

**ANGIOTENSINA II INTRA-RENAL MODULA A
EXPRESSÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NEURONAL
NA HIPERTENSÃO RENOVASCULAR 2R1C**

Thiago de Melo Costa Pereira

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Centro Biomédico
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória – ES, Dezembro de 2005**

THIAGO DE MELO COSTA PEREIRA

**ANGIOTENSINA II INTRA-RENAL MODULA A
EXPRESSÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NEURONAL
NA HIPERTENSÃO RENOVASCULAR 2R1C**

Thiago de Melo Costa Pereira

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Centro Biomédico
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória – ES, Dezembro de 2005**

THIAGO DE MELO COSTA PEREIRA

**ANGIOTENSINA II INTRA-RENAL MODULA A
EXPRESSÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NEURONAL
NA HIPERTENSÃO RENOVASCULAR 2R1C**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof^a Dr^a Silvana dos Santos Meyrelles

Co-orientador: Prof. Dr. Ian Victor Silva

Vitória

2005

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

- P436a Pereira, Thiago de Melo Costa, 1980-
Angiotensina II intra-renal modula a expressão da óxido nítrico sintase neuronal na hipertensão renovascular 2R1C / Thiago de Melo Costa Pereira. – 2005.
118. : il.
- Orientadora: Silvana dos Santos Meyrelles.
Co-Orientador: Ian Victor Silva.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Biomédico.
1. Óxido nítrico. 2. Angiotensina. 3. Hipertensão renovascular. I. Meyrelles, Silvana dos Santos. II. Silva, Ian Victor. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Biomédico. IV. Título.

CDU: 612

THIAGO DE MELO COSTA PEREIRA

**ANGIOTENSINA II INTRA-RENAL MODULA A
EXPRESSÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NEURONAL
NA HIPERTENSÃO RENOVASCULAR 2R1C**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dra. Sônia Alves Gouvêa
FAESA - Membro externo

Prof. Dr. Antônio de Melo Cabral
Universidade Federal do Espírito Santo - Membro interno

Prof. Dr. Ian Victor Silva
Universidade Federal do Espírito Santo – Co-Orientador

Prof^a Dr^a Silvana dos Santos Meyrelles-
Universidade Federal do Espírito Santo - Orientadora

Prof^a Dr^a Ester Miyoki Nakamura Palacios
Coordenador, PPG-CF, Centro Biomédico, UFES

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, dezembro de 2005.

DEDICO

A Deus, autor e consumidor da minha fé;

À minha amada esposa Letícia, com todo

amor e carinho;

Aos meus pais, Gerval e Jane, minhas irmãs

Thais e Thássia, indispensáveis nesta minha

caminhada.

Essa vitória também pertence a todos vocês!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, que sonda o meu coração a todo instante, guiando-me continuamente, agradeço pelo dom da vida! Que todo o louvor, a honra e a glória sejam oferecidos somente a Ti!

À professora Silvana e ao professor Vasquez, pela confiança, zelo e atenção dispensados, por onde eu procurava não desperdiçar nenhum dos momentos juntos, buscando sempre absorver mais uma “gota” deste “mar” de conhecimento. Exemplos de cidadãos e pesquisadores a serem seguidos, a começar pelo entusiasmo, dedicação e seriedade para com a ciência. Pessoas que dificilmente possibilitarão comparações.

Ao professor Cabral, pelo grande aprendizado como professor, pesquisador e colega, pela confiança dispensada.

Ao professor Ian, pelas dicas, paciência e dedicação, frutos de um bom orientador;

À professora Cicilini, que não media esforços para me ajudar. Obrigado pelo suporte técnico-científico que tanto auxiliou na viabilidade desse trabalho.

À amiga Cleci, que me “socorreu” em todas as vezes que solicitei. Obrigado pela humildade, companheirismo e simpatia. Luis, obrigado pelo gelo!

Aos amigos do LTCC: Verônica, pelas experiências compartilhadas; Robéria, pelo incentivo e coração enorme que tens; Ágata, pela alegria incondicional e conhecimentos compartilhados; Breno, pela grande amizade constituída, mais chegado até que um irmão; Michele e Débora, pela força de vontade contagiante; Maíne, exemplo de humildade; Lídia, pelo dom de servir.

A Camile, pela sua sabedoria, paciência e vontade de aprender. Que isso persevere por toda sua caminhada científica. Obrigado pela sua dedicação inquestionável.

Ao LEMC (prof. Dalton) e ao laboratório da professora Valéria Fagundes, que me proporcionou estender um pouco mais nosso laboratório com as salas de bioquímica e revelação;

Aos amigos conquistados nestes últimos anos: Roger, Evandro, Enildo, Jones, Juliana, Rita, Élio, Alessandra, Andreza, Eduardo, Ivy, João Vicente, Raquel, Rodrigo, Robson, Ana Raquel, Raner...que Deus os abençoe!

Agradecimentos

À Letícia, a qual sem ela seria tudo muito mais difícil. Além de bela e excelente esposa, uma grande amiga em todos os momentos da minha vida. Obrigado por acreditar na realização desta conquista. Te amo!

Aos meus pais, que tanto desde os meus primeiros dias de vida torcem pelo meu sucesso. Não tenho palavras para agradecer todo o incentivo, cuidado e confiança dispensada ao longo desses 25 anos. Amo vocês!

Às minhas irmãs, Thais e Thássia, pela amizade e união firmadas pelo nosso Deus;

Aos meus sogros José Marques e Fátima e meus cunhados "irmãos" Oscar e Gustavo, pela agradável convivência nesses últimos anos;

Aos meus familiares: vô Amauri, vó Júlia, tio Mauro, Valesca, Washington, Tio Remígio, Tia Regina, Ângelo e Lory, obrigado pela existência de vocês na minha vida!

À minha grande família da Igreja Batista da Praia da Costa, pelo auxílio e orações dispensadas. Amo vocês!

A todos aqueles que, mesmo na humildade do anonimato, contribuíram para essa vitória.

Meu eterno louvor

“Como agradecer, a Jesus, o que fez por mim...
Bênçãos, sem medida, vem provar o seu amor sem fim,
Nem anjos podem expressar a minha eterna gratidão,
Tudo o que sou e o que vier a ser,
Eu ofereço a Deus

A Deus demos glória, a Deus demos glória!
A Deus demos glória, pelas bênçãos sem fim
Com seu sangue salvou-me
Seu poder, transformou-me
A Deus demos glória! Pelas bênçãos sem fim!”

(Extraído)

“...Não tenho palavras para agradecer tua bondade,
Dia após dia, me cercas com Tua fidelidade...
Nunca me deixes esquecer, que tudo o que tenho, tudo o que sou
e o que eu vier a ser, vem de Ti, Senhor!... “

(Extraído)

“Não há nada melhor para o homem do que comer e beber, e fazer com que sua alma goze do bem do seu trabalho. Também vi que isto vem da mão de Deus.”

Eclesiastes 2:24

SUMÁRIO

Lista de tabelas.....	10
Lista de figuras.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1 <i>Hipertensão arterial.....</i>	22
1.2 <i>Rim: um órgão fundamental para o controle da pressão arterial.....</i>	23
1.3 <i>Hipertensão renovascular.....</i>	27
1.4 <i>Sistema Renina Angiotensina.....</i>	28
1.5 <i>Hipertensão de Goldblatt dois rins, um clipe (2R1C).....</i>	33
1.6 <i>Sistema Óxido Nítrico (NO).....</i>	36
1.7 <i>NO e rim</i>	38
1.8 <i>NO renal e estresse oxidativo.....</i>	40
1.9 <i>Interações entre o Sistema Renina Angiotensina e o Sistema Óxido Nítrico.....</i>	41
1.10 <i>Biologia Molecular (Western blotting): uma importante ferramenta para estudos fisiológicos.....</i>	44
2. OBJETIVOS.....	46
2.1 <i>Gerais.....</i>	46
2.2 <i>Específicos.....</i>	46
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
3.1 <i>Animais experimentais.....</i>	48
3.2 <i>Grupos Experimentais.....</i>	48
3.3 <i>Protocolo Experimental.....</i>	48
3.4 <i>Obtenção da Hipertensão renovascular (2R1C).....</i>	49
3.5 <i>Medida de Pressão Arterial Média e Frequência Cardíaca (FC).....</i>	50
3.6 <i>Western blotting</i>	51

3.6.1 Extração dos órgãos.....	53
3.6.2 Preparação das amostras e medidas de proteína.....	53
3.6.3 Eletroforese e transferência para membrana.....	54
3.6.4 Incubação com os anticorpos e detecção da isoforma nNOS.....	56
3.6.5 <i>Quantificação das bandas</i>	57
3.7 <i>Dosagem de GMPc (enzima imunoensaio-EIA)</i>	58
3.8 <i>Análise dos dados</i>	59
4. RESULTADOS.....	61
4.1 <i>Efeito da hipertensão renovascular sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC)</i>	61
4.2 <i>Efeito da hipertensão renovascular sobre o peso renal</i>	63
4.3 <i>Expressão da nNOS em tecidos renais nos animais 2R1C</i>	64
4.3.1 Medula renal.....	64
4.3.2 Córtex renal.....	66
4.3.2 a) Córtex renal 2R1C.....	66
4.3.2 b) Córtex renal 2R1C + losartan.....	67
4.3.2 c) Córtex renal 2R1C + tempol.....	69
4.4 <i>Dosagem de GMPc</i>	70
5. DISCUSSÃO.....	73
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 01

