcoplasmático) (BLAUSTEIN; HAMLYN, 2010; GHOSH *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2008)

Após a ligação do Ca^{2+} à Calmodulina será formado o complexo Ca^{2+} - CaM que ativa a quinase de cadeia leve de miosina (MLCK), responsável por fosforilar a cadeia leve da miosina (MLC_{20}), permitindo que a cabeça da miosina se ligue ao filamento de actina e promova a contração (ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015). Essa contração pode ser mediada por acoplamento eletromecânico ou farmacomecânico (LAMOUNIER-ZEPTER; BALTAS; MORANO, 2003).

Como exemplo de acoplamento eletromecânico, temos a contração promovida pelo KCl através da despolarização da membrana, onde o aumento da concentração de K^+ extracelular, promove influxo de Ca^{2+} para dentro da CMLV através da abertura de canais de Ca^{2+} operados por voltagem tipo L (VOCC). O KCl também age como sensibilizador de cálcio na contração do músculo liso (RATZ *et al.*, 2005).

Um exemplo de acoplamento farmacomecânico é a contração à Fenilefrina. Esta se liga ao receptor α_1 -adrenérgico acoplado a uma proteína G que ativa a Fosfolipase C (PLC), que por sua vez estimula a síntese de IP3 e DAG. O IP3 age nos receptores IP3R no retículo sarcoplasmático promovendo a liberação de Ca^{2+} intracelular. O DAG ativa a proteína quinase C (PKC) que promove a abertura de

canais de Ca^{+2} na membrana, aumenta a sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca^{+2} e fosforila a cadeia leve da miosina (MLC20). Além disso, o aumento do Ca^{+2} intracelular ativa a quinase de cadeia leve da miosina (MLCK) promovendo contração do MLV. Outros exemplos de agonistas contráteis são a norepinefrina, endotelina, angiotensina II e a serotonina (BÁRÁNY, 1996; FUKATA et al., 2001).

As substâncias vasodilatadoras produzidas no endotélio são: fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), Prostaciclina e NO, sendo esse o principal vasodilatador produzido e um dos mais importantes na regulação do tônus vascular (MONCADA et al., 1991).

O NO é um radical livre, inorgânico, gasoso, altamente reativo, o que permite sua difusão facilmente pelas membranas celulares levando a vasodilatação. Ele também está envolvido na regulação do crescimento celular, além de possuir ação inibitória sobre a adesão e agregação plaquetária (MONCADA et al., 1991; CANNON, 1998).

O NO é produzido nas células endoteliais a partir da ação de alguns agonistas como a acetilcolina (ACh), bradicinina, adenosina difosfato (ADP), substância P ou pelo efeito de cisalhamento ou *shear stress*. Esses agonistas vão levar ao aumento de Ca^{+2} intracelular, que por sua vez ativa a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), transformando a L-arginina em NO e L-citrulina. Essa reação é dependente de oxigênio e alguns cofatores como a NADPH, Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD), Flavina Mononucleotídeo (FMN) e Tetrahydrobiopterina (BH4) (SAHRAWAT; CHATTERJEE, 2016).

Após a sua produção, o NO se difunde para o músculo liso vascular onde ativa a enzima guanilato ciclase (GC), levando ao acúmulo de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) através de sua ação sobre o trifosfato de guanosina (GTP), induzindo a diminuição do Ca^{+2} intracelular nas células do músculo liso vascular e conseqüentemente ao relaxamento (ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015).

Em algumas situações clínicas como a HAS e a aterosclerose, o endotélio vascular exibe um estresse oxidativo excessivo e uma diminuição da biodisponibilidade do NO, que são características da disfunção endotelial. (LEAL et al., 2015; BALARINI et al., 2013; DIAS et al., 2014).

O estresse oxidativo vem sendo apontado como um importante componente na fisiopatologia das DCV, bem como na promoção de seus agravos (MONTERA, 2007; KUROKAWA et al., 2011).

1.5 Disfunção endotelial e estresse oxidativo na hipertensão

Na HAS ocorre uma alteração no equilíbrio entre a liberação de fatores vasodilatadores e vasoconstritores, levando a disfunção endotelial (BALARINI *et. al.*, 2013; DIAS *et. al.*, 2014).

A disfunção endotelial encontrada no modelo 2R1C é provocada principalmente pelo aumento no estresse oxidativo causado pelas espécies reativas de oxigênio (EROs), relacionado com o aumento da ativação da NADPH oxidase pela Ang II, e diminuição da disponibilidade de NO (NOGUEIRA *et. al.*, 2012; DIAS *et. al.*, 2014).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade do organismo de controlá-las (FINKEL, 2000).

A Ang II induz a formação de EROs no endotélio e no músculo liso. Esse processo ocorre via receptor AT₁ e a ativação da NADPH oxidase, sendo essa principal produtora de EROs em processos patológicos (TOUYZ, 2000).

A hipertensão renovascular apresenta características específicas durante o seu desenvolvimento como lesão endotelial, altos níveis plasmáticos de Ang II, taquicardia, hipertrofia cardíaca, estresse oxidativo elevado e atrofia do rim estenótico. (VASQUEZ *et. al.* 2016).

1.6 Prostanóides derivados da ciclooxigenase

Outro produtor de EROs são os prostanóides derivados da via do ácido araquidônico - ciclooxigenase (COX) através da estimulação da NADPH oxidase (HERNANZ et al., 2014). A ativação da COX resulta em produção de prostanóides vasoconstritores e vasodilatadores através do metabolismo do ácido araquidônico e estes estão diretamente relacionados a modulação vascular, sendo os mais comuns a prostaglandina (PGE₂), o tromboxano (TXA₂), que leva ao aumento da expressão da NADPH oxidase e a prostaciclina (PGI₂) que ao contrário dos anteriores, leva a

redução da expressão da NADPH oxidase, reduzindo a produção de EROs (ALVAREZ et al., 2005).

A COX se apresenta através de duas isoformas, COX-1 uma isoforma constitutiva que tem como função a manutenção das funções fisiológicas (SMITH et al., 1996) e a COX-2 isoforma induzida relacionada principalmente aos processos inflamatórios (FÉLÉTOU, 2010). O O_2^- também contribui para o processo inflamatório, participando da expressão de COX-2, presente na HA (ALVAREZ, *et. al.*, 2008).

1.7 Estratégias Terapêuticas na Hipertensão Renovascular

Os principais objetivos no tratamento da hipertensão arterial renovascular são a redução da morbidade, da mortalidade relacionada a elevação da pressão arterial, proteção da circulação e das funções renais. O tratamento pode ser clínico, cirúrgico ou por meio da implantação de próteses endovasculares (stents). Com relação ao tratamento clínico recomenda-se os inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECAs), bloqueadores do receptor AT1 (BRAs), bloqueadores dos canais de cálcio e os betabloqueadores (DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO, 2020).

Os IECAs pertencem a uma categoria de fármacos com uso crescente em diversas doenças, incluindo HAS, insuficiência cardíaca, infarto agudo do miocárdio, nefropatia diabética e outras formas de nefropatia (CHEUNG, 2002). Além de converter Ang I em Ang II, a ECA também inativa as cininas (GAVRAS & CORCORAN, 1994) com isso os IECAs aumentam os níveis de bradicinina, contribuindo para seu efeito anti-hipertensivo. Além de reduzir a pressão arterial, os IECAs promovem regressão da hipertrofia ventricular (DAHLOF et al., 1992), diminuem a morbimortalidade associada à insuficiência cardíaca, reduzem a mortalidade e melhoram a função cardíaca pós-infarto (DAHLOF et al., 1992; Pfeffer et al., 1992), melhoram a disfunção endotelial (MANCINI et al., 1996) e reduzem a progressão da nefropatia diabética e de outras nefropatias (MASCHIO et al., 1996; LEWIS et al., 1993).

O benazepril é um IECA potente comparado aos outros fármacos de sua classe, por aumentar a excreção do sódio e por ser mais lipossolúvel, o que facilita a sua penetração nos tecidos e por ter uma ação inibidora da formação de Ang II, com picos de concentração em 30 minutos. Ele apresenta efeitos cardioprotetores e

renoprotetores, pois possui a capacidade de reduzir o tamanho do infarto, reduzir a fibrose e deposição de colágeno, consequentemente reduz a hipertrofia ventricular esquerda e melhora da função endotelial vascular, pois ao reduzir os níveis de Ang II, ele quebra as ações do SRAA e diminui a degradação da bradicinina, que estimula a produção de óxido nítrico e prostaglandinas, sendo portanto utilizado em pacientes com Insuficiência Cardíaca Congestiva - ICC (SAHOO *et al.*, 2009; BARRIOS E ESCOBAR, 2010; HOU *et al.*, 2007; STOMPÓR, 2011; HE *et al.*, 2008).

Vários estudos, com tratamento de até 8 semanas, demonstraram que Benazepril 10 a 80 mg/dia (geralmente 10 a 40 mg) é eficaz na redução da pressão arterial em pacientes com hipertensão leve a moderadamente grave e a sua eficácia anti-hipertensiva se mantém por até 02 anos de tratamento. (AGABITI, *et al.*, 1990; BELLET, 1990; CONRAD, 1988). Já em ratos com hipertensão renovascular (modelo 2R1C) e espontaneamente hipertensos (SHR) alguns estudos relataram que a administração única ou repetida do Benazepril, com duração de 4 a 8 semanas, 10 a 40 mg/dia, levou a efeitos anti-hipertensivos (HUANG, 2017; LIU, 2009; TANAKA, 1991).

A L-arginina é um aminoácido que pode ser utilizado para controle da pressão arterial. Sendo um substrato para a produção de NO tem demonstrado efeitos positivos na redução da pressão arterial e aumento da excreção de sódio e água em ratos com hipertensão 2R1C, além de melhorar as funções vasomotoras do endotélio, aumentando a síntese de NO nos vasos, levando a atividade diminuída da endotelina-1 e Ang II, modulação das alterações hemodinâmicas nos rins, diminuição do estresse oxidativo e melhora da sensibilidade à insulina (GOUVEA, 2003; GOKCE, 2004). Estudos anteriores, demonstraram que a L-arginina é capaz de produzir vasodilatação renal e natriurese, além de aumentar a liberação de nitrito e nitrato, L-citrulina e GMPc e aumentar a biodisponibilidade de NO na circulação renal (DENG *et al.*, 1995; ACKERMANN *et al.*, 1998).

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que animais tratados com L-arginina tiveram redução da hipertensão arterial quatorze dias após o tratamento. Além do efeito sistêmico sobre a pressão arterial, a L-arginina promoveu diurese e natriurese nos animais 2R1C, reverteu a hipertrofia cardíaca, aumentou a

massa do rim clipado e reduziu de forma significativa a atividade da ECA no plasma, coração e rim clipado (GOUVEA et al. 2002, 2004).

Nesse contexto, muitos estudos têm relatado as ações de fármacos que atuam no SRAA no modelo de hipertensão 2R1C, dentre as estratégias terapêuticas encontradas podemos citar o uso isolado de inibidores do SRAA, combinação dos inibidores dos SRAA com diuréticos, combinação dos inibidores do SRAA com bloqueadores dos canais de Ca^{2+} e até o duplo bloqueio do SRAA. As medicações também estão sendo investigadas quanto à sua capacidade de aumentar a disponibilidade de NO e diminuir o estresse oxidativo (HUANG, 2017; AGABITI-ROSEI, 1990).

Com isso, a proposta do nosso trabalho foi investigar de maneira inédita os efeitos da associação da L-arginina e do Benazepril em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular.

2. JUSTIFICATIVA

A HAS é considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, sendo responsável por grande número de mortes e internações. Por isso, além de gerar grandes custos aos cofres públicos, ela também provoca redução na qualidade e expectativa de vida da população mundial (DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO, 2020).

Diante de vários danos provocados pela hipertensão e de sua alta incidência na população ela é vista como um grave problema de saúde pública. A hipertensão renovascular é uma das principais causas de hipertensão secundária e resistente ao tratamento. A sua prevalência é estimada em 2% dos hipertensos, mas a sua prevalência pode chegar a 6,8% na população com 65 anos ou mais e 5,8% nos casos de hipertensão secundária em adultos jovens (HERRMANN, 2018).

Tendo em vista que a hipertensão renovascular tem como principal mediador o SRAA e a ativação desse sistema leva ao aumento da Ang II, responsável pela disfunção endotelial, diminuição de NO e aumento do estresse oxidativo, e o tratamento farmacológico empregado são os IECAs, nossa hipótese é que o tratamento com inibidor da ECA (Benazepril) associado a um precursor do NO (L-arginina) no modelo de hipertensão 2R1C poderia não só reduzir a pressão arterial como também reduzir as lesões nos vasos, promovendo uma resposta vasodilatadora, aumento da produção de NO e redução do estresse oxidativo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito terapêutico da associação da L-arginina e benazepril em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos do tratamento com L-arginina e Benazepril sobre:

- A pressão arterial sistólica;
- Respostas vasoconstritoras dependentes e independentes do endotélio em anéis de aorta;
- Respostas vasodilatadoras dependentes e independentes do endotélio em anéis da aorta;
- Participação das espécies reativas ao oxigênio;
- Participação dos prostanóides derivados da via da ciclooxigenase-2;
- Participação óxido nítrico;
- Deposição de colágeno e hipertrofia no músculo liso vascular.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Animais Experimentais

Foram utilizados no presente trabalho ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), pesando 120-150g, provenientes do Biotério do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Os animais foram mantidos em gaiolas sob condições controladas de temperatura (23°C) e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e ração padrão para roedores.

O manejo dos animais foi realizado de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA – UFES 15/2017).

4.2 Produção da Hipertensão Renovascular (Hipertensão 2R1C)

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

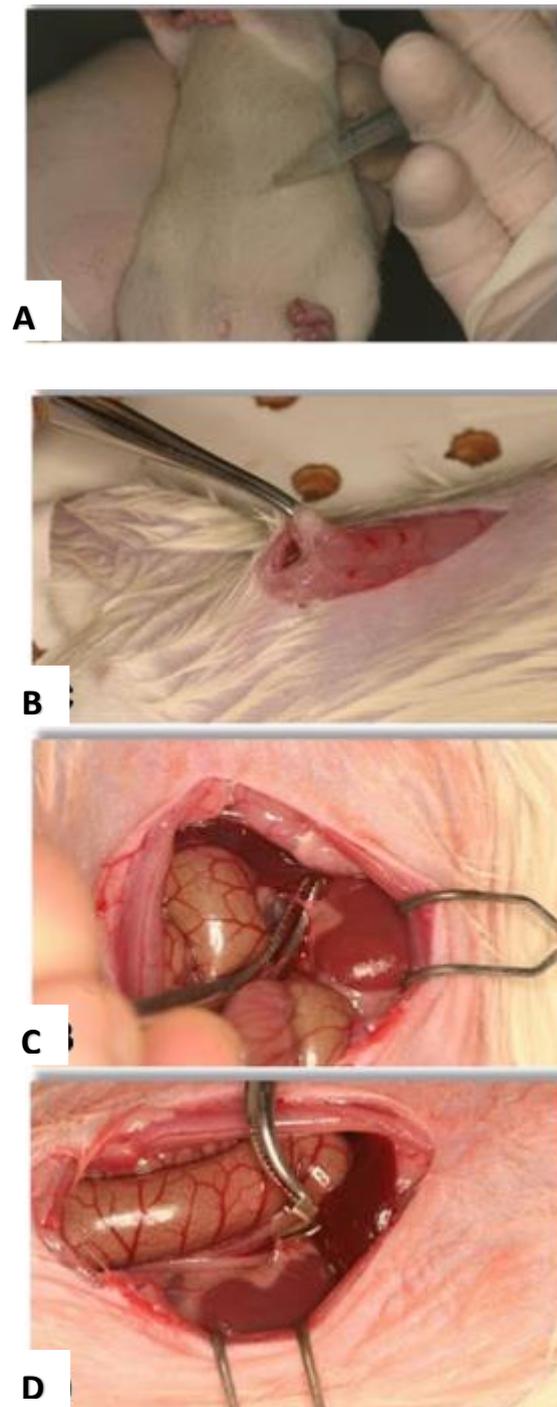


Figura 2 Procedimento de clipagem da artéria renal. (A) Anestesia com Ketamina e Xylazina intraperitoneal (B) Laparotomia com exposição do pedúnculo renal (C) Separação da artéria renal esquerda (D) Inserção do clipe de prata (diâmetro interno de 0,2 mm). (Santuzzi et al., 2014).

