

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

BIANCA PRANDI CAMPAGNARO

**UTILIZAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO
PARA ANÁLISE DO EFEITO DA HIPERTENSÃO
RENOVASCULAR 2R1C SOBRE CÉLULAS
SANGUÍNEAS, ENDOTELIAIS E DA MEDULA
ÓSSEA DE CAMUNDONGOS**

VITÓRIA
2012

BIANCA PRANDI CAMPAGNARO

**UTILIZAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO
PARA ANÁLISE DO EFEITO DA HIPERTENSÃO
RENOVASCULAR 2R1C SOBRE CÉLULAS
SANGUÍNEAS, ENDOTELIAIS E DA MEDULA
ÓSSEA DE CAMUNDONGOS**

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

Orientadora: Prof^a Dr.^a Silvana dos Santos Meyrelles

VITÓRIA
2012

BIANCA PRANDI CAMPAGNARO

**Utilização da citometria de fluxo para
análise do efeito da hipertensão renovascular
2R1C sobre células sanguíneas, endoteliais e
da medula óssea de camundongos**

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

Aprovada em 07 de dezembro de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Dr.^a Silvana dos Santos Meyrelles
Orientadora

Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez
Examinador Interno

Prof Dr Leonardo dos Santos
Examinador Interno

Prof Dr Thiago de Melo Costa Pereira
Examinador Externo

Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva
Examinador Externo

RESUMO

Campagnaro BP. Utilização da citometria de fluxo para análise do efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre células sanguíneas, endoteliais e da medula óssea de camundongos. [tese] Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, 2012. 169f.

A angiotensina II foi considerada durante muito tempo apenas como um hormônio vasoativo. Entretanto, sabe-se que além de um potente vasoconstritor, a angiotensina II apresenta funções biológicas importantes na regulação do crescimento e proliferação celular, além de atuar como imunomodulador indutor de respostas inflamatórias. Apesar de muitos estudos demonstrarem que a angiotensina II aumenta a produção de ROS, levando a ativação de mecanismos de apoptose em órgãos-alvo da hipertensão, pouco se sabe a respeito dos efeitos da hipertensão renovascular 2R1C sobre células hematopoiéticas e endoteliais. Por isso, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da hipertensão renovascular 2R1C sobre células sanguíneas, endoteliais e de medula óssea, por citometria de fluxo, em camundongos. Para isso, camundongos C57 machos (~23g) foram separados em dois grupos Sham (n=25) e 2R1C (n=25). A hipertensão foi induzida no grupo 2R1C pela colocação de um clipe de aço ao redor da artéria renal esquerda. O grupo Sham foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a colocação do clipe. Após 14 dias, os animais tiveram sua artéria carótida cateterizadas para medidas hemodinâmicas. Em seguida, os animais foram eutanasiados, e o sangue coletado por punção cardíaca. Após a perfusão, as células endoteliais foram mecanicamente isoladas da aorta torácica e mantidas em solução de HBSS. As células da medula óssea foram isoladas dos fêmures e tíbias e colocadas em DMEM. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer. A identificação de células endoteliais foi realizada por imunofenotipagem utilizando o anticorpo CD31-APC (5 μ l/10⁶ células). Para análise do estresse oxidativo 10⁶ células foram diluídas em PBS e incubadas com 160 μ M de DHE e 20mM de DCFH-DA por 30 minutos a 37°C no escuro e, depois lavadas e ressuspensas em 0,5ml de PBS-iFBS. Para a análise de apoptose 10⁶ células foram ressuspensas em tampão de ligação e incubadas com 5 μ l de anexina V-FITC e 5 μ l de iodeto de propídeo (PI) a temperatura ambiente, por 15 minutos, no escuro e foram ressuspensas em 0,5ml

de tampão de ligação. Para avaliar o conteúdo de DNA, 10^6 células foram fixadas em etanol 70% gelado, lavadas com PBS e ressuspensas em 200 μ l de solução de coloração (20mg/ml RNase, 500 μ g/ml PI, 10% Triton X-100). As amostras foram mantidas em gelo até o momento da aquisição dos dados pelo citômetro de fluxo FACSCanto II. Em cada experimento foram avaliadas 30000 células. Os dados foram analisados com o auxílio dos *softwares* BDFACSDiva e FCS Express 4.0. Os dados estão expressos como média \pm EPM e a análise estatística foi realizada por teste *t* de Student ou Wilcoxon. Como esperado os animais 2R1C apresentaram níveis maiores de pressão arterial (144 \pm 5,6 mmHg) quando comparados com os respectivos controles (103 \pm 0,8 mmHg). A análise por citometria de fluxo mostrou aumento na produção de $O_2^{\cdot-}$ nas células sanguíneas (Sham: 941 \pm 63 vs. 2R1C: 2155 \pm 289 *a.u.*), endoteliais (Sham: 432 \pm 51 vs. 2R1C: 2630 \pm 184 *a.u.*) e da medula óssea (Sham: 1309 \pm 175 vs. 2R1C: 12036 \pm 2205 *a.u.*) de animais 2R1C quando compara aos animais Sham. Simultaneamente, também observamos aumento na produção de H_2O_2 nas células sanguíneas (Sham: 252 \pm 23 vs. 2R1C: 531 \pm 48 *a.u.*), endoteliais (Sham: 300 \pm 30 vs. 2R1C: 1049 \pm 112 *a.u.*) e da medula óssea (Sham: 2107 \pm 222 vs. 2R1C: 7517 \pm 1067 *a.u.*) dos animais hipertensos comparado aos animais normotensos. A análise de apoptose pela marcação com AnexinaV-FITC/PI, mostrou que os animais hipertensos apresentam mais apoptose em células sanguíneas (Q₂Sham: 1,5 \pm 0,1 vs. Q₂2R1C: 15,3 \pm 3,8; Q₄Sham: 1,6 \pm 0,2 vs. Q₄2R1C: 18,3 \pm 4,3 %), endoteliais (Q₂Sham: 1,2 \pm 0,2 vs. Q₂2R1C: 21,1 \pm 3,0; Q₄Sham: 12,5 \pm 2,6 vs. Q₄2R1C: 31,2 \pm 2,4 %) e de medula óssea (Q₂Sham: 5,7 \pm 0,6 vs. Q₂2R1C: 22,5 \pm 2,5; Q₄Sham: 12,9 \pm 1,1 vs. Q₄2R1C: 27,2 \pm 2,5 %) nos animais do grupo 2R1C quando comparado aos Sham. Além disso, as células da medula óssea dos animais 2R1C (1,54 \pm 0,26 %) apresentaram aumento na fragmentação do DNA quando comparado com os animais Sham (0,50 \pm 0,09 %). Nossos resultados sugerem que a hipertensão renovascular 2R1C aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio levando ao estresse oxidativo e, conseqüentemente a apoptose em células sanguíneas, endoteliais e de medula óssea isoladas de camundongos hipertensos. Além disso, neste modelo de hipertensão experimental as espécies reativas de oxigênio aumentadas interagem com o DNA das células, fragmentando-o.

Palavras-chave: Hipertensão renovascular. Angiotensina II. Citometria de fluxo. ROS. Apoptose. Fragmentação do DNA

ABSTRACT

Campagnaro BP. Flow cytometric analysis of 2K1C renovascular hypertension on blood, endothelial, and bone marrow cells in mice. [thesis] Vitória: Federal University of Espírito Santo, 2012. 169f.

Angiotensin II has been recognized for a long time as a powerful vasoconstrictor. In addition, several studies have attributed a variety of other biological activities to this peptide, such as, cellular growth, proinflammatory and immunomodulator effects. However, some reports show that high angiotensin II levels increase reactive oxygen species (ROS) production and, consequently, apoptosis in target organs of the disease, the analysis of this peptide effect by flow cytometry remains unclear in the 2K1C model. The objective of this study was to evaluate the effects of 2K1C renovascular hypertension on blood, endothelium and bone marrow cells in mice. Experiments were conducted on male C57 mice (averaging 23 g), which were randomly separated in two groups: Sham (n=25) and two-kidney one-clip (2K1C, n=25). The renovascular 2K1C hypertension was induced by placing a stainless clip around the left renal artery. The Sham group was subjected to the same surgical procedure, without clip placement. Animals were studied 14 days later, when a catheter was inserted into the right carotid artery for direct arterial pressure measurements. Then, the animals were euthanized, and blood collected by heart puncture. After perfusion, endothelial cells were mechanically isolated from thoracic aorta and placed in warmed HBSS. Bone marrow cells were flushed out of tibias and femurs and placed in ice-cold PBS. Cells were counted using a Neubauer chamber. The identification of endothelial cells was determined by immunofluorescence detection after incubation with CD31-APC (5 μ l/10⁶ cells). Oxidative stress was determined by H₂O₂ and O₂⁻ production using the probes DHE and DCFH-DA, respectively. 10⁶ cells were diluted with 1mL PBS and incubated with 20mM DCFH-DA and 160 μ M DHE for 30 min at 37°C in the dark, then washed and resuspended in 0.5ml of PBS. In order to analyze apoptosis, 10⁶ cells were resuspended in Binding Buffer (BB) and incubated with 5 μ l of Annexin V-FITC and 5 μ l of propidium iodide (PI) at room temperature for 15 min in the dark and resuspended in 0.5ml of BB. To assay DNA content, 10⁶ cells were fixed in ice-cold 70% ethanol and fixed at -20°C. Cells were washed with ice-cold PBS and resuspended in 200 μ l of staining solution

(20mg/ml RNase, 500 μ g/ml PI, 10% Triton X-100). All cell preparations were stored on ice, and flow cytometric measurements were terminated within 4 hr. A FACSCanto II cytometer was used for the flow cytometric analysis. FSC and SSC were used to establish size gates and exclude cellular debris from the analysis. In each measurement, 30000 events were analyzed. Data were acquired and analyzed using the BD FACSDiva and FCS Express softwares. Data are means \pm SEM. Statistical analysis was performed with Student's *t* test and Wilcoxon's. As expected, blood pressure was higher in 2K1C than in Sham mice (Sham: 103 \pm 0.8 vs. 2K1C: 144 \pm 5.6 mmHg). Flow cytometric analysis showed that 2K1C mice presented a significant increase in O₂⁻ production was higher in blood (Sham: 941 \pm 63 vs. 2K1C: 2155 \pm 289 *a.u.*), endothelial (Sham: 432 \pm 51 vs. 2K1C: 2630 \pm 184 *a.u.*) and bone marrow (Sham: 1309 \pm 175 vs. 2K1C: 12036 \pm 2205 *a.u.*) cells of 2K1C mice compared to Sham. Simultaneously, H₂O₂ production was also augmented in blood (Sham: 252 \pm 23 vs. 2K1C: 531 \pm 48 *a.u.*), endothelial (Sham: 300 \pm 30 vs. 2K1C: 1049 \pm 112 *a.u.*) and bone marrow (Sham: 2107 \pm 222 vs. 2K1C: 7517 \pm 1067 *a.u.*) cells of 2K1C mice compared to Sham. Apoptosis analysis by Annexin V-FITC/PI demonstrated that hypertensive mice presented higher percentages of apoptotic cells in blood (Q₂Sham: 1.5 \pm 0.1 vs. Q₂2K1C: 15.3 \pm 3.8; Q₄Sham: 1.6 \pm 0.2 vs. Q₄2K1C: 18.3 \pm 4.3 %), endothelial (Q₂Sham: 1.2 \pm 0.2 vs. Q₂2K1C: 21.1 \pm 3.0; Q₄Sham: 12.5 \pm 2.6 vs. Q₄2K1C: 31.2 \pm 2.4 %) and bone marrow (Q₂Sham: 5.7 \pm 0.6 vs. Q₂2K1C: 22.5 \pm 2.5; Q₄Sham: 12.9 \pm 1.1 vs. Q₄2K1C: 27.2 \pm 2.5 %) cells compared to Sham. DNA content analysis showed augmented DNA fragmentation in bone marrow cells of 2K1C (1.54 \pm 0.26 %) mice compared to Sham (0.50 \pm 0.09 %). Our data suggest that renovascular hypertension increases reactive oxygen species production leading to oxidative stress and, consequently, apoptosis in blood, endothelial and bone marrow cells of hypertensive mice. In addition, this model of experimental hypertension leads to DNA damage which could be due to augmented reactive oxygen species which is known to cause DNA fragmentation.

Keywords: Renovascular hypertension. Angiotensin II. Flow cytometry. ROS. Apoptosis. DNA fragmentation

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Página
Figura 1: Efeitos hemodinâmicos da angiotensina II.	22
Figura 2: Efeitos não-hemodinâmicos da angiotensina II.	23
Figura 3: Modelo de indução de hipertensão renovascular 2R1C.	25
Figura 4: Fontes de espécies reativas de oxigênio.	26
Figura 5: Doenças oxidantes e seus efeitos sobre macromoléculas biológicas.	27
Figura 6: Estrutura da enzima NAD(P)H oxidase	29
Figura 7: Principais alterações observadas em células necróticas.	32
Figura 8: Principais alterações observadas em células apoptóticas.	33
Figura 9: Vias indutoras de apoptose.	35
Figura 10: Câmara de fluxo do FACSCanto II.	37
Figura 11: Esquema da focalização hidrodinâmica dentro da câmara de fluxo.	38
Figura 12: Sistema óptico do FACSCanto II.	39
Figura 13: FSC x SSC.	40

Figura 14: Filtros ópticos utilizados no citômetro de fluxo: <i>longpass</i> , <i>shortpass</i> e <i>bandpass</i> .	41
Figura 15: Camundongo da linhagem C57/Bl6.	50
Figura 16: Cirurgia para indução da hipertensão renovascular 2R1C.	52
Figura 17: Cateterização da artéria carótida.	55
Figura 18: Sistema de aquisição de dados hemodinâmicos: Biopac Systems.	56
Figura 19: Coleta de células sanguíneas.	59
Figura 20: Coleta de células endoteliais.	60
Figura 21: Coleta de células da medula óssea.	62
Figura 22: Contagem celular em câmara de Neubauer.	64
Figura 23: Citômetro de fluxo e <i>softwares</i> de análise.	66
Figura 24: CS&T: (<i>Cytometer Steup and Tracking Beads</i>).	67
Figura 25: Identificação de células endoteliais de aorta.	69
Figura 26: DHE e DCFH-DA.	70
Figura 27: Análise de apoptose.	73
Figura 28: Análise do conteúdo de DNA.	75
Figura 29: Valores basais de pressão arterial.	78
Figura 30: Valores basais de frequência cardíaca.	79

Figura 31: Níveis de angiotensina II plasmática.	80
Figura 32: <i>Dot plots</i> FSC x SSC ilustrativos de células de sangue, aorta e medula óssea de camundongos.	82
Figura 33: Identificação de células endoteliais de aorta por imunofenotipagem utilizando CD31-APC.	84
Figura 34: Histogramas típicos utilizados na análise do efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre as células sanguíneas de camundongos expostas ao DHE e ao DCFH-DA.	86
Figura 35: Níveis de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 em células sanguíneas de camundongos.	87
Figura 36: <i>Dot plots</i> típicos de células sanguíneas incubadas simultaneamente com DHE e DCFH-DA utilizados na análise de estresse oxidativo.	88
Figura 37: Histogramas típicos utilizados na análise do efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre as células endoteliais de camundongos expostas ao DHE e ao DCFH-DA.	89
Figura 38: Níveis de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 em células endoteliais de camundongos.	90
Figura 39: <i>Dot plots</i> típicos de células endoteliais incubadas simultaneamente com DHE e DCFH-DA utilizados na análise de estresse oxidativo.	91
Figura 40: Histogramas típicos utilizados na análise do efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre as células da medula óssea de camundongos expostas ao DHE e ao DCFH-DA.	92
Figura 41: Níveis de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 em células da medula óssea de camundongos.	93

Figura 42: <i>Dot plots</i> típicos de células da medula óssea incubadas simultaneamente com DHE e DCFH-DA utilizados na análise de estresse oxidativo.	94
Figura 43: <i>Dot plots</i> típicos utilizados na análise do efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre apoptose e viabilidade de células sanguíneas de camundongos incubadas com anexina V-FITC e PI.	96
Figura 44: Efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre apoptose e viabilidade de células sanguíneas de camundongos incubadas com anexina V-FITC e PI.	97
Figura 45: <i>Dot plots</i> típicos utilizados na análise do efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre apoptose e viabilidade de células endoteliais de camundongos incubadas com anexina V-FITC e PI.	98
Figura 46: Efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre apoptose e viabilidade de células endoteliais de camundongos incubadas com anexina V-FITC e PI.	99
Figura 47: <i>Dot plots</i> típicos utilizados na análise do efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre apoptose e viabilidade de células da medula óssea de camundongos incubadas com anexina V-FITC e PI.	100
Figura 48: Efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre apoptose e viabilidade de células da medula óssea de camundongos incubadas com anexina V-FITC e PI.	101
Figura 49: <i>Dot plot</i> utilizados na análise do conteúdo de DNA de células da medula óssea.	102

Figura 50: Histogramas típicos utilizados na análise do efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre o conteúdo de DNA de células da medula óssea de camundongos marcadas com PI.	103
Tabela 1: Características morfológicas nos diferentes tipos de morte celular.	31
Tabela 2: Medidas antropométricas de coração e rins.	81
Tabela 3: Viabilidade e apoptose de células sanguíneas de camundongos.	96
Tabela 4: Viabilidade e apoptose de células endoteliais de camundongos.	98
Tabela 5: Viabilidade e apoptose de células da medula óssea de camundongos.	100
Tabela 6: Conteúdo de DNA das células de medula óssea de camundongos.	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 1R1C: um rim, um clipe
- 2R1C: dois rins, um clipe
- ADH: hormônio antidiurético (*Antidiuretic Hormone*)
- APC: aloficocianina (*Allophycocyanine*)
- ApoE-KO: camundongo *knockout* para apolipoproteína E
- APS: Sociedade Americana de Fisiologia (*American Physiological Society*)
- Ar: argônio
- AT₁: receptor de angiotensina II tipo 1
- AT₂: receptor de angiotensina II tipo 2
- *a.u.*: unidades arbitrárias
- BD: *Becton, Dickinson and Company*
- bpm: batimentos por minuto
- C57BL/6: linhagem de camundongo C57 black/6
- Caspase: *Cysteine-dependent Aspartate-specific Protease*
- CAT: catalase
- CD: grupo de diferenciação (*cluster of differentiation*)
- CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais
- ClO⁻: hipoclorito
- CS&T: *Cytometer Setup and Tracking Beads*
- CTNBio: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
- Cu: cobre
- DCFH-DA: 2',7'- diacetato de diclorofluoresceína
- DHE: dihidroetideo
- DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- DMSO: dimetil sulfóxido
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- DOCA-sal: acetato de desoxicorticosterona (*desoxicorticosterone-acetate*)
- ECA: enzima conversora de angiotensina
- EMESCAM: Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória
- EPC: célula progenitora endotelial (*Endothelial Progenitor Cell*)