Peptídeos do sistema renina-angiotensina (SRA), seus principais receptores e efeitos fisiológicos.....31

Tabela 02

Cronograma geral do protocolo experimental.....49

Tabela 03

Relação entre pesos renais de animais SHAM, 2R1C, 2R1C + losartan, 2R1C + tempol após 28 dias de tratamento63

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	
O néfron e suas principais estruturas.....	26
Figura 02	
Sistema de autoregulação renal: comportamento do fluxo sanguíneo renal e filtração glomerular	27
Figura 03	
Representação esquemática dos mecanismos enzimáticos envolvidos na geração dos principais peptídeos do SRA.....	32
Figura 04	
Níveis dos componentes do SRA e efeitos dependentes de angiotensina II ativados pela estenose unilateral renal.....	36
Figura 05	
Representação esquemática de um dos principais mecanismos geradores de ânions superóxido e sua interação com o NO para a formação metabólitos inativos	41
Figura 06	
Esquema representando as fases da técnica de <i>western blotting</i>	51
Figura 07.....	52
A: rins de ratos SHAM após perfusão,	
B: rins de ratos 2R1C após perfusão	
C: homogeneização de tecidos	

- D: centrifugação
- E: espectrofotômetro para dosagem protéica
- F e G: aplicação das amostras no gel
- H e I: equipamentos necessários para eletroforese
- J: retirada do gel após eletroforese
- L: transferência de proteínas para a membrana de nitrocelulose (“blot”)
- M: confirmação da transferência com marcador de peso molecular
- N: confirmação de transferência por ausência de bandas no gel e presença destas na membrana
- O: incubação com anticorpos
- P: exposição do filme à membrana para revelação.

Figura 08

Representação esquemática da transferência de proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose.56

Figura 09

Valores basais de pressão arterial média (PAM) nos grupos Sham, 2R1C, 2R1C + losartan, 2R1C + tempol61

Figura 10

Valores basais de frequência cardíaca (FC) nos grupos Sham, 2R1C, 2R1C + losartan, 2R1C + tempol62

Figura 11

Gráfico representando a expressão de nNOS renal (medula direita e esquerda) de ratos SHAM (n=5), 2R1C (n=5) após 28 dias de colocação do clipe.....65

Figura 12

Gráfico representando a expressão de nNOS renal (córtex direito e esquerdo) de ratos SHAM (n=9), 2R1C (n=9) após 28 dias de colocação do clipe.....67

Figura 13

Gráfico representando a expressão de nNOS renal (córtex direito e esquerdo) de ratos SHAM (n=4), 2R1C + Losartan (n=4) após 28 dias de colocação do clipe68

Figura 14

Gráfico representando a expressão de nNOS renal (córtex direito e esquerdo) de ratos SHAM (n=6), 2R1C + Tempol (n=6) após 28 dias de colocação do clipe69

Figura 15

Sumário da expressão das nNOS nos rins contralateral e clipado dos diferentes grupos estudados.....70

Figura 16

Quantificação de GMPc nos rins contralateral e clipado dos diferentes grupos estudados71

LISTA DE ABREVIÇÕES

- 1R1C: Um rim, um clipe
- 2R1C: Dois rins, um clipe
- 7-NI: 7 nitro-imidazol
- Ang I: Angiotensina I
- Ang II: Angiotensina II
- AT1: Receptor de angiotensina II
- ANOVA: Análise de variância
- ANP: fator natriurético atrial
- bpm: Batimentos por minuto
- BH₄: tetrahydrobiopterina
- COX-1: Cicloxigenase tipo 1
- COX-2: Cicloxigenase tipo 2
- CVLM: bulbo caudal-ventrolateral
- DAF-2 DA: 4,5 diaminofluoresceína diacetato
- DAF-FM: 4-amino-5 methylamino-2' 7'- difluorescein diacetate
- ECA: Enzima conversora de angiotensina
- ECL: *Enhanced Chemiluminescent*
- EDTA: Ácido tetracético etilenodiamina
- eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial
- EPM: Erro padrão da média
- ET-1: endotelina
- FAD: Flavina adenina dinucleotídeo

- FC: Frequência cardíaca
- FMN: Flavina mononucleotídeo
- g: Grama
- GFR: Taxa de filtração glomerular
- GMPc: Guanosina monofosfato cíclica
- HIF-1: fator induzível de hipóxia alfa 1
- HRP: Peroxidase “horseradish”
- HT: Hipertensos
- IBMX: 3-isobutil- 1- metilxantina
- *i.m.*: Intramuscular
- iNOS Óxido nítrico sintase induzível
- *i.p.*: Intraperitoneal
- *i.v.*: Intravenosa
- kDa: Kilo-dalton
- Kg: Quilograma
- L-arg: L-Arginina
- L-NAME: Nitro-L-arginina metil éster
- L-NNA: Nitro-L-arginina
- mA: Mili ampère
- MAP Kinase: proteína kinase mitógena-ativada
- mmHg: Milímetros de mercúrio
- NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
- NO: óxido nítrico

- NOS: Óxido nítrico sintase
- nNOS: Óxido nítrico sintase neuronal
- NTS: núcleo do trato solitário
- OONO⁻ ou NO₃⁻: peroxinitrito
- PAM: Pressão arterial média
- PBS: Salina tampão fosfato
- PGI₂: Prostaciclina
- PMSF: Fenilmetisulfonil fluorídrica
- pH: -log [íon hidrogênio]
- PKG: proteína quinase G
- RBF: fluxo sanguíneo renal
- RVLM: bulbo rostral-ventrolateral
- SDS: Duodecil sulfato de sódio
- SDS-PAGE: Gel de eletroforese com poliacrilamida e duodecil sulfato de sódio
- SOD: superóxido dismutase
- SRA: Sistema Renina-Angiotensina
- TGF: *Feedback* Túbulo-glomerular
- u.d.o.: Unidade de densidade óptica
- V: Volts
- µg: Micrograma
- µl: Microlitro
- °C: Grau Celsius

Uma adequada perfusão tecidual é uma condição indispensável para a homeostase do meio interno. Para isso, a pressão arterial precisa ser mantida em níveis adequados, autoregulada por vários mecanismos cardiovasculares, dentre os quais o rim participa ativamente. Para melhor entendimento dos complexos mecanismos humorais regulatórios envolvidos, os estudos em fisiologia na atualidade têm utilizado a biologia molecular como uma importante ferramenta. Inicialmente, apenas os modelos *in vitro* eram disponíveis para elucidação dos mecanismos citosólicos pertinentes à fisiopatologia do sistema cardiovascular. Com o avanço da pesquisa e a necessidade de uma melhor compreensão da expressão gênica no controle cardiovascular, surgiram os estudos *in vivo*. Esta intersecção da fisiologia com a biologia molecular é uma área recentemente explorada, a qual oferece um novo rumo para o esclarecimento de complexos questionamentos até então difíceis de serem respondidos.

1.1 Hipertensão arterial

A hipertensão arterial (HA) consiste numa entidade clínica multifatorial, poligênica, de prevalência elevada, até então estimada em cerca 30% da população mundial adulta (Mielnik et al., 2004). Ainda que as formas de detecção precoce e tratamento medicamentoso alcance uma considerável parcela da população mundial, paradoxalmente seu alto custo social é responsável por cerca de 40% dos casos de aposentadoria precoce e de absenteísmo no trabalho na sociedade atual (Marinho et al., 2002). A HA envolve diversos mecanismos fisiopatológicos e múltiplos fatores etiológicos que se caracterizam por elevação

Resumo

Em condições fisiológicas, o óxido nítrico (NO) produzido principalmente pela óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) exerce uma influência modulatória no fluxo sanguíneo renal. Ainda que alguns estudos demonstrem que a expressão de RNAm da nNOS renal está alterada durante a hipertensão arterial (HA), ainda não é bem conhecido como a expressão protéica da nNOS pode ser modulada mediante baixos níveis de renina e simultaneamente, altos níveis intra-renais de angiotensina II (Ang II), um potente peptídeo vasoconstritor e inibidor da biodisponibilidade de NO.

Com a técnica da *western blotting* avaliamos a influência da HA e da Ang II intra-renal sobre a expressão da enzima nNOS em rins de ratos submetidos à hipertensão renovascular dois rins-1 clipe (2R1C). Mais especificamente, foi investigada a participação de receptores AT₁ e do *stress* oxidativo na modulação da expressão da nNOS bem como a biodisponibilidade de NO por dosagem de GMPc, através do ensaio imunoenzimático.