4.3 Tratamentos

Os tratamentos foram realizados por 21 dias iniciando 07 dias após estabilização do procedimento cirúrgico 2R1C (conforme Fig. 3). Foi administrado L-arginina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA, L-arginina 10 mg/kg/dia, diluída em água, por gavagem, 0,3

ml) e Benazepril (Novartis, Itália, Benazepril 40 mg/kg/dia, diluído em água, por gavagem, 0,3 ml). No grupo Associação foi administrado (L-arginina 10 mg/kg/dia, diluída em água, por gavagem, 0,3 ml + Benazepril 40 mg/kg/dia, diluído em água, por gavagem, 0,3 ml). Foram divididos os grupos da seguinte forma: SHAM; 2R1C; 2R1C+LARG; 2R1C+BEN e 2R1C+L-ARG+BEN. As drogas foram administradas por gavagem.

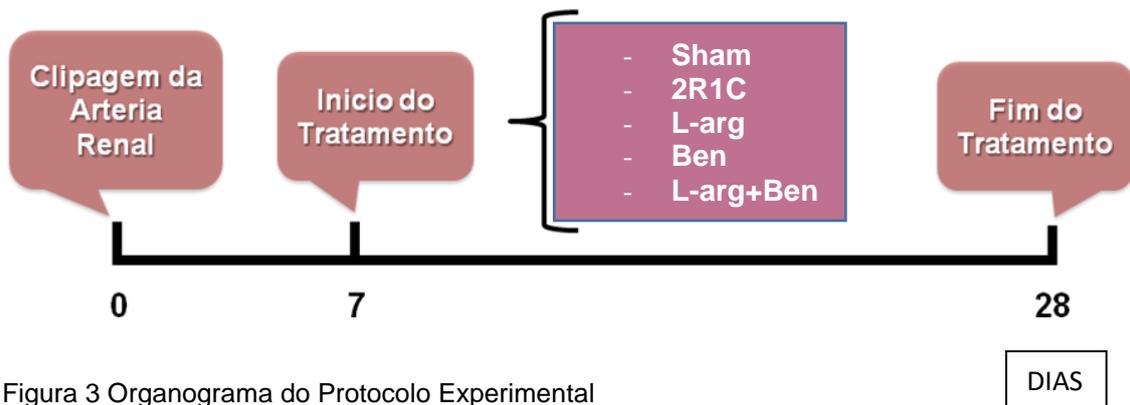


Figura 3 Organograma do Protocolo Experimental

4.4 Medida da Pressão Arterial

A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida de forma indireta através de pletismógrafo de cauda (IITC Life Science – 23924 Victory Blvd, Woodland Hills, CA). Todos os ratos foram submetidos previamente a ambientação, durante três dias, antes da primeira mensuração, para adaptarem-se ao pletismógrafo, com o intuito de prevenir alterações pressóricas devido ao estresse do animal frente ao procedimento. Durante as medidas de pressão os animais eram colocados em um cilindro de acrílico dentro de uma estufa a 37°C por um período de 15 minutos, com o intuito de promover dilatação da artéria caudal. A PAS foi mensurada antes da cirurgia (tempo 0), uma semana após a cirurgia para confirmar a eficácia do procedimento resultando em animais hipertensos (tempo 7) e, ao final do tratamento, 28 dias após a cirurgia (tempo 28). Foram realizadas três medidas da pressão arterial sistólica de cada animal das quais foi obtida a média aritmética.

4.5 Metodologia Empregada para Obtenção dos Anéis Isolados de Aorta Torácica

Os animais foram anestesiados com Ketamina (50mg/Kg) e Xilazina (10mg/Kg) e em seguida a aorta torácica descendente foi cuidadosamente removida e imersa rapidamente em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit, composta por (em mM): NaCl 127; KCl 4,7; CaCl₂.2H₂O 2,5; MgSO₄.7H₂O 1,2; KH₂PO₄ 1,17; NaHCO₃ 24; Glicose 11; EDTA 0,01, aerada com mistura carbogênica contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂. Esta solução foi mantida com pH 7,4.

Após a retirada do tecido conectivo e adiposo, a aorta torácica foi dividida em seis segmentos cilíndricos de aproximadamente 3 a 4 mm de comprimento (Figura 4). Alguns desses anéis tiveram seu endotélio removido mecanicamente através da fricção do lúmen com uma haste metálica.



Figura 4 Aorta torácica em uma placa de Petri imersa em solução de Krebs após retirada dos tecidos, sendo dividida em segmentos cilíndricos de aproximadamente 4 mm (Angeli, 2009).

Cada anel vascular foi colocado em cubas contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit aquecida a 36°C, continuamente aerada com mistura carbogênica, mantendo o pH estável em 7,4. Dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulos, foram passados através do lúmen dos segmentos de forma que ficassem paralelos na luz do vaso. Um fio foi fixado à parede do banho e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Assim, qualquer alteração do diâmetro do vaso foi captado pelo transdutor de força (TSD 125) conectado a um sistema de aquisição de dados (LabChart 8, AD InstrumentsPtyLtd., NSW, AUS) e este a um computador (Figura 5).

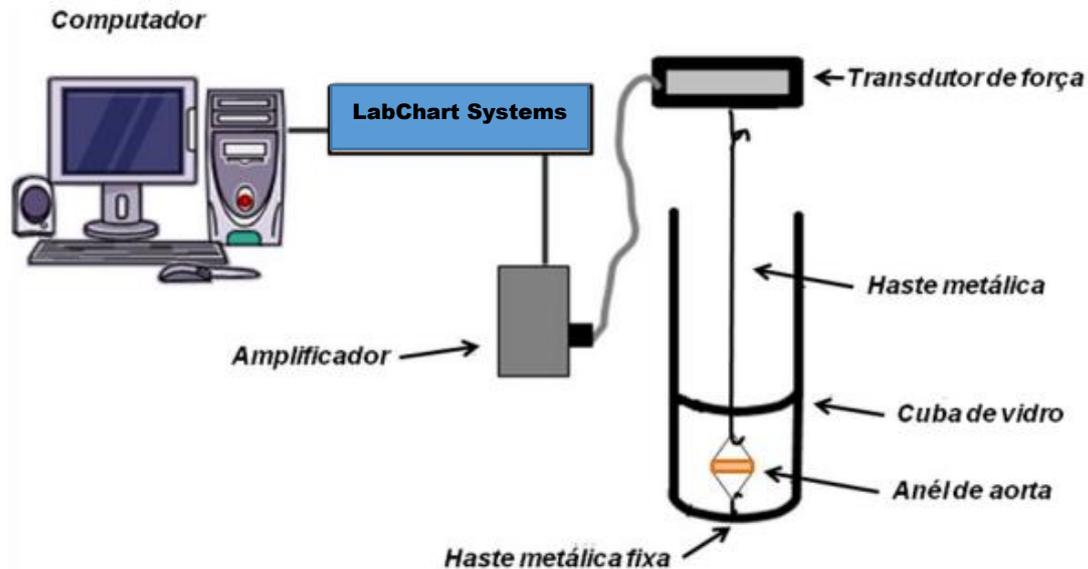


Figura 5 Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular "in vitro". Sistema de aquisição de dados *LabChart Systems*.

Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 1 grama, reajustada quando necessário, durante 45 minutos de estabilização (Figura 6 A).

4.5.1 Avaliação da integridade do músculo liso vascular

Após a estabilização, foi administrado ao banho Cloreto de Potássio (KCl 75 mM) para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização. Ao atingirem uma variação de um grama de força a partir do valor basal, estes anéis foram lavados aproximadamente três vezes com solução de Krebs-Henseleit até retornar a tensão de repouso (Figura 6 B, C). Assim, os anéis que não obtiveram tal contração foram descartados. Após 30 minutos de estabilização (Figura 6 D), uma nova dose de KCl (75 mM) foi adicionada ao banho para a aquisição de uma contração máxima do músculo liso vascular, aferida no período de 30 minutos, tempo necessário para atingir um platô no registro da contração (Figura 6 E, F). Após este platô, os anéis foram novamente lavados três vezes para atingir o valor basal (1.0 grama) e, depois de 30 minutos (Figura 6 G, H), esses anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

4.5.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico Acetilcolina (ACh). Para tal, os anéis de aorta foram pré-contraídos com Fenilefrina (Fe) 10^{-6} M. Uma vez atingido o platô, uma dose única de ACh (10^{-5} M) foi aplicada (Figura 5 I, J, L).

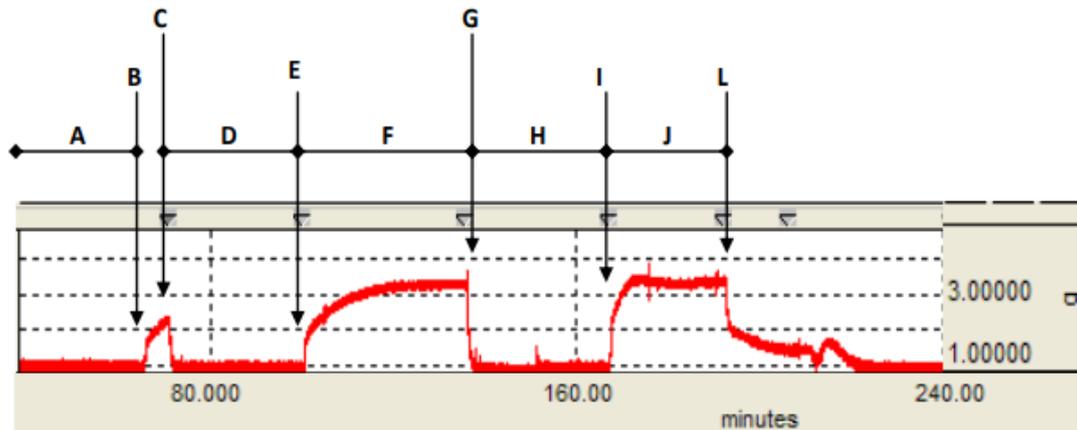


Figura 6 Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0.9 a 1,3 g); B) Adição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

4.5.3 Protocolos Experimentais

4.5.3.1 Efeitos dos tratamentos com Benazepril e L-arginina sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina

Após a avaliação da integridade funcional do endotélio, a solução nutritora do banho foi trocada três vezes para que a tensão basal fosse restabelecida. Depois da estabilização foi incubado os fármacos por 30 minutos e em seguida foi realizada a curva concentração-resposta à Fenilefrina (10^{-10} a 10^{-4} M) de maneira cumulativa nos grupos estudados.

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

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pela Acetilcolina (ACh). Para tal, os anéis de aorta com endotélio foram pré-contraídos com Fenilefrina 10^{-6} M. Uma vez obtido o platô, foram realizadas as curvas concentração-resposta, cumulativas à acetilcolina (1.10^{-11} a 3.10^{-4} M).

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

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

4.5.3.4 Influência do tratamento com Benazepril e L-arginina de ratos com hipertensão renovascular na avaliação da participação de prostanóides derivados da ciclooxigenase

Com a finalidade de estudar a participação da ciclooxigenase-2 na resposta contrátil à fenilefrina, os anéis de aorta foram incubados com um inibidor não específico da ciclooxigenases, a Indometacina (10 μ M, Sigma, St. Louis, USA).

4.6 Análises Histológicas

Os anéis da aorta foram rapidamente removidos e armazenado em recipientes contendo solução tamponada de formol (10%). Após passam por processo de desidratação em banho de álcool, diafanização em banhos de xilol e inclusão em bloco com banhos de parafina. Foram feitos cortes transversais em cada fatia com espessura de 4 μ m e montados em laminas de vidro, sendo coradas com picrosírius (Picrosírius Red, F3BA, FLUKA, EUA) ou hematoxilina e eosina (Vetec, Brasil) para as análises específicas descritas e seguir.

4.6.1 Análises do Colágeno e Hipertrofia

Os anéis de aorta foram cortados em seções transversais de 4 μ m de espessura e coradas com picrosírius para determinar a área ocupada por colágeno. As fatias também foram coradas com hematoxilina-eosina (H&E) para determinar área de secção transversa. A porcentagem de coloração vermelho do Picrosírius indicou o valor percentual ocupada por colágeno. As imagens foram obtidas com uma câmera

digital (Evolution, Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD) acoplado a um microscópio óptico (Eclipse 400, Nikon) sob aumento de 400 vezes. Imagens celulares vistas com uma câmera de vídeo foram projetadas em um monitor e rastreado. Imagens para a quantificação da deposição de colágeno e avaliação da área de secção transversa foram processadas com o software Image J (v. 1.43u, National Institutes of Health, EUA).

4.7 Protocolos de Fluorescência

Os protocolos de fluorescência foram realizados no Laboratório Multiusuário de Histologia Molecular e Imunohistoquímica (LHMI) - CCS/UFES.

4.7.1 Quantificação “*in situ*” do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

A produção “*in situ*” de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) foi avaliada pela fluorescência por dihidroetídeo (DHE, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), como previamente descrito por Nunes, et al., (2014). O anel da aorta foi retirado no momento que os animais foram anestesiados para o protocolo da reatividade vascular. O anel da aorta foi rapidamente dissecado e imerso em solução de Krebs (8 mM HEPES, 2 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,45 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 11,1 mM glicose, pH 7,4) por um período de 2 h. Após, estes anéis foram congelados em ojetato (Tissue-Tek OCT Compound, Sakura) e mantidos a $-80^\circ C$ até o momento da análise. Utilizando-se um criostato (CM 1850, Leica Microsystems, Alemanha), cortes transversais dos anéis de aorta (8 μm) foram obtidos e colocados em lâminas gelatinizadas e secos em estufa a $37^\circ C$ por 30 min. Após, as lâminas contendo os cortes foram lavadas e incubadas com Krebs por 30 min a $37^\circ C$. Decorrido o tempo, foi realizada a incubação DHE 2 μM (30 min, $37^\circ C$) em câmara úmida e protegidos da luz. 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. As configurações de análise foram às mesmas em todos os grupos. A média da densidade das fluorescências foi calculada a partir de cinco imagens de segmentos de aorta de cada animal, utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health, EUA).