- EPM: erro padrão da média
- *et al.*: *et alli* – e colaboradores
- EUA : Estados Unidos da América
- FACS: separador celular ativado por fluorescência (*fluorescence activated cell sorter*)
- FBS: soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*)
- FC: frequência cardíaca
- FITC: isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein Isothiocyanate*)
- FSC: *forward scatter*
- GPx: glutationa peroxidase
- GR: glutationa redutase
- GST: glutationa S-transferase
- H₂O₂: peróxido de hidrogênio
- HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*
- HPLC: cromatografia líquida de alta performance (*High Performance Liquid Chromatography*)
- iFBS: soro fetal bovino inativado (*inactivated Fetal Bovine Serum*)
- IgG: imunoglobulina G
- MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno (*Mitogen Activated Protein Kinase*)
- MFI: mediana da intensidade de fluorescência (*Median Fluorescence Intensity*)
- mmHg: milímetros de mercúrio
- Mn: manganês
- NAD(P)H: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
- NK: linfócitos *natural killer*
- NO: óxido nítrico
- Nox: *Non-Phagocytic NAD(P)H oxidase*
- O₂^{•-}: ânion superóxido
- p: significância estatística
- PAD: pressão arterial diastólica
- PAS: pressão arterial sistólica
- PBS: solução salina de fosfato tamponada (*Phosphate Buffered Saline*)
- phox: oxidase fagocítica (*Phagocytic Oxidase*)

- PI: iodeo de propídeo (*Propidium Iodide*)
- PMT: tubo fotomultiplicador (*photomultiplier tube*)
- Q: quadrante
- RD: rim direito
- RE: rim esquerdo
- ROS: espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*)
- rpm: rotações por minuto
- SHR: rato espontaneamente hipertenso (*Spontaneously Hypertensive Rat*)
- SIT: tubo de injeção de amostra (*Sample Injection Tube*)
- SOD: superóxido dismutase
- SSC: *side scatter*
- TNF: fator de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor*)
- SRA: sistema renina angiotensina
- UFES: Universidade Federal do Espírito Santo
- UNIFESP: Universidade Federal de São Paulo
- UV: ultravioleta
- vs.: versus
- Zn: zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	HIPERTENSÃO.....	19
1.2	ESTRESSE OXIDATIVO.....	25
1.3	APOPTOSE.....	31
1.4	PRINCÍPIO BÁSICOS DE CITOMETRIA DE FLUXO.....	36
2	JUSTIFICATIVA	44
3	HIPÓTESE	46
4	OBJETIVOS	48
4.1	OBJETIVO GERAL.....	48
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
5	METODOLOGIA	50
5.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	50
5.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	51

5.3	INDUÇÃO DA HIPERTENSÃO RENOVASCULAR 2R1C.....	51
5.4	MEDIDAS HEMODINÂMICAS.....	54
5.4.1	Cateterização da artéria carótida.....	54
5.4.2	Medida direta da pressão arterial.....	55
5.5	MEDIDAS BIOMÉTRICAS DO CORAÇÃO E RINS.....	56
5.6	DOSAGEM PLASMÁTICA DE ANGIOTENSINA II.....	56
5.7	COLETA DE CÉLULAS SANGUÍNEAS.....	57
5.8	COLETA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTA.....	59
5.9	COLETA DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA.....	61
5.10	QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS EM CÂMARA DE NEUBAUER.....	63
5.11	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE EM CITÔMETRO DE FLUXO.....	65
5.12	ANÁLISE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	65
5.12.1	Identificação de células endoteliais.....	68
5.12.2	Determinação dos níveis citoplasmáticos de espécies reativas de oxigênio.....	69
5.12.2.1	Marcação com dihidroetídeo (DHE).....	70
5.12.2.2	Marcação com 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH- DA).....	71
5.12.2.3	Marcação simultânea com DHE e DCFH-DA.....	71
5.12.3	Análise de viabilidade e apoptose celular.....	72
5.12.4	Análise do conteúdo de DNA.....	74
4.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	76

6	RESULTADOS	78
6.1	MEDIDAS HEMODINÂMICAS.....	78
6.2	MEDIDAS BIOMÉTRICAS DO CORAÇÃO E RINS.....	80
6.3	DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	81
6.3.1	Identificação de células endoteliais isoladas da aorta torácica	83
6.3.2	Conseqüências da hipertensão renovascular sobre a quantificação da concentração citoplasmática de espécies reativas de oxigênio	84
6.3.2.1	Nas células sanguíneas.....	85
6.3.2.2	Nas células endoteliais.....	88
6.3.2.3	Nas células de medula óssea.....	91
6.3.3	Conseqüências da hipertensão renovascular sobre apoptose e viabilidade celular	94
6.3.3.1	Nas células sanguíneas.....	95
6.3.3.2	Nas células endoteliais.....	97
6.3.3.3	Nas células de medula óssea.....	99
6.3.4	Conseqüências da hipertensão renovascular sobre o conteúdo de DNA	102
6.3.4.1	Na células de medula óssea.....	102

7	DISCUSSÃO	106
8	CONCLUSÕES	129
	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	131
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133

1 INTRODUÇÃO

1.1 HIPERTENSÃO

As doenças cardiovasculares representam, universalmente, um grave problema de saúde pública. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 31% das mortes registradas no ano de 2008, tiveram como causa doenças do aparelho circulatório (Mendis *et al.*, 2011). No Brasil, não é diferente. Segundo dados divulgados pelo Ministério da Saúde, no ano de 2010, as doenças cardiovasculares representaram a primeira causa de óbito, com taxa de mortalidade específica de 171,1 óbitos por 100.000 habitantes, e a terceira de permanência hospitalar prolongada (DATASUS, 2012).

A hipertensão arterial é a doença cardiovascular mais freqüente, além de ser o principal fator de risco para complicações muito comuns como acidente vascular cerebral, infarto agudo do miocárdio e doença renal crônica, morbidades de grande impacto econômico. Segundo dados obtidos no ano de 2011 pelo Sistema de Monitoramento de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas Não Transmissíveis por Inquérito Telefônico, na população brasileira na faixa de idade igual ou maior de 18 anos, a prevalência de pessoas que referem diagnóstico médico de hipertensão arterial foi de 22,7%. No município de Vitória estes valores chegaram a 25%, sendo a quarta capital com maior freqüência de adultos hipertensos (VIGITEL, 2012). Portanto, a partir desses dados, acredita-se haver no Brasil cerca de 33.000.000 de adultos diagnosticados com hipertensão arterial (SISHiperdia, 2012).

Segundo as VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (2010), a hipertensão arterial sistêmica é uma condição clínica definida e caracterizada pela elevação sustentada da pressão arterial para números acima dos valores considerados normais (Pressão Sistólica \geq 140 mmHg; Pressão Diastólica \geq 90mmHg). Apesar de ser uma doença comum e rapidamente detectável, geralmente não apresenta sintomas clínicos aparentes podendo levar ao aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais (Kuppasani & Reddi, 2010; Owens, 2011; Polly *et al.*, 2011).

A hipertensão é uma doença multifatorial causada pela interação de diversos fatores que envolvem a função cardíaca, o volume sanguíneo, a regulação de sal, o

tônus vascular periférico e a função endotelial (Guyton *et al.*, 1981; Varin *et al.*, 2000; Chapman *et al.*, 2004). Além disso, estudos epidemiológicos indicam que de 30 a 60% da variação fenotípica da pressão arterial é atribuída a fatores genéticos (Mongeau, 1989). Portanto, esta doença é consequência de uma combinação prejudicial de fatores genéticos, culturais e ambientais que levam ao desequilíbrio entre os mecanismos vasoconstritores e vasodilatadores (Smithies *et al.*, 2000).

Apesar dos esforços para desvendar os mecanismos envolvidos na patogênese da hipertensão, sua causa permanece desconhecida em aproximadamente 95% dos pacientes caracterizando a chamada hipertensão primária ou essencial, em contraste àquelas formas de hipertensão que são secundárias a causas conhecidas, como estenose da artéria renal, e que acometem 5% dos pacientes sendo conhecidas como hipertensão secundária (Corrêa *et al.*, 2005; Guyton & Hall, 2006).

Hipertensão renovascular é uma forma de hipertensão secundária definida como o aumento da pressão arterial causado por uma lesão estenótica ou obstrutiva na artéria renal, e acomete entre 2% e 5% da população hipertensa (Working Group on Renovascular Hypertension, 1989; Praxedes, 2002).

A descoberta da hipertensão renovascular ocorreu com o trabalho pioneiro de Goldblatt e colaboradores (1934), que estudaram os efeitos do clampeamento da artéria renal em cães. Este modelo patológico, conhecido como modelo de hipertensão 2-rins 1-clipe (2R1C), serviu como base para estudos subsequentes e demonstrou que uma lesão obstrutiva na artéria renal deve alcançar um nível crítico de 75% a 80% para produzir mudanças hemodinâmicas significantes na medida do fluxo arterial através da lesão (May *et al.*, 1963). Sabe-se que quando o fluxo sanguíneo renal diminui, renina é liberada pelas células justaglomerulares, que funcionam como mecanorreceptores e são encontradas, principalmente, na parede das arteríolas aferentes do aparato justaglomerular dos rins. A renina é uma enzima que atua enzimaticamente sobre o angiotensinogênio plasmático, sintetizado principalmente no fígado, catalisando sua conversão em um peptídeo de 10 aminoácidos, a angiotensina I, que possui pequena atividade vasoconstritora, insuficiente para causar mudanças significantes na função circulatória. Em seguida, dois aminoácidos são removidos da angiotensina I formando o octapeptídeo angiotensina II, potente vasoconstritor e efector chave do sistema renina angiotensina (SRA). Esta conversão ocorre quase que inteiramente nos pulmões durante a

passagem do sangue através dos pequenos vasos pulmonares e é catalisada pela enzima conversora de angiotensina (ECA) que se encontra primariamente ligada ao endotélio e em concentrações particularmente elevadas nas células endoteliais da vasculatura pulmonar. Entretanto, atualmente sabe-se que os componentes do SRA são sintetizados e expressos em vários tecidos do organismo (Rohrwasser et al., 1999; Cohn & Tognoni, 2001; Ruiz-Ortega et al., 2001b; Morimoto et al., 2002; Strawn et al., 2004).

A angiotensina II é um peptídeo vasoativo que atua em praticamente todos os órgãos do organismo, incluindo coração, vasos sanguíneos, rins, medula óssea, cérebro e sangue, exercendo efeitos fisiológicos e fisiopatológicos dependendo do tipo de célula afetada e do tempo de exposição ao peptídeo.

O mecanismo pelo qual o SRA induz a hipertensão tem sido geralmente atribuído ao efeito vasoconstritor da angiotensina II e aos efeitos mineralocorticóides da aldosterona. A angiotensina II é um vasoconstritor extremamente poderoso que apresenta dois efeitos principais que podem elevar a pressão arterial. O primeiro é a vasoconstrição, com maior intensidade nas arteríolas e menor intensidade nas veias, ao aumentar a liberação de noradrenalina pelas terminações nervosas simpáticas encontradas nos vasos e também a secreção do vasoconstritor endotelina I. A constrição das arteríolas aumenta a resistência periférica total, levando ao aumento da pressão arterial. A segunda forma pela qual a angiotensina II eleva a pressão arterial é ao diminuir a excreção de sal e água pelos rins, o que aumenta o volume do fluido extracelular e, conseqüentemente a volemia, ao estimular a secreção de aldosterona pelo córtex adrenal e de hormônio antidiurético (ADH) pela glândula pituitária (Figura 1) (Guyton & Hall, 2006).

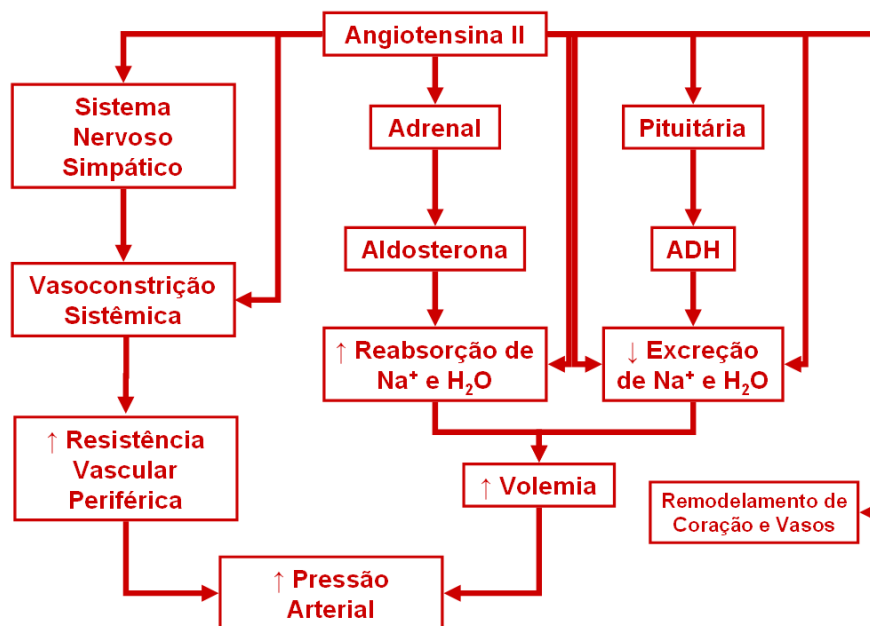


Figura 1: Efeitos hemodinâmicos da angiotensina II. ADH: hormônio antidiurético.

É importante ressaltar que a angiotensina II não é apenas um hormônio vasoativo que regula a pressão arterial e a homeostase eletrolítica através de seus efeitos hemodinâmicos, mas também atua como um fator de crescimento influenciando a proliferação/apoptose celular, leva ao estresse oxidativo pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e atua como um imunomodulador participando de respostas inflamatórias de forma não-hemodinâmica (Figura 2) (Wolf, 1998; Luft, 2001; Ruiz-Ortega *et al.*, 2001a; Higashi *et al.*, 2002; Touyz, 2003, 2005; Ferrario, 2006). Surgem cada vez mais evidências de que os efeitos não-hemodinâmicos da angiotensina II são indispensáveis para os danos causados aos órgãos-alvo pela hipertensão (Wolf, 1998; Luft, 2001; Ruiz-Ortega *et al.*, 2001b). Portanto, a angiotensina II é a principal responsável pelos danos observados em órgãos-alvo da hipertensão, como rins, coração e vasos sanguíneos, através de seus efeitos hemodinâmicos e não-hemodinâmicos.

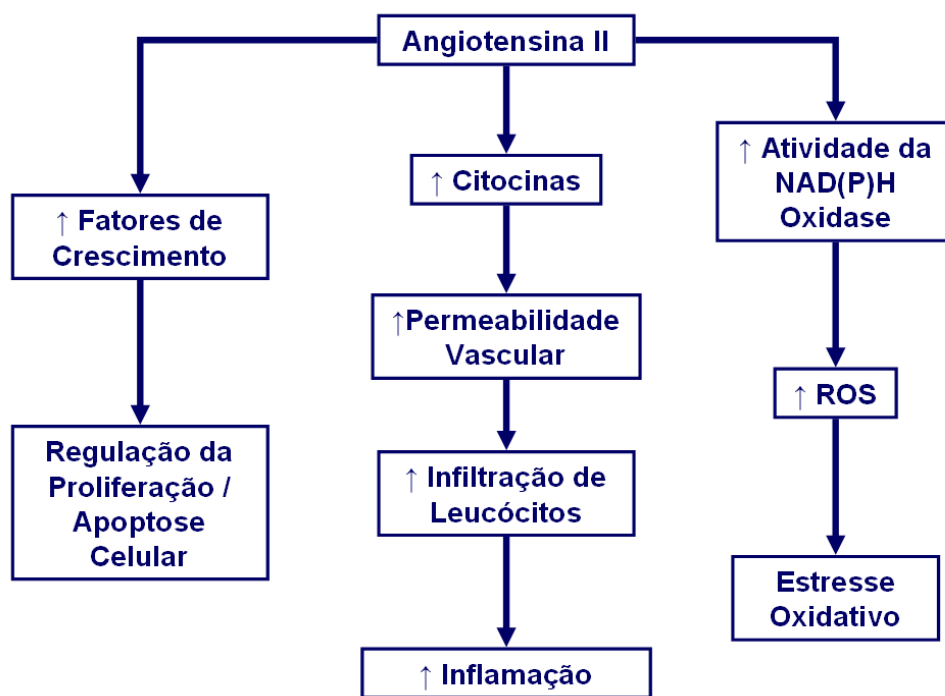


Figura 2: Efeitos não-hemodinâmicos da angiotensina II. ROS: espécies reativas de oxigênio.

A angiotensina II exerce seus efeitos ao se ligar a receptores específicos, acoplados à proteína G, na superfície celular (Hayashida *et al.*, 1996). Os receptores de angiotensina II no sistema cardiovascular são divididos em dois tipos principais: receptores de angiotensina II tipo 1 (AT₁) e tipo 2 (AT₂) (de Gasparo *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2010; Pulgar *et al.*, 2011). Em roedores, os receptores AT₁ são subdivididos em AT_{1A} e AT_{1B} que têm 95% de homologia em suas seqüências de aminoácidos (Kakar *et al.*, 1992; Griendling *et al.*, 1996). Foi demonstrado que o subtipo AT_{1A} é predominante na maioria dos tecidos, com exceção do córtex da adrenal, glândula pituitária, glomérulo e útero, onde os receptores AT_{1B} são altamente expressos (Burson *et al.*, 1994; Bouby *et al.*, 1997). As ações celular e molecular da angiotensina II nos tecidos cardiovascular e renal são quase que exclusivamente mediadas por receptores AT₁, que são responsáveis pelos efeitos vasoconstritores da angiotensina II (Kim & Iwao, 2000; Kaschina & Unger, 2003). Os receptores AT₂ tem apenas 34% de homologia com o receptor AT₁ e são muito expressos em tecidos fetais, porém pouco expressos em tecidos adultos, (Mukoyama *et al.*, 1993;

Douglas & Hopfer, 1994; Shanmugan *et al.*, 1996; de Gasparo *et al.*, 2000; Sabuhi *et al.*, 2010).

O conceito clássico define o SRA como um sistema circulante de hormônio que regula a pressão arterial, o fluxo sanguíneo, o volume extracelular e o balanço de eletrólitos. Entretanto, a partir da década de 1990, esta descrição foi expandida pela descoberta de que componentes do SRA são expressos localmente e que a angiotensina II funciona de forma autócrina / parácrina (Paul *et al.*, 1992). Atualmente, sabe-se que o SRA é ativado localmente, particularmente no coração (Cohn & Tognoni, 2001), parede dos vasos sanguíneos (Ruiz-Ortega *et al.*, 2001b), rim (Cheng *et al.*, 1995), cérebro (Morimoto *et al.*, 2002) e medula óssea (Strawn *et al.*, 2004), e nestes tecidos seus componentes permitem a síntese local de angiotensina.