Para tanto, os animais foram divididos em 4 grupos: 2R1C (n=9), 2R1C + dose subpressora de losartan (10 mg/Kg/dia, água de beber; n=4), 2R1C + dose subpressora de tempol (0,2 mmol/Kg/dia, água de beber n=6) e Sham (n=16), apresentando valores de PAM 179 ± 5 mmHg, 140 ± 7 mmHg, 181 ± 10 mmHg e 99 ± 3 mmHg, respectivamente. A expressão da nNOS foi aumentada em rins contralaterais e clipados de animais 2R1C quando comparados ao grupo SHAM

($0,43 \pm 0,03$ vs. $0,14 \pm 0,02$ u.d.o. e $0,27 \pm 0,03$ vs. $0,16 \pm 0,03$ u.d.o. respectivamente), normalizada em ambos rins no grupo 2R1C tratado com losartan quando comparados ao grupo SHAM ($0,24 \pm 0,01$ vs $0,27 \pm 0,01$ u.d.o e $0,21 \pm 0,03$ vs. $0,29 \pm 0,02$ u.d.o., respectivamente). No grupo 2R1C tratado com tempol, a expressão da nNOS foi diminuída no rim contralateral ($0,27 \pm 0,06$ vs. $0,19 \pm 0,06$ u.d.o., respectivamente) mas ainda aumentada no rim clipado quando comparado ao grupo SHAM ($0,35 \pm 0,08$ vs. $0,17 \pm 0,03$ u.d.o., respectivamente).

Nossos resultados indicam que:

- 1) no modelo de hipertensão renovascular 2R1C, os receptores AT_1 e o *stress* oxidativo parecem ser estímulos primários para o aumento da expressão da nNOS e não a HA propriamente dita;
- 2) O aumento da expressão da nNOS não reflete diretamente em uma maior biodisponibilidade de NO, seja no rim clipado ou no contralateral;
- 3) O aumento da expressão da enzima nNOS reflete um dos possíveis mecanismos compensatórios gerados pelo rim a fim de preservar sua homeostase neste modelo de hipertensão.

Abstract

In physiological conditions, nitric oxide (NO) exerts a modulatory influence on renal blood flow mainly due the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) enzyme isoform. Although some studies have demonstrated that the renal nNOS mRNA expression is modified in arterial hypertension (HÁ), it has not yet been shown how nNOS protein expression is modulated by endogenous angiotensin II (Ang II), a vasoconstrictor and a NO function inhibitor.

Through the western blotting technique have been evaluate the relative role of HA and Ang II on the nNOS protein expression in the kidneys of renovascular hypertensive rats two-kidneys one clip (2K1C). The specific aim was to investigate the role of AT₁ receptors and oxidative stress in modulating nNOS expression and the NO bioavaiability by GMPc quantification for enzymeimmunoassay.

Then, the animals were divided in 4 groups: 2K1C (n=9), 2K1C+subpressor dose of losartan (10 mg/Kg/day in drinking water; n=4), 2K1C+subpressor dose of tempol (0.2 mmol/Kg/day in drinking water; n=6), and Sham (n=16), presenting values of MAP 179 ± 5 mmHg, 140 ± 7 mmHg, 181 ± 10 mmHg and 99 ± 3 mmHg, respectively. The nNOS expression was increased in the contralateral and clipped kidneys of the animals 2R1C when compared to SHAM group ($0,43 \pm 0,03$ vs. $0,14 \pm 0,02$ u.d.o. e $0,27 \pm 0,03$ vs. $0,16 \pm 0,03$ u.d.o. respectively), normalized in both kidneys in 2R1C + losartan when compared to

SHAM group ($0,24 \pm 0,01$ vs $0,27 \pm 0,01$ u.d.o e $0,21 \pm 0,03$ vs $0,29 \pm 0,02$ u.d.o., respectively). In 2R1C + tempol group, the nNOS expression was decreased in the contralateral kidney ($0,27 \pm 0,06$ vs. $0,19 \pm 0,06$ u.d.o., respectively) but still increased in the clipped kidney when compared to SHAM group ($0,35 \pm 0,08$ vs. $0,17 \pm 0,03$ u.d.o., respectively).

The present results demonstrate that:

- 1) In the 2K1C renovascular hypertension model, the AT_1 receptors and oxidative stress seem to be primary stimuli for increasing nNOS expression but not the HA *per se*;
- 2) The increase in nNOS expression does not reflect directly on the more NO bioavailability in both kidneys (contralateral or clipped);
- 3) The increase in nNOS expression induces a compensatory mechanism in order to maintain the renal homeostasis in this model of hypertension.

Uma adequada perfusão tecidual é uma condição indispensável para a homeostase do meio interno. Para isso, a pressão arterial precisa ser mantida em níveis adequados, autoregulada por vários mecanismos cardiovasculares, dentre os quais o rim participa ativamente. Para melhor entendimento dos complexos mecanismos humorais regulatórios envolvidos, os estudos em fisiologia na atualidade têm utilizado a biologia molecular como uma importante ferramenta. Inicialmente, apenas os modelos *in vitro* eram disponíveis para elucidação dos mecanismos citosólicos pertinentes à fisiopatologia do sistema cardiovascular. Com o avanço da pesquisa e a necessidade de uma melhor compreensão da expressão gênica no controle cardiovascular, surgiram os estudos *in vivo*. Esta intersecção da fisiologia com a biologia molecular é uma área recentemente explorada, a qual oferece um novo rumo para o esclarecimento de complexos questionamentos até então difíceis de serem respondidos.

1.1 Hipertensão arterial

A hipertensão arterial (HA) consiste numa entidade clínica multifatorial, poligênica, de prevalência elevada, até então estimada em cerca 30% da população mundial adulta (Mielnik et al., 2004). Ainda que as formas de detecção precoce e tratamento medicamentoso alcance uma considerável parcela da população mundial, paradoxalmente seu alto custo social é responsável por cerca de 40% dos casos de aposentadoria precoce e de

absenteísmo no trabalho na sociedade atual (Marinho et al., 2002). A HA envolve diversos mecanismos fisiopatológicos e múltiplos fatores etiológicos que se caracterizam por elevação da pressão sanguínea diastólica e sistólica, ou apenas a pressão sistólica (hipertensão sistólica isolada), comumente encontrada nos pacientes com mais de 50 anos de idade (De Burt et al., 1995). Sua evolução é progressiva e, no momento de sua detecção, pode estar associada a lesões de órgãos alvo, tais como rim, coração e endotélio vascular levando à falência dos mesmos ou até ao óbito (Ribeiro, 1995; Suematsu et al., 2002), sendo responsável por um terço do total de mortes no Brasil. As constantes descobertas de mecanismos fisiopatológicos da hipertensão têm aumentado o mosaico de componentes e teorias sugeridas que esclareçam a etiopatogenia da HA. Classicamente, as vias propostas englobam mecanismos ambientais, adaptativos, anatômicos, genéticos, neurais, cardíacos, renais, endócrinos e moleculares (Page, 1967,1982; Ribeiro, 1995).

1.2 Rim: um órgão fundamental para o controle da pressão arterial

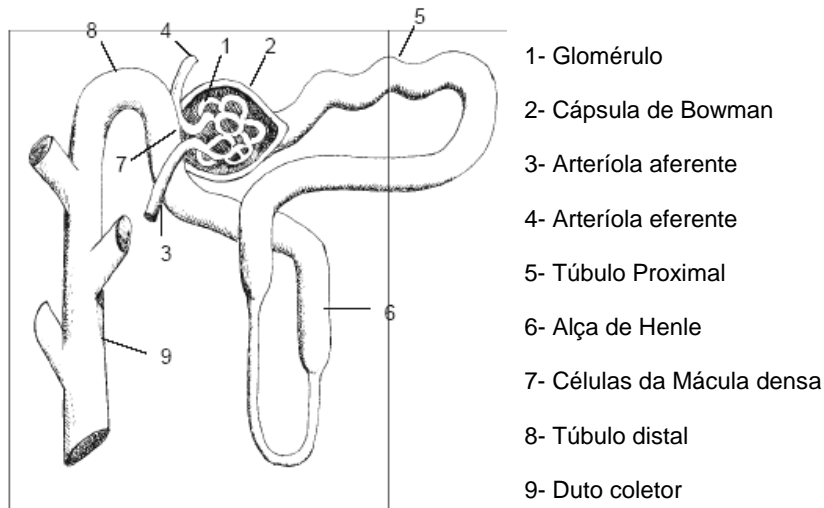
O rim e o controle da pressão arterial interagem de maneira íntima e complexa. A discussão se a hipertensão é causa ou consequência da doença renal não tem apenas importância acadêmica ou teórica, uma vez que as etiologias diferentes podem ser clínica e laboratorialmente superponíveis (Pascoal, 1998).