4.7.2 Quantificação “*in situ*” de óxido nítrico

Para a detecção de óxido nítrico *“in situ”* foi utilizado 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), através de método descrito previamente por Lobato, et al., (2011). Após dissecação as aortas foram imersas em solução tampão de Krebs-HEPES com 30% de sacarose durante uma hora e a seguir foram embebidas em meio de congelamento de tecidos para criostomia Tissue-Tek - OCT (Bayer) e mantidas à -80°C até o momento da realização dos cortes com criostato (Killik®, Easy Path). Os segmentos de aorta foram cortados com 08 μm de espessura e transferidas para lâminas gelatinizadas. Os cortes nas lâminas foram incubados com tampão fosfato (0,1M) contendo CaCl_2 (0,45M) e mantidos em estufa a 37°C por 30 min para retirar o meio de inclusão (Tissue-Tek®, Compound, Sakura – OCT), após secagem foram incubadas em câmara escura a 37°C por 30 min com a finalidade de avaliar a fluorescência do NO e a inibição da síntese de óxido nítrico. As imagens foram coletadas no microscópio de fluorescência invertido Leica DM 2500, usando filtro 568 nm e com câmera Leica DFC 310 FX, usando configurações iguais de imagem em todos os grupos. A média da densidade das fluorescências foi calculada a partir de cinco imagens de segmentos de aorta de cada animal, utilizando o software Image J (National Institutes of Health, EUA).

4.8 Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada através do programa estatístico Graph-Pad Prism 8. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média do número de animais utilizados em cada protocolo experimental.

Para análise estatística das variáveis estudadas, foi efetuada análise de variância (ANOVA) 1 e 2 vias, seguida pelo cálculo das diferenças mínimas significativas entre as médias, pelo teste Tukey. O nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos do Tratamento com Benazepril e L-Arginina sobre a Pressão Arterial Sistólica (PAS) de ratos com Hipertensão Renovascular

Em todos os grupos experimentais a PAS foi aferida no tempo 0 (antes de realizar a implantação do clipe na artéria renal) e não houve diferença entre os grupos (Sham $119,5 \pm 1,7$ mmHg, $n=7$; 2R1C $121,4 \pm 1,3$ mmHg, $n=7$; Benazepril $118,2 \pm 1,5$ mmHg, $n=8$; L-arginina $120,2 \pm 1,6$ mmHg, $n=8$; L-arginina+Benazepril $120 \pm 1,7$ mmHg, $n=8$; $p > 0,05$). No sétimo dias após a cirurgia de implantação do clipe a PAS dos grupos 2R1C, Benazepril, L-arginina, e L-arginina+Benazepril apresentaram um aumento significativo quando comparado ao grupo Sham (2R1C $173,9 \pm 5,4$ mmHg, $n=7$; Benazepril $169,7 \pm 9,6$ mmHg, $n=8$; L-arginina $170,6 \pm 4,5$ mmHg, $n=8$; L-arginina+Benazepril $170,9 \pm 6,7$ mmHg, $n=8$ vs Sham $119,3 \pm 0,9$ mmHg, $n=7$ $p < 0,05$). Ao final do tratamento, a PAS foi novamente aferida para determinar a ação dos fármacos sobre a hipertensão renovascular, onde observamos uma redução significativa da PAS nos grupos tratados em comparação com o grupo 2R1C (Benazepril $135,5 \pm 4,8$ mmHg, $n=8$; L-arginina $149 \pm 2,78$ mmHg, $n=8$; L-arginina+Benazepril $124,9 \pm 3,76$ mmHg, $n=8$ vs 2R1C $178,7 \pm 3,7$ mmHg, $n=7$, $p < 0,05$). Já em comparação com o grupo Sham, somente o grupo L-arginina+Benazepril foi capaz de reduzir a PAS (Sham $116,3 \pm 3,57$ mmHg, $n=7$ vs L-arginina+Benazepril $124,9 \pm 3,76$ mmHg, $n=8$, $p > 0,05$), conforme demonstrado na Figura 7.

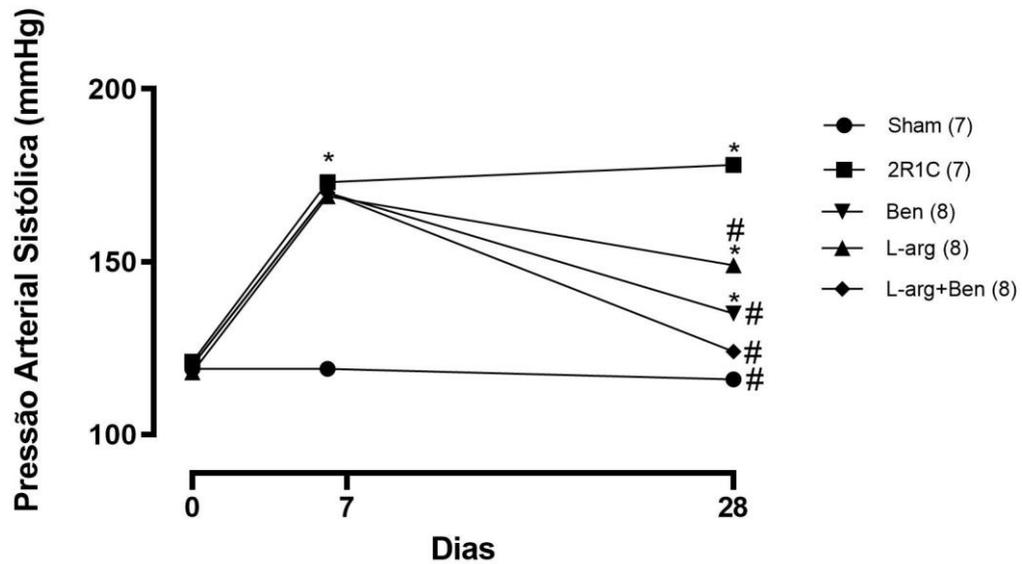


Figura 7 Análise dos valores da PAS (mmHg) medidas por meio da pletismografia de cauda em ratos dos grupos Sham, L-arginina+Benazepril, Benazepril, L-arginina e 2R1C, antes da cirurgia (0), 7 dias após a cirurgia e 28 dias após o procedimento. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA (uma via), * $p < 0,05$ vs Sham no 7º e 28º dia. # $p < 0,05$ vs 2R1C no 28º dia.

5.2 Reatividade Vascular

5.2.1 Contração do músculo liso vascular ao Cloreto de Potássio (KCl)

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

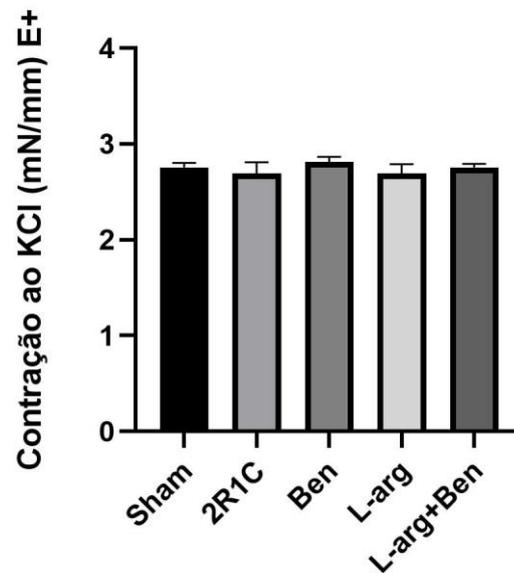


Figura 8 Avaliação da função muscular lisa dos segmentos de aorta (Δ Contração ao KCl) com endotélio. Valores expressos em média e EPM; $p > 0,05$, ANOVA (uma via) /Tukey.

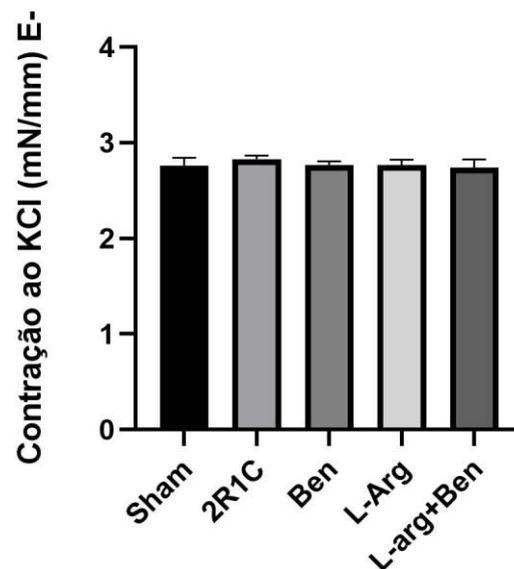


Figura 9 Avaliação da função muscular lisa dos segmentos de aorta (Δ Contração ao KCl) sem endotélio. Valores expressos em média e EPM; $p > 0,05$, ANOVA (uma via) /Tukey.

5.2.2 Efeitos do tratamento com Benazepril e L-arginina sobre a reatividade à fenilefrina nos anéis isolados de aorta de ratos com hipertensão renovascular.

A incubação com concentrações crescentes de Fenilefrina (agonista α_1 adrenérgico), promoveu resposta vasoconstritora concentração-dependente nos anéis de aorta de animais dos grupos estudados (Figura 10). A avaliação das concentrações entre os

diversos grupos demonstrou que o grupo 2R1C apresentou um aumento na contratilidade comparado com os demais grupos (Sham, L-arginina, Benazepril e L-arginina+Benazepril). Ao observar a resposta máxima, podemos verificar que foi menor nos segmentos arteriais dos animais dos grupos L-arginina, Benazepril e L-arginina+Benazepril quando comparados ao grupo 2R1C (Tabela 01). A resposta à fenilefrina foi expressa em porcentagem da contração máxima induzida pelo KCl.

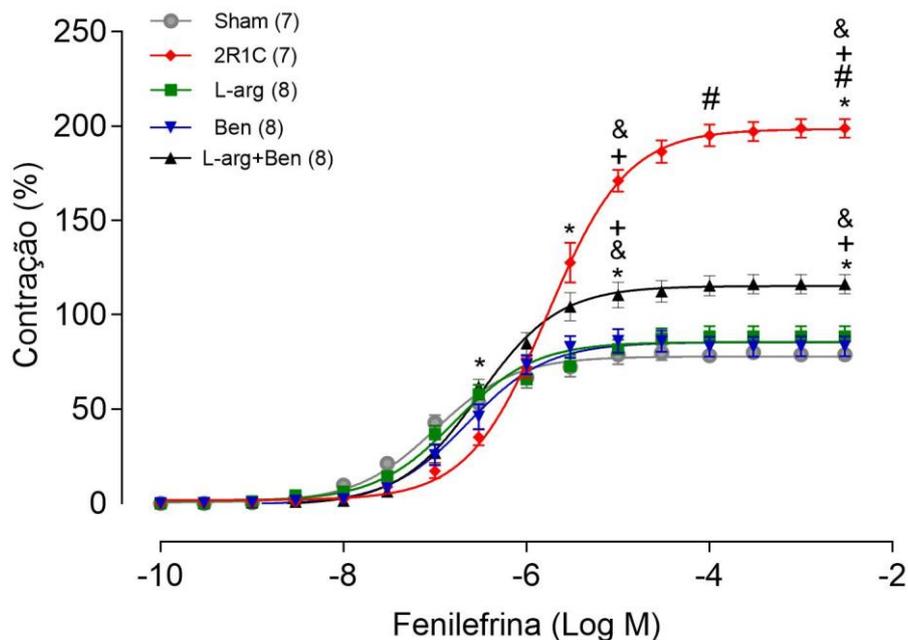


Figura 10 Curvas concentração resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos Wistar nos grupos 2R1C, tratados L-Arginina, Benazepril e associação de L-arginina + Benazepril. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; ANOVA (duas vias)/Tukey. * $p < 0,05$ vs Sham; # $p < 0,05$ vs L-arginina+Benazepril; + $p < 0,05$ vs Benazepril; & $p < 0,05$ vs L-arginina.

Tabela 1 Valores de resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, g) e sensibilidade (pD_2) das curvas concentração - resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas intactos de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: Sham, 2R1C, tratado com L-arginina, tratado com Benazepril e tratado com L-arginina + Benazepril.

Grupo	$R_{m\acute{a}x}$ (%)	pD_2
Sham	$81,3 \pm 2$	$-7,27 \pm 0,07$
2R1C	$185,8 \pm 16$ *#&	$-6,06 \pm 0,2$ *
L-arginina	$81,3 \pm 5,2$	$-6,84 \pm 0,04$
Benazepril	$80,5 \pm 9,7$ +	$-6,63 \pm 0,06$

L-arginina+Benazepril

111,2 ± 4,3 * &

-6,52 ± 0,07 *

Os símbolos representam média ± EPM; ANOVA (uma via)/Tukey. * p < 0,05 vs Sham; # p < 0,05 vs L-arginina+Benazepril; + p < 0,05 vs Benazepril; & p < 0,05 vs L-arginina.

5.2.3 Modulação Endotelial do Tratamento com Benazepril e L-arginina sobre a reatividade a Fenilefrina nos anéis isolados de aorta de ratos com hipertensão renovascular.

Para definir se haveria alguma participação do endotélio no aumento da resposta contrátil à Fenilefrina, removemos o endotélio e analisamos o comportamento das curvas de ambos os grupos. A remoção mecânica do endotélio demonstrou um aumento da resposta contrátil à Fenilefrina em todos os grupos estudados (Figura 11), no entanto observamos que os grupos BEN e L-arg apresentaram resposta reduzida e equivalente ao grupo Sham. A resposta à fenilefrina foi expressa em porcentagem da contração máxima induzida pelo KCl.

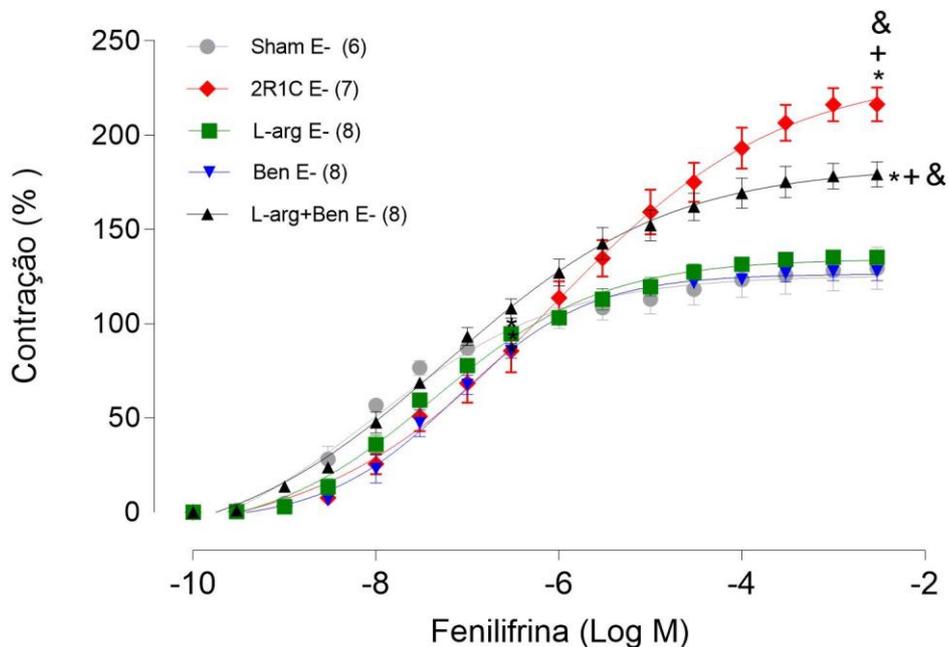


Figura 11 Efeito da remoção do endotélio (E-) na curva concentração resposta à fenilefrina em anéis isolados de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos Sham (Sham E-), dois rins um clipe (2R1C E-), tratado com L-arginina (L-arg E-), tratado com Benazepril (Benazepril E-) e tratado com L-arginina+Benazepril (L-arg+Ben E-). O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média ± EPM; ANOVA (duas vias)/ Tukey. * p < 0,05 vs Sham; # p < 0,05 vs L-arginina+Benazepril; + p < 0,05 vs Benazepril; & p < 0,05 vs L-arginina.