O modelo de hipertensão renovascular unilateral dois-rins um-clipe (2R1C) de Goldblatt é um modelo experimental que em muitos aspectos se assemelha a hipertensão renovascular humana. Este tipo de hipertensão pode ser induzido em cães, macacos, coelhos, ratos e ultimamente também em camundongos. Experimentalmente, na hipertensão 2R1C, apenas uma artéria renal é submetida à estenose que é induzida pela colocação de um clipe ao redor da artéria para obstruir parcialmente o fluxo sanguíneo renal (Figura 3). Neste modelo a hipertensão se deve ao aumento da produção de renina pelo rim isquêmico (Bruner *et al.*, 1971) o que leva a uma elevação sustentada da pressão arterial devido ao aumento da atividade da renina plasmática que, por sua vez, aumenta a angiotensina II circulante (Carretero & Gulati, 1978; Martinez-Maldonado, 1991; Navar *et al.*, 1998). Apesar disto, no rim contra-lateral tanto o fluxo sanguíneo quanto a taxa de filtração glomerular (por grama de rim) são similares ao dos controles normotensos (Himmelstein & Klotman, 1989; Martinez-Maldonado, 1991) e a produção de renina neste rim é inibida (Textor *et al.*, 1983). O estabelecimento da hipertensão se deve ao rápido aumento da renina plasmática e, conseqüentemente, ao aumento da angiotensina II circulante. Além disso, não ocorre retenção de sal e de água porque o rim remanescente hipertrofia-se e continua funcionando normalmente, prevenindo o aumento da volemia. Portanto, a hipertensão renovascular se deve ao efeito pressor direto da angiotensina II e por isso é dita angiotensina-dependente.

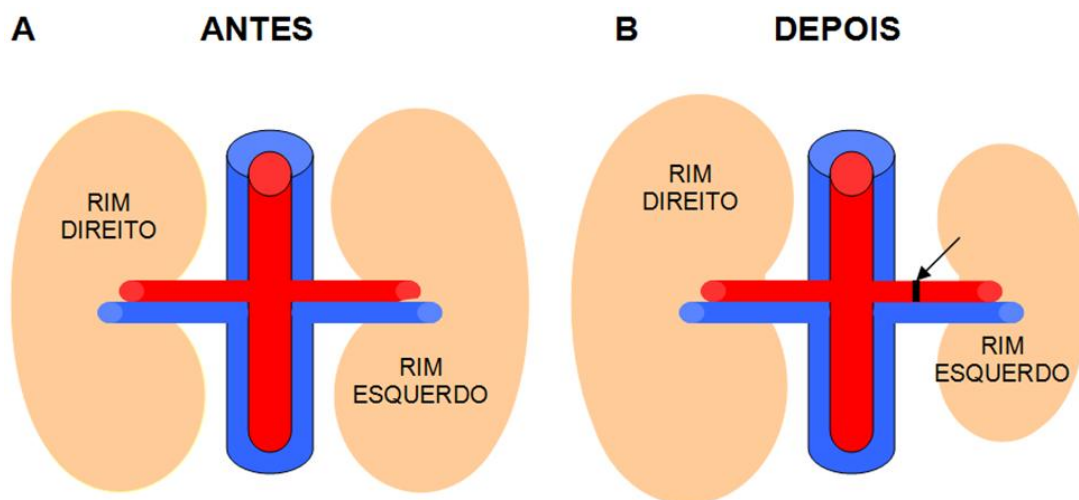


Figura 3: Modelo de indução de hipertensão renovascular 2R1C. Antes da colocação do clipe, os rins direito e esquerdo possuem aproximadamente mesmo tamanho (A), entretanto, após a cirurgia o rim clipado atrofia enquanto que o contra-lateral hipertrofia (B). A seta mostra o local onde o clipe foi colocado. Em vermelho artérias e em azul veias.

O modelo de hipertensão experimental 2R1C é bastante útil, pois cronicamente se assemelha a hipertensão humana devido à estenose unilateral da artéria renal. Os valores pressóricos alcançados no modelo 2R1C, assim como o tempo de manutenção da hipertensão dependem da espécie usada para implantação do modelo e do grau de estenose da artéria renal (Fazan *et al.*, 2001). A pressão arterial e a atividade da renina voltam ao normal ao retirar o clipe ou remover o rim afetado (Cervenka *et al.*, 2008).

Portanto, o SRA desempenha papel importante na regulação da pressão arterial e, aparentemente, os efeitos não-hemodinâmicos da angiotensina II tecidual são tão importantes quanto da angiotensina II circulante na patogênese da hipertensão e de suas complicações, apesar dos mecanismos envolvidos ainda não serem totalmente conhecidos.

1.2 ESTRESSE OXIDATIVO

Estresse oxidativo é um fenômeno complexo definido como o excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) resultante do aumento de sua produção ou da diminuição de sua degradação (Wilcox, 2005; Paravicini & Touyz, 2006; Dikalov *et*

al., 2007). As ROS são pequenas moléculas derivadas do metabolismo do oxigênio incluindo radicais livres, como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), óxido nítrico (NO), radical hidroxila ($\bullet OH$), hipoclorito (ClO^-) e peroxinitrito ($ONOO^-$), e também algumas moléculas que não são radicais livres, mas agentes oxidantes que podem ser facilmente convertidos em radicais, como ozônio (O_3), oxigênio *singlet* (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Bedard & Krause, 2007). As ROS desempenham papéis fisiológicos importantes uma vez que estão envolvidas em diversas funções celulares, como defesa contra patógenos, expressão gênica, senescência, apoptose e regulação do crescimento celular (Bedard & Krause, 2007).

As ROS podem ser originadas de forma exógena, pela ação de fatores ambientais, ou endógena, como produto ou subproduto do metabolismo celular (Figura 4). A formação endógena pode ocorrer no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana celular (Anderson, 2000). Em mamíferos, as oxidases integram os principais sistemas enzimáticos responsáveis pela produção de ROS. Entre elas podemos citar a NAD(P)H oxidase (Griendling *et al.*, 2000), xantina oxidase (Spiekermann *et al.*, 2003), lipoxigenase, cicloxigenase, óxido nítrico sintases desacopladas (Landmesser *et al.*, 2003) e a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria (Fridovich, 2004).

Fontes de Espécies Reativas de Oxigênio

Endógenas	Exógenas
Respiração Aeróbia	Poluição
Processos Inflamatórios	Radiação UV
Peroxisomos	Radiação Ionizante
Processos Patológicos	Tabagismo
Células Fagocíticas	Medicamentos
	Alimentação

Figura 4: A formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode ocorrer a partir de fontes endógenas ou exógenas.

Embora uma pequena quantidade de ROS seja essencial para muitos processos vitais do organismo, como na imunidade inata (Mackaness, 1970; Adams

et al., 1982), sua produção excessiva pode conduzir a diversas formas de dano celular através da oxidação maciça de substratos biológicos (Figura 5), desempenhando papel importante no envelhecimento e desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Cai & Harisson, 2000; Schimidit-Ott *et al.*, 2000; Annuk *et al.*, 2003; Harrison *et al.*, 2007; Porto *et al.*, 2011; Lima *et al.*, 2012), neurodegenerativas (Benhar *et al.*, 2002), inflamatórias e câncer (Cai & Harisson, 2000; Chilsom & Steinberg, 2000; Griendling *et al.*, 2000; Steinberg & Witztum, 2002). Portanto, a formação de ROS nem sempre é deletéria, mas se houver estímulo exagerado para produção destas espécies e a isto estiver associada uma falha na defesa antioxidante, poderão ocorrer eventos nocivos às células, tecidos e, conseqüentemente, ao organismo.

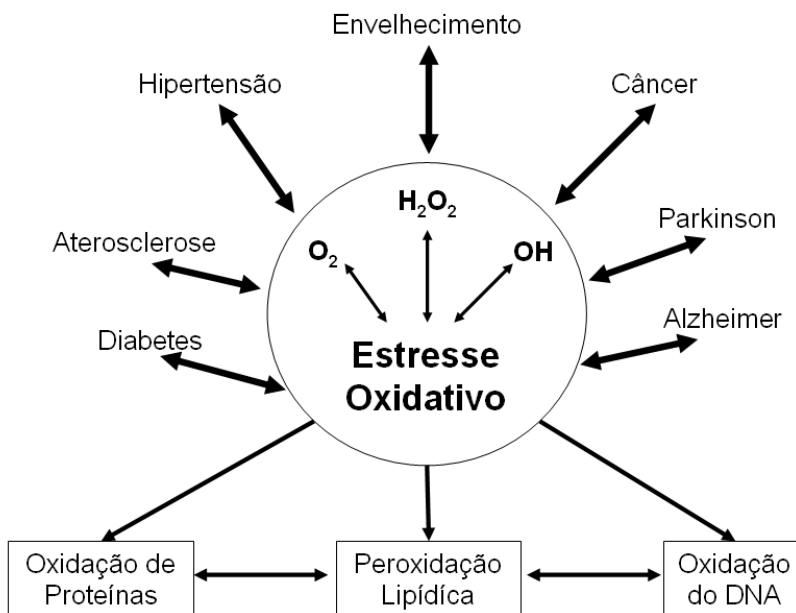


Figura 5: Diversas doenças estão diretamente relacionadas ao aumento da produção de ROS capazes de danificar macromoléculas biológicas.

Existem vários mecanismos que contrabalançam a produção de ROS (Nordberg & Arnér, 2001), pela ação de enzimas antioxidantes como a catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), redutase (GR) e S-transferase (GST), além de três tipos de superóxido dismutase (SOD): Cu/ZnSOD citosólica ou SOD1, dependente de cobre e zinco (Cu/Zn), encontrada no núcleo e no citosol; MnSOD ou SOD2, dependente de manganês (Mn) e encontrada na mitocôndria, e Cu/ZnSOD extracelular (eCu/ZnSOD) ou SOD3 também dependente de Cu/Zn, mais encontrada

na matriz extracelular. Estas enzimas são consideradas enzimas antioxidantes, pois retardam ou previnem a oxidação de substratos biológicos (Hebbel, 1986; Minotti & Aust, 1987; Horton *et al.*, 1989).

As principais ROS envolvidas na manutenção e/ou desenvolvimento da hipertensão são o $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 . O $O_2^{\bullet-}$ é a primeira ROS formada pelo processo de redução univalente do oxigênio, sendo formada predominantemente pela ação da NAD(P)H oxidase. É produzido em praticamente todas as células aeróbias durante a ativação de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (Halliwell & Gutteridge, 1984, 1990) e só consegue entrar nas células através de canais iônicos e apresenta meia-vida curta por reagir rapidamente com a SOD sendo reduzido à H_2O_2 (Adams *et al.*, 1982). Por sua vez, o H_2O_2 apresenta meia-vida maior, é relativamente estável e consegue penetrar facilmente nas células (Halliwell & Gutteridge, 1999).

A principal responsável pela produção de $O_2^{\bullet-}$ nas células do sistema cardiovascular é a NAD(P)H oxidase que catalisa sua produção pela redução do oxigênio, usando a NAD(P)H como doadora de elétron (Gyllenhammar, 1987; Griendling *et al.*, 1994; Mohazzab *et al.*, 1994; Pagano *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1996; Gu *et al.*, 1998; Lassegue & Clempus, 2003). A NAD(P)H oxidase é uma enzima complexa composta por três subunidades citosólicas, p47^{phox}, p67^{phox} e p40^{phox}, e duas subunidades de membrana p22^{phox} e Nox, sendo esta última a subunidade catalítica (Chabrashvili *et al.*, 2002; Babior, 2004; Altenhofer *et al.*, 2012). Esta enzima existe de forma constitutiva nas células vasculares e pode ser regulada por fatores humorais, como angiotensina II (Griendling *et al.*, 1994; Hayakawa *et al.*, 1997; Haynes *et al.*, 1998), e por forças hemodinâmicas, como *shear stress* (Haynes *et al.*, 1997; de Keulenaer *et al.*, 1998). Quando a NAD(P)H oxidase é estimulada, a subunidade p22_{phox} é fosforilada e as subunidades citosólicas se reúnem formando um complexo que se liga às subunidades de membrana, possibilitando a produção de $O_2^{\bullet-}$ (Patterson *et al.*, 1999; Lassegue *et al.*, 2001) (Figura 6). A atividade da NAD(P)H oxidase tem sido implicada no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como aterosclerose e hipertensão (Sorescu *et al.*, 2002).

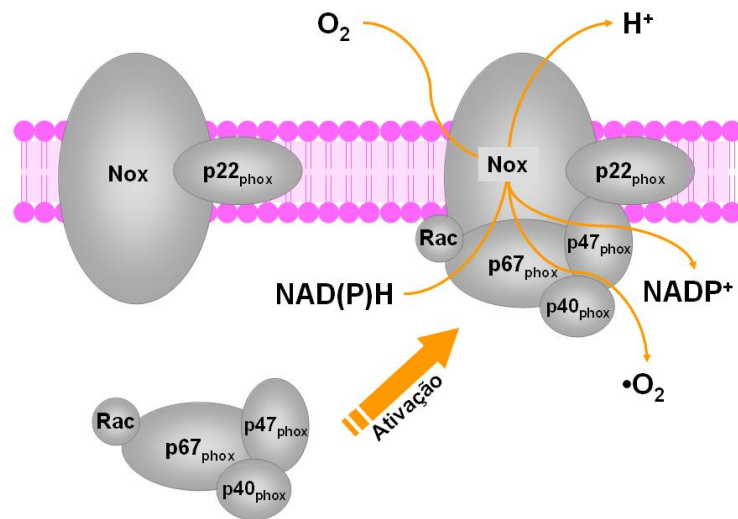


Figura 6: Complexo da NAD(P)H oxidase, com suas subunidades de membrana (Nox e p22_{phox}) e citosólicas (p67_{phox}, p40_{phox}, p47_{phox}), sendo que estas migram e se ligam às subunidades de membrana quando a NAD(P)H oxidase é ativada.

O H₂O₂ é formado diretamente pela transferência de dois elétrons (redução divalente) do oxigênio por ação de diferentes oxidases. A principal forma de síntese de H₂O₂ no sistema cardiovascular é através da dismutação do O₂^{•-}, que pode ocorrer espontaneamente em pH ácido, ou pode ser catalisada pela SOD (Pollycove & Feinendegen, 2003). A estrutura química do H₂O₂ não o classifica como radical livre, uma vez que não apresenta elétrons desemparelhados. Entretanto, é uma ROS extremamente deletéria, pois participa da reação que produz •OH (Cohen, 1989). Tem meia-vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas, sendo altamente tóxico para as células (Eaton, 1991; Halliwell & Gutteridge, 1999; Touyz *et al.*, 2008). As propriedades distintas do O₂^{•-} e do H₂O₂ sugerem que vias de sinalização diferentes podem ser ativadas por tipos diferentes de ROS levando a respostas funcionais que contribuem para o desenvolvimento da hipertensão de distintas formas. Por exemplo, níveis aumentados de O₂^{•-} inativam o vasodilatador NO levando à disfunção endotelial e vasoconstrição (Cai & Harrison, 2000; Tabet *et al.*, 2004). Por outro lado, o H₂O₂ atua sobre os leitos vasculares contribuindo para o processo de remodelamento vascular (Matoba *et al.*, 2000; Fortuno *et al.*, 2005; Haurani & Pagano, 2007), visto vez que a angiotensina II foi capaz de induzir hipertrofia em células musculares lisas em cultura, através da ativação da expressão de protooncogenes (Jancowski *et al.*, 1999).

As ROS interagem com macromoléculas biológicas como proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos, destruindo ou alterando a função destes compostos e causando citotoxicidade, alergias, mutagênese e até morte celular, dependendo da proporção da exposição (Matés *et al.*, 1999). Por exemplo, a peroxidação lipídica é um efeito bem conhecido das ROS que resulta em dano à membrana celular assim como à membrana das organelas (Thollon *et al.*, 1995; Rathore *et al.*, 1998). Quando interagem com proteínas, as ROS podem levar a inativação de enzimas críticas ou induzir a desnaturação proteica tornando-as não-funcionantes (Lockwood, 2000; Stadtman & Levine, 2003). Além disso, as ROS podem induzir quebras de fita, oxidação de bases (purinas) e *cross-links* DNA-DNA e DNA-proteína danificando o DNA ou podem mediar alterações na estrutura da cromatina afetando a expressão gênica (Konat, 2003; Rahman, 2003).

Acredita-se que as ROS sejam causadoras de mais de 20 tipos diferentes de danos ao DNA (Slupphaug *et al.*, 2003), como modificações químicas nas bases nitrogenadas, formação de sítios abásicos, *cross-links* DNA-proteína e quebras de fita simples ou dupla (Loft & Poulsen, 1996; Ashok *et al.*, 1997). O radical hidroxila reage indiscriminadamente com as bases púricas, com as pirimídicas e com a pentose causando a eliminação de uma base ou quebras na fita de DNA (Dizdaroglu, 1986).

Portanto, em condições fisiológicas normais, a produção de espécies reativas de oxigênio pelas enzimas oxidantes é contrabalançada pelos mecanismos antioxidantes do organismo. Entretanto, algumas condições patológicas, como a hipertensão arterial, causam mudanças pronunciadas na expressão e na atividade de enzimas antioxidantes e pró-oxidantes, estimulando a produção de ROS e levando ao estresse oxidativo, ou seja, um desequilíbrio entre a produção e a eliminação destas espécies reativas que podem interagir com moléculas biológicas, como o DNA, danificando-as.

1.3 APOPTOSE

A morte celular é essencial para o desenvolvimento embrionário e para manutenção da homeostase tecidual em organismos multicelulares. Injúrias reversíveis ou irreversíveis podem desencadear a morte celular de formas

diferentes. Autofagia, necrose e apoptose distinguem-se molecular, bioquímica e morfológicamente, dependendo da duração ou da intensidade do estresse ao qual a célula é submetida (Schweichel & Merker, 1973; Kuwana & Newmeyer, 2003) (Tabela 1).

Tabela 1: Características morfológicas observadas nos diferentes tipos de morte celular.

Morte Celular	Características
Apoptose	Condensação da cromatina Formação de corpos apoptóticos Degradação em fagócitos
Autofagia	Aumento do número de autofagossomos e autolisossomos
Necrose	Intumescimento celular Ruptura da membrana plasmática

A autofagia é um processo comum em células de mamíferos, que ocorre em situações de estresse metabólico, como falta de nutrientes, e resulta na degradação de componentes celulares (Danial & Korsmeyer, 2004; Kelekar, 2005; Kroemer & Jaattela, 2005; Lum *et al.*, 2005).