Ainda que atualmente as terapias farmacológicas anti-hipertensivas sejam tão eficazes no retardamento e até na prevenção de patologias renais, a via pela

qual a hipertensão lesa o rim ainda não é completamente elucidada (Pascoal, 1998). Entretanto, sabe-se que o aumento da pressão intraglomerular pode comprometer glomérulos (glomeruloesclerose) e que também o próprio remodelamento arterial (levando à diminuição do lúmen) pode induzir a isquemia associada à glomeruloesclerose, comprometendo assim a homeostase renal. Quanto à importância do rim na gênese da hipertensão, Cusi e colaboradores (1991) em experimentos de transplantação cruzada mostraram que rins transplantados de animais hipertensos induziram hipertensão em animais previamente normotensos, enquanto rins de doadores normotensos normalizaram a pressão arterial em receptores hipertensos. Tal evidência pode ser fundamentada por Guyton et al. (1974) os quais sugeriram que a hipertensão primária é caracterizada por anormalidades da natriurese pressórica. Esse fenômeno baseia-se em um aumento compensatório da pressão arterial a fim de manter a excreção de sódio e água diante de uma sobrecarga hidroeletrolítica. Como “efeito adverso”, a elevação da pressão arterial sistêmica aumentaria o fluxo sanguíneo para todos os tecidos do corpo. Em resposta, existe um mecanismo de auto-regulação renal que aumentaria a resistência vascular periférica, restaurando assim a normalidade da perfusão nesse órgão. Conseqüentemente, o preço biológico para esta readaptação é denominado "hipertensão arterial". Uma vez estabelecida a HA, outros fatores tais como aumento da resistência vascular periférica e alterações estruturais na microvasculatura renal e extra-renal, tendem a perpetuar o processo, tornando assim a HA mantida (Pascoal & Mion, 1998).

Diante do mecanismo exposto, nota-se que a auto-regulação renal é fundamental para a manutenção da pressão arterial. Sob condições basais, a filtração glomerular e o fluxo sanguíneo renal podem ser mantidos de forma estável através de uma regulação precisa, concertada, independente de uma regulação neural. Didaticamente, a auto-regulação renal pode ser subdividida em 2 mecanismos (Vander, 1995; Persson, 2002): 1) mecanismo miogênico e 2) *feedback* tubuloglomerular (TGF). O primeiro, mais rápido, ocorre semelhantemente aos leitos vasculares não-renais: o músculo liso vascular contrai em resposta ao aumento do estiramento, ocasionado por um aumento da pressão intra-arteriolar, mantendo o fluxo sanguíneo renal (RBF) constante, sem o envolvimento de moléculas intermediárias. Já o TGF trata-se de um mecanismo mais complexo, o qual regula primeiramente a taxa de filtração glomerular (GFR) que, por conseguinte, irá modular o fluxo sanguíneo renal (RBF). Em elevados níveis de pressão arterial, a pressão glomérulo-capilar e o RBF aumentam. Como conseqüência, haverá um incremento da GFR, que repercutirá diretamente no fluxo tubular proximal e na alça de Henle. Na porção mais espessa e distal dessa alça, existe a mácula densa (MD), a qual é a principal responsável pelo TGF. A MD é formada por células sensíveis ao fluxo - via sódio e principalmente cloreto (Uchida e Sasaki, 2005) - que ao “detectar” o excesso do fluxo tubular estimula a vasoconstrição da arteríola aferente pelas células justaglomerulares através de renina, adenosina e até ATP (Nishiyama et al., 2001a e 2005; Persson, 2002b;) diminuindo assim a GFR. Esse mecanismo normalmente é ativado após 30 segundos de oscilação na pressão arterial. A

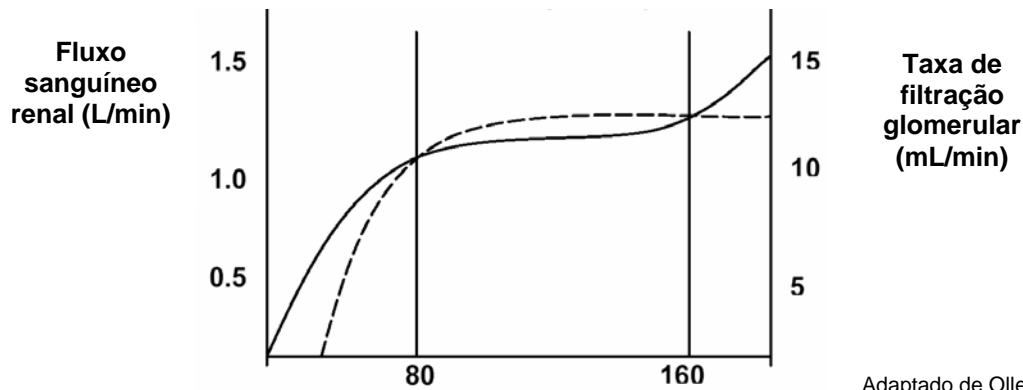
unidade morfo-funcional do rim bem como suas principais estruturas estão representadas na figura 01.



Adaptado de Ollerstam, 2002

Figura 01. Esquema mostrando a unidade morfofuncional do rim (néfron). O aparelho justaglomerular é a principal estrutura responsável pela autoregulação renal. É composto por arteriola aferente, arteriola eferente, glomérulo, células da mácula densa e células mesangiais (macrófagos diferenciados que se localizam contíguo ao glomérulo, não mostrado na figura)

Dessa forma, esses 2 mecanismos agem sinergicamente, mantendo o RBF relativamente constante dentro de uma estreita faixa de variação de PAM, encontrada entre 80 e 160 mmHg (Forster e Maes, 1947; Baer e Navar 1973; Arendhorst et al., 1975) conforme representação na figura 02.



Adaptado de Ollerstam, 2002

Figura 02. Mesmo sob alterações de pressão arterial entre 80 a 160 mmHg, a taxa de filtração glomerular (linha pontilhada) e o fluxo sanguíneo renal (linha contínua) são mantidos constantes, através do mecanismo de auto-regulação renal.

1.3 Hipertensão renovascular

Em cerca de 95% dos pacientes hipertensos não é identificada uma única causa reversível da pressão arterial elevada, caracterizando-se então hipertensão essencial ou primária. Entretanto, na outra pequena parcela de pacientes, a gênese da elevação da pressão arterial pode ser definida, sendo então conhecida como hipertensão secundária. A hipertensão renovascular é um dos tipos mais freqüentes dessa última, decorrente de uma diminuição de fluxo sangüíneo para os rins, induzida raramente por uma displasia fibromuscular ou, na maioria dos casos, pela formação de uma lesão aterosclerótica na artéria renal. Curiosamente, a bifurcação da artéria aorta com a artéria renal em animais APOE *knockout* (KO) ou até em humanos ateroscleróticos é um dos locais mais freqüentes de acúmulo de ateromas (Hartley et al., 2000). Com a estenose estabelecida,

há uma diminuição da pressão de perfusão renal, estímulo que gera a liberação de renina induzindo assim a formação de angiotensina II (Ang II), como descrito a seguir.

1.4 Sistema Renina Angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) é o principal mecanismo humoral envolvido na modulação das funções cardiovascular e renal, participando na homeostase da pressão arterial e no balanço eletrolítico. Muitos estudos têm confirmado significativa importância desse sistema na fisiopatologia da hipertensão (Navar e Rosival, 1984; Mitchell e Navar 1995; Navar et al., 1998), justificando assim o alvo desse estudo.

O SRA é composto por uma cascata de reações enzimáticas que culminam com a formação da Ang II, peptídeo de maior importância para o desenvolvimento da hipertensão.

A cascata se inicia com a produção de angiotensinogênio principalmente por via hepática e renal, apesar de ser encontrada também em células adiposas, células da glia, ovário, glândula adrenal, coração, pulmão, intestino e estômago (Phillips et al., 1993). Esse peptídeo não possui atividade intrínseca. Para tal, necessita sofrer duas modificações em sua estrutura: a primeira, é a perda de dois aminoácidos, transformando-se num decapeptídeo, a angiotensina I (Ang I), através da ação da enzima proteolítica renina. Produzida pelas células justaglomerulares e armazenada em grânulos de secreção, a renina é liberada quando ocorre:

- a) Diminuição da pressão de perfusão renal;
- b) Diminuição do aporte de sódio para as células da mácula densa;
- c) Estimulação dos receptores β_1 .adrenérgicos renais.