Adicionalmente, a avaliação da resposta máxima a remoção do endotélio (E-) quando comparado ao anel com o endotélio pérvio (E+) apresentou um aumento da R_{máx} e da sensibilidade nos grupos Sham, L-arginina, Benazepril e L-arginina+Benazepril. (Tabela 2).

A análise da diferença percentual abaixo da curva (% dAUC) mostrou que a modulação endotelial na resposta contrátil à fenilefrina em ratos com hipertensão renovascular tratados com L-arginina e Benazepril é significativamente maior no grupo tratado com L-arginina+Benazepril quando comparado aos grupos 2R1C (%dAUC – L-arg+Ben: 96,8 ± 28,3 vs 2R1C: 31,3 ± 11,5) (Figura 12 F).

Tabela 2 Valores de resposta máxima (R_{máx}) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração- resposta à fenilefrina em anéis (intactos e desnudos) de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos diferentes grupos estudados.

Grupo	R _{máx} (%)	pD ₂
Sham E+	81,28 ± 1,96	-7,27 ± 0,07
Sham E-	116,3 ± 8,40 *	-7,85 ± 0,07 *
2R1C E+	185,8 ± 16,02	-6,06 ± 0,21
2R1C E-	194,7 ± 11,10	-6,22 ± 0,15
L-arginina E+	81,33 ± 5,20	-6,84 ± 0,04
L-arginina E-	125,3 ± 4,39 *	-7,30 ± 0,11 *
Benazepril E+	80,50 ± 9,7	-6,63 ± 0,06
Benazepril E-	121,1 ± 3,03 *	-7,12 ± 0,12 *
L-arginina+Benazepril E+	111,2 ± 4,33	-6,52 ± 0,07
L-arginina+Benazepril E-	163,4 ± 7,45 *	- 7,02 ± 0,12 *

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

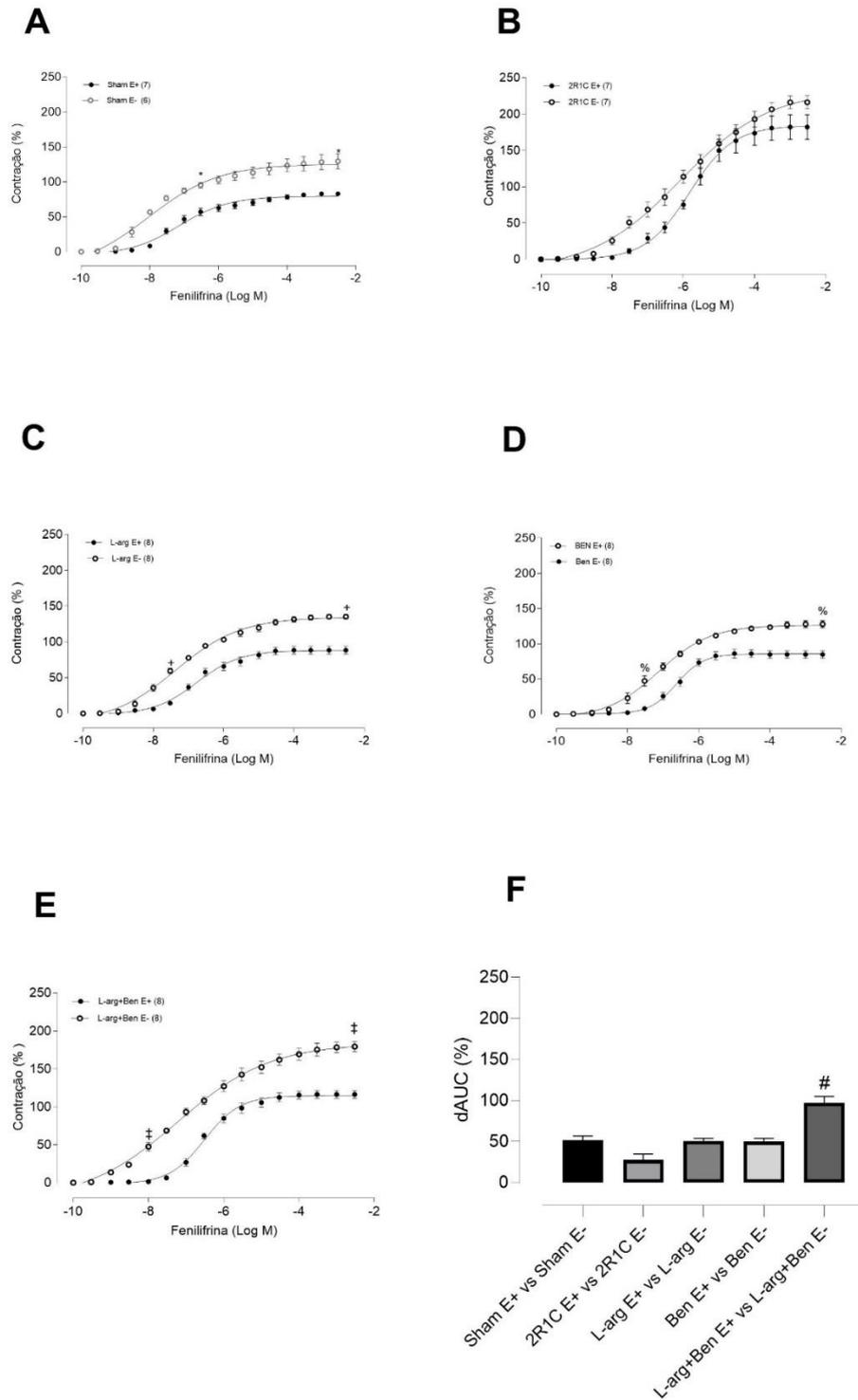


Figura 12

Figura 12: Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (A) Sham (Sham E+) e após a retirada do endotélio (Sham E-); (B) (2R1C E+) e após a retirada do endotélio (2R1C E-); (C) tratado com L-arginina (L-arg E+) e após a retirada do endotélio (L-arg E-); (D) tratado com Benazepril (Ben E+) e após a retirada do endotélio (Ben E-); (E) tratado com L-arginina associado a Benazepril (L-arg+Ben E+) e após a retirada do endotélio (L-arg+ Ben E-); (F) Diferença percentual da área abaixo da curva em vasos com endotélio intacto e desnudo entre os grupos. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; ANOVA (uma e duas vias)/Tukey. * $p < 0,05$ Sham E+ vs Sham

E-; #p<0,05 2R1C E+ vs 2R1C E-; + L-arg E+ vs L-arg E-; % Ben E+ vs Ben E-; ‡ L-arg+Ben E+ vs L-Arg+Ben E-

5.2.4 Efeito do tratamento com L-arginina e benazepril sobre o relaxamento dependente do endotélio de aorta de ratos com hipertensão renovascular.

A avaliação da resposta máxima (R_{máx}) foi significativamente menor nos segmentos arteriais dos animais do grupo 2R1C comparado aos demais grupos estudados. Já a avaliação da sensibilidade (pD₂) demonstrou um aumento significativo nos grupos tratados (isolado ou associado) quando comparados ao grupo 2R1C (tabela 3). Ao avaliarmos a curva concentração resposta a Ach, o relaxamento mediado pelo endotélio apresentou uma resposta vasodilatadora nos grupos tratados, entretanto, o grupo L-arginina não foi capaz de normalizar a resposta em comparação ao grupo SHAM (Figura 13).

Tabela 3 Valores de resposta máxima (R_{máx}, g) e sensibilidade (pD₂) induzidas pela acetilcolina em anéis isolados de aortas intactos de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: Sham, 2R1C, tratado com tratado com L-arginina, tratado com Benazepril e tratado com L-arginina + Benazepril. A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina.

Grupo	R _{máx} (%)	pD ₂
Sham	97,13 ± 1,36 *	-7,34 ± 0,17 *
2R1C	61,25 ± 4,1	-6,59 ± 0,1
L-arginina	89,36 ± 1,6 *	-7,58 ± 0,15 *
Benazepril	94,4 ± 3,46 *	-8,18 ± 0,26 * +
L-arginina+Benazepril	97,5 ± 3,1 *	-8,1 ± 0,13 *

Valores expressos em média ± EPM; ANOVA (uma via)/ Tukey. *p<0,05 vs 2R1C, + p<0,05 vs Sham.

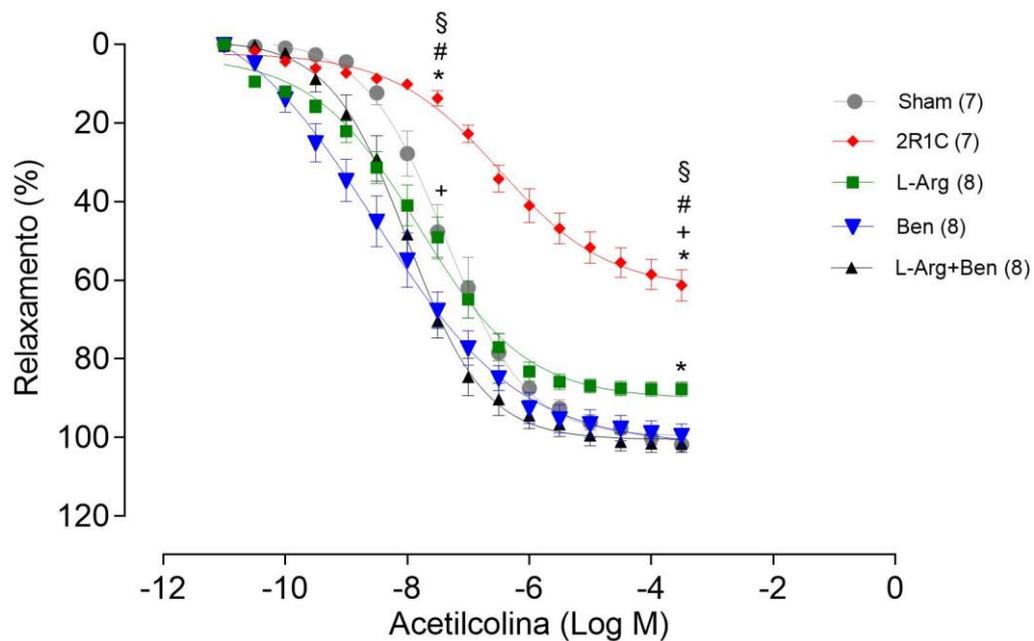


Figura 13 Curvas concentração-resposta à acetilcolina para a avaliação do relaxamento dependente do endotélio em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos 2R1C, tratados L-Arginina, Benazepril e associação de L-arginina + Benazepril. O número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; ANOVA (duas vias)/ Tukey. * $p < 0,05$ vs Sham; # $p < 0,05$ vs L-arginina+Benazepril; + $p < 0,05$ vs Benazepril; & $p < 0,05$ vs L-arginina.

5.2.5 Efeito do tratamento com L-arginina e benazepril sobre o relaxamento independente do endotélio de aorta de ratos com hipertensão renovascular.

O relaxamento independente do endotélio foi avaliado através do efeito induzido pelo Nitroprussiato de sódio (NPS). A avaliação da resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$) e da sensibilidade (pD_2) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados (Tabela 4). A análise da curva concentração resposta ao NPS não foi diferente nos grupos estudados (Figura 14).

Tabela 4 Valores da resposta máxima ($R_{m\acute{a}x}$, g) e sensibilidade (pD_2) induzidas pelo Nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis desnudos de aortas de ratos com hipertensão renovascular dos diferentes grupos estudados. A resposta máxima está expressa como percentual de relaxamento após a pré-contração com fenilefrina.

Grupo	$R_{m\acute{a}x}$ (%)	pD_2
Sham	$97,5 \pm 1,35$	$-7,87 \pm 0,25$
2R1C	$90,1 \pm 2,2$	$-8,06 \pm 0,35$

L-arginina	96,8 ± 1,95	- 7,50 ± 0,2
Benazepril	92,03 ± 1,84	- 7,90 ± 0,1
L-arginina+Benazepril	93,2 ± 2,45	- 8,17 ± 0,2

Valores expressos em média ± EPM; ANOVA (uma via)/ Tukey. P>0,05.

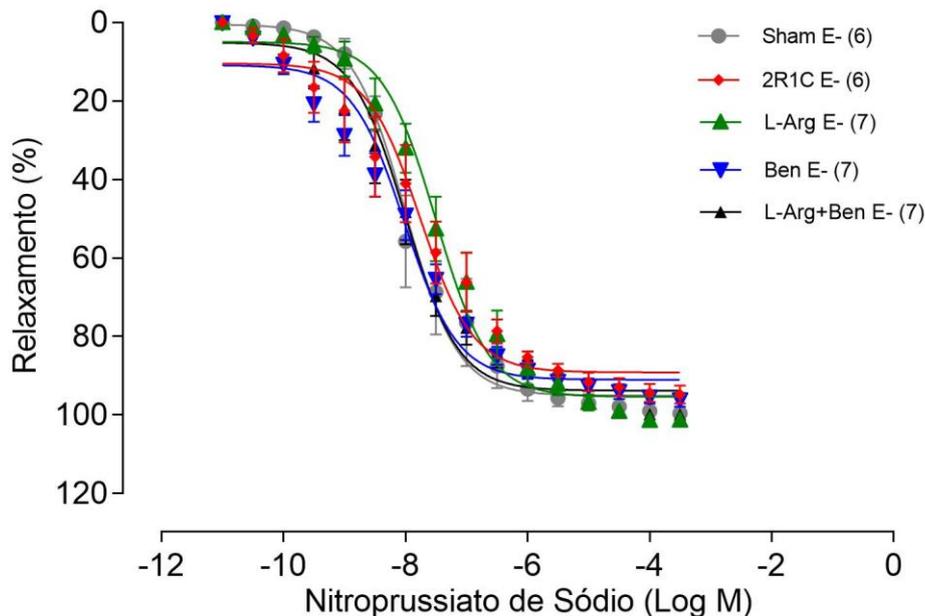


Figura 14 Curvas concentração-resposta ao NPS para a avaliação do relaxamento independente do endotélio em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos Sham (Sham E-), dois rins um clipe (2R1C E-), tratado com Benazepril (Ben E-), tratado com L-arginina (L-arg E-) e tratado com L-arginina+Benazepril (L-arg+Bem E-). Os valores estão expressos como percentual de relaxamento após a pré-contracção com fenilefrina. ANOVA (duas vias)/ Tukey. p > 0,05.

5.2.6 Efeito dos fatores endoteliais envolvidos no tratamento com Benazepril e L-arginina sobre a resposta à fenilefrina nos anéis isolados de aorta de ratos com hipertensão renovascular.

Os resultados apresentados anteriormente mostraram que os tratamentos com Benazepril, L-arginina ou sua associação foram capazes de diminuir a resposta constritora à fenilefrina e esta diminuição foi abolida após a lesão endotelial, demonstramos também que a associação do L-arginina + Benazepril foi capaz de restaurar o relaxamento à acetilcolina. Assim, procuramos avaliar se os diferentes tratamentos de escolha alteram os efeitos endoteliais, através do aumento da biodisponibilidade de NO, em ratos com hipertensão renovascular. Para isso foi

realizada curva contração resposta a fenilefrina na presença de L-NAME (inibidor inespecífico da síntese de NO).