Necrose é uma palavra de origem grega que quer dizer estado de morte e é o resultado de injúria celular irreversível. A necrose é caracterizada morfológicamente pelo aumento do volume celular, vacuolização da cromatina, desorganização do citoplasma, degradação da membrana plasmática, com conseqüente ruptura celular, e indução de reação inflamatória local (Schweichel & Merker, 1973; Vannucci & Hagberg, 2004; Vandenabeele *et al.*, 2008; Puyal *et al.*, 2009) (Figura 7). Portanto, a necrose é definida como um processo agressivo de morte celular iniciada por estímulos patológicos que resultam em rápido desequilíbrio da homeostase e que tem como característica afetar várias células ao mesmo tempo, uma vez que os agentes causadores atingem grandes áreas do tecido.

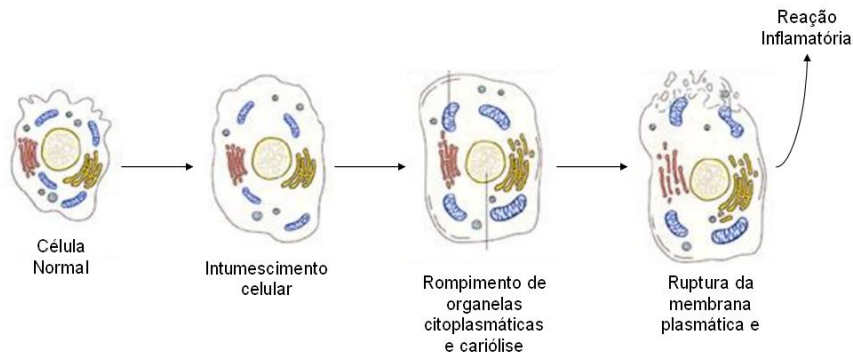


Figura 7: Principais alterações observadas em células necróticas. Adaptado de: <http://www.virtual.unifesp.br/unifesp/bio40/apoptose/index.htm>

Em 1964, o termo morte celular programada foi proposto para designar um tipo de morte que ocorre de forma intencional (Lockshin & Williams, 1964), que ficou posteriormente conhecido como apoptose (Kerr *et al.*, 1972). O mecanismo de apoptose é disparado nas mais diversas situações sendo de grande importância na embriogênese, morfogênese e renovação celular fisiológica (Bennett *et al.*, 1995; Green, 2000), além de ser um mecanismo de defesa para remover células infectadas, danificadas ou desnecessárias, prevenindo processos patológicos (Joza *et al.*, 2002).

Os estímulos apoptóticos resultam em diversos eventos moleculares organizados e em cascata que ocorrem em resposta a estímulos intra e extracelulares e que requerem energia e síntese proteica para sua execução. As principais mudanças morfológicas decorrentes da apoptose são retração celular, perda da aderência com a matriz extracelular e com as células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação de corpos apoptóticos.

A apoptose é considerada uma resposta ativa a estímulos fisiológicos que levam à morte e eliminação celular sem ativação de vias inflamatórias ou alteração do microambiente celular (Parolin & Reason, 2001; Orrenius *et al.*, 2003). É um fenômeno muito rápido que ocorre através de uma seqüência de mudanças morfológicas específicas e coordenadas. Inicialmente, ocorre a redução do volume celular, causando perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, e a translocação de fosfolipídeos da camada interna da membrana celular para

camada externa. A cromatina é condensada e marginalizada se concentrando junto à membrana nuclear que se mantém intacta. Em seguida, a membrana celular forma prolongamentos ou bolhas citoplasmáticas que são liberadas formando pequenas vesículas, chamadas de corpos apoptóticos, que são rapidamente digeridos por fagócitos, responsáveis pela degradação da célula e reciclagem de seus componentes, sem causar um processo inflamatório (Kerr *et al.*, 1972; Tait *et al.*, 2004; Elmore, 2007; Taylor *et al.*, 2008; Wang & Youle, 2009). Outra característica marcante desta forma de morte celular é a ativação de endonucleases responsáveis pela fragmentação internucleossômica do DNA em fragmentos de tamanhos variáveis, mas sempre múltiplos de 200 pares de base (Enari *et al.*, 1998; Hunot, 2001; Parolin & Reason, 2001; Zimmerman *et al.*, 2001) (Figura 8).

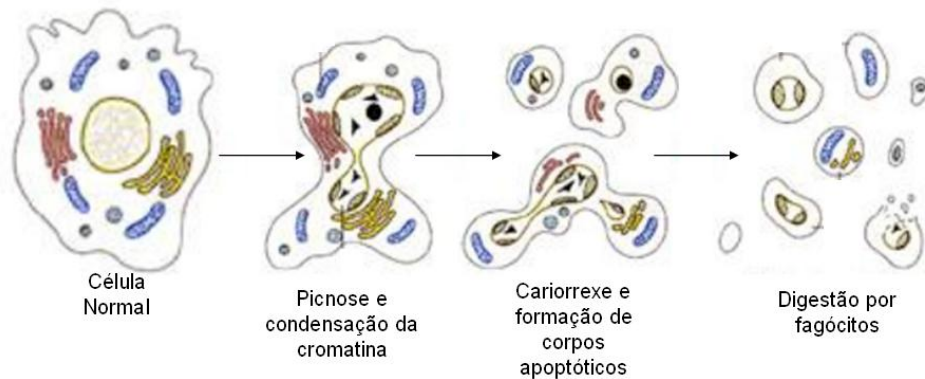


Figura 8: Principais alterações observadas em células apoptóticas. Adaptado de: <http://www.virtual.unifesp.br/unifesp/bio40/apoptose/index.htm>

O processo de apoptose é coordenado por um conjunto de vias bioquímicas encontradas em todos os seres vivos e desempenha papel fisiológico importante na manutenção da homeostase tecidual. Além disso, representa um importante mecanismo fisiopatológico de lesão tecidual, estando envolvido no desenvolvimento ou manutenção de muitas doenças cardiovasculares, como hipertensão (Morillas *et al.*, 2012), diabetes (Kitada *et al.*, 2012) e aterosclerose (Karafrou *et al.*, 2008).

As alterações morfológicas observadas em células apoptóticas são consequência de uma combinação de eventos moleculares e bioquímicos, executados por uma família de proteases zimogênicas, conhecidas como caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) (Hengartner, 2000), que degradam a célula de forma ordenada pela clivagem de substratos celulares (Martin

& Green, 1995; Blank & Shiloh, 2007), levando à externalização de fosfolípidos de membrana que sinalizam para que fagócitos eliminem a célula (Martin *et al.*, 1995; Taylor *et al.*, 2008; Boatright & Salvesen, 2003). Além das caspases, as proteínas da família Bcl-2 participam ativamente da regulação da morte celular por apoptose, uma vez que são proteínas pró (Bax e Bak) e anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-XL) (Hengartner, 2000; Borner, 2003), e se houver desequilíbrio na expressão destas proteínas, o mecanismo de apoptose é iniciado (Petros *et al.*, 2004).

O processo de apoptose pode ser deflagrado em células eucarióticas por duas vias distintas: intrínseca ou mitocondrial e extrínseca ou citoplasmática (Figura 9). A via extrínseca é ativada por estímulos extracelulares de estresse e caracteriza-se pela ligação de ligantes a receptores específicos na superfície celular, conhecidos como “receptores de morte”, ativando a cascata de caspases (Budihardjo *et al.*, 1999). Os receptores de morte (rTNF: *tumor necrosis factor* e Fas: CD95/Apo-1) possuem domínios citoplasmáticos, responsáveis pela formação do complexo sinalizador e indutor de morte (Neumann *et al.*, 2010). Os ligantes destes receptores atuam como ativadores extracelulares de apoptose. Quando os receptores de morte reconhecem um ligante específico (TNF e Fas-L), seus domínios de morte interagem com as proteínas adaptadoras FADD (*Fas-associated death domain*)/MORT1 que recrutam a caspase-8, responsável por ativar a caspase-3, levando à morte celular (Daniel *et al.*, 2001; Hassan *et al.*, 2009).

A via intrínseca de apoptose inicia-se na mitocôndria e é ativada por estresses intra ou extracelulares (Hengartner, 2000), que geram sinais responsáveis por deflagrar o processo apoptótico. Quando estes sinais alcançam a mitocôndria, induzem o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, assim como o colapso do potencial da membrana mitocondrial interna e, simultaneamente, a passagem de água para a matriz mitocondrial, levando à ruptura da organela (Loeffler & Kremer, 2000; Wang, 2001; Gupta, 2003). Estes eventos levam ao vazamento de proteínas, como o citocromo *c*, para o citoplasma e, conseqüentemente, à diminuição da produção de ATP e ao aumento de ROS (Kroemer & Reed, 2000; Jaattela & Tschopp, 2003; Kroemer *et al.*, 2007). No citoplasma, o citocromo *c* se liga à proteína Apaf-1 (*Apoptotic Protease-Activating Factor*) e à caspase-9 formando um complexo, conhecido como apoptossomo (Taylor *et al.*, 2008), que ativa caspase-9 (Budihardjo *et al.*, 1999) e esta, por sua

vez, ativa a caspase-3, que executa a morte celular por apoptose (Petros *et al.*, 2004; Rupnarain *et al.*, 2004).

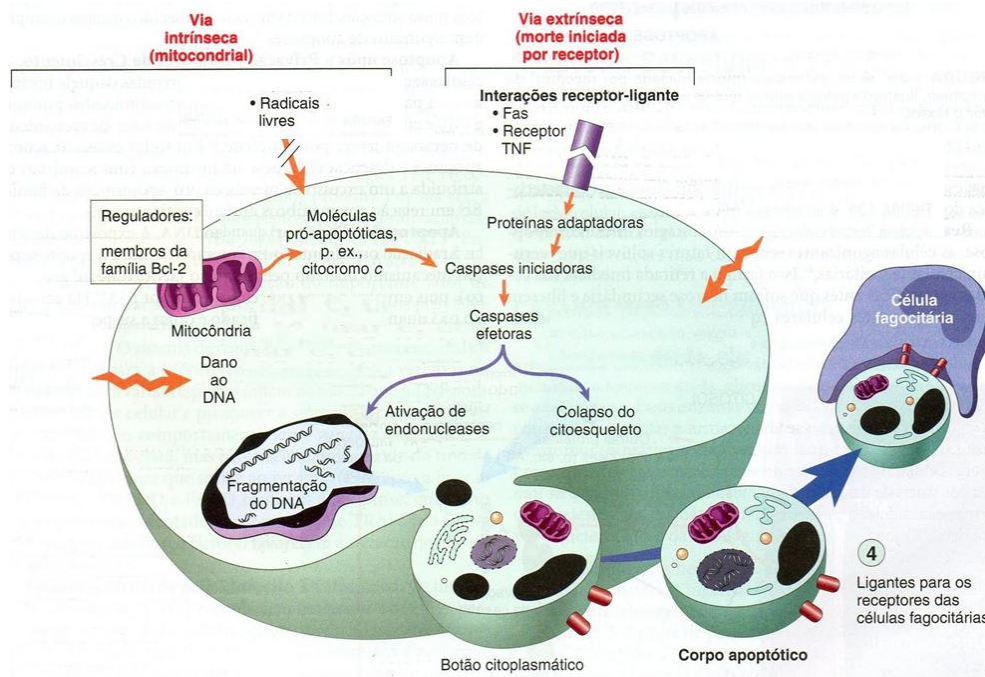


Figura 9: Vias intrínseca e extrínseca de indução de apoptose. Fonte: Kumar *et al.*, 2007.

Técnicas apropriadas são utilizadas para identificar e quantificar a apoptose, aproveitando-se das múltiplas alterações celulares observadas durante este processo de morte. A citometria de fluxo, considerado o ensaio mais exato, permite a análise precisa e confiável de células em apoptose (Lecouer *et al.*, 1997; Kam & Ferch, 2000; Cornelissen *et al.*, 2002).

A apoptose desempenha papel importante na fisiopatologia de doenças cardiovasculares como aterosclerose, insuficiência cardíaca e hipertensão (Diez, 2007; Richards, 2010; Heres-Alvarez & Peix-Gonzalez, 2011; Montecucco *et al.*, 2011). Estudos mostram que pacientes hipertensos apresentam níveis aumentados de marcadores de apoptose e de inflamação, sendo que existe correlação entre estes parâmetros e os danos observados em diferentes órgãos-alvo da doença, indicando que estas moléculas devem participar do desenvolvimento de lesões hipertensivas (Fortuno *et al.*, 2001; Diez, 2007; Sander *et al.*, 2010; Rosello-Lleti *et al.*, 2009). Além disso, sabe-se que a angiotensina II apresenta efeitos pró-apoptóticos dependentes da formação de ROS que estimulam a expressão de

fatores que facilitam a indução da via mitocondrial da apoptose nas células endoteliais (Napoli, 2003; Ruiz-Ortega *et al.*, 2003).

1.4 PRINCÍPIOS BÁSICOS DE CITOMETRIA DE FLUXO

A necessidade de obter cada vez mais informações sobre os processos biológicos tem conduzido ao desenvolvimento de equipamentos e técnicas cada vez mais modernas para avaliar eventos celulares, como estresse oxidativo e apoptose.

A citometria de fluxo é uma técnica quantitativa de análise celular, desenvolvida na década de 1970, que possibilita a medida simultânea de múltiplas características físicas, químicas e biológicas de células em suspensão, orientadas num fluxo laminar e interceptadas uma a uma por um feixe de luz. Dentre suas principais aplicações, destacam-se as relacionadas à farmacologia (estudos de cinética celular e resistência a fármacos), microbiologia (sensibilidade a antimicrobianos), biologia molecular (ensaios de apoptose e proliferação celular) e genética (cariótipo) (Riley, 2005).

O princípio básico da citometria de fluxo é fazer as células em suspensão passar de forma alinhada por um feixe de luz com comprimento de onda constante, geralmente um *laser*, que ao interceptar as células gera sinais que são captados e transformados por detectores apropriados. Os sinais eletrônicos produzidos são proporcionais ao tamanho, complexidade interna e intensidade de fluorescência relativa da célula analisada.

O citômetro de fluxo é um equipamento composto por três sistemas principais: o sistema fluídico, responsável por transportar as células em fluxo laminar até o ponto de interceptação pelo *laser*; o sistema óptico, formado por lasers monocromáticos e filtros que direcionam os sinais luminosos para detectores apropriados; e o sistema eletrônico que converte os sinais luminosos em sinais eletrônicos proporcionais, chamados pulsos de voltagem, que são armazenados e posteriormente processados pelo computador (BD, 2000).

A suspensão celular é injetada no centro da câmara de fluxo que se encontra preenchida por uma solução salina, chamada fluido de revestimento (*sheath fluid*), que apresenta pressão inferior a pressão da suspensão celular. Através da focalização hidrodinâmica, as células são forçadas a passar individualmente, em

fluxo laminar, pelo centro da câmara de fluxo (Figura 10) onde são interceptadas por um *laser*, que incide perpendicularmente sobre elas.

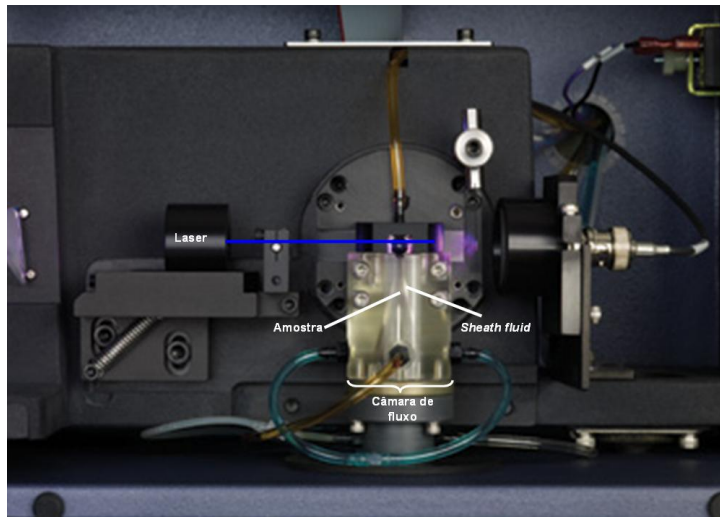


Figura 10: Câmara de fluxo onde a suspensão celular é injetada e carregada pelo sistema fluídico do citômetro de fluxo. Fonte: BD

A diferença de pressão entre os dois fluidos faz com que o fluxo seja laminar. A pressão da amostra é superior à pressão do fluido de revestimento e ajustável, por isto, alterando a pressão da amostra é possível aumentar ou diminuir o fluxo da amostra fazendo com que mais células sejam interceptadas pelo laser no mesmo período de tempo (Figura 11), produzindo informações captadas por detectores apropriados.

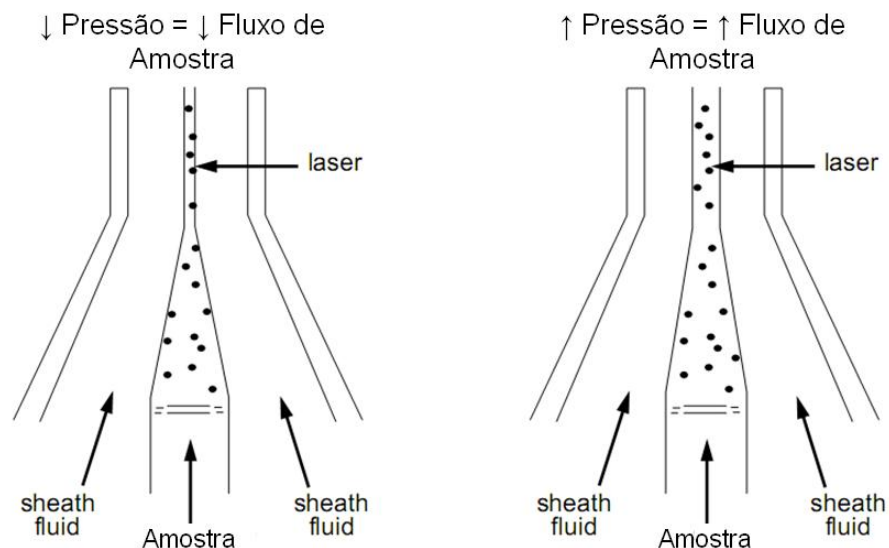
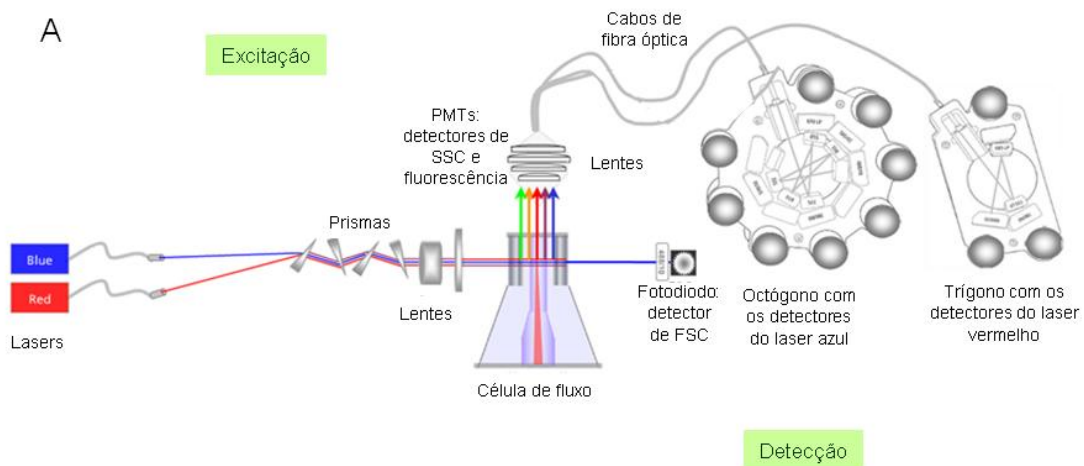


Figura 11: Focalização hidrodinâmica da amostra devido ao gradiente de pressão dos fluidos dentro da câmara de fluxo. A pressão da amostra é ajustável, tornando possíveis variações no fluxo de amostra. Modificado de: BD, 2000.