A angiotensina I é um decapeptídeo de pouca ação biológica e através da ação da enzima endopeptidase neutra e prolil-endopeptidase, pode se originar a angiotensina 1-7 (Angio1-7). Descoberta recentemente, a Angio1-7 é encontrada nas mesmas concentrações plasmáticas que a Ang II e exerce sua ação através da ligação com o seu alvo específico: o receptor Mas. Muitos estudos têm sido realizados e diversos efeitos para Angio1-7 já foram elucidados, como vasodilatação (podendo ser potencializada por bradicinina), efeito antiarritmogênico, melhora da função contrátil pós-infarto e inibição da proliferação celular (Santos et al., 2005). Além da Angio1-7, observações recentes indicam que importantes ações periféricas e centrais do SRA podem ser mediadas por outras seqüências menores de peptídeos angiotensinérgicos como a angiotensina III (Angio 2-8), Angiotensina (2-10) e angiotensina IV (Angio 3-8). Esses estudos têm ampliado o conceito do SRA, podendo-se então considerar que tanto a Ang I como a Ang II podem sofrer um processo de biotransformação, gerando uma “família” de peptídeos biologicamente ativos (Santos et al., 2005).

Mesmo que outros peptídeos do SRA sejam alvos de muitas pesquisas na atualidade, repletos de dados relevantes (tabela 01), o peptídeo de maior importância cardiovascular derivado da angiotensina I é a Ang II. Esse peptídeo é formado através da ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) produzida pelo endotélio pulmonar e demais tecidos (Millatt et al.1999), podendo-se então entender que a Ang II participa tanto de mecanismos endócrinos quanto autócrino-parácrinos em diversos órgãos, como coração, endotélio, cérebro e rim. Este sistema tecidual parece participar de forma significativa em diversas fisiopatologias cardiovasculares, como na insuficiência renal e hipertensão arterial (Navar et al.,1984; Navar et al., 2002; Navar, 2004).

Além disso, pode ser produzido por outras vias como catepsinas e quimases (Tonnesen et al., 1982; Weir et al., 1999). A Ang II é um octapeptídeo e pode atuar através de dois receptores: AT₁ e AT₂ (Clauser et al., 1996).

No organismo, o receptor AT₁ é amplamente distribuído, podendo ser encontrado no coração, rins, glândulas adrenais, cérebro e músculo liso. Quando ativado pela ligação da Ang II, diversas ações biológicas são geradas, como aumento da resposta simpática, vasoconstricção, aumento da reabsorção de sódio, secreção de aldosterona e vasopressina, sede, remodelamento cardíaco e vascular, efeito pró-inflamatório, aumento da produção de radicais livres, entre outros (Millatt et al., 1999). Compensatoriamente, a ligação da Ang II com o receptor AT₂ gera efeitos antagônicos aos da ligação da Ang II com o receptor AT₁. Os receptores AT₂ encontram-se em menor densidade que os receptores AT₁ no indivíduo adulto, porém estão maior número no feto e recém nascido (Millatt et al, 1999; Volpe et al., 2003).

Nos rins, os receptores AT₁ estão localizados mais na medula que na região cortical: em células glomerulares, no túbulo proximal, em células intersticiais, do epitélio tubular ascendente e distal, células do duto coletor e da mácula densa. Já os receptores AT₂ são encontrados em menor quantidade no túbulo proximal, duto coletor e em alguma vasculatura (Eduards e Aiyar, 1993).

Convém salientar que recentemente outros peptídeos do SRA têm sido identificados. Apesar de mais conhecida, atualmente percebe-se que a complexidade desta via é ainda maior, podendo ser comparada às vias das encefalinas e interleucinas. Para tanto, segue abaixo a tabela 01 que

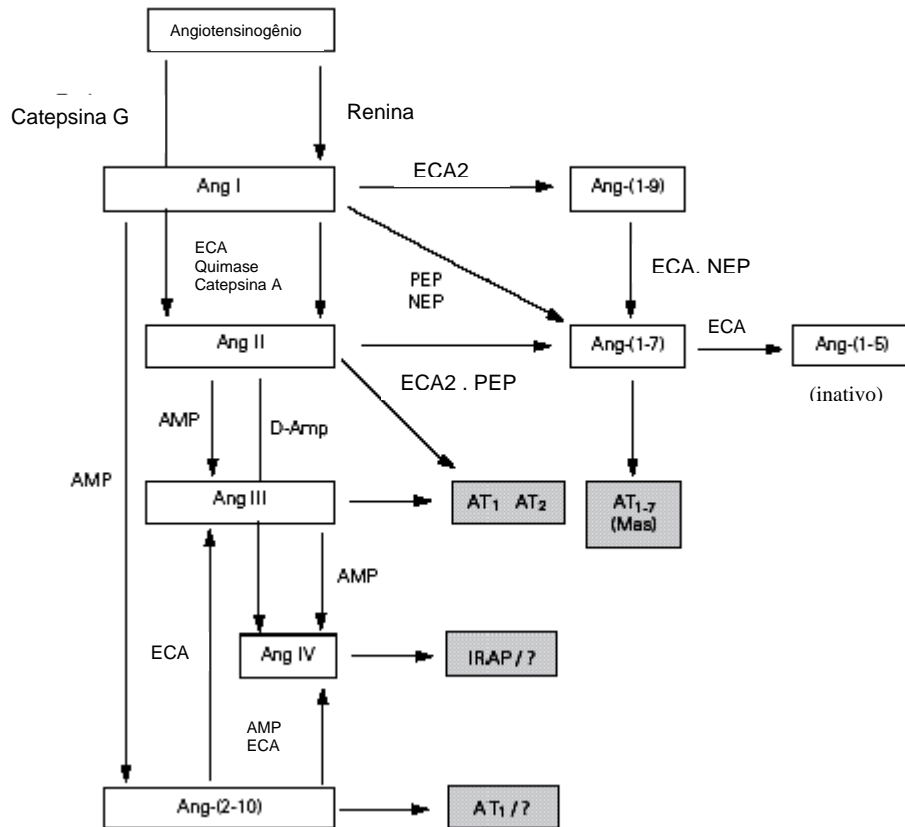
resumidamente mostra os efeitos biológicos dos peptídeos mais conhecidos e recentemente explorados (Santos et al., 2005):

Angiotensina	Receptor	Ações
Ang II	AT ₁	Vasoconstrição Inotropismo e cronotropismo positivo Efeito arritmogênico Pró-remodelamento Estimula proliferação celular Trombogênico Pró inflamatório
	AT ₂	Inibição da proliferação celular Apoptose Vasodilatação (?)
Ang III	AT ₁ e AT ₂	Ação central
Ang 1-7	AT ₁ - 7(Mas)	Vasodilatação Potencialização da BK-vasodilatação Efeito antiarritmogênico Melhora da contratilidade pós isquemia Inibição da proliferação celular
Ang 3-8 (Ang IV)	AT ₄ /?	Vasodilatação Inibição da proliferação celular
Des-Asp-AngI	AT ₁ /?	Inibição da proliferação celular induzida por Ang II

Tabela 01: Efeitos biológicos da ligação da angiotensina II e angiotensina 1-7 com os seus respectivos receptores. A angiotensina II também pode originar angiotensina 1-7 através da ação das enzimas proli-endopeptidase e proli-carboxipeptidase.

Adaptado de Santos, 2005

Diante do exposto, pode-se entender que o SRA é constituído de peptídeos preponderantemente pressores, possuindo também antagonistas fisiológicos que atenuam ou modulam tal efeito. Os efeitos agonistas mediados pelo receptor AT_1 são antagonizados não somente por receptores AT_2 , mas também os receptores Mas. Pela figura 03, podemos resumir a cascata do SRA



Adaptado de Santos, 2005

da seguinte maneira:

1.5 Hipertensão de Goldblatt dois rins, um clipe (2R1C)

Embora a hipertensão seja freqüentemente considerada como causa de doenças renais e falência renal crônica, também sabe-se que a hipertensão pode ser uma conseqüência promovida por defeitos na microcirculação renal e nas funções de transporte, comprometendo a capacidade normal dos rins de manter o balanço de sódio e água (Cowley, 1992; Guyton, 1991; Navar, 2004)

Aumentos dos níveis de Ang II circulantes e teciduais (principalmente em tecido renal) ocorrem numa variedade de modelos experimentais de hipertensão, alterando assim o balanço de sódio e água (Guan et al., 1992; Von Thun et al., 1994; Zou et al., 1996). Um dos modelos usados para o estudo da hipertensão dependente de Ang II é o dois rins, um clipe (2R1C) de Goldblatt (1937), primeiramente desenvolvido em cães. Somente em 1970, Miksche et al. estabeleceram os modelos um rim 1 clipe (1R1C) e 2R1C em ratos. Através de uma constrição em uma das artérias renais sustenta-se uma hipertensão mesmo na presença de um rim normal, não manipulado (Ploth, 1983; Navar et al., 1998). Curiosamente, diversos estudos mostram que esse rim não-clipado não protege o desenvolvimento da hipertensão porque também desenvolve, de forma inapropriada, grandes quantidades de Ang II, induzindo assim alterações na microvasculatura renal e na função tubular (Ploth et al., 1981; Ploth, 1983; Guan et al., 1992; Braam et al., 1995; Navar et al., 1998).