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

Para analisar o papel do óxido nítrico na resposta vasoconstritora à fenilefrina, os segmentos de aorta torácica com endotélio íntegro foram pré-incubados com L-NAME (100 μ M). A resposta máxima (R_{máx}) foi significativamente maior nos segmentos arteriais dos animais estudados, exceto no grupo 2R1C (Tabela 5 e Figura 15).

Tabela 5 Valores de resposta máxima (R_{máx}, g) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas de ratos com hipertensão renovascular dos diferentes grupos estudados, na presença e na ausência de L-NAME.

Grupo	R _{máx} (%)	pD ₂
Sham E+	81,28 \pm 1,96	-7,27 \pm 0,07
Sham L-NAME	117,5 \pm 8,16 *	-7,87 \pm 0,13 *
2R1C E+	185,8 \pm 16	-6,06 \pm 0,21
2R1C L-NAME	203,4 \pm 14,72	-6,45 \pm 0,15
L-arginina E+	81,3 \pm 5,2	-6,84 \pm 0,04
L-arginina L-NAME	122,1 \pm 6,34 *	-7,50 \pm 0,04 *
Benazepril E+	80,50 \pm 9,70	-6,63 \pm 0,06
Benazepril L-NAME	122,4 \pm 9,22 *	-7,76 \pm 0,20 *
L-arginina+Benazepril E+	111,2 \pm 4,33	-6,52 \pm 0,07
L-arginina+Benazepril L-NAME	145,6 \pm 8,32 *	-7,63 \pm 0,16 *

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

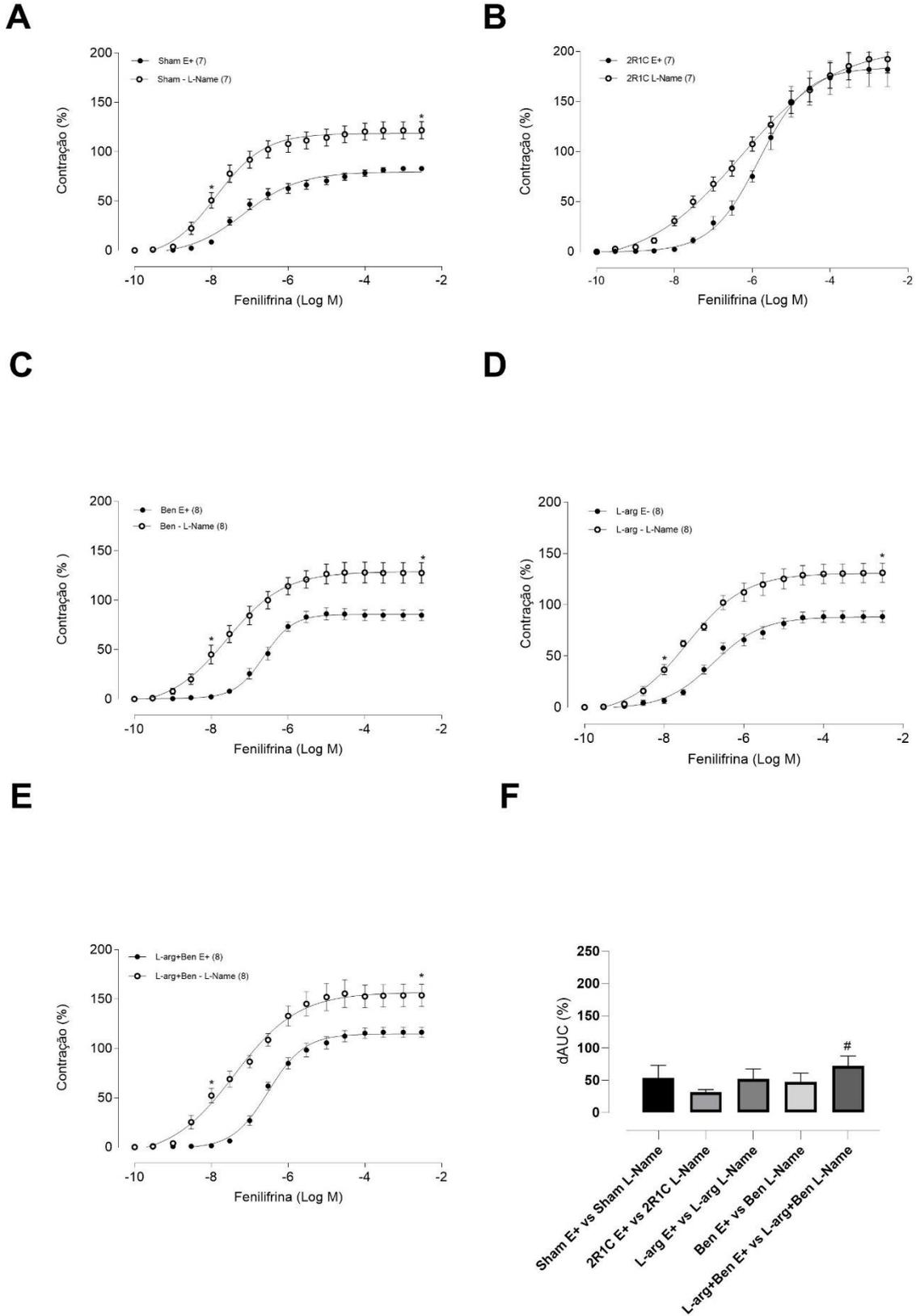


Figura 15 Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (A) Sham (Sham E+) e após a incubação com L-NAME (Sham L-NAME); (B) 2R1C (2R1C E+) e após a incubação com L-NAME (2R1C L-NAME); (C); L-arginina (L-arg E+) e após a incubação com L-NAME (L-arg L-NAME); (D) Benazepril (Ben E+) e após a incubação com L-NAME (Ben L-NAME); (E) L-arginina + Benazepril (L-arg+Ben E+) e após a incubação com L-NAME (L-arg+Ben L-NAME); (F) Diferença percentual da área abaixo da curva entre os grupos estudados. O

número de animais está demonstrado entre parênteses. Os símbolos representam média \pm EPM; ANOVA (uma e duas vias) seguido de Tukey. * $p < 0,05$ E+ vs L-NAME; # % dAUC 2R1C vs L-arg+Ben.

Diante desse resultado utilizamos um ensaio de detecção *in situ* de NO em secções transversais de anéis isolados de aorta (08 μ m), mensurada pela sonda DAF-2 fluorescente (figura 16). A hipertensão 2R1C reduziu a produção de NO *in situ*, quando comparado ao grupo SHAM. Os tratamentos foram capazes de aumentar a fluorescência nos 3 grupos quando comparados ao grupo 2R1C.

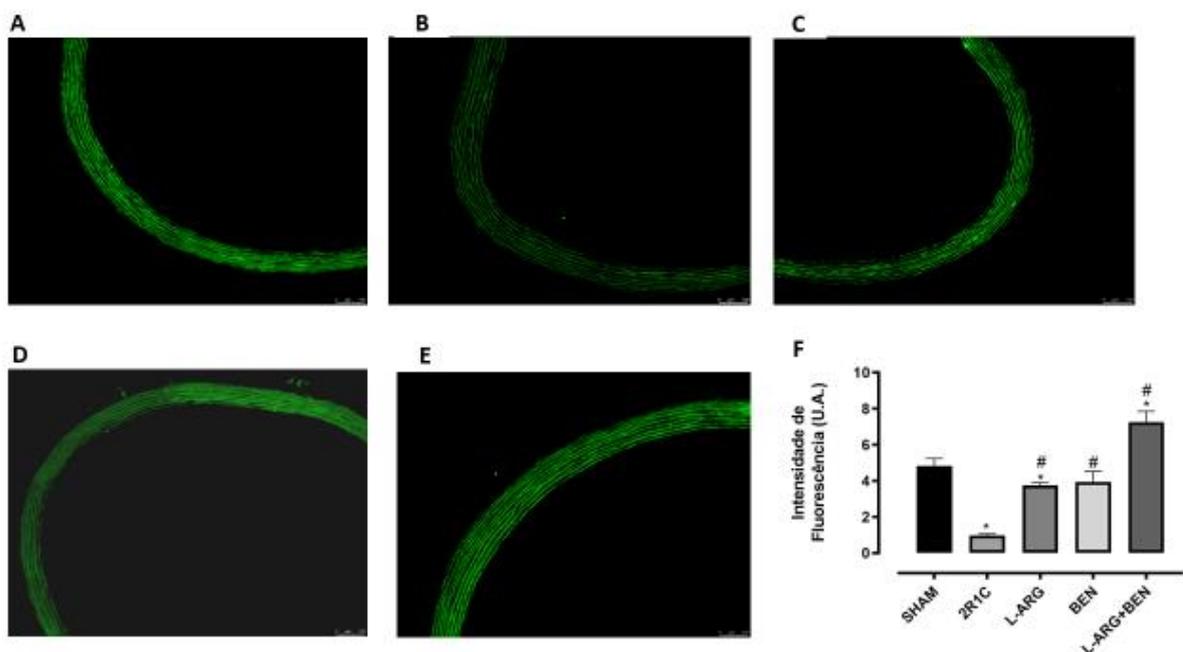


Figura 16. Imagens de microscopia apresentam a fluorescência emitida por 4,5 diaminofluoresceína (DAF-2) na artéria aorta dos ratos Sham (A), 2R1C (B), L-ARG (C), BEN (D) e L-ARG+BEN (E). Gráfico com valores da fluorescência emitida por diaminofluoresceína (DAF-2) (F). Valores expressos em média \pm EPM; (n = 4 por grupo). * $P < 0,05$ em relação ao grupo SHAM; # $P < 0,05$ em relação ao grupo 2R1C.

5.2.8 Participação da via da enzima Ciclooxygenase (COX) no tratamento com L-arginina e Benazepril sobre a resposta contrátil a fenilefrina em aorta torácica de ratos com hipertensão renovascular.

Para avaliar a participação da via da Ciclooxygenase no aumento da resposta contrátil à fenilefrina nos grupos estudados, utilizamos um inibidor não seletivo da COX, a Indometacina. A resposta máxima foi semelhante em todos os grupos, exceto nos

grupos 2R1C e L-arginina, onde a reatividade vascular foi reduzida na presença desse fármaco (Tabela 6 e Figura 17).

Tabela 6 Valores de resposta máxima (R_{máx}, g) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis isolados de aortas de ratos com hipertensão renovascular dos diferentes grupos estudados, na presença e na ausência de Indometacina (INDO).

Grupo	R _{máx} (%)	pD ₂
Sham E+	81,28 ± 1,96	-7,27 ± 0,07
Sham INDO	81,58 ± 5,93	-7,29 ± 0,06
2R1C E+	185,8 ± 16 *	-6,06 ± 0,21 *
2R1C INDO	75,36 ± 9,69	-6,91 ± 0,14
L-arginina E+	81,33 ± 5,2 *	-6,84 ± 0,04
L-arginina INDO	68,94 ± 4,98	-7,05 ± 0,02
Benazepril E+	80,50 ± 9,7	-6,63 ± 0,06
Benazepril INDO	77,00 ± 5,24	-6,90 ± 0,07
L-arginina+Benazepril E+	111,2 ± 4,33	-6,52 ± 0,07
L-arginina+Benazepril INDO	98,85 ± 4,57	-6,56 ± 0,07

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

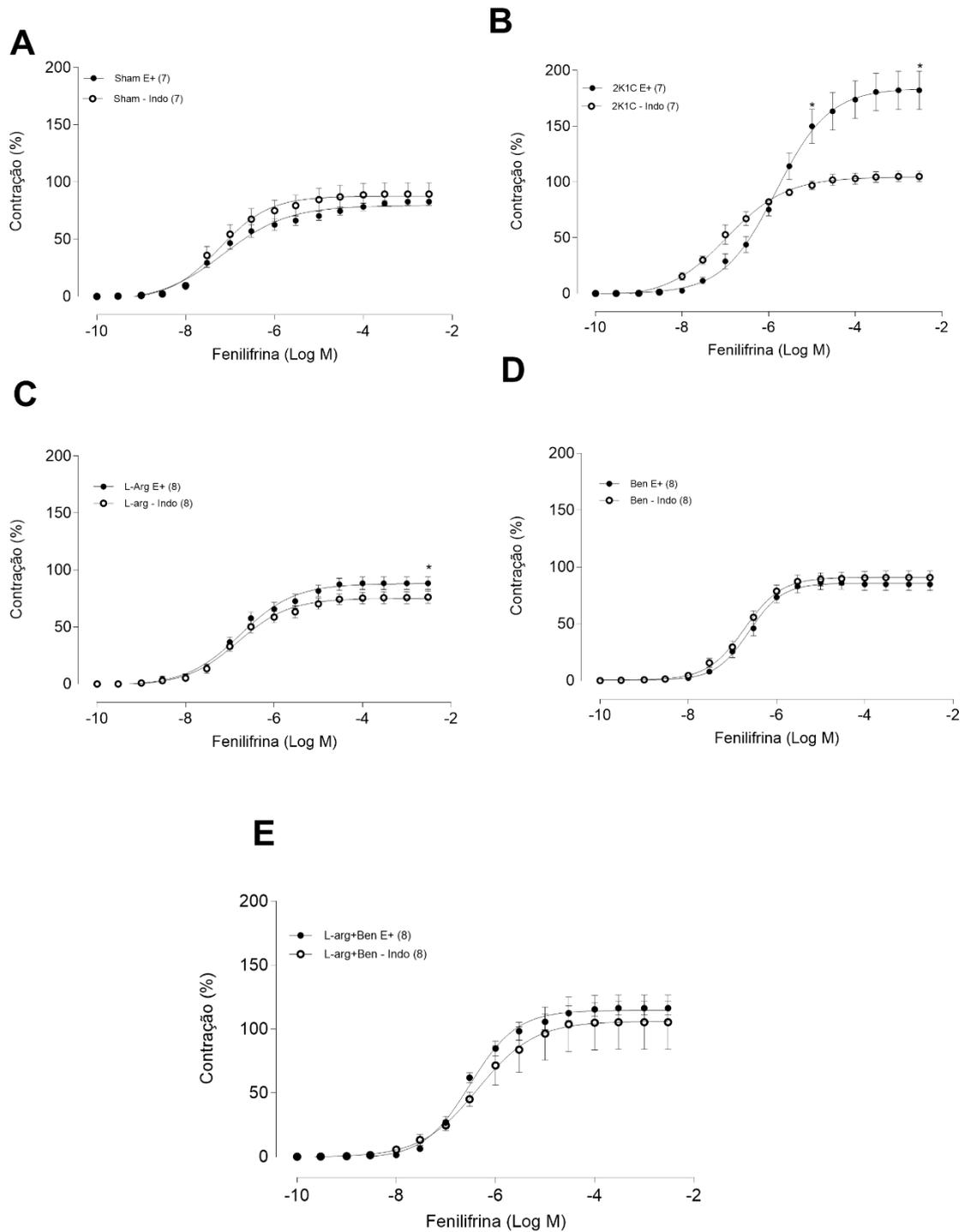


Figura 17 Curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular dos grupos: (A) Sham (Sham E+) e após a incubação com Indometacina (Sham Indo); (B) 2R1C (2R1C E+) e após a incubação com Indometacina (2R1C Indo); (C) Benazepril (Ben E+) e após a incubação com Indometacina (Ben Indo); (D) L-arginina (L-arg E+) e após a incubação com Indometacina (L-arg Indo); (E) L-arginina + Benazepril (L-arg+Ben E+) e após a incubação com Indometacina (L-arg+Ben Indo); Os símbolos representam média \pm EPM; ANOVA (uma e duas vias) seguido de Tukey.. * $p < 0,05$ E+ vs Indometacina.