O sistema óptico desempenha duas funções principais: excitação e detecção. Os componentes de excitação são *lasers*, prismas e lentes, enquanto que os componentes de detecção são lentes, cabos de fibra óptica, espelhos, filtros e detectores. Quando o *laser* intercepta a célula, a luz dispersa e emitida é coletada por lentes apropriadas que conduzem, através de cabos de fibra óptica, a fluorescência emitida até filtros e detectores específicos (Figura 12A). Os sinais luminosos gerados pelo *laser* azul são captados por um octógono de detectores em série, enquanto que os sinais gerados pelo laser vermelho são captados por um triângulo (Figura 12B). Filtros que refletem e transmitem comprimentos de onda específicos, estão localizados em frente a cada um dos detectores.



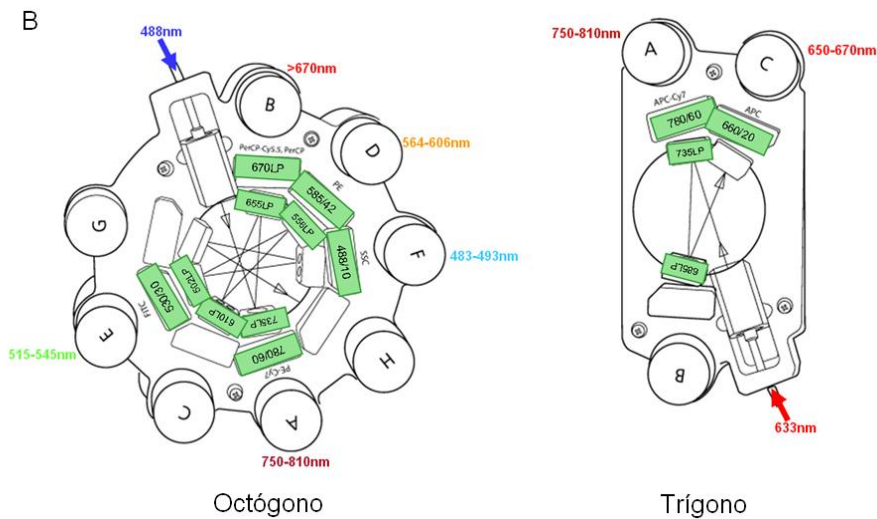


Figura 12: Sistema óptico do citômetro de fluxo FACSCanto II. A) Visão geral dos componentes ópticos. B) Conjuntos de detectores em série.

Os parâmetros medidos podem ser detectados em canais ópticos ou em canais de fluorescência. Os canais ópticos determinam características morfológicas das células, como tamanho e complexidade interna, através da dispersão da luz observada durante a interação física do *laser* com a célula. Ao interceptar a célula, o feixe de luz é desviado em todas as direções. A luz desviada frontal (FSC: *forward-scattered light*), e lateralmente (SSC: *side-scattered light*) fornece informações morfológicas importantes sobre a célula. A luz difratada é coletada por lentes e direcionada para um detector de fotodiodo que capta a intensidade da luz dispersa frontalmente, fornecendo informações sobre o tamanho da célula (Riley, 2005). A luz refratada e refletida é coletada por lentes localizadas perpendicularmente à fonte luminosa e transmitem o sinal para um tipo de detector muito sensível, chamado de tubos fotomultiplicadores (PMT: *photomultiplier tubes*) (Côrte-Real *et al.*, 2002) que captam a intensidade da luz dispersa lateralmente (90°), fornecendo informações sobre a complexidade e granulidade interna da célula. É necessário utilizar um detector muito sensível para SSC, porque a dispersão lateral corresponde a cerca de 10% do sinal de luz emitida. A intensidade da luz dispersa frontal e lateralmente é proporcional ao tamanho e complexidade interna das células, o que permite a identificação de diferentes tipos celulares em uma população heterogênea (Peres & Curi, 2005) (Figura 13).

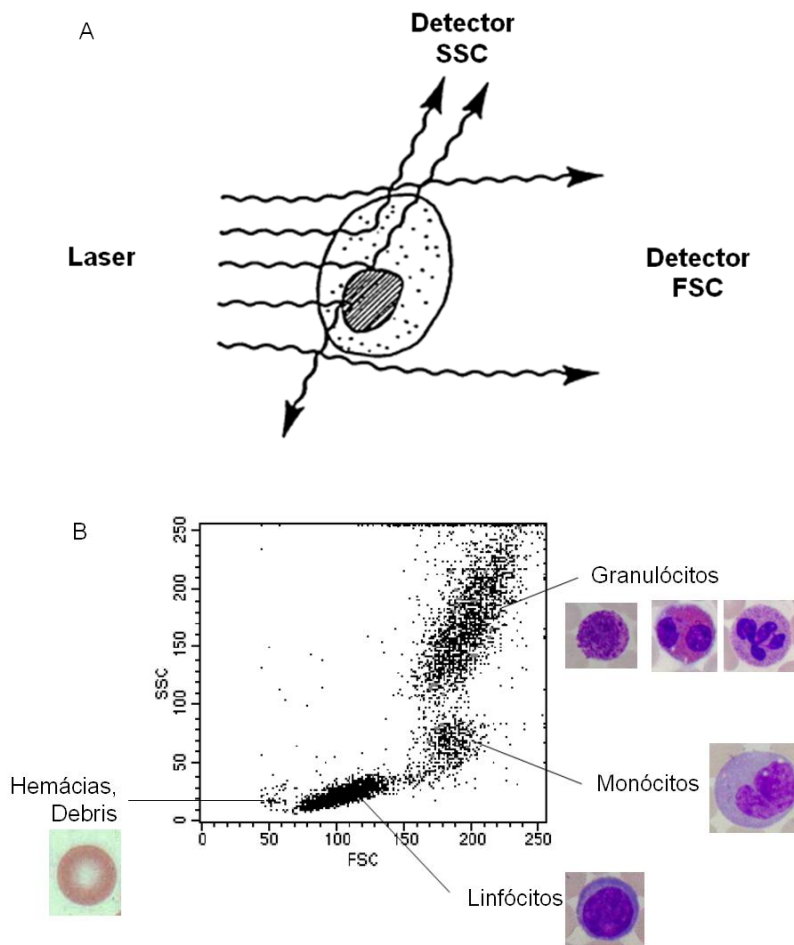


Figura 13: FSC x SSC. A) Esquema da luz dispersada e detectada pelos canais ópticos do citômetro de fluxo. B) Identificação de tipos celulares diferentes em uma amostra heterogênea de medula sangue. Modificado de: BD, 2000.

Além dos parâmetros morfológicos o *laser* também é capaz de excitar fluorocromos ou compostos celulares com fluorescência intrínseca. Ao ser excitado pelo laser, os fluorocromos absorvem energia e reemitem como fluorescência pela emissão de fótons com maior comprimento de onda e menor energia. A fluorescência, assim como a dispersão lateral da luz, é detectada por tubos fotomultiplicadores e a intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de marcadores presentes na célula. A fluorescência é direcionada por filtros ópticos altamente específicos para os tubos fotomultiplicadores que captam e convertem os sinais luminosos em pulsos elétricos que serão amplificados, digitalizados, armazenados em computador e, posteriormente, analisados por *softwares* específicos.

Os citômetros de fluxo utilizam diferentes tipos de filtros (*longpass*, *bandpass* e *shortpass*) que permitem a passagem de comprimentos de ondas específicos tornando possível a detecção simultânea de vários fluorocromos. Os filtros do tipo *longpass* (LP) transmitem comprimentos de onda iguais ou maiores ao especificado, enquanto que os filtros *shortpass* (SP) transmitem comprimentos de onda iguais ou menores ao especificado. Os filtros do tipo *bandpass* (BP) transmitem apenas uma faixa de comprimento de onda sendo, portanto mais específicos (Figura 14).

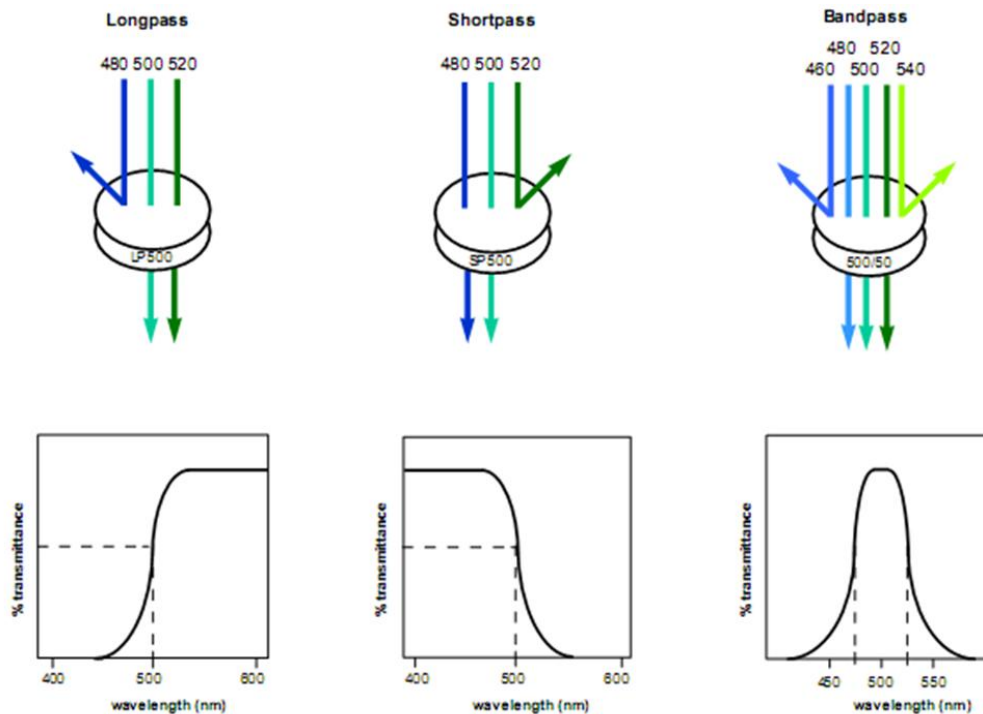


Figura 14: Filtros utilizados em um citômetro de fluxo. O filtro LP500, é do tipo *longpass* e transmite comprimentos de onda iguais ou maiores a 500nm, enquanto que o SP500, do tipo *shortpass*, transmite comprimentos de onda iguais ou menores a 500nm. O filtro 500/50, é um filtro do tipo *bandpass* e, portanto, transmitem apenas a faixa de comprimento de onda compreendida entre 475 e 525 nm. Fonte: BD, 2000.

Portanto, a citometria de fluxo é uma técnica relativamente recente que tem como principal vantagem a análise multiparamétrica de milhares de células, individualmente, em um curto espaço de tempo, tornando-a uma técnica consistente e bastante confiável para detecção de parâmetros morfológicos, bioquímicos e fisiológicos de células individuais.

2 JUSTIFICATIVA

A hipertensão renovascular angiotensina II-dependente é o tipo mais comum de hipertensão secundária. Sabe-se que a angiotensina II, além de um potente vasoconstritor, possui várias outras atividades biológicas, como regulação do crescimento/apoptose celular e produção e liberação de fatores pro-inflamatórios, imunomoduladores e oxidantes.

Existem muitos estudos que investigam os efeitos da hipertensão sobre órgãos-alvo clássicos da doença como coração, rins, cérebro e vasos sanguíneos – órgãos comumente afetados tanto pelo aumento da força hemodinâmica como por moléculas com função sinalizadora. Entretanto, poucos estudos demonstram interesse em caracterizar os efeitos não-hemodinâmicos da hipertensão renovascular 2R1C sobre células individuais também obtidas de tecidos que não são considerados alvos clássicos da doença, como sangue e medula óssea.

Além disso, na maior parte destes estudos os parâmetros de interesse são avaliados por técnicas amplamente difundidas como microscopia, quimioluminescência, espectrofotometria e *blottings*. A citometria de fluxo é uma técnica relativamente nova e amplamente utilizada por apresentar muitas vantagens como alta especificidade, sensibilidade e rapidez na obtenção dos resultados. Apesar disso, em fisiologia cardiovascular poucos trabalhos utilizam esta metodologia.

Portanto, atualmente, fazem-se necessários estudos capazes de determinar como doenças cardiovasculares que atingem grande parte da população mundial, como hipertensão arterial, afetam a produção de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, a taxa de apoptose em células individuais de órgãos de extrema importância para homeostase do organismo.

3 HIPÓTESE

A hipótese do presente estudo é de que na hipertensão renovascular angiotensina II-dependente, ocorre aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e que estas são capazes de interagir com macromoléculas biológicas levando à fragmentação do DNA, desencadeando mecanismos de apoptose. Além disso, estes efeitos prejudiciais poderiam ser observados em células isoladas de tecidos que não são considerados alvos clássicos da hipertensão, uma vez que em outras doenças cardiovasculares, como diabetes, existem evidências destes acontecimentos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo caracterizar, por meio de citometria de fluxo, os efeitos da hipertensão renovascular 2R1C sobre as células sanguíneas, endoteliais e da medula óssea de camundongos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em camundongos hipertensos e seus controles Sham:

- Determinar os valores de frequência cardíaca e pressão arterial sistólica, diastólica e média;
- Verificar ocorrência de hipertrofia cardíaca
- Avaliar por meio da citometria de fluxo em células sanguíneas, endoteliais e de medula óssea:
 - Produção de ânion superóxido
 - Produção de peróxido de hidrogênio
 - Graus de apoptose
 - Fragmentação do DNA

5 METODOLOGIA

5.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo, foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem C57Bl/6 (Figura 15), pesando entre 23 e 23,5 gramas com aproximadamente 8 semanas de idade, provenientes do biotério do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular, pertencente ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, com garantia de serem animais isogênicos, ou seja, filhos de casais irmãos e, portanto, com o mínimo de variabilidade genética. Os animais foram mantidos no biotério em gaiolas individuais colocadas em estantes ventiladas onde receberam água e ração *ad libitum* e tiveram controlado o ciclo de 12 horas claro/escuro, bem como a temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e a umidade (70%) do ambiente.

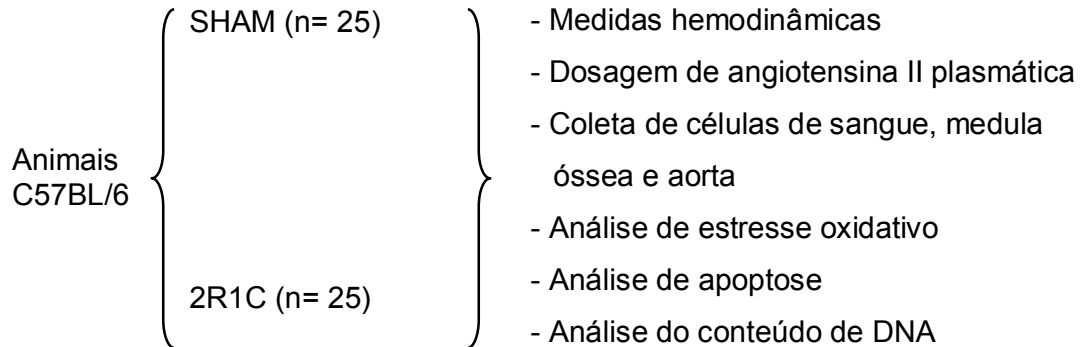
Os aspectos éticos, a utilização e o manuseio experimental dos animais estavam de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e a *American Physiological Society* (APS). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (CEUA-EMESCAM #010/2009).



Figura 15: Camundongo da linhagem C57BL/6 do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular da UFES.

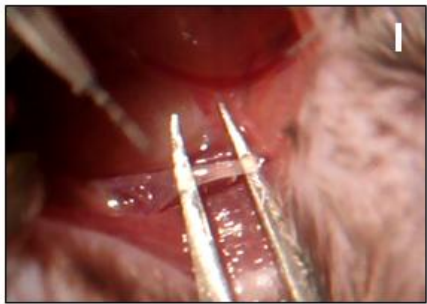
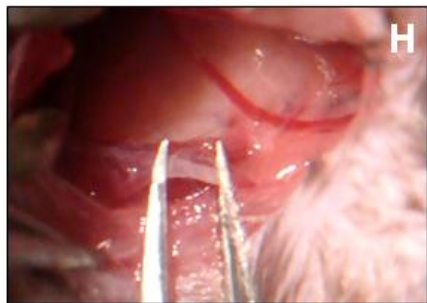
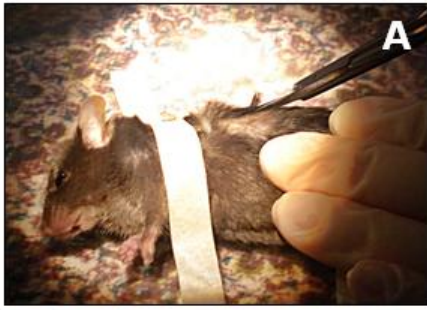
5.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais:



5.3 INDUÇÃO DA HIPERTENSÃO RENOVASCULAR 2R1C

Os animais foram anestesiados com ketamina/xilazina (91/9.1 mg/kg) por via intraperitoneal. Após a tricotomia (Figura 16A e B), foi realizada uma incisão no flanco esquerdo (Figura 16C e D) dos animais para exposição do conteúdo da cavidade retroperitoneal (Figura 16E e F). Com auxílio de uma lupa cirúrgica (Opto Eletrônica S/A Brasil) a artéria renal esquerda foi isolada da veia renal (Figura 16G-L), o fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, a pressão de perfusão renal reduzidos pela colocação de um clipe de aço em forma de "U" com 0,12mm de abertura (Figura 16M - Exidel AS, Moutiter, Suíça) ao redor da artéria renal esquerda, próximo à aorta dos animais do grupo 2R1C (Figura 16N-P). A camada muscular e a incisão cutânea foram suturadas, respectivamente, com Catgut 4.0 e Fio de Seda 4.0 (Figura 16Q-S). Os animais do grupo Sham foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a colocação do clipe. Durante a cirurgia, o animal foi mantido aquecido sobre uma manta cirúrgica regulada em 37°C. Os animais foram observados até se recuperarem da anestesia (Figura 16T) e estudados 14 dias após a indução da hipertensão.