Neste modelo, ao promover uma padronizada estenose na artéria renal do animal, induz-se a liberação de renina pelo rim clipado e conseqüentemente, formação de Ang II circulante que, por sua vez, eleva a resistência vascular

periférica, aumentando assim os níveis pressóricos de forma aguda (Navar, 1995). Além disso, altos níveis desse octapeptídeo influencia diretamente na hemodinâmica renal ao exercer um papel vasoconstritor. O fluxo plasmático renal é reduzido, diminuindo assim a taxa de filtração glomerular e , inversamente, a reabsorção de sódio pelo túbulo proximal é aumentada. Adicionalmente, a Ang II estimula a secreção de aldosterona pela supra-renal elevando assim a reabsorção tubular distal de sódio (Pickering, 1995).

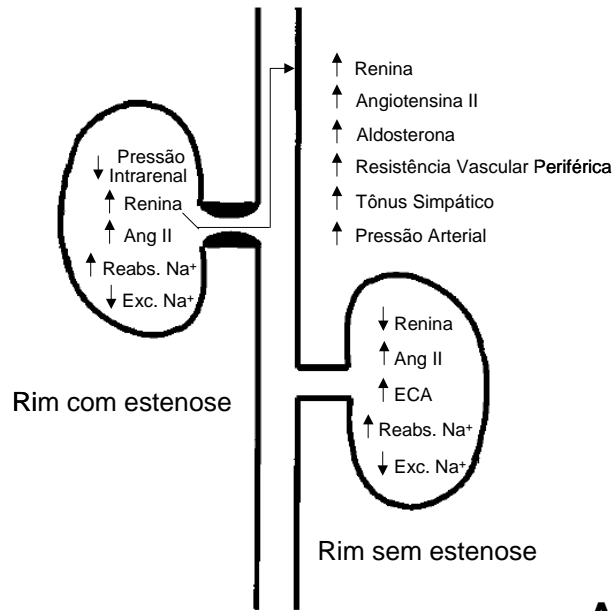
Devido ao aumento dos níveis pressóricos, o fluxo sanguíneo para o rim clipado é restaurado, e após 28 dias, os níveis de renina e Ang II plasmáticos retornam a valores próximos dos normais (Guan et al.,1992; Navar et al., 1998). Mesmo assim, este rim ainda sofre atrofia devido à diminuição de fluxo para o mesmo.

Já o rim contralateral (não-clipado), sujeito à progressiva elevação da pressão arterial, torna-se depletado de renina e excreta elevadas quantidades de sódio, fenômeno conhecido como natriurese pressórica (Diekmann et al., 2000). Este efeito pode ser atenuado posteriormente pela ação da Ang II intrarenal aumentada, mesmo sob baixos níveis de renina, como explicitado acima. Em consequência desta sobrecarga de trabalho, este rim desenvolve uma hipertrofia compensatória. Portanto, pode-se perceber que nesta segunda fase, a manutenção da hipertensão renovascular 2R1C caracteriza-se pelo aumento inapropriado de Ang II, contribuindo assim para uma excessiva retenção de sódio e água (mantendo a hipertensão) além de, à longo prazo,

induzir efeitos proliferativos que destinarão à injúria renal alterando assim parâmetros hemodinâmicos (Schiffrin, 1999; Navar & Nishiyama, 2004).

Navar e colaboradores (2004) têm mostrado que as concentrações de Ang II intrarenais são responsáveis pela regulação da hemodinâmica renal e transporte tubular. Na hipertensão, o acúmulo desse peptídeo é mediado por receptores AT₁ que internaliza e acumula-se intracelularmente em endossomas. Entretanto, a Ang II não perderá sua função: ela pode exercer funções citosólicas ou ser reciclada e por fim, secretada para exercer suas ações hipertensoras, ligando-se novamente em receptores AT₁ na membrana celular (Navar, 2004). Alternativamente, recentes estudos de Navar & Nishiyama (2004) sugerem que uma substancial fração intersticial de Ang II seja também formada por grandes concentrações do substrato angiotensinogênio em células tubulares proximais. O aumento desse substrato é paradoxalmente estimulado por Ang II. Essa retroalimentação positiva pode ser um importante contribuinte para a manutenção de altos níveis intrarenais de Ang II na fase crônica, mesmo com baixos níveis de renina (Schunkert et al., 1992; Kobori et al., 2001; Ingelfinger JR et al., 1999).

A figura 04 resume os níveis dos componentes do SRA e os efeitos após a colocação do clipe:



ADAPTADO

Figura 04: Níveis dos componentes do SRA e efeitos dependentes de angiotensina II ativados pela estenose unilateral renal. Ang II: angiotensina II; ECA: enzima conversora de angiotensina; Reabs.: reabsorção; Exc.: excreção.

1.6 Sistema do Óxido Nítrico

Considerada a molécula do ano em 1992 por Koshland, o óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso que medeia múltiplas funções em nosso organismo. Agindo autocrina ou paracrinamente, o NO está envolvido no relaxamento do músculo liso vascular, diminuição da agregação plaquetária (Kuo et al., 1995; Loscalzo et al., 2001), sinalização celular, aprendizado, além de respostas imunológicas citotóxicas (Nathan e Xie, 1994). Na área cardiovascular, a deficiência de sua produção está envolvida na formação e

manutenção de diversos estados patológicos como aterosclerose, *diabetes mellitus* e hipertensão.

Como o NO é produzido? À partir do aminoácido básico L-arginina (L-arg), o NO pode ser sintetizado simultaneamente com a L-citrulina. Para isso, é indispensável a ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual é representada por 3 isoformas: NOS neuronal (nNOS ou tipo I) descrita inicialmente em tecidos neuronais, NOS induzível (iNOS ou tipo II) encontrada em macrófagos e NOS endotelial (eNOS ou tipo III) identificada em células endoteliais. É importante lembrar que a atividade enzimática requer também a participação de cofatores como calmodulina, tetrahydrobiopterina (BH₄), FAD, FMN e NADPH, fundamentais para uma correta síntese de NO (Michel et al., 1997). As enzimas nNOS e eNOS são expressas constitutivamente e são dependentes de Ca⁺² - calmodulina (Lowenstein e Snyder, 1992; Kiechele et al., 1993; Wong et al., 1996). Apenas a iNOS é expressa de forma induzível e não é dependente de Ca⁺² - calmodulina (Marletta, 1993).

O mecanismo de ação intracelular do NO é comum para as três isoformas: inicialmente, ocorre a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel, aumentando assim a conversão da guanosina monofosfato (GTP) em Guanosina 3',5'-monofosfato cíclica (GMPc). Após a formação desse 2º mensageiro, a proteína quinase G (PKG) é ativada acarretando uma diminuição citosólica de Ca⁺² em células do músculo liso vascular, induzindo assim a uma resposta celular do NO, induzindo finalmente a uma ação vasodilatadora (Moncada e Higgs, 1993).

O desenvolvimento de hipertensão está bem documentado em animais com bloqueio crônico da síntese de NO ou animais *knockout* para o gene NOS, enquanto que a reversão dessa também é verificada em camundongos que superexpressam o gene NOS (Gava et al., 2005). Portanto, a participação do NO na regulação vascular é muito importante. Convém salientar que existem outros mecanismos contribuindo para a hipertensão e injúria de órgãos em quadros de deficiência de NO. Neste caso, sugere-se que tanto a Ang II quanto endotelina (ET-1) também contribuem para manutenção da hipertensão e em lesões cardio-renais (Schiffrin et al., 1999; Kashiwagi et al., 2000; Pollock et al., 1993).

1.7 NO e rim

Desde 1936 inúmeros estudos foram realizados para avaliar o mecanismo pelo qual a remoção de ambos os rins causa hipertensão sistêmica (hipertensão renopriva). Alguns dados sugeriram que este efeito se devia a ausência da ação vasodilatadora normal de várias substâncias sintetizadas pelo rim (Grollman et al., 1949), enquanto outros indicavam que a pressão arterial aumentava devido a inevitável retenção de volume. Várias possibilidades existem, mas a única com embasamento experimental suficiente é a da produção de substâncias vasodilatadoras pelo rim normal, na ausência das quais a pressão arterial se eleva. Prostaglandinas, o sistema cinina-caliceína e, mais recentemente, os fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRFs) ou NO, agindo isolada ou combinadamente, são, atualmente, os melhores candidatos para essa função.

No tecido renal, o NO é a mais importante molécula vasodilatadora (Majid e Navar, 2001). Além disso, possui uma grande ação regulatória parácrina, justificando assim, mesmo em condições basais, a presença das três isoformas de NOS distribuídas em vários tipos de células renais: a nNOS é expressa na mácula densa (Welch et al., 2002; Bachmann et al., 1994), arteríolas aferentes e eferentes, nervos renais (Welch et al., 2002; Patzac et al., 2004), glomérulo, duto coletor, alça descendente e em toda microvasculatura renal (Star, 1991; Kone e Baylis, 1997; Kone 1997) . Inclusive, Bachmann e colaboradores (1994) afirmam ser a isoforma mais abundante no tecido renal (Baylis et al., 1996). Quanto a iNOS, esta isoforma no rim também é constitutivamente expressa por células mesangiais (Ahn et al., 1994). A eNOS é encontrada no leito vascular renal e também é expressa no epitélio tubular (Welch et al., 2002).