5.3 Efeitos do Tratamento com L-arginina e Benazepril sobre a deposição de colágeno e espessamento da parede da artéria aorta torácica

Ao analisar as lâminas histológicas, podemos observar alterações estruturais promovidas pelo modelo 2R1C, que levaram ao aumento da espessura da parede do vaso. Os tratamentos com Benazepril, L-arginina e a associação com Benazepril foram capazes de reduzir essas alterações (figura 18).

A medida do conteúdo de colágeno pela coloração com picosírius mostrou um aumento da deposição de colágeno promovida pelo modelo 2R1C quando comparado ao grupo Sham. Os tratamentos com Benazepril, L-arginina e a associação com Benazepril foram capazes em reduzir o conteúdo de colágeno (Figura 19).

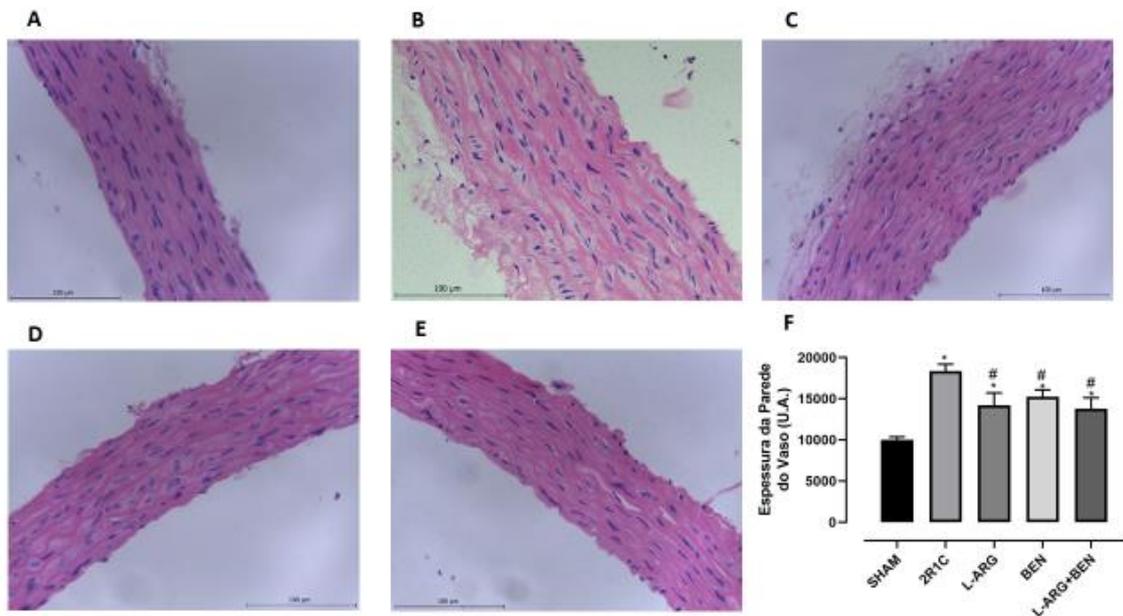


Figura 18 Imagens histológicas representativas de seções arteriais microscópicas coradas utilizando hematoxilina e eosina (HE) (SHAM: A; 2R1C: B; L-ARG: C; BEN: D; LARG+BEN: E) obtidas de artérias aortas de ratos sham e 2R1C tratados com L-arginina e benazepril. Quantificação da espessura do vaso (F). 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 2R1C.

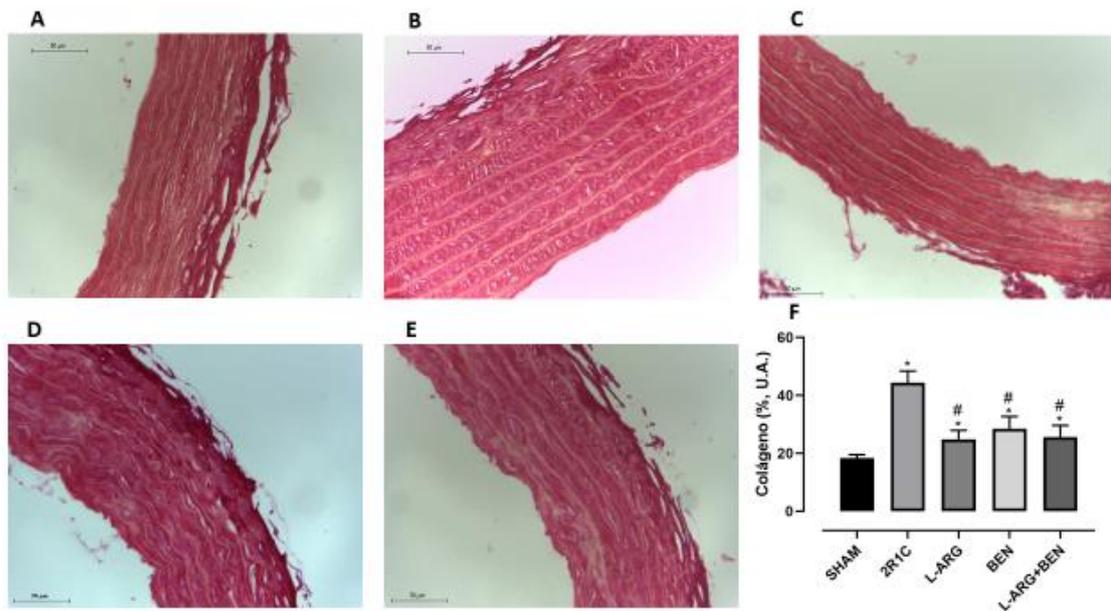


Figura 19 Imagens histológicas representativas de seções arteriais microscópicas coradas utilizando picrosirius red (PR) (SHAM: A; 2R1C: B; L-ARG: C; BEN: D; LARG+BEN: E) obtidas de artérias aortas de ratos sham e 2R1C tratados com L-arginina e benazepril. Quantificação do conteúdo de colágeno (F). Valores expressos em média \pm EPM; (n = 8 por grupo). *P < 0,05 em relação ao grupo SHAM; #P < 0,05 em relação ao grupo 2R1C.

5.4 Quantificação de Ânion Superóxido “*In Situ*” em aorta torácica de ratos com Hipertensão Renovascular

A análise da fluorescência produzida pelo Dihidroetídeo - DHE na artéria aorta revelou um aumento da produção de EROs nos animais 2R1C (Figura 20 B), e que os tratamentos com L-ARG, BEN e L-ARG+BEN (20 C, D, E) foram efetivos em reduzir os valores de fluorescência quando comparados ao 2R1C.

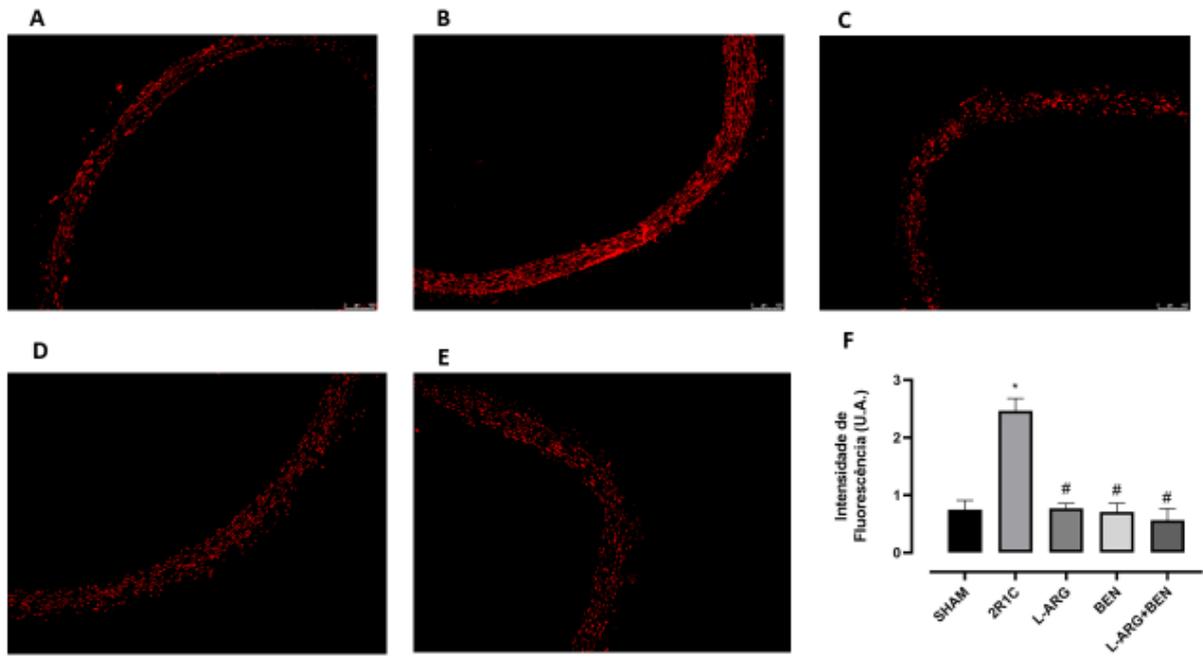


Figura 20 Detecção “*in situ*” da produção de ânion superóxido em segmentos de aorta. Microfotografias de fluorescência representando secções transversais de aorta torácica na presença de DHE dos ratos SHAM (A), 2R1C (B), L-ARG (C), BEN (D) e L-ARG+BEN (E). Gráfico de barras demonstrando a análise quantitativa (F). 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 2R1C.

6 DISCUSSÃO

No nosso estudo investigamos o tratamento com um inibidor da ECA (Benazepril) associado ou isolado a um precursor do NO (L-arginina) no modelo de hipertensão 2R1C. Esse modelo é um modelo clássico de hipertensão renovascular que envolve a ativação do SRAA e do sistema nervoso simpático. Apesar da hipertensão renovascular ter a sua prevalência estimada em 2% dos hipertensos, ela pode chegar a 6,8% na população com 65 anos ou mais e 5,8% nos casos de hipertensão secundária em adultos jovens, sendo caracterizada como uma hipertensão com elevada mortalidade (HERRMANN, 2018).

As manifestações clínicas da hipertensão renovascular são heterogêneas e evoluem com repercussão hemodinâmica mínima e silenciosas, até progredirem para níveis críticos associados a ativação de mecanismos fisiopatológicos hipertensivos (ativação do SRAA) e de isquemia renal (PARIKH, 2014). O SRAA tem envolvimento importante no início e na manutenção da hipertensão renovascular, através da formação final da Ang II (NAVAR et al., 2002). De forma complementar, estudos apontam que o aumento da pressão arterial é mediada por diversos mecanismos, cujo traço comum é a disfunção endotelial e o estresse oxidativo, caracterizados pela baixa disponibilidade de NO e pelo desequilíbrio entre os fatores de contração e relaxamento do endotélio vascular (KANEL, 1993).

Alguns grupos farmacológicos são utilizados na prática clínica visando contrapor-se ao SRAA, como os IECAs e BRAs. Os IECAs pertencem a uma categoria de fármacos com uso crescente em diversas doenças cardiovasculares, pois impedem a formação de Ang II e reduzem a degradação da bradicinina, contribuindo para seu efeito anti-hipertensivo e promovem regressão da hipertrofia ventricular (DAHLOF et al., 1992), diminuem a morbi-mortalidade associada à insuficiência cardíaca, reduzem a mortalidade e melhoram a função cardíaca pós-infarto (DAHLOF et al., 1992; PFEFFER et al., 1992), melhoram a disfunção endotelial (Mancini et al., 1996) e reduzem a progressão da nefropatia diabética e de outras nefropatias (MASCHIO et al., 1996; LEWIS et al., 1993).

Diante disso, parece promissor a utilização de um medicamento que atua bloqueando o SRAA, o Benazepril, mais a L-arginina, um precursor da síntese do principal vasodilatador derivado do endotélio, o NO, para avaliar os seus efeitos

isolados e a associação sobre a reatividade vascular da aorta torácica e o remodelamento vascular de ratos com hipertensão renovascular, o que poderia propor uma nova abordagem terapêutica contra a progressão da doença. Portanto, a importância desse estudo reside no fato de avaliar e tornar mais conhecido o efeito do tratamento combinado de Benazepril e L-arginina na hipertensão renovascular sobre o sistema cardiovascular.

Através dos resultados encontrados, o presente estudo forneceu três novas descobertas importantes para a consideração do uso da associação da L-arginina+Benazepril na farmacoterapia do tratamento da hipertensão renovascular. O primeiro achado foi que a associação da L-arginina e Benazepril reduziu significativamente a pressão dos ratos que desenvolveram a hipertensão renovascular após 21 dias de tratamento, ficando semelhante ao grupo Sham. O segundo foi uma melhora significativa nas respostas vasculares após 21 dias de tratamento, atingindo valores semelhantes ao grupo Sham. E o terceiro achado é que a associação da L-arginina e do Benazepril levou a um relaxamento dependente do endotélio semelhante ao grupo Sham.

Os resultados também mostraram que o tratamento com Benazepril e L-arginina de forma isolada foram capazes de reduzir significativamente a PAS comparados ao grupo 2R1C, mas não foram capazes de normalizar a PAS de ratos com hipertensão renovascular. Já a associação das duas drogas foi capaz de reduzir a PAS comparado ao grupo Sham.

Um estudo realizado com pacientes com hipertensão essencial demonstrou que a monoterapia com Benazepril controlou a pressão arterial. O efeito redutor da pressão arterial deve-se principalmente à vasodilatação na circulação renal e é observado até 24 h após a administração do fármaco (VALVO,1990). Outro estudo realizado com pacientes diabéticos e hipertensos comparou os efeitos do Benazepril e Losartana na função endotelial e rigidez vascular e foi observado uma redução maior da pressão arterial no grupo Benazepril, sendo sugerido pelos autores que pacientes diabéticos e hipertensos em uso de Benazepril apresentam maior redução da PCR (proteína C reativa) e uma leve melhora na vasodilatação mediada por fluxo do que aqueles em uso de losartana (GISMONDI, 2015). Um outro estudo realizado em ratos com hipertensão renovascular (modelo 2R1C), demonstrou a redução significativa da

pressão arterial sistólica dos ratos tratados com Benazepril, o que corrobora com os nossos resultados. O mecanismo de diminuição da PAS está associado ao efeito do Benazepril de reduzir os níveis plasmáticos e teciduais de Ang II, através da inibição da ECA, e da redução do estresse oxidativo (HUANG, 2017). Mochel et al. (2015) forneceram uma descrição abrangente do efeito do Benazepril na dinâmica do SRAA em cães. Foi demonstrado que a concentração plasmática de Ang II diminuiu acentuadamente após a administração em bolus de Benazepril, o que levou a redução da pressão arterial dos cães.

Por outro lado, estudos realizados em nosso laboratório confirmam o que foi visto em nossos experimentos com relação a redução da PAS no uso isolado da L-arginina, que 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; MENGAL et al., 2016), 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). O aumento na formação do NO pode ser um componente importante na redução da PAS, por facilitar a reperfusão renal e promover a vasodilatação sistêmica.