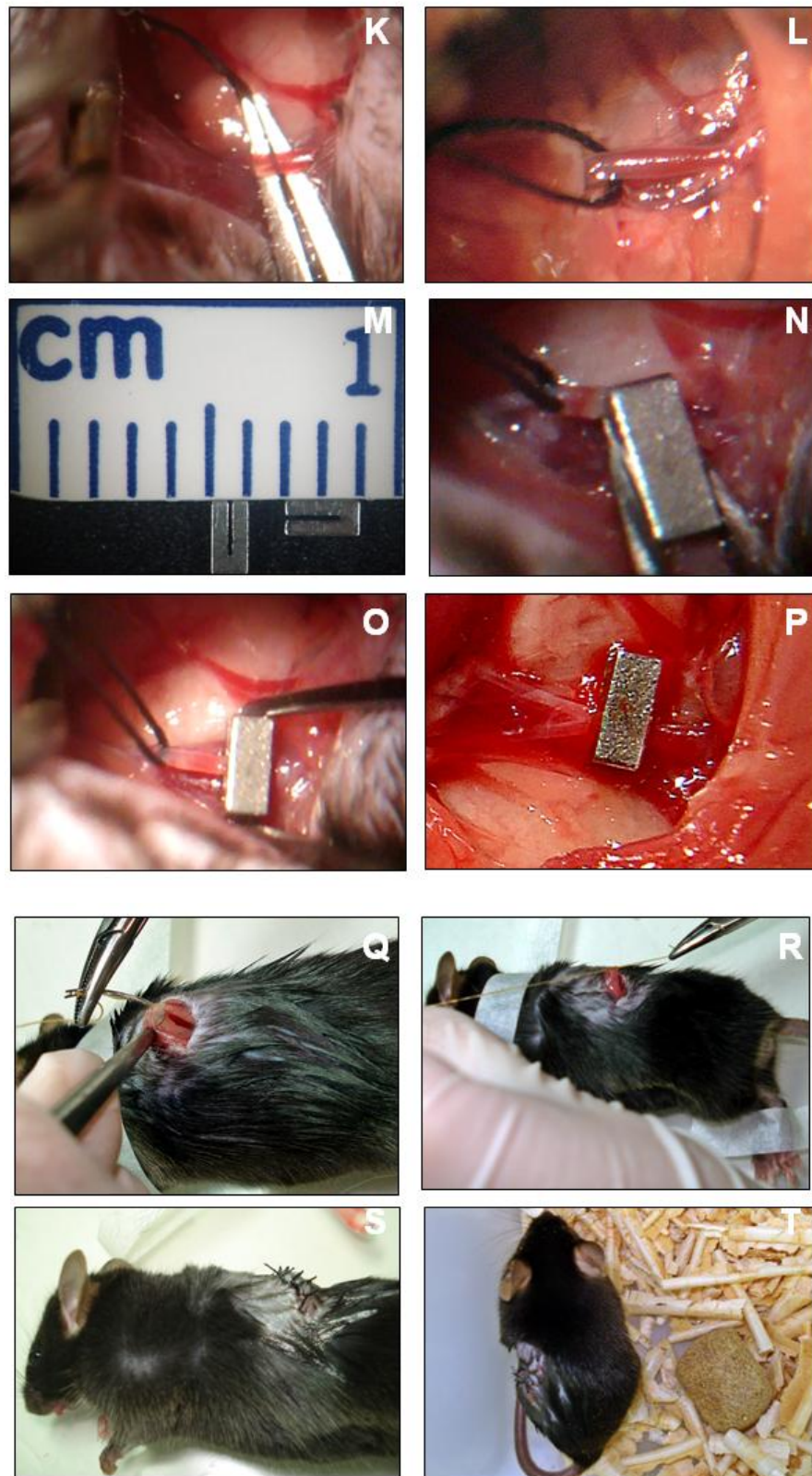


Figura 16: Cirurgia para indução da hipertensão 2R1C. Tricotomia (A e B), incisão no flanco esquerdo (C e D), exposição do conteúdo da cavidade retroperitoneal (E e F), isolamento da

artéria renal esquerda (G-L), clipe de aço (M), colocação do clipe ao redor da artéria (N e O), artéria renal esquerda clipada (P), sutura (Q-S), animal recuperando-se da anestesia (T).

5.4 MEDIDAS HEMODINÂMICAS

5.4.1 Cateterização da artéria carótida

As pressões arterial sistólica, diastólica e média e a frequência cardíaca foram medidas 14 dias após a cirurgia para indução da hipertensão. Para o registro das medidas hemodinâmicas, foi colocado um cateter na artéria carótida direita comum, que consistia em uma cânula com 4 a 5 cm de comprimento (0,040 mm OD X 0,025 mm ID; *Micro-Renathane; Braintree Science*) que foi esticada sobre ar aquecido até que sua extremidade ficasse com aproximadamente 300-500 µm de diâmetro. Para isso, os animais foram anestesiados com ketamina/xilazina (91/9.1 mg/kg) por via intraperitoneal. Foi feita uma incisão cervical nos animais, que permitiu o acesso à artéria carótida, que foi isolada (Figura 17A e B) e teve uma de suas extremidades amarrada (Figura 17C). Em seguida, o cateter foi preenchido com solução salina isotônica contendo heparina (100U) e inserido no lúmen da artéria através de uma pequena incisão para registros de pressão arterial sistólica, diastólica e média e da frequência cardíaca. Por fim, o cateter foi firmemente amarrado e exteriorizado na nuca dos animais com o auxílio de um trocater. A cirurgia foi realizada com o auxílio de lupa cirúrgica (Figura 17D - Opto Eletrônica S/A) e o animal foi mantido aquecido sobre uma manta térmica durante toda a cirurgia.

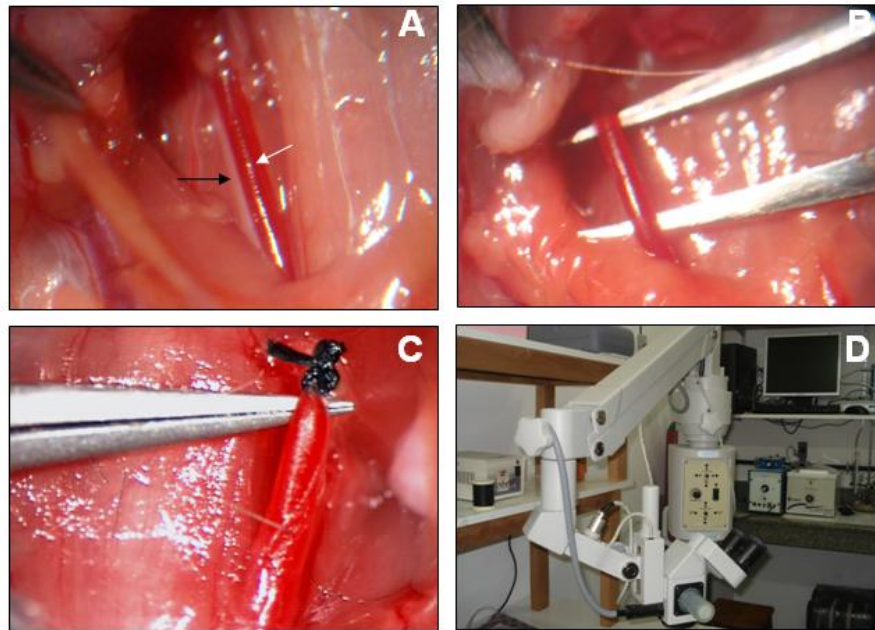


Figura 17: Artéria carótida direita (seta branca) e nervo vago (seta preta) (A), artéria carótida isolada (B), com sua extremidade amarrada (C), lupa cirúrgica (D).

5.4.2 Medida direta da pressão arterial

O registro foi realizado nos animais conscientes e livres, 48 horas após a colocação do cateter. Para o registro das pressões arterial sistólica, média, diastólica e da frequência cardíaca, o cateter foi acoplado a um pino de aço de 23-gauge que estava conectado a um tubo de polietileno de aproximadamente 25 cm (PE-50; 0,023 mm ID X 0,038 mm OD; Clay-Adams, EUA). A extremidade livre deste tubo foi acoplada a um transdutor de pressão (Cobe Laboratories, EUA) previamente conectado a um amplificador e a um sistema de aquisição de dados (Figura 18). A indução da hipertensão foi considerada bem sucedida quando os animais apresentavam pressão arterial média maior que 120 mmHg. Os animais que não atingiam este critério foram excluídos do estudo. Quando o animal apresentava sinais de estresse ou dor, ele era eutanasiado com uma sobredose de pentobarbital sódico intraperitonealmente.

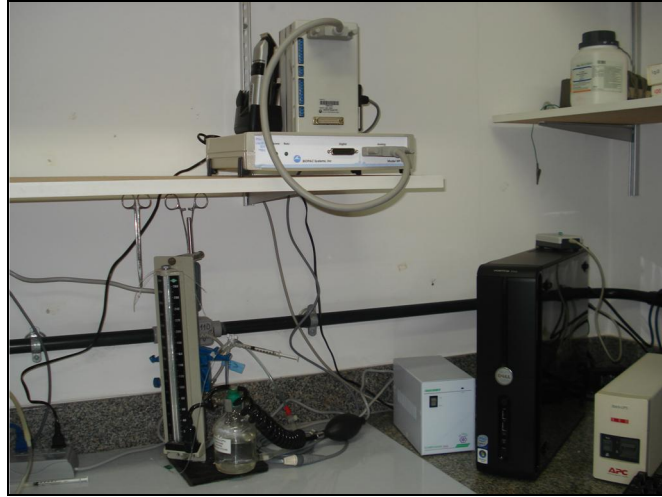


Figura 18: Sistema para aquisição de dados das medidas hemodinâmicas (Biopac Systems, EUA).

5.5 MEDIDAS BIOMÉTRICAS DO CORAÇÃO E RINS

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados com sobredose intraperitoneal de pentobarbital sódico e tiveram rins e o coração removidos. Os átrios foram separados e os ventrículos pesados, colocados para secar em estufa a 37°C por 48 horas e novamente pesados. A cápsula renal foi removida, os rins foram pesados, secos por 48 horas a 37°C em estufa e novamente pesados. O peso dos órgãos utilizado nas análises foi o obtido após o período de 48 horas na estufa, (portanto o peso seco) e foi dado em miligramas (mg). O índice de massa ventricular foi calculado pela razão do peso ventricular seco / peso corporal (mg/g) para verificar a existência de hipertrofia ventricular. Também calculamos a razão entre o peso seco do rim esquerdo / peso seco do rim direito para determinar a presença de hipertrofia renal direita e atrofia renal esquerda.

5.6 DOSAGEM PLASMÁTICA DE ANGIOTENSINA II

Após as medidas hemodinâmicas, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical para dosagem de angiotensina II plasmática. O sangue foi coletado, na presença do anticoagulante EDTA, por punção cardíaca em

normocardia, utilizando agulha de 26-gauge e seringa de 1mL. O sangue foi transferido para um microtubo onde foi adicionado o *cocktail* de inibidores de protease (#P2714, Sigma-Aldrich). A amostra foi homogeneizada, centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C, o plasma transferido para um criotubo e armazenado em nitrogênio líquido até o momento da dosagem por cromatografia líquida de alta performance (HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*). Resumidamente, as amostras de plasma foram concentradas em coluna Sep-Pack-C₁₈ (Millipore, Massachusetts, USA) ativada com metanol (5 mL), tetrahidrofurano (5 mL), hexano (5 mL), metanol (5 mL) e água (10 mL; MiliQ). Após a ativação, as amostras foram aplicadas na coluna e o peptídeo de interesse eluído com solução de etanol: ácido acético: água (90:4:6, v/v). O eluato contendo angiotensina II foi liofilizado utilizando o Speed Vac SC 110 (Savant Instruments, Holbrook, NY, USA), ressuspenso em 500 µL de ácido fosfórico 0,1% em acetonitrila 5% e filtrado com membrana 0,22 µm antes de ser injetado na coluna analítica do sistema HPLC. Os peptídeos foram separados em uma coluna de fase reversa Aquapore ODS 300 de 7 µm (4,6x250 mm) (*Applied Biosciences*, Foster City, CA) utilizando um gradiente linear de 5 a 35% de fase móvel (acetonitrila em 0,1% H₃PO₄) durante 40 minutos, sob fluxo constante de 1,5 mL/min. A coluna de HPLC foi calibrada utilizando angiotensina III como padrão interno e a detecção do peptídeo foi acompanhada em absorbância de 214 nm. O tempo de retenção foi utilizado para identificar o pico de interesse, previamente determinado pela eluição de peptídeos padrão de concentração conhecida. Os cálculos foram efetuados com base na área do pico e a concentração de angiotensina II foi expressa em pmol/ml de sangue. Este protocolo foi realizado no Laboratório de Rim e Hormônios da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

5.7 COLETA DE CÉLULAS SANGUÍNEAS

Por punção cardíaca, sob anestesia intraperitoneal com ketamina/xilazina (91/9.1 mg/kg), foram coletadas amostras de sangue para análise por citometria de fluxo 14 dias após a cirurgia para indução da hipertensão. O sangue foi coletado por punção cardíaca e, para isso, os animais foram colocados em decúbito lateral. Em seguida, uma agulha de 26-gauge, acoplada a uma seringa plástica heparinizada de

1 mL, foi inserida pelo espaço intercostal até o ventrículo esquerdo e o sangue lentamente coletado (Figura 19A-C). Imediatamente após a coleta, o sangue foi acondicionado em microtubos contendo o anticoagulante heparina, sendo 200 μ L destinados à realização da citometria de fluxo. As hemácias foram lisadas pela incubação por duas vezes consecutivas com solução de lise (BD Pharm Lyse, # 555899) segundo as orientações do fabricante. Resumidamente, a solução de lise (10X) foi diluída (1X) com água destilada e mantida em temperatura ambiente. Foram adicionados 2 mL de solução de lise 1X ao tubo contendo 200 μ L de sangue. Em seguida, os tubos foram vortexados e incubados, em temperatura ambiente, por 15 minutos para rompimento de hemácias (Figura 19D). Decorrido este tempo, a reação foi parada acrescentando-se 2 mL de PBS ao tubo. As amostras foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos (Eppendorf: Centrifuge 5702) e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e descartado (Figura 19E e F). Como mencionado anteriormente, as amostras de sangue foram incubadas duas vezes com solução para lise de hemácias. Após as duas etapas para lise de hemácias, o *pellet* foi ressuspensionado em 2 mL de tampão fosfato (PBS: *Phosphate Buffered Saline*) acrescido de 1% de soro fetal bovino (FBS: *Fetal Bovine Serum*) inativado (PBS-iFBS) para lavar o excesso de solução de lise. Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e os leucócitos ressuspensionados em 1 mL de PBS-iFBS e mantidos a 4°C até a marcação para análise por citometria de fluxo. Uma alíquota foi separada para contagem em câmara de Neubauer.

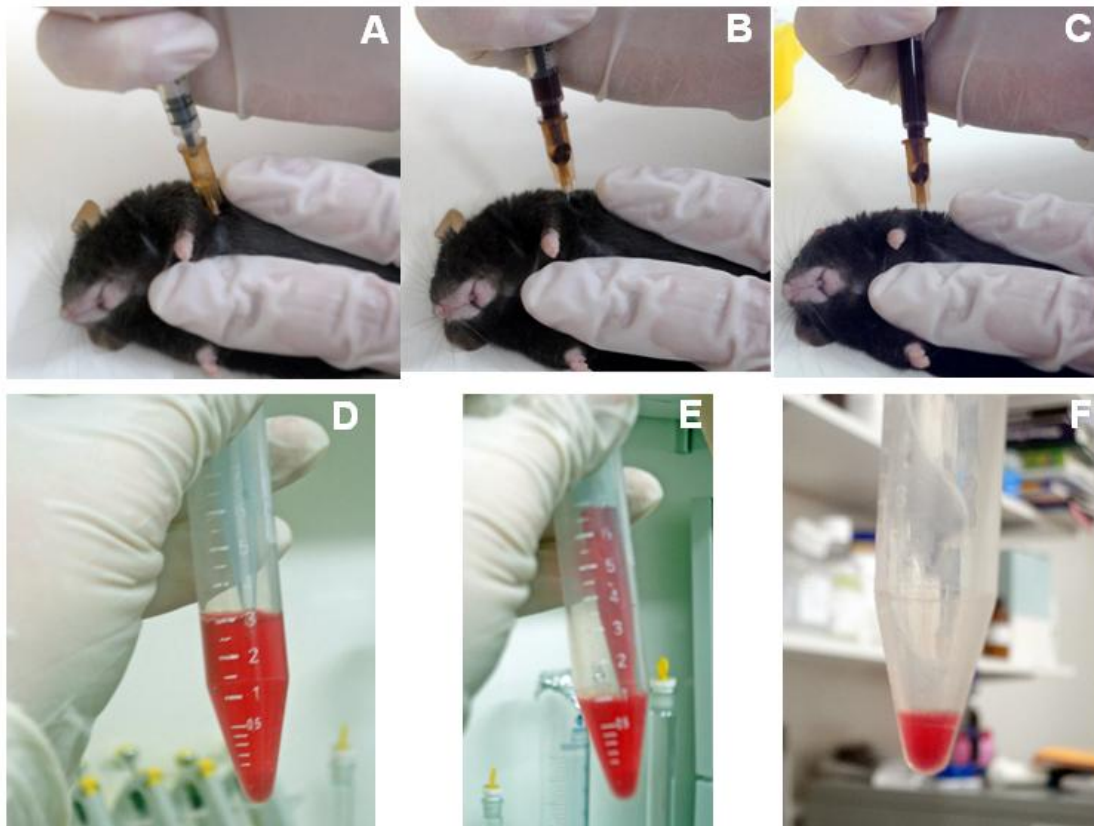


Figura 19: Coleta intra-cardíaca de sangue (A-C) e lise de hemácias (D-E) para análise por citometria de fluxo.