O NO é uma molécula com função ampla no tecido renal. Historicamente, foi descrita como fator regulatório de diurese e natiurese. Seus efeitos fisiológicos podem ser mediados por alterações na hemodinâmica renal e/ou na reabsorção de sódio e água no néfron, aguda ou cronicamente (Stauss et al., 2000; Persson et al., 2002). O NO promove vasodilatação na arteríola aferente, aumentando a taxa de filtração glomerular (Juncos et al., 1995; Gabbai et al., 1999), inibe a reabsorção de sódio ao longo do néfron (Ortiz et al., 2002, 2003; Sasaki et al., 2004) . Além disso, a presença da nNOS na mácula densa sugere que o NO possa modular a secreção de renina pelo aparato justaglomerular e pelo *feedback* tubuloglomerular (TGF) (Schnackenberg et al., 1997; Millatt et al., 1999) apesar de existirem trabalhos evidenciando o estímulo ou a inibição de

sua secreção (Kurtz e Wagner, 1998). A ação do NO sobre a secreção do SRA tem óbvias implicações terapêuticas, porém os achados ainda são discrepantes (Flora Filho e Zilberstein, 2000). Adicionalmente, o NO regula o transporte iônico em vários segmentos do néfron (Ortiz e Garvin, 2002).

1.8 NO renal e estresse oxidativo

Em condições fisiológicas, o metabolismo celular do oxigênio gera potencialmente espécies reativas do oxigênio. Normalmente, a quantidade e a magnitude de formação de espécies oxidantes é balanceada pela sua taxa de metabolização ou eliminação. Entretanto, quando as células chegam a um limite da capacidade antioxidante, pode haver um desequilíbrio entre pró-oxidantes e anitoxidantes, ocorrendo o fenômeno conhecido como estresse oxidativo (Touyz, 2004).

Uma das moléculas mais pró-oxidante que se conhece é o ânion superóxido (O_2^-). As maiores fontes de liberação de O_2^- são as enzimas NADH oxidase e NADPH oxidase (Stamler et al., 1996; Münzel et al., 1995), as quais são ricamente expressas no rim, distribuídas em todo o tecido e microvasculatura (Touyz, 2004). Inclusive, possuem suas atividades aumentadas na presença de Ang II (Griendling et al., 1994; Agarwal et al., 2004) que pode contribuir diretamente para a disfunção renal e dano vascular (Touyz, 2004).

Nos tecidos, o NO possui um tempo de meia vida limitado a poucos segundos devido à rápida e irreversível interação com O_2^- levando à formação

de peroxinitrito (OONO^-) conforme representado na figura 05. Este pode ser posteriormente metabolizado e aparecer nos fluidos extracelulares e urina como $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$, servindo inclusive como indicativos indiretos de produção de NO. Os peroxinitritos também podem ligar-se a resíduos de tirosina em proteínas formando a nitrotirosina. Esse produto auxilia nos estudos imunohistoquímicos, evidenciando por exemplo, em rim clipados de ratos 2R1C a participação do NO por todo aparelho justaglomerular (Bosse e Bachmann, 1997; Wilcox, 2000).

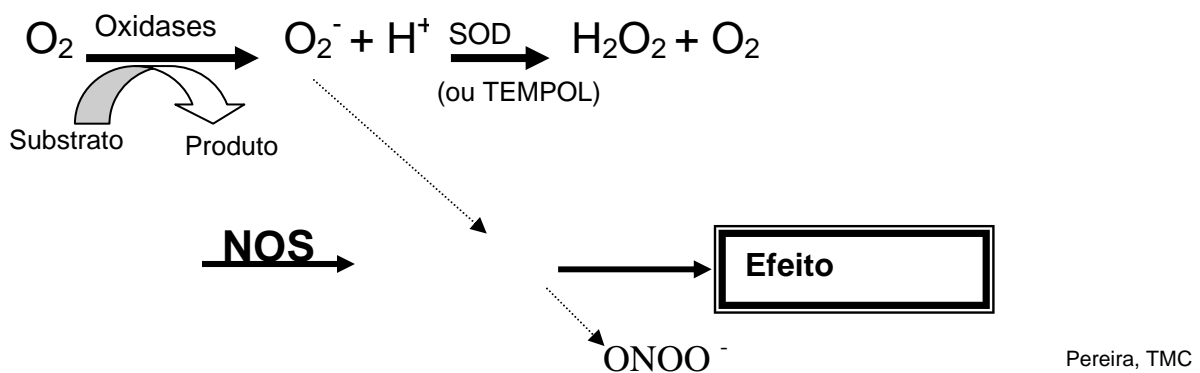


Figura 05. Representação esquemática de um dos principais mecanismos geradores de ânions superóxido e sua interação com o NO para a formação de um metabólito inativo, o peroxinitrito.

1.9 Interações entre o Sistema Renina Angiotensina e o Sistema Óxido Nítrico

O desequilíbrio entre Ang II – NO talvez não explique toda fisiopatologia vascular da hipertensão, mas certamente é um importante componente (Raij, 2001), devido à aplicação direta sobre as três características principais da

hipertensão: tônus vascular anormal, anormalidades em natriurese além de remodelamento vascular. Ademais, a interação entre esses dois sistemas é iminente, uma vez que as isoformas da óxido nítrico sintase estão distribuídas em proximidade aos sítios dos componentes do SRA (Millatt et al., 1999).

No rim, a Ang II é um vasoconstritor potente, com propriedades tróficas. É mais pronunciado nas arteríolas eferentes que na aferentes, elevando a GFR. Sua função predominantemente cortical confere modulação do processo de autoregulação renal, aumentando a vasoconstrição. Já o NO, com propriedades vasodilatadoras, antitrombóticas e anti-crescimento, mantém a integridade e prevenção de danos em órgãos-alvo, como no rim (Raij, 2001). O efeito vasodilatador é predominante na arteríola aferente, mas também exerce efeito na eferente (Kone, 1997; Patzac et al., 2004). Madrid e colaboradores (1997) sugerem que NO pode ser um modulador mediado por Ang II mais efetivo na região cortical que medular (1997). Portanto, o antagonismo fisiológico entre esses dois sistemas permite a regulação do TGF. Braam e Koomans (1995) evidenciaram que o TGF pode ser potencializado após inibição das óxido nítrico sintases, principalmente pela nNOS (Wilcox et al., 1992; Ollerstam e Persson, 2002).

A inabilidade do rim na excreção de sódio é um importante componente patogênico da hipertensão. O NO participa desse controle de excreção, diminuindo a reabsorção tubular de sódio através de uma modulação medular (Majid e Navar, 1997). Já a Ang II, possui papel antinatriurético, por ações

diretas (elevando reabsorção tubular pelo transportador Na^+/H^+) ou indiretas (diminuindo filtração glomerular, aumentando liberação de aldosterona).

Um outro mecanismo envolvido entre NO e Ang II é quanto a ativação das NADH/NADPH oxidases que induzem a produção de O_2^- . A produção deste radical livre é estimulada por Ang II e, no rim, tem sido encontrado em células do músculo liso vascular (Griendling et al., 1996) e células mesangiais (Jaimes et al., 1998). Extracelularmente, o O_2^- inativa o NO, enquanto que intracelularmente, ativa MAP quinases induzindo à hipertrofia celular.

Diante do exposto, pode-se afirmar que a gênese da injúria em órgãos-alvo na hipertensão é afetada pela queda da biodisponibilidade de NO e aumento dos níveis de Ang II. Curiosamente, a vasoconstrição mediada pelo bloqueio agudo de NO não requer a participação de Ang II. Entretanto, quando os níveis de Ang II são suficientemente altos para afetar o tônus renovascular, o NO é importante na manutenção da perfusão renal (Rajj et al., 1995; Beierwaltes et al., 1996). A inibição intrarenal de NO causa um aumento da resistência arteriolar aferente e uma queda da GFR. Portanto, conclui-se que em parte, o NO participa em oposição às ações da Ang II (Ohishi et al., 1992; Sigmon et al., 1992).

Diante disso, pode-se afirmar que estratégias terapêuticas capazes de restaurar o equilíbrio desses agentes vasoativos poderiam ser protetores eficazes dos órgãos-alvo (Rajj, 2001).

1.10 Biologia Molecular (Western blotting): uma importante ferramenta para estudos fisiológicos

Em estudos fisiológicos, uma das ferramentas mais comumente utilizadas são fármacos, os quais com perfis agonistas ou antagonistas, em seus respectivos receptores, permitem que muitas perguntas sejam respondidas, à partir de protocolos bem elaborados.

No intuito de complementar os estudos na fisiologia cardiovascular que dificilmente poderiam ser respondidos apenas por perfis farmacodinâmicos, surge a oportunidade de investigar as regulações ao nível celular, observando características pós transcricionais, ou mais especificamente, pós traducionais, quando mensura-se a expressão protéica proporcionado pela técnica de *western blotting*.