A L-arginina associada ao Benazepril foi eficiente em normalizar a PAS, esse fato aponta como promissor o tratamento com L-arginina em associação a outros anti-hipertensivos na redução da hipertensão arterial (SANTUZZI et al., 2014; TIRADENTES et al., 2015).

A hipertensão induz alterações vasculares estruturais e funcionais que estão relacionadas a complicações cardiovasculares. A remodelação arterial em resposta às alterações hemodinâmicas hipertensivas leva a alterações na estrutura vascular (ARRIBAS et al., 2006; HUMPHREY, 2008), e este processo envolve a degradação e reorganização da matriz extracelular, resultando em uma hipertrofia do vaso, aumento do conteúdo de colágeno e elastina (CASTRO et al., 2008, 2009) e rigidez vascular (MONTEZANO et al., 2015). A este respeito as metaloproteinases de matriz tem sido implicada em alterações vasculares funcionais e estruturais da hipertensão (SCHULZ, 2007; RAFFETTO E KHALIL, 2008; CASTRO et al., 2009). Níveis aumentados das

metaloproteinases de matriz foram demonstrados em modelos clínicos e experimentais de hipertensão (BOUVET et al., 2005; MARTINEZ et al., 2006; CASTRO et al., 2008; FONTANA et al., 2011), e o principal mecanismo está envolvido na ativação do SRAA e estresse oxidativo que podem interagir para promover a regulação positiva das metaloproteinases de matriz (LUCHTEFELD et al., 2005; KANDASAMY et al., 2010). No modelo de hipertensão experimental 2R1C o SRAA é ativado e o aumento dos níveis de Ang II promove hipertrofia vascular e aumento de EROs, especialmente através da ativação da NADPH oxidase, a principal fonte de ânions superóxido vasculares (Montenegro et al., 2011).

Em nosso estudo, observamos alterações estruturais e mecânicas na artéria aorta de ratos com hipertensão 2R1C, através do aumento da deposição de colágeno, que é responsável pela rigidez arterial. Esses achados foram acompanhados pela diminuição da deposição de colágeno na parede das artérias após os tratamentos. Entretanto sobre a espessura da parede do vaso, os tratamentos com L-arginina, Benazepril e sua associação (L-ARG+BEN) foram efetivos em reduzir a hipertrofia causada pela hipertensão renovascular.

Ceron et al. (2012), ao estudarem as alterações vasculares provocadas na hipertensão renovascular, através do modelo 2R1C, observou um aumento significativo de deposição de colágeno na parede das artérias na fase inicial da hipertensão que tendem a aumentar na fase crônica. Outro dado importante encontrado, foi que ocorreu um aumento da atividade da ECA, associadas as alterações vasculares, indicando uma importante ativação do SRAA.

Estudos clínicos e experimentais demonstraram que as alterações vasculares ocasionadas pela hipertensão podem ser normalizadas pelo tratamento com drogas que bloqueiam o SRAA (ROSEI et al., 2009; LAURENT, 2019) ou por uso de antioxidantes ou inibidores de metaloproteinases da matriz vascular (CERON, 2010). Esses efeitos podem estar relacionados à redução da pressão arterial, bem como a diminuição dos efeitos mediados por Ang II na musculatura vascular lisa, incluindo vasoconstrição, crescimento celular e inflamação (SHARIFI et al., 1998; LI et al., 1997).

A Fenilefrina promoveu uma resposta vasoconstrictora concentração dependente. Os animais do grupo 2R1C apresentaram um aumento da contratilidade

em relação aos demais grupos, sugerindo que a hipertensão 2R1C pode desencadear alterações na capacidade vasodilatadoras e vasoconstrictoras do endotélio vascular, responsáveis pela alteração da aorta torácica. Dados semelhantes foram encontrados por Choi (2016), que observou um aumento da resposta à fenilefrina em ratos 2R1C comparados a ratos Sham.

Contudo, no presente estudo, podemos observar que os tratamentos com Benazepril, L-arginina ou sua associação, L-arginina+Benazepril, promoveram uma diminuição, concentração dependente, da reatividade à fenilefrina em anéis de aorta comparados ao grupo 2R1C. Resultado semelhante foi encontrado por Chen (2014), que demonstrou uma melhora na disfunção endotelial e redução na pressão arterial em ratos diabéticos hipertensos tratados por 8 semanas com Benazepril. Santuzzi et al. (2014) demonstrou em seus estudos que ao tratar ratos 2R1C com L-arginina houve uma diminuição, concentração dependente, da reatividade à fenilefrina em anéis de aorta comparado ao grupo 2R1C.

Ao avaliarmos modulação endotelial através do protocolo de reatividade vascular na ausência e na presença do endotélio vascular, podemos verificar que na ausência do endotélio a resposta contrátil a fenilefrina foi aumentada em todos os grupos estudados. No entanto, a magnitude dessa resposta, avaliada através da área abaixo da curva, foi maior no grupo tratado com L-arginina+Benazepril quando comparada aos demais grupos. Esses dados associados à diminuição da reatividade vascular a fenilefrina sugerem que o tratamento de L-arg+Ben foi mais potente em liberar um fator de relaxamento derivado do endotélio, sendo portanto capaz de restaurar o desequilíbrio ocasionado pela hipertensão renovascular.

Ao analisar os resultados descritos acima, podemos verificar um desequilíbrio na função endotelial e a partir disso foi investigado como a hipertensão 2R1C e os tratamentos propostos alteravam o relaxamento vascular dependente do endotélio, onde foi realizado curvas concentração resposta a acetilcolina, que promove relaxamento dependente do endotélio, nos anéis de aorta.

Nossos achados demonstraram que os grupos Benazepril e associação restauraram o relaxamento dependente do endotélio, sugerindo que a vasodilatação dependente do endotélio foi preservada nesses grupos. Por outro lado, os demais grupos (2R1C e L-arginina) apresentaram um prejuízo curvas concentração resposta

a acetilcolina, sugerindo uma alteração na produção de NO estimulada pela acetilcolina.

Ao avaliarmos a resposta máxima, observamos que o grupo L-arginina, assim como o grupo Benazepril e a associação, se assemelham ao grupo Sham, demonstrando que a monoterapia de L-arginina também é capaz de restaurar o relaxamento dependente do endotélio, portanto, sendo capaz de prevenir o prejuízo na produção e/ou liberação de NO pela acetilcolina promovida pela hipertensão renovascular.

Resultados semelhantes foram encontrados por Choi (2016) e Santuzzi et al. (2014), que demonstraram que a hipertensão renovascular promoveu prejuízo na vasodilatação induzida pela acetilcolina. Em estudos realizados por Guo et al. (2000) eles demonstraram que o tratamento por quatro semanas com a L-arginina foi efetivo em restaurar parcialmente a reatividade aórtica de ratos com hipertensão renovascular.

Estudos realizados por Gismondi (2015), demonstraram que pacientes diabéticos e hipertensos tratados com Benazepril apresentaram uma melhora na vasodilatação mediada por fluxo, comparados a pacientes tratados com losartana. Além de melhorar a vasodilatação, os pacientes tratados com Benazepril apresentaram maior redução na proteína C reativa, um importante biomarcador inflamatório.

A vasodilatação não mediada pelo endotélio foi avaliada em anéis de aorta, através do Nitroprussiato de sódio (NPS), visando verificar se a hipertensão renovascular e os diferentes tratamentos empregados promovem um prejuízo no relaxamento do músculo liso vascular. O NPS promoveu resposta vasodilatadora semelhante em todos os grupos experimentais, sugerindo que nem a hipertensão 2R1C e nem os tratamentos modificaram a capacidade de relaxamento do músculo liso vascular. Resultados semelhantes foram encontrados por Santuzzi et al., (2014) que também mostraram que não houve diferença no relaxamento induzido pelo NPS nos animais 2R1C e tratados com L-arginina e por Chen (2014), que tratou ratos diabéticos e hipertensos por 8 semanas com Benazepril, não encontrando diferença no relaxamento induzido pelo NPS.

Diante destes resultados, podemos supor que os tratamentos com Benazepril, L-arginina e principalmente a associação dessas drogas influencia a liberação de fatores vasodilatadores derivado do endotélio. Os mecanismos pelos quais a hipertensão 2R1C altera a reatividade vascular está relacionada a disfunção endotelial que é desenvolvida no decorrer da hipertensão 2R1C (ARRUDA et al.,2005). Entretanto, a influência do tratamento com as drogas Benazepril e L-arginina na hipertensão renovascular precisa ser melhor investigada. Assim, neste estudo, desenvolvemos um experimento para avaliar os efeitos do tratamento com Benazepril e L-arginina na disfunção endotelial em ratos com hipertensão renovascular.

Nesse sentido, investigamos algumas vias de agentes vasoativos relacionados com o estresse oxidativo, afim de verificar a influência dessas vias no aumento da resposta contrátil à Fenilefrina e assim poderemos esclarecer a ação vascular desses tratamentos em anéis de aorta de ratos com hipertensão renovascular.

Dentre os fatores vasodilatadores derivados do endotélio, o NO é o principal fator relaxante do endotélio que regula o tônus vascular e modula as respostas contráteis vasculares a diferentes agonistas (LI et al., 2014; MONCADA *et. al*, 1991). O NO desempenha um importante papel como agente vasodilatador, sendo produzido no endotélio e depois difundido para o músculo liso vascular. Por esse motivo, decidimos avaliar a participação do NO, através da curva concentração resposta à Fenilefrina na presença de L-NAME, um inibidor inespecífico da síntese do NO.

Neste estudo, o L-NAME, em anéis de ratos 2R1C tratados com Benazepril, L-arginina ou a associação de ambos potencializou a resposta vasoconstrictora à fenilefrina em todos os grupos analisados, entretanto, essa resposta foi potencializada em maior proporção no grupo L-arg+Ben quando comparado ao grupo 2R1C. Sugerindo que o tratamento associado (L-arg+Ben) em anéis de aorta além de diminuir a reatividade vascular, aumenta a modulação endotelial na resposta contrátil a fenilefrina por aumentar a biodisponibilidade de NO, além de aumentar a sua produção e diminuir a produção das EROs. Dessa forma, dentre os tratamentos estudados, o tratamento com L-arg+Ben mostrou ser efetivo no relaxamento induzido pela Ach e apresentou um aumento da biodisponibilidade de NO local.

Estudos sugerem que 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; JABŁECKA et al., 2004). Em ratos diabéticos e hipertensos tratados com Benazepril os níveis sérios de NO foram aumentados, em comparação com ratos não tratados. (CHEN, 2014).

Huang (2017) ao analisar as aortas de ratos 2R1C tratados com Benazepril, observou a redução da produção das EROs, através da diminuição da expressão das NOX 1 e NOX 4, que são duas fontes principais de EROs na hipertrofia vascular induzida pela Ang II, em comparação ao grupo 2R1C.

Para avaliar a participação da via da Ciclooxygenase no aumento da resposta contrátil à Fenilefrina nos animais com hipertensão renovascular, tratados com L-arginina, Benazepril e sua associação, utilizamos um inibidor não seletivo da COX, a Indometacina. A resposta máxima foi semelhante em todos os grupos, exceto nos grupos 2R1C e L-arginina, onde a reatividade vascular foi reduzida na presença desse fármaco.

Ao avaliarmos os modelos experimentais de hipertensão foi notado maior expressão da COX-2 e maior participação dos prostanóides contráteis derivados desta via na resposta vascular (ALVARÉZ et al., 2005). Sabe-se também que na hipertensão há uma colaboração 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 (BRIONES; TOUYZ, 2010).

Nossos achados demonstraram que o tratamento com L-arginina+Benazepril em ratos hipertensos renovasculares foi eficaz para reduzir a PAS, melhorar as respostas vasculares e aumentar o relaxamento dependente do endotélio. Supomos que tais benefícios estejam relacionados ao aumento da produção de NO e diminuição do estresse oxidativo das aortas torácicas dos ratos hipertensos renovasculares.

7. CONCLUSÃO

Os resultados do nosso estudo sugerem que os efeitos vasculares da hipertensão 2R1C são dependentes do endotélio, tendo em vista o aumento da reatividade vascular em anéis de aorta, prejuízo no relaxamento à acetilcolina e em alterações estruturais na artéria aorta.

Adicionalmente, observamos pela primeira vez que o tratamento com L-arginina associado ao Benazepril foi efetivo em reduzir a PAS e melhorar a estrutura vascular e o relaxamento dependente do endotélio.

Portanto, nossos dados revelam os efeitos benéficos da L-arginina associada ao Benazepril, sugerindo que essa combinação possa ser um novo agente anti-hipertensivo, especialmente aos pacientes com hipertensão dependente do SRAA e com disfunção endotelial.

Este estudo por sua vez permite ampliar o conhecimento de terapias isoladas ou associadas para o controle da PAS e redução dos efeitos colaterais sobre os órgãos alvos.

REFERENCIAS

- ACKERMANN A., Fernández-Alfonso M.S., Sánchez de Rojas R., Ortega T., Paul M., González C. Modulation of angiotensin-converting enzyme by nitric oxide. *British Journal of Pharmacology*. v. 124: p. 291-298, 1998.
- ADEAGBO AS, Zhang X, Patel D. Cyclo-oxygenase-2, endothelium and aortic reactivity during deoxycorticosterone acetate salt-induced hypertension. *J Hypertens*. V. 23: p. 1025-1036, 2005.
- AGABITI-ROSEI E., Rizzoni D, Zulli R, Muiesan L, Motolese M, et al. Sustained antihypertensive effects of benazepril demonstrated by ambulatory monitoring: placebo-controlled trial at two dosage levels. In Brunner HR, et al. (Eds) *Benazepril: profile of a new ACE inhibitor*, pp. 59-65, Royal Society of Medicine Services International Congress and Symposium Series No. 166, Royal Society of Medicine Services Limited, 1990.
- 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*, v. 153: p.926-935, 2008.
- ARRIBAS, S.M., Hinek, A., Gonzalez, M.C.. Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacol. Ther.* 111, 771–791, 2006.
- ANGELI, J.K. Efeitos do Gadolínio sobre a reatividade vascular em aorta de ratos. 2009. 139f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, 2009.
- BALARINI, C. et al. Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein e knockout mouse. *J Transl Med. Journal of Translational Medicine*. V. 11, n. 3, 2013.
- BÁRÁNY, M. *Biochemistry of Smooth Muscle Contraction*. [s.l.] Elsevier, 1996.

BARRIOS, V.; ESCOBAR, C. Antihypertensive and organ-protective effects of benazepril. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.*, v. 8, n. 12, p. 1653–1671, 2010.

BARROSO, Weimar Kunz Sebba. et.al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020. *Arq. Bras. Cardiol.* v. 116, n. 3, p. 516-658, mar. 2021.

BELLET, M.; Whalen JJ, Bodin F, Serrurier D, Tanner K, Ménard J. Use of crossover trials to obtain antihypertensive dose-response curves and to study combination therapy during the development of benazepril. *J Hypertens Suppl.* v. 8, n. 4, 1990.

BLAUSTEIN, M. P.; HAMLYN, J. M. Signaling mechanisms that link salt retention to hypertension: Endogenous ouabain, the Na⁺ pump, the Na⁺/Ca²⁺ exchanger and TRPC proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, v. 1802, n. 12, p. 1219–1229, 2010.

BOUVET, C., Gilbert, L.A., Girardot, D., deBlois, D., Moreau, P. Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition. *Hypertension* 45, 432–437, 2005.