5.8 COLETA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTA

Após a coleta das amostras de sangue, os animais foram colocados sobre uma grade onde foi realizada a perfusão para eliminar o sangue do sistema circulatório, evitando contaminações das amostras do endotélio por células sanguíneas. Através de uma incisão torácica (Figura 20A-C) que permitia livre acesso ao coração do animal, foi feita uma pequena incisão no átrio direito para extravasamento do sangue e, aproximadamente, 50 ml de PBS (0,1 M; pH 7,4) foi infundido no ventrículo esquerdo com auxílio de uma agulha de 22-gauge acoplada a um equipo associado a um frasco de *Mariotti*. A solução foi infundida com pressão controlada pela força da gravidade, sendo a pressão hidrostática determinada pela altura da coluna líquida ($1,36 \text{ cm H}_2\text{O} = 1 \text{ mmHg}$) (Figura 20C-E). A perfusão foi realizada nestas condições objetivando mimetizar a pressão arterial média do animal preservando o formato das artérias e evitando possíveis danos ao endotélio. Ao

término da perfusão e com auxílio de uma lupa cirúrgica, a aorta torácica foi cuidadosamente removida (Figura 20F-I) e transferida para uma placa de Petri contendo 2 mL de solução salina balanceada de Hank (HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*) aquecida (37°C), onde procedeu-se a remoção de tecidos gordurosos (Figura 22J). Em seguida, a aorta foi lavada duas vezes com HBSS, transferida para outra placa de Petri (Figura 20K) contendo 1000 µL de HBSS aquecido e cortada longitudinalmente para remoção mecânica do endotélio. Para isso, foi feito um *flush* na aorta com 500 µL de HBSS aquecido utilizando um pipetador automático de 200 µL. Em seguida, a aorta e a solução foram transferidas para um microtubo que foi mantido em estufa a 37°C por 30 minutos. Decorrido este tempo, a aorta foi removida e a suspensão de células obtida foi centrifugada a 1200 rpm por 15 minutos e concentrada em 1 mL de HBSS. Após esta etapa, as células permaneceram acondicionadas em estufa (37°C) até o momento do experimento. Uma alíquota foi separada para contagem em câmara de Neubauer.



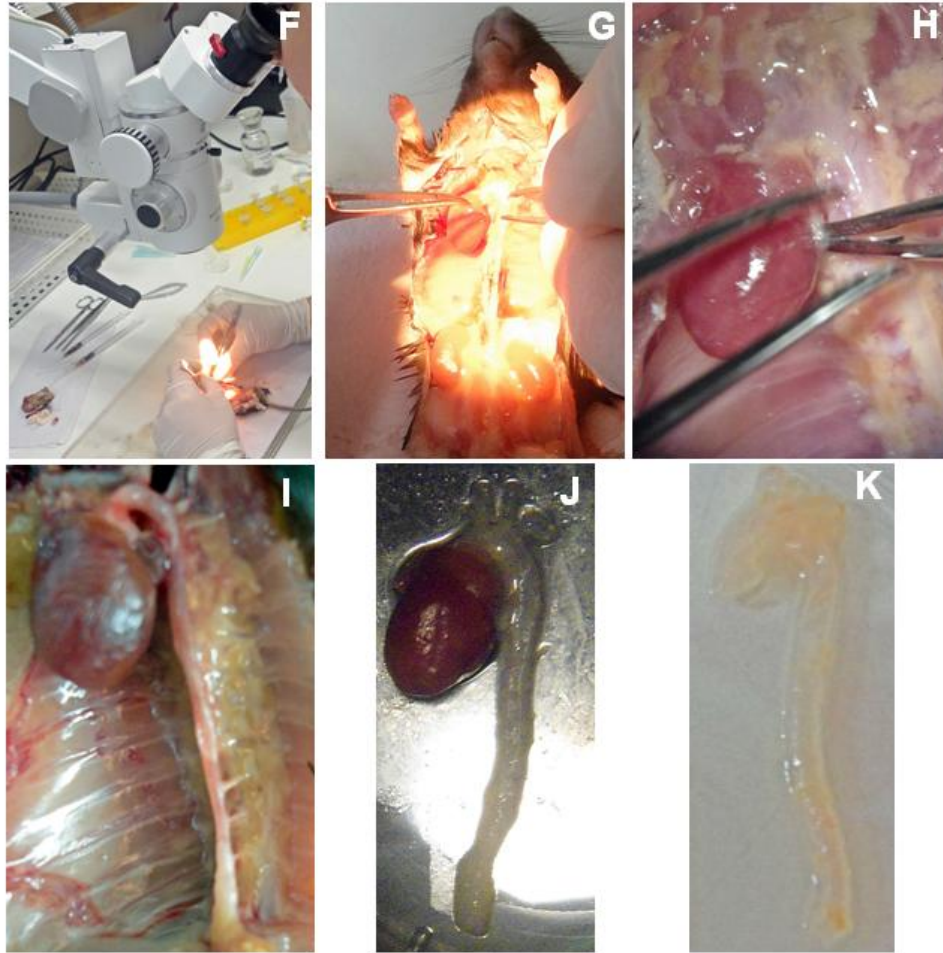
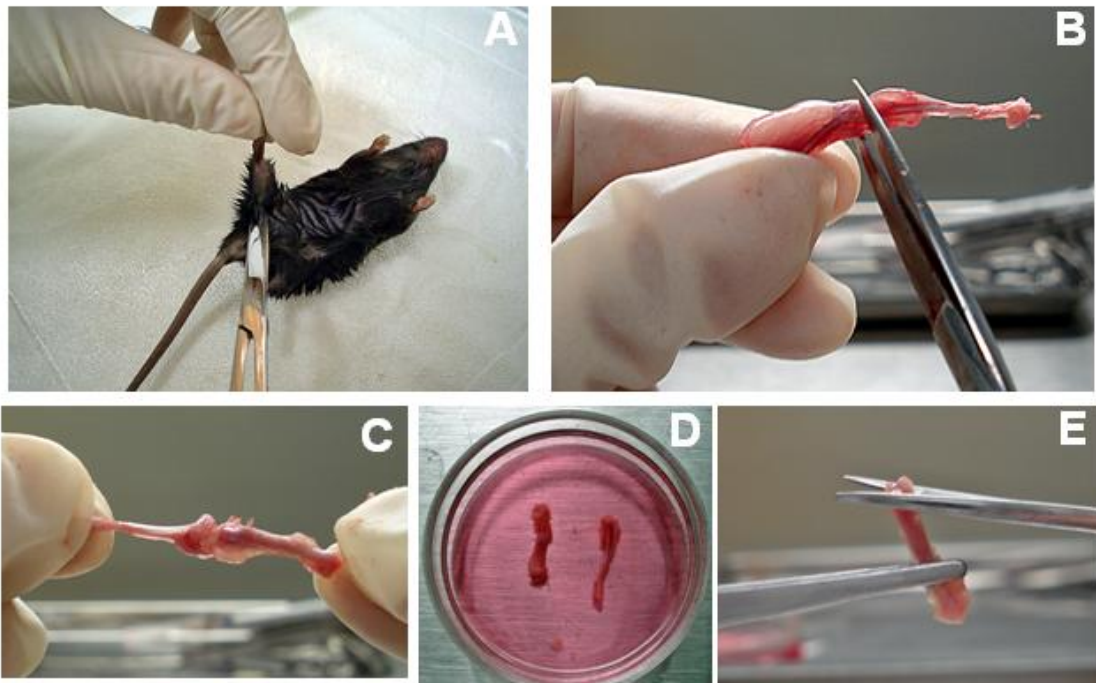


Figura 20: Coleta de células endoteliais de aorta. Os animais foram perfundidos (A-E) e a aorta torácica removida para isolamento das células endoteliais (F-I).

5.9 COLETA CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA

Após a coleta de células endoteliais, os animais foram levados para capela de fluxo laminar onde foi realizado o isolamento de células da medula óssea. Foi realizada a assepsia, os fêmures e as tíbias (Figura 21A) dos animais foram removidos, assim como o excesso de músculo e tecido conjuntivo ao redor dos ossos (Figura 21B-D). As epífises foram cortadas (Figura 21E) para exposição do canal medular. Para remoção da medula óssea, uma agulha de 26-gauge acoplada a uma seringa plástica de 1 mL foi inserida na cavidade medular para retirada da medula óssea através de *flush* (Figura 21F) utilizando meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Sigma). A suspensão de medula óssea foi

homogeneizada (Figura 21G) e centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos (Eppendorf: Centrifuge 5702). O sobrenadante foi desprezado, as células ressuspendidas em solução de lise de hemácias (BD Pharm Lyse, # 555899) (Figura 21H). Para isso, foram adicionados 2 mL de solução de lise 1X ao tubo contendo o precipitado de células da medula. Em seguida, os tubos foram vortexados e incubados, em temperatura ambiente, por 15 minutos para rompimento de hemácias. As amostras foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e descartado. Em seguida, o *pellet* foi ressuspendido em 2 mL de PBS acrescido de 1% de FBS inativado (PBS-iFBS) para lavar o excesso de solução de lise e as amostras novamente centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos. As amostras de medula óssea, assim como as de sangue, foram incubadas duas vezes com solução para lise de hemácias, portanto os procedimentos descritos acima foram realizados duas vezes. Por fim, o sobrenadante foi aspirado (Figura 21I) e as células ressuspendidas em 1 mL de PBS-iFBS e mantidas a 4°C até a marcação para análise por citometria de fluxo. Uma alíquota foi separada para contagem em câmara de Neubauer (Figura 21J).



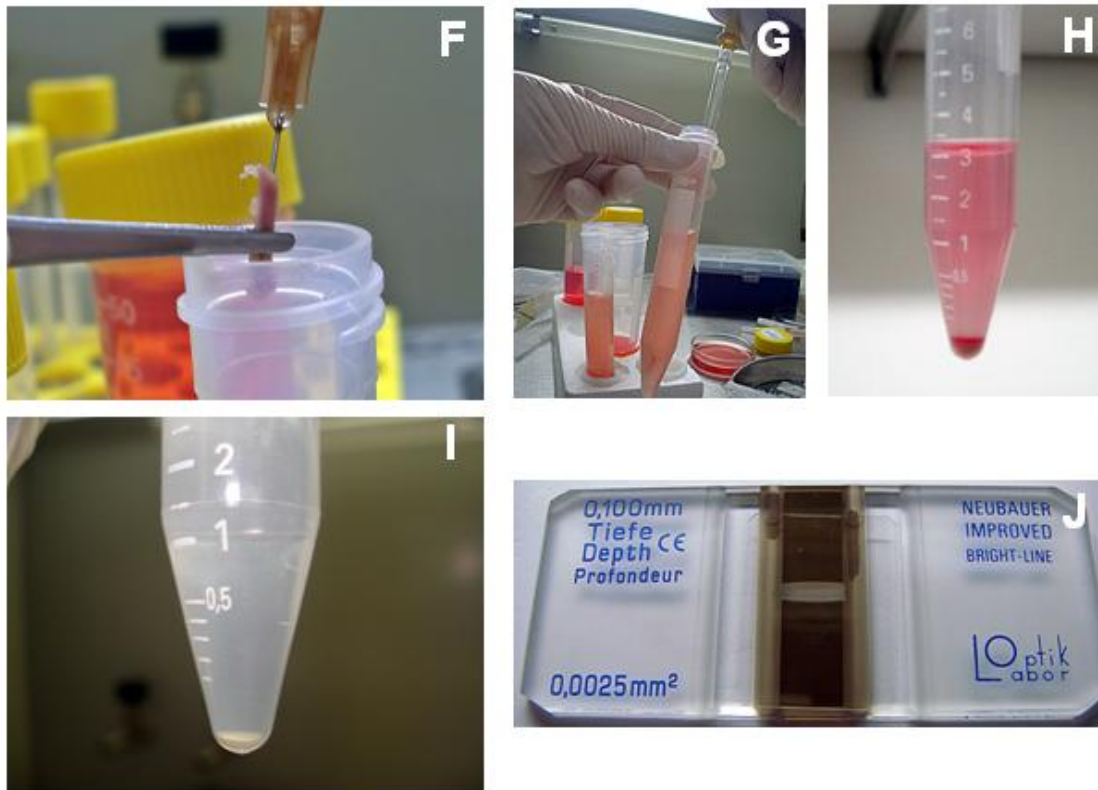


Figura 21: Isolamento de células da medula óssea de camundongos: retirada do fêmur e da tíbia (A-C), ossos isolados em meio de cultura (D), corte das epífises (E), *flush* para remover a medula óssea (F), homogeneização do lavado da medula (G), lise de hemácias (H), células isoladas (I), câmara de Neubauer (J).

5.10 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS EM CÂMARA DE NEUBAUER

Para determinação do número de células obtido, foi realizada uma diluição 1:10 (v/v) da suspensão celular de sangue, aorta ou medula óssea em PBS (Gibco). Em seguida, uma alíquota desta solução foi diluída 1:2 (v/v) em solução de Turck (ácido acético 2% com azul de metileno) para eliminar resíduos de hemácias das amostras, e uma alíquota desta última solução foi novamente diluída 1:2 (v/v) em solução de azul de Tripano 0,4% para quantificação das células vivas. A solução (células/Turck/Tripano) foi homogeneizada e colocada em um lado da câmara de Neubauer (Figura 22A) para contagem com auxílio do microscópio óptico (Nikon Tsi – Figura 22B) no aumento de 40X. As células são contadas nos quatro quadrantes externos da câmara (Figura 22C) seguindo sempre a mesma direção (Figura 22D) e

usando o esquema do “L” para que a mesma célula não seja contada duas vezes. Portanto, as células que se encontravam sobre as linhas de baixo e da direita não eram contadas (Figura 22E). A equação usada para determinar o número de células por mililitro foi:

$$QC = FD \times 10^4 \times 1ml \times \frac{N^{\circ} \text{ de células}}{4}, \text{ onde:}$$

FD → Fator de diluição (40x)

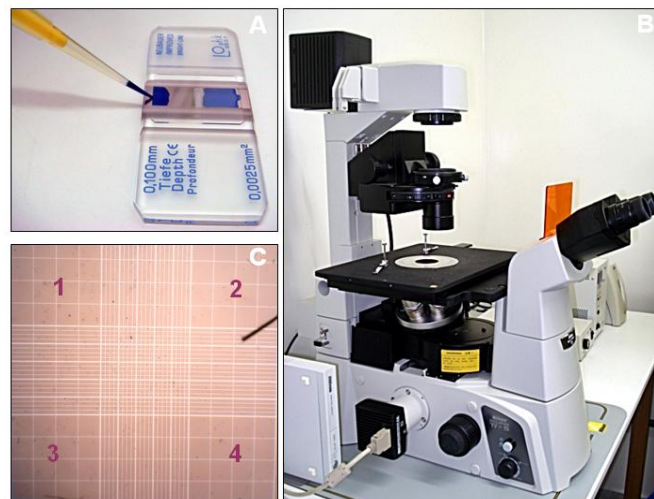
10^4 → Fator de correção da câmara de Neubauer

1ml → Volume da amostra

N° de células → Média do número de células contadas

4

Este protocolo foi realizado objetivando utilizar sempre 10^6 células nas marcações analisadas por citometria de fluxo. As amostras de sangue e medula óssea, forneceram sempre 10^7 células/ml, já as amostras de aorta forneceram 10^6 células/ml.



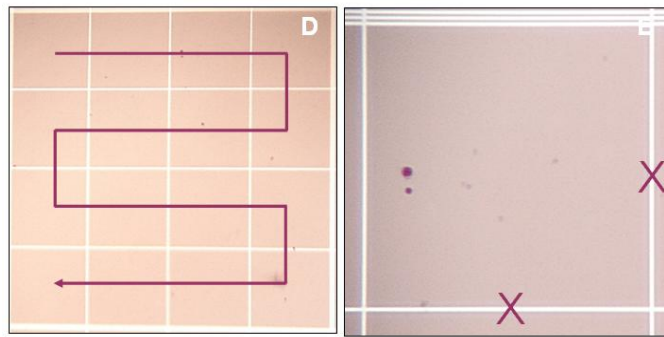


Figura 22: Contagem celular em câmara de Neubauer. Suspensão celular misturada com os corantes sendo adicionada à câmara (A), microscópio óptico utilizado na análise (B), as células foram contadas nos quatro quadrantes externos da câmara, indicados pelos números (C), detalhe de um quadrante mostrando o sentido da contagem (D) e as células que se encontravam sobre as linhas marcadas com o x não eram contadas (E).

5.11 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE EM CITÔMETRO DE FLUXO

Para minimizar a manipulação e a consequente perda celular, foi utilizado o método de lise de hemácias em sangue total e medula óssea. Como foi realizada perfusão dos animais, não houve necessidade de submeter as amostras de aorta à lise de hemácias. Por fim, o centrifugado celular (*pellet*) de sangue, aorta e medula óssea foi ressuspenso em PBS-iFBS, com objetivo de reduzir substâncias plasmáticas potencialmente capazes de se ligarem de forma não específica aos anticorpos ou de reagirem com os marcadores utilizados. Em seguida foram colocadas 10^6 células de sangue, aorta ou medula óssea em tubos previamente identificados que foram incubados no escuro com os marcadores específicos para cada ensaio. Ao final, as células foram ressuspendidas em 400 μ l de PBS-iFBS ou *Binding Buffer* e mantidas a 4°C até o momento da aquisição dos dados no citômetro de fluxo.

5.12 ANÁLISE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Foi utilizado um citômetro de fluxo (FACSCanto II Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA – Figura 23A) acoplado a um computador. Foram adquiridos 30.000 eventos de cada amostra (10.000 eventos em triplicata) e os dados coletados foram analisados pelos *softwares* BDFACSDiva (BD – Figura 23B) e FCSExpress (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA – Figura 23C). No citômetro de fluxo, as células são analisadas de acordo com suas propriedades físicas e químicas como tamanho e complexidade interna ou granulidade, e intensidade de fluorescência que é proporcional à quantidade de marcação pela sonda fluorescente utilizada (APC, DCFH-DA, DHE, FITC e PI).



Figura 23: A) Citômetro de fluxo FACSCanto II (BD) e *layout* dos *softwares* utilizados na análise dos dados FACSDiva (B) e FCS Express 4 Plus (C).

Ao iniciar o citômetro, foram retiradas bolhas de ar e obstruções que eventualmente penetram no sistema fluido e podem interferir na leitura das células. Antes da aquisição das amostras, foi utilizado o reagente CS&T (*Cytometer Setup and Tracking*; BD – Figura 24) para ajustar as voltagens dos tubos fotomultiplicadores e avaliar sua sensibilidade. Este reagente é utilizado para caracterização e monitoramento do desempenho do equipamento, objetivando a manutenção dos parâmetros analisados permitindo maior precisão e reprodutibilidade dos resultados obtidos pelo citômetro. Além disso, após cada aquisição, foi feita a limpeza do tubo de injeção de amostra (SIT: *Sample Injection Tube*), pois pequenas quantidades de fragmentos residuais de células existentes no circuito poderiam contaminar a próxima amostra a ser processada.