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar a influência da angiotensina II intrarenal sobre a expressão da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) em córtex renais de ratos com hipertensão renovascular 2R1C.

2.2. Objetivos Específicos

- Padronizar e otimizar a técnica de *Western blotting* para a expressão da nNOS em diferentes tecidos como cérebro, hipófise (controle positivo) e rim (tecido estudado);
- Propor possíveis mecanismos de ação para estímulo de expressão da nNOS, na região cortical renal de ratos, determinando:
 - Através do tratamento farmacológico com losartan, a participação de receptores AT₁ na modulação da expressão da nNOS;
 - Através do tratamento farmacológico com tempol, a influência do estresse oxidativo na expressão da nNOS;
- Avaliar se as variações de expressão da enzima refletem diretamente na biodisponibilidade de NO.
- Avaliar os efeitos da hipertensão 2R1C (com ou sem tratamento farmacológico) sobre:
 - Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC)
 - Peso corporal
 - Peso úmido renal

3.1 Animais Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com peso corporal variando entre 150-180g, provenientes do Biotério do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo. Os animais foram mantidos em temperatura controlada (20-25°C) e iluminação artificial de acordo com as diretrizes recomendadas para biotérios de pesquisa (FINEP).

3.2 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais, sendo:

- 1) Normotensos **SHAM**;
- 2) Hipertensos **2R1C**;
- 3) Hipertensos **2R1C** tratados com **losartan** (10mg/Kg/dia)
- 4) Hipertensos **2R1C** tratados com **tempol** (0,2 mmol/Kg/dia)

3.3 Protocolo Experimental

Para melhor entendimento, o protocolo experimental será resumido na tabela 02, cujos itens serão explicitados a seguir.

4.1 Efeito da hipertensão renovascular sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC)

Na figura 09, estão demonstrados os valores basais da pressão arterial média (PAM). Conforme esperado, os animais submetidos à estenose da artéria renal apresentaram aumentos significantes dos níveis pressóricos (SHAM 99 ± 3 mmHg; 2R1C 179 ± 5 mmHg) até mesmo quando submetidos ao tratamento com losartan e tempol em doses subpressoras quando comparados ao grupo controle (2R1C + Losartan 140 ± 7 mmHg; 2R1C + Tempol: 181 ± 10 mmHg). Convém salientar que a metade dos animais submetidos ao tratamento com losartan ficaram normotensos (97 ± 4 mmHg) , os quais foram excluídos do grupo, a fim de fidelizar a interpretação dos dados.

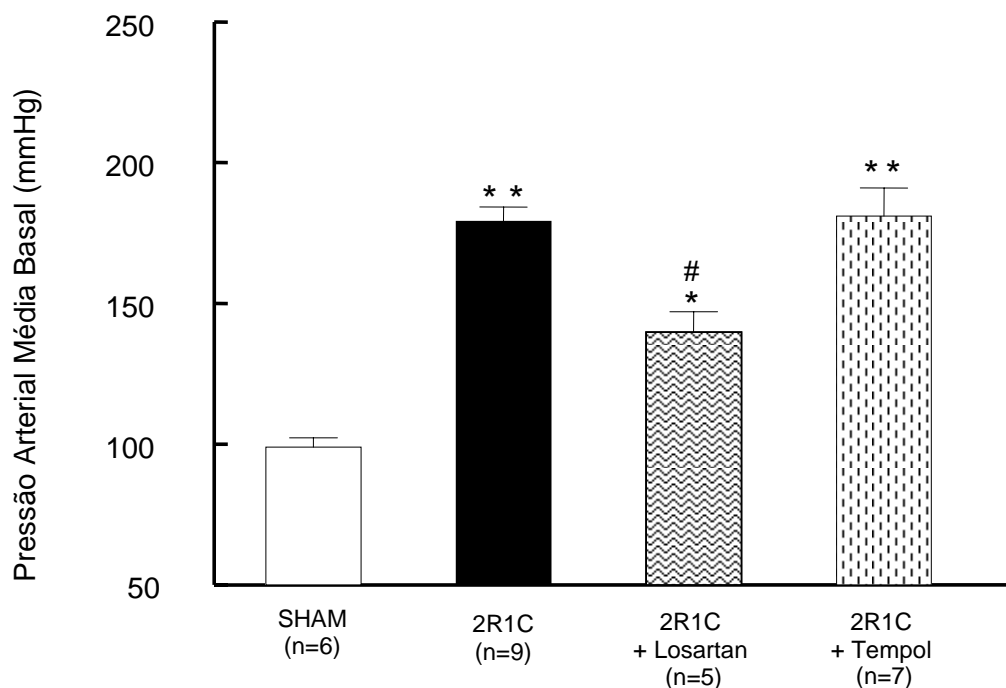


Figura 09: Pressão arterial média (PAM) de ratos SHAM (n=6), 2R1C (n=9), 2R1C + losartan 10mg/Kg/dia (n=5) e 2R1C + tempol 0,2mmol/Kg/dia (n=7) após 28 dias

Em nossos experimentos, colocamos na artéria renal esquerda cliques estenóticos de 0,20 mm mantendo o rim direito intacto. Após quatro semanas, os ratos foram submetidos à medida da pressão arterial média, os quais apresentaram valores de 179 ± 5 mm Hg (Figura 09), evidenciando que indução da hipertensão foi eficaz. Além dos valores pressóricos, foi analisado o peso renal dos animais. Indispensavelmente, o rim contralateral deveria apresentar uma hipertrofia quando comparado ao rim clipado (não isquêmico), numa diferença compreendida, no mínimo, maior que 35%. Analisando a tabela 03, observamos que o rim contralateral dos animais 2R1C apresentou hipertrofia quando comparado ao rim clipado do mesmo grupo. Esse fenômeno ocorre através de uma compensação imposta pelo rim clipado, na tentativa de restabelecer uma excreção hidroeletrólítica eficiente, evitando assim uma expansão de volume, proporcionado à partir de um reflexo reno-renal (Zanchetti e Stella, 1984). Complementando a primeira evidência, outra hipótese é discutida por Burszty et al. (2001), que justifica a participação de fator de crescimento insulina-*like* (IGF-1) na hipertrofia do rim contralateral. Esse fator está aumentado nesse rim (não estenótico) e diminuído no rim clipado. Isso também pode explicar por que rins de animais submetidos à hipertensão renovascular 1R1C não exibem atrofia: os níveis de IGF-1 também estão elevados.

O grupo 2R1C tratado com losartan apresentou uma hipertrofia significativamente maior em relação aos outros grupos. Logo, pode-se sugerir que a hipertrofia não é influenciada apenas com o incremento pressórico, mas também

Referências Bibliográficas

Agarwal R, Campbell RC, Warnock DG (2004). Oxidative stress in hypertension and chronic kidney disease: role of angiotensin II. *Semin Nephrology*, 24(2):101-14.

Allcock GH, Hukkanen M, Polak JM, Pollock JS, Pollock DM (1999). Increased nitric oxide synthase-3 expression in kidneys of deoxycorticoesterone acetate-salt hypertensive rats. *Journal of the American Society of Nephrology*, 10 (11):2283-2289.

Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA (1999). Localization of angiotensin II AT1 and AT2 receptors. *Journal of the American Society of Nephrology* 10 Suppl 11: S23-S29 .

Amiri F, Garcia R (1997). Renal angiotensin I receptor regulation in two-kidney, one clip hypertensive rats: effect of receptor inhibition. *Hypertension*; 30: 3 Pt1, 337-344.

Anh KY, Mohaupt MG, Madsen KM, Kone BC (1994). In situ hybridization localization of mRNA encoding inducible nitric oxide synthase in rat kidney. *American Journal of Physiology*, 267:F748-757.

Arendshorst WJ, Finn WF, Gottschalk CW (1975). Autoregulation of blood flow in the rat kidney. *American Journal of Physiology*;228:127-33.

Arendshorst WJ, Brannstrom K, Ruan X (1999). Actions of angiotensin II on the renal microvasculature. *Journal of the American Society of Nephrology* 10 Supplement 11:S149-S161.

Bachmann S, Mundel P (1994). NO in the kidney: synthesis localization and function. *American Journal of Kidney Diseases*, 24:112-129.

Bachmann S, Bosse HM, Mundel P (1995). Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in mammalian kidney. *American Journal of Physiology*, 268:F885-889.

Baer PG, Navar LG (1973). Renal vasodilation and uncoupling of blood flow and filtration rate autoregulation. *Kidney Integrative*, 4:12-21.

Baylis C (2005). Changes in renal hemodynamics and structure in the aging kidney; sexual dimorphism and the nitric oxide system. *Experimental Gerontology*, 40: 271-278.

Baylis C, Qiu C (1996). Importance of nitric oxide in the control of renal hemodynamics. *Kidney Integrative*, 49:1727-1731.