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

Brunner & Suddarth, Manual de enfermagem médico-cirúrgica / revisão técnica Sonia Regina de Souza; tradução Patricia Lydie Voeux. - 13. ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: hipertensão arterial sistêmica / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

Bolívar, Juan J. Essential hypertension: an approach to its etiology and neurogenic pathophysiology. *International Journal of Hypertension.* v. 2013, 2013.

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

CASTRO, M.M., Rizzi, E., Figueiredo-Lopes, L., Fernandes, K., Bendhack, L.M., Pitol, D.L., Gerlach, R.F., Tanus-Santos, J.E. Metalloproteinase inhibition ameliorates

hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. *Atherosclerosis* 198, 320–331, 2008.

CASTRO, M.M., Rizzi, E., Rodrigues, G.J., Ceron, C.S., Bendhack, L.M., Gerlach, R.F., TanusSantos, J.E. Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 1298–1307, 2009.

CHEN F, Wu JL, Fu GS, Mou Y, Hu SJ. Chronic treatment with Qiliqiangxin improves aortic endothelial cell dysfunction in diabetic rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics.* 230-240, 2014.

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

CHOI, S, Kwon HR, Sang HP, Jun, JYI, Byung CS, Jong HC, Cheol HY. Direct vascular actions of quercetin in aorta from renal hypertensive rats, *Kidney Research and Clinical Practice*, v. 35, 2016.

CERON CS, Castro MM, Rizzi E, et al. Spironolactone and hydrochlorothiazide exert antioxidant effects and reduce vascular matrix metalloproteinase-2 activity and expression in a model of renovascular hypertension. *Br J Pharmacol.* v. 160, p. 77-87, 2010.

CERON CS, Rizzi E, Guimaraes DA, Martins-Oliveira A, Cau SB, Ramos J, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Time course involvement of matrix metalloproteinases in the vascular alterations of renovascular hypertension. *Matrix Biol.* v.31(4): p. 261-70, 2012.

CONRAD KA, Fagan TC, Lewis GP, Gourley LA, Whalen JJ. Benazepril — effects on blood pressure and the renin-angiotensin system. Abstract 1029. *American Journal of Hypertension* 1: 18A, 1988.

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*, v. 107: p.1017-1023, 2003.

- 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*, v. 50, p.419-424, 1968.
- DAHLOF B, Pennert K, Hansson L. Reversal of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. A metanalysis of 109 treatment studies. *Am J Hypertens*, v. 5, p. 95-110, 1992.
- DAVIDGE S.T. Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circulation Research*, 89: p.650-660, 2001.
- 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*. v. 26: p. 256- 262, 1995.
- DIAS AT, Rodrigues BP, Porto ML, Gava AL, Balarini CM, Freitas FP, Palomino Z, Casarini DE, Campagnaro BP, Pereira TM, Meyrelles SS, Vasquez EC. Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice with renovascular hypertension. *J. Transl. Med.* 12, 35, 2014
- DONATO, A.J., et al. Role of NFkB in age-related vascular endothelial dysfunction in humans. *Aging (Albany NY)*. v.1, n.8, p.678-680, 2009.
- 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.
- FÉLÉTOU, M., HUANG, Y., VANHOUTTE, P.M. Vasoconstrictor prostanoids. *Pflugers Arch.* v.459, n.6, p.941-50, 2010.
- FINKEL T., Holbrook N.J. Biology of Ageing. *Nature*, 408: p.239-247, 2000.
- FONTANA, V., Silva, P.S., Belo, V.A., Antonio, R.C., Ceron, C.S., Biagi, C., Gerlach, R.F., TanusSantos, J.E. Consistent alterations of circulating matrix metalloproteinases levels in untreated hypertensives and in spontaneously hypertensive rats: a relevant pharmacological target. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 109, 130–137, 2011.

FRÖLICH, J. C.; FÖRSTERMANN, U. Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance. *Advances in prostaglandin, thromboxane, and leukotriene research*, v. 19, p. 211–5, 1989.

FUKATA, Y. et al. Rho–Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 22, n. 1, p. 32–39, 2001.

FURCHGOTT, RFE, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. v.288, n.5789, p.373-6, 1980.

GAVRAS H. Corcoran Lecture. Angiotenin-converting enzyme inhibition and the heart. *Hypertension*. v. 23: p.813-818, 1994.

GBD 2016 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980- 2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet*. v. 390; n.10100, p.1151-210, 2017.

GISMONDI, R. A., Oigman, W., Bedirian, R., Pozzobon, C. R., Ladeira, M. C. B., & Neves, M. F. Comparison of benazepril and losartan on endothelial function and vascular stiffness in patients with Type 2 diabetes mellitus and hypertension: A randomized controlled trial. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 16(4), p. 967-974, 2015.

GUAN S, Fox J, Mitchell KD, Navar LG. Angiotensin and angiotensin converting enzyme tissue levels in two-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension*. v. 20: p. 763– 767, 1992.

GOUVEA, SA, Moysés MR, Bissoli NS, Pires JGP, Cabral AM, Abreu GR. Oral administration of L-arginine decreases blood pressure and increases renal excretion of sodium and water in renovascular hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 36: p. 943-949, 2002.

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.

GOUVEA, SA, Bissoli NS, Moysés MR, Cicilini MA, Pires JGP, Abreu GR. Activity of Angiotensin-Converting Enzyme After Treatment with L-Arginine in Renovascular Hypertension. *Clinical and experimental hypertension*, v. 56: p. 569-579, 2004.

GOKCE, N. L-arginine and hypertension. *J Nutr.*134(10 Suppl):2807S-2819S, 2004.

GHOSH, D. et al. Calcium Channels in Vascular Smooth Muscle. *Advances in Pharmacology*, v. 78, p. 49-87, 2017.

GUIMARÃES DA. et. al. Inibição de metaloproteinases da matriz extracelular: uma possível estratégia terapêutica na hipertensão arterial? *Revista Brasileira de Hipertensão*. 17 (4): 226-230, 2010.

GUO YM, Zhu XN, Pan JY. Nitric oxide changes aortic function in rats with renal hypertension. *Sheng Li Xue Bao*, 52(3): 243-6, 2000.

HE, H.B. et al. Comparison of cardioprotective effects of salvianolic acid B and benazepril on large myocardial infarction in rats. *Pharmacological Reports*, v. 60, p. 369-381, 2008.

HERRMANN SM, Textor SC. Current Concepts in the Treatment of Renovascular Hypertension. *Am J Hypertens*. v.12; 31(2): p. 139-149, 2018.

HERNANZ, R., et al. New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension. *Clinical Science*. v.126, p.111–121, 2014.

HOU, F.F. et al. Renoprotection of Optimal Antiproteinuric Doses (ROAD) Study: A Randomized Controlled Study of Benazepril and Losartan in Chronic Renal Insufficiency. *J Am Soc Nephrol*, v.18, p. 1889–1898, 2007.

HUANG F, Ni M, Zhang JM, Li DJ and Shen FM: TRPM8 downregulation by angiotensin II in vascular smooth muscle cells is involved in hypertension. *Mol Med Rep* 15: 1900-1908, 2017

HUMPHREY, J.D. Mechanisms of arterial remodeling in hypertension: coupled roles of wall shear and intramural stress. *Hypertension* 52, 195–200, 2008.

KANDASAMY, A.D., Chow, A.K., Ali, M.A., Schulz, R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc. Res.* 85, 413–423, 2010.

KANEL WB, Larson M. Long Term epidemiologic prediction of coronary disease. The Framingham Experience. *Cardiology.* v. 82(2-3): p. 137-152, 1993.

KHANGURA K.K. et al. Cardiac Function In Renovascular Hypertensive Patients With and Without Renal Dysfunction. *Am J Hypertens*, p. 1-9, 2013.

JACKSON, W. F. Ion Channels and Vascular Tone. *Hypertension*, v. 35, n. 1, p. 173–178, 2000.

KIM, H. R. et al. Smooth muscle signalling pathways in health and disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 12, n. 6a, p. 2165–2180, 2008.

LAMOUNIER-ZEPTER, V.; BALTAS, L. G.; MORANO, I. Distinct Contractile Systems for Electromechanical and Pharmacomechanical Coupling in Smooth Muscle. *Molecular and Cellular Aspects of Muscle Contraction*. Springer, Boston, MA, p. 417-426, 2003.

LAURENT, S., Cunha, PG. Rigidez arterial nas fases iniciais da pré-hipertensão. In: Zimlichman, R., Julius, S., Mancina, G. (eds) *Pré-hipertensão e Síndrome Cardiometabólica. Atualizações em Hipertensão e Proteção Cardiovascular*. Springer, Cham, 2019.

LEAL, M.A.; Balarini, C.M.; Dias, A.T.; Porto, M.L.; Gava, A.L.; Pereira, T.M.; Meyrelles, S.S.; Vasquez, E.C. Mechanisms of enhanced vasoconstriction in the mouse model of atherosclerosis: The beneficial effects of sildenafil. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 16(6), 517-530, 2015.

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

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

- LIU XP, Pang YJ, Zhu WW, Zhao TT, Zheng M, Wang YB, Sun ZJ, Sun SJ. Benazepril, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, alleviates renal injury in spontaneously hypertensive rats by inhibiting advanced glycation end-product-mediated pathways. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* v. 36(3): p. 287-296, 2009.
- LOBATO, N.S., et al. Obesity induced by neonatal treatment with monosodium glutamate impairs microvascular reactivity in adult rats: role of NO and prostanoids. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* v.21, p.808-816, 2011.
- LUCHTEFELD, M., Grote, K., Grothusen, C., Bley, S., Bandlow, N., Selle, T., Struber, M., Haverich, A., Bavendiek, U., Drexler, H., Schieffer, B. Angiotensin II induces MMP-2 in a p47phox-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 183–188, 2005.
- LUSCHER TF, Boulanger CM, Dohi Y, Yang Z. Endothelium- derived contracting factors. *Hypertension.* 19:117-130, 1992.
- MANCINI GB, Henry GC, Macaya C et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing Endothelial Dysfunction) Study. *Circulation.* v. 94, p.258-265, 1996.
- 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.
- MARTINEZ, M.L., Lopes, L.F., Coelho, E.B., Nobre, F., Rocha, J.B., Gerlach, R.F., Tanus-Santos, J.E. Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-9 activity in patients with hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 47, 117–122, 2006.
- MASCHIO G, Alberti P, Janin G. ACE inhibition in progressive renal insufficiency study group: effect of the angiotensin-convertingenzyme benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. *N Engl J Med;* v. 45; 1996.
- 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.

MEYRELLES SS, et al . Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids in Health and Disease*. 14; 10:211, 2011.

MOCHEL, J.P., Fink, M., Peyrou, M. et al. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling of Renin-Angiotensin Aldosterone Biomarkers Following Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibition Therapy with Benazepril in Dogs. *Pharm Res* 32, 1931–1946, 2015.

MONCADA S., Palmer R.M., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* v.43, n.2, p.109-42, 1991.

MONTENEGRO, M.F., Pessa, L.R., Tanus-Santos, J.E. Isoflavone genistein inhibits the angiotensin-converting enzyme and alters the vascular responses to angiotensin I and bradykinin. *Eur. J. Pharmacol.* 607, 173–177, 2009.

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*, v. 28, n. 3, p. 288-295, 2012.

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.

NAVAR, L.G. et al. Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypertension*, v. 39, p.316-322, Feb, 2002.

NOBRE F. et. al. Hipertensão arterial sistêmica primária. *Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da FMRP*. 46(3):256-72, 2013.

NUNES, D.O., et al. Flaxseed oil increases aortic reactivity to phenylephrine through reactive oxygen species and the cyclooxygenase-2 pathway in rats. *Lipids Health Dis.* v.13, p.107, 2014.

Oliveira-Sales EB, Dugaich AP, Carillo BA, et al. Oxidative stress contributes to renovascular hypertension. *Am J Hypertens*. 21(1) : 98-104, 2008.

PARIKH SA, Shishehbor MH, Gray BH, White CJ, Jaff MR. SCAI expert consensus statement for renal artery stenting appropriate use. *Catheter Cardiovasc Interv.* v. 84(7): p.1163-71, 2014.

PFEFFER JM, Pfeffer MA, Mirsky I, Braunwald E. Regression of left ventricular hypertrophy and prevention of left ventricular dysfunction by captopril in the spontaneously hypertensive rat. *Proc Natl Acad Sci USA*; v. 79: p. 3310-3314, 1992.

PRAXEDES, JN. Hipertensão renovascular: epidemiologia e diagnóstico. *Rev Bras Hipertens.* v. 9: p. 148-153, 2002.

RAFFETTO, J.D., Khalil, R.A.. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem. Pharmacol.* 75, 346–359, 2008.

RAMESHRAD, M. et al. Rat aorta as a pharmacological tool for in vitro and in vivo studies. *Life Sciences*, v. 145, p. 190–204, 2016.

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.

SAHOO, K. C. et al. Cardioprotective effects of benazepril, an angiotensin converting enzyme inhibitor, in an ischaemiareperfusion model of myocardial infarction in rats. *Journal of the Renin- Angiotensin- Aldosterone System*, v. 10, n.4, 2009.

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.

SALVEMINI D, Kim SF, Mollace V. Reciprocal regulation of the nitric oxide and cyclooxygenase pathway in pathophysiology: relevance and clinical implications. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* v. 304, p. 473-487, 2013;

SAHRAWAT, T. R.; CHATTERJEE, D. Time-Dependent Model to Mimic Acetylcholine Induced Vasodilatation in Arterial Smooth Muscle Cells. *International Letters of Natural Sciences*, v. 52, p. 60–66, 2016.

SCHULZ, R.. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 211–242, 2007.

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.

SMITH, W.L., GARAVITO, R.M., DEWITT, D.L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem.* v.271, p.33157–160, 1996.

STOMPÓR, T.; NAPORA, M.; OLSZEWSKI, A. Renoprotective effects of benazepril: current perspective. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.*, v. 9, n. 6, p. 663–673, 2011.

STURTZEL, Caterina. Endothelial cells. *The Immunology of Cardiovascular Homeostasis and Pathology*, p. 71-91, 2017.

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.* v. 494: p. 130-137, 2010.

TANAKA M, Yamamoto S, Nakao K, Inukai T, Ogawa N, Katsumura H, Ohara N, Shukunobe K, Ono H. Antihypertensive action of the novel angiotensin converting enzyme inhibitor benazepril hydrochloride in hypertensive rat models. *Arzneimittelforschung.* v. 41(6):p. 608-612,1991.

TOUYZ RM, Schiffrin EL. 2000. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev.* 52(4):639-72, 2000.

TRIGGLE CR, Hollenberg M, Anderson TJ, Ding H, Jiang Y, Ceroni L, Wiehler WB, Ella SMN, Ellis A, Andrews K, McGuire JJ, Pannirselvam M. The endothelium in

health and disease – A Target for therapeutic intervention. *Journal of Smooth Muscle Research*. 39(6): 249-267, 2003.

VASQUEZ EC, et. al. Novel Therapeutic Targets for Phosphodiesterase 5 Inhibitors: Current State-of-the-art on Systemic Arterial Hypertension and Atherosclerosis. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2016.

VALVO E, Casagrande P, Bedogna V, Antiga L, Alberti D, Zamboni M, Perobelli L, Dal Santo F and Maschio G: Systemic and renal effects of a new angiotensin converting enzyme inhibitor, benazepril, in essential hypertension. *J Hypertens*. 8:991–995. 1990.

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.

ZHAO, Y.; VANHOUTTE, P. M.; LEUNG, S. W. S. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 129, n. 2, p. 83–94, 2015.