Figura 24: CS&T (*Cytometer Setup and Tracking Beads*): reagente utilizado como controle de qualidade do citômetro de fluxo.

O FACSCanto II possui duas fontes luminosas (feixe de luz), um *laser* de argônio (Ar - laser azul: 488 nm de excitação) e de hélio-neônio (HeNe – laser vermelho: 633 nm de excitação). A transmissão ou a refração da luz pelas células é captada por meio de oito detectores: *Forward Scatter* (FSC) que é sensível à dispersão frontal da luz (proporcional ao tamanho da célula); *Side Scatter* (SSC) que é sensível à dispersão lateral da luz (proporcional à granulosidade ou complexidade interna da célula), bem como por seis detectores de fluorescência. Os detectores FSC e SSC foram ajustados para acomodar populações heterogêneas de células presentes nas amostras e os dados foram coletados em escala linear. Dados de fluorescência foram coletados em escala logarítmica. As fluorescências do FITC e do DCFH-DA foram captadas pelo filtro de 530/30 (530 ± 15) nm e medidas pelo detector E (octógono); as fluorescências do PI e do DHE foram captadas pelo filtro de 585/42 (585 ± 21) nm e medidas pelo detector D (octógono) e a fluorescência do APC foi captada pelo filtro de 660/20 (660 ± 10) nm e medida pelo detector C (trígono). É importante destacar que nos protocolos em que foram utilizados dois marcadores simultaneamente (ROS e apoptose), foi realizada a compensação das fluorescências com o objetivo de minimizar a interferência da luz emitida e captada pelos tubos fotomultiplicadores.

Para todos os protocolos de citometria de fluxo, as células foram visualizadas em gráfico de pontos (*dot plot*) bidimensional onde foram analisados os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), em escala linear, para identificação das populações celulares e exclusão de debris. Em seguida, realizou-se um *gate* eletrônico único em torno das células de interesse para excluir células inviáveis da

região analisada. Além disso, foram feitos histogramas e *dot plots* para análise em escala logarítmica de cada marcador fluorescente utilizado em cada protocolo.

Cada amostra foi lida em triplicata e, de cada uma, foram adquiridos 10.000 eventos (30.000 células/animal). Os valores referentes à produção de espécies reativas de oxigênio foram avaliados por meio da mediana da intensidade de fluorescência emitida pela população de células analisada. Este valor é dado pelo aparelho e foi esta unidade utilizada para se avaliar a intensidade de fluorescência das células.

5.12.1 Identificação de células endoteliais

Após o isolamento e contagem das células endoteliais de aorta, uma alíquota foi retirada para confirmar a presença de células endoteliais por análise imunofenotípica para identificação de antígenos específicos expressos na superfície celular. Para isso foi utilizado o anticorpo anti-CD31 (BD/Pharmlngen), fortemente expresso na superfície de células endoteliais, conjugado a alofococianina (APC). A imunoglobulina isotipo-específica, não reagente, marcada com o mesmo fluorocromo (anti-rat IgG_{2a}-APC; BD/Pharmlngen) foi utilizada como controle (Figura 25A).

Dois tubos de citometria de fluxo foram separados e identificados para cada animal. No primeiro foram colocados 5µl do anticorpo controle (IgG_{2a}-APC) e no segundo a mesma quantidade do anticorpo marcador, ou seja, 5µl de CD31-APC (Figura 25B). Em seguida, foram adicionadas aproximadamente 10⁵ células isoladas da aorta em cada tubo e as amostras foram incubadas no escuro por 20 minutos. Decorrido este tempo, as células foram lavadas em PBS para remover o excesso de anticorpo e, por fim, foi feita a aquisição de 30000 eventos no FACSCanto II e os dados foram analisados com auxílio do *software* BDFACSDiva (Bencton Dickinson).

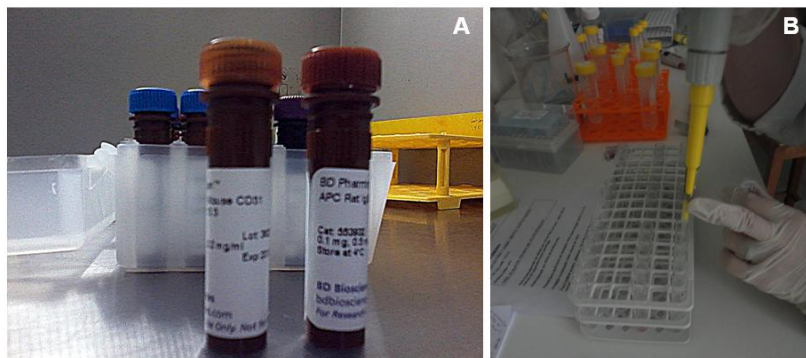


Figura 25: Identificação de células endoteliais. A) CD31-APC e IgG_{2a}-APC, B) marcação de células isoladas da aorta com os anticorpos.

5.12.2 Determinação dos níveis citoplasmáticos de espécies reativas de oxigênio

Os níveis citoplasmáticos de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 foram analisados separada e simultaneamente nas amostras de células sanguíneas, endoteliais e de medula óssea, através da mediana da intensidade de fluorescência emitida pelos marcadores dihidroetídeo (DHE) e 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína DCFH-DA (Figura 26). Após o isolamento das células, foram separados e identificados 6 tubos, sendo que cada tubo, de acordo com seu número, recebeu uma substância diferente, obedecendo sempre a mesma ordem da seguinte forma:

1. Tubo 1: Células – 10^6 células sanguíneas, endoteliais ou de medula óssea em PBS
2. Tubo 2: Controle Negativo – Células + 20 μ l EtOH
3. Tubo 3: Controle Positivo – Células + 20 μ l DHE + 20 μ l DCFH-DA + 20 μ l H_2O_2 (50 μ M)
4. Tubo 4: DHE – Células + 20 μ l DHE (160 μ M)
5. Tubo 5: DCF – Células + 20 μ l DCFH-DA (20mM)
6. Tubo 6: DHE/DCF – Células + 20 μ l DHE + 20 μ l DCFH-DA



Figura 26: DHE e H₂DCFDA: marcadores utilizados para determinação dos níveis citoplasmáticos de O₂^{•-} e H₂O₂.

5.12.2.1 Marcação com dihidroetídeo (DHE)

Os níveis de ânion superóxido (O₂^{•-}) foram medidos por citometria de fluxo através da fluorescência emitida pelo etídeo, que é produto da oxidação do dihidroetídeo ou hidroetidina. O DHE, forma reduzida do brometo de etídeo, entra livremente na célula e reage rapidamente com o O₂^{•-} formando etídeo. No citoplasma, o DHE é um fluorocromo azul (420nm), entretanto quando oxidado à etídeo, este se liga ao DNA causando a amplificação da fluorescência vermelha (518-605nm) (Sharikabad *et al.*, 2001). A oxidação do DHE é quantitativamente proporcional a concentração de O₂^{•-} na célula.

As células sanguíneas, endoteliais e de medula óssea foram ressuspensas em 1ml de PBS na concentração de 1x10⁶ células/mL e incubadas, no escuro, com 160µM de DHE em etanol absoluto, por 30 minutos à 37°C. Decorrido este tempo, as amostras foram centrifugadas a 1200rpm por 10 minutos para remover o excesso do marcador e o *pellet* ressuspensado em 400 µL de PBS-iFBS. As amostras foram mantidas resfriadas (4°C) e protegidas da luz até a aquisição dos dados no citômetro de fluxo. Os sinais foram obtidos utilizando o filtro 585/42. Como controle positivo, as células foram previamente incubadas com 50µM H₂O₂ por 5 minutos, enquanto que para o controle negativo, as amostras celulares foram incubadas apenas em etanol. A análise dos dados foi realizada com auxílio do *software* FACSDiva, pela determinação da mediana da intensidade de fluorescência de 30.000 células.

5.12.2.2 Marcação com 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA)

Os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram medidos por citometria de fluxo através da fluorescência emitida pela diclorofluoresceína (DCF) que é produto da oxidação do 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA). O DCFH-DA é um éster, não-fluorescente, internalizado pelas células e que se incorpora às regiões hidrofóbicas. Após entrar na célula, o DCFH-DA perde o grupo diacetato, pela ação de esterases intracelulares, resultando na formação de um composto intermediário (DCFH), que pode ser oxidado pelo H_2O_2 formando o composto fluorescente diclorofluoresceína (DCF), que por ser apolar fica aprisionado no interior da célula. Portanto, a oxidação do DCFH-DA é quantitativamente proporcional à concentração de H_2O_2 na célula (Hirabayashi *et al.*, 1985).

As células sanguíneas, endoteliais e de medula óssea foram ressuspensas em 1mL de PBS na concentração de 1×10^6 células/ml e incubadas, no escuro, com solução de 20mM H_2DCFDA (Gao *et al.*, 2004) em etanol absoluto, por 30 minutos à $37^\circ C$. Decorrido este tempo, as amostras foram centrifugadas a 1200rpm por 10 minutos para remover o excesso do marcador e o *pellet* ressuspendido em 400 μ l de PBS-iFBS. As amostras foram mantidas resfriadas ($4^\circ C$) e protegidas da luz até a aquisição dos dados no citômetro. Os sinais foram obtidos utilizando o filtro de 530/30 para DCF. Como controle positivo, as células endoteliais foram previamente incubadas com $50\mu M H_2O_2$ por 5 minutos, enquanto que para o controle negativo, as amostras celulares foram incubadas apenas em etanol. A análise dos dados foi realizada com auxílio do *software* FACSDiva, pela determinação da intensidade média de fluorescência de 30.000 células.

5.12.2.3 Marcação com dihidroetídeo (DHE) e 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA)

Como mencionado anteriormente, as amostras também foram incubadas simultaneamente com os marcadores DHE e DCFH-DA. Para isso, foram adicionados ao tubo de citometria identificado como DHE/DCF 10^6 células

sanguíneas, endoteliais ou de medula óssea, 160 μ M de DHE e 20mM de DCFH-DA. O protocolo de marcação foi o mesmo utilizado anteriormente, ou seja, as amostras foram incubadas, no escuro, por 30 minutos à 37°C, centrifugadas, ressuspensas e mantidas a 4°C até o momento da aquisição dos dados.

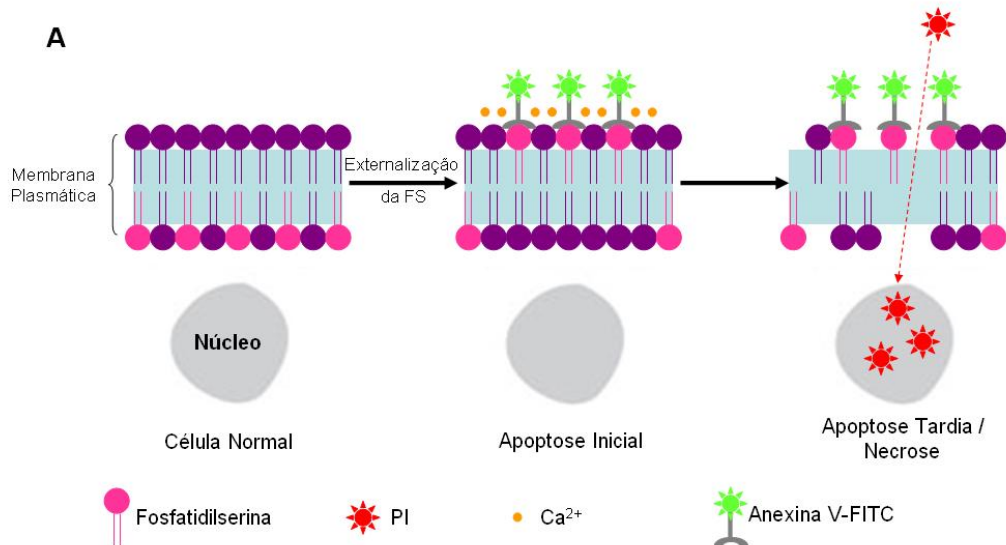
5.12.3 Análise de viabilidade e apoptose celular

Para determinação de viabilidade e apoptose celular foi utilizada a marcação com o reagente Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit[®] (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), composto da proteína anexina V conjugada à fluoresceína (FITC) e do corante intracitoplasmático iodeto de propídeo (PI: *Propidium Iodide*), seguida de análise em citômetro de fluxo. Este ensaio consiste na ligação eficiente da proteína anexina V aos resíduos do fosfolípido fosfatidilserina. Na célula viável, estes resíduos se encontram na face interna da membrana plasmática. Entretanto, quando o processo de morte celular programada (apoptose) é iniciado, estes resíduos são rapidamente translocados para a face externa da membrana, permitindo a ligação da proteína anexina V. O PI, marcador padrão de viabilidade, é usado para distinguir células viáveis de não-viáveis, uma vez que células viáveis com membrana intacta são impermeáveis ao corante, enquanto que membranas de células mortas ou danificadas são permeáveis. Além disso, o PI é usado em conjunto com a anexina V para permitir a identificação de células em estágio inicial e final de apoptose (van Engeland *et al.*, 1996). Portanto, neste ensaio é possível determinar a proporção de células vivas (anexina V/PI⁻); células em estágio inicial de apoptose onde ocorre apenas a exposição da FS na face externa da membrana plasmática com consequente marcação com a anexina V (anexina V⁺/PI⁻); células em estágio tardio de apoptose ou em necrose onde além da exposição da FS, a membrana plasmática sofre colapso e se torna permeável ao PI, fazendo com que a célula possua dupla marcação (anexina V⁺/PI⁺) (Figura 27A). Inicialmente, foram separados e identificados 5 tubos para cada amostra:

1. Tubo 1: Células – 10⁶ células sanguíneas, endoteliais ou de medula óssea
2. Tubo 2: Controle Negativo – Células + 20 μ L *Binding Buffer*

3. Tubo 3: Controle Positivo – Células + 20µL H₂O₂ (50µM)
4. Tubo 3: FITC – Células + 5µL Anexina V-FITC
5. Tubo 4: PI – Células + 5µL PI
6. Tubo 5: Annexina V/PI – Células + 5µL Anexina V-FITC + 5µL PI

As células sanguíneas, endoteliais e de medula óssea foram ressuspensas em 400 µl de tampão de ligação 1X (*Binding Buffer*[®] 1X: 10mmol HEPES, NaOH, pH7,4, 140mmol NaCl, 2,5mmol CaCl₂) na concentração de 1x10⁶ células/ml. Em seguida, 100µl desta solução (1x10⁵ células) foram transferidos para os tubos de citometria previamente identificados, onde foram acrescentados 5µl de anexina V-FITC (Tubo 3), 5µl de PI (Tubo 4) ou ambos os marcadores (Tubos 2 e 5). As células foram incubadas por 15 minutos, a temperatura ambiente (25°C), na ausência de luz. Por fim, 400µl de *Binding Buffer* 1X foram adicionados a cada tubo e as amostras analisadas em citômetro de fluxo no período máximo de 1 hora. As amostras foram analisadas em triplicata, sendo adquiridos 10.000 eventos por leitura. Os dados foram analisados com auxílio do *software* FACSDiva, pela determinação da porcentagem de células encontradas em cada um dos quadrantes do *dot plot* (Figura 27B).



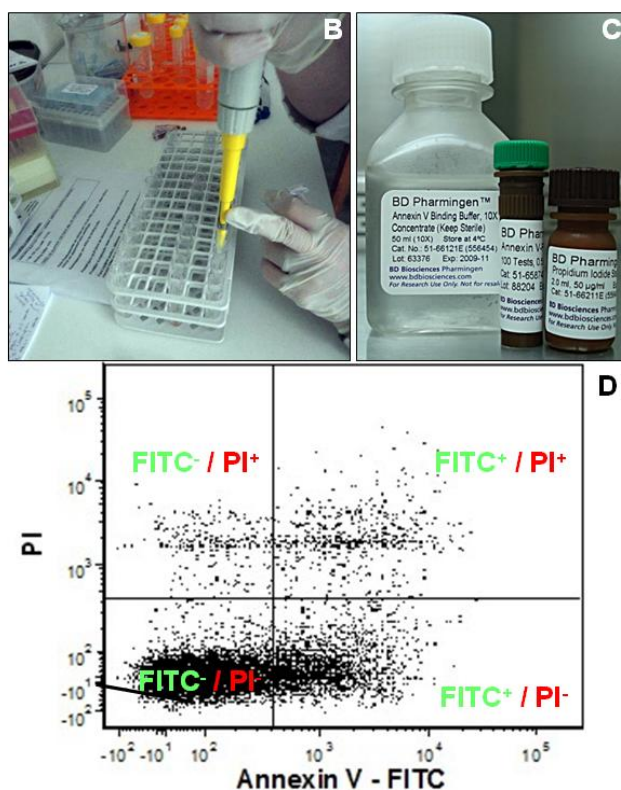


Figura 27: Análise de apoptose. A) Ligação da proteína anexina V aos resíduos de fosfatidilserina externalizados na membrana celular. B) Marcação de células, C) kit de apoptose, D) citograma típico obtido durante a aquisição dos dados e análise dos resultados de apoptose.

5.12.4 Análise do conteúdo de DNA

Através deste protocolo foi determinado o conteúdo de DNA das células pela coloração com iodeto de propídeo (PI) por citometria de fluxo. O PI é um agente intercalante fluorescente de DNA que quando a membrana celular é permeabilizada é capaz de penetrar na célula e corando o DNA. Desta forma, a fluorescência emitida pelo PI é proporcional à quantidade de DNA das células. Inicialmente, 1×10^6 células sanguíneas, endoteliais e de medula óssea foram ressuspensas e fixadas em 1mL de etanol 70% por pelo menos 2 horas a -20°C . As células foram lavadas, ressuspensas em 1mL de PBS gelado e incubadas com 200 μL de solução de coloração (200 μL de RNase A (20mg/mL), 800 μL de PI (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 20 μL de Triton X-100, Q.s.p. 20mL de PBS1x) por 30 minutos, no escuro, a 4°C . Em seguida, as

células foram centrifugadas a 1200rpm por 10 minutos e, para inativar o PI, após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 1mL de PBS. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em 200µL de PBS e a fluorescência emitida pelo PI medida no citômetro de fluxo. A taxa de aquisição foi de 200 células / segundos para que fosse possível diferenciar *singlets* e *doublets*. Além disso, foi feito um citograma da fluorescência de PI versus FSC (FSC vs. PI) para excluir debris. A análise dos dados foi realizada utilizando o *software* FACSDiva. Os histogramas da fluorescência emitida foram analisados para detectar a presença de DNA fragmentado (região sub-G₀/G₁), DNA normal (diploide – região G₀/G₁, antes da síntese de DNA), DNA em processo de duplicação (região S) e DNA duplicado (poliploide – região G₂/M) (Figura 28).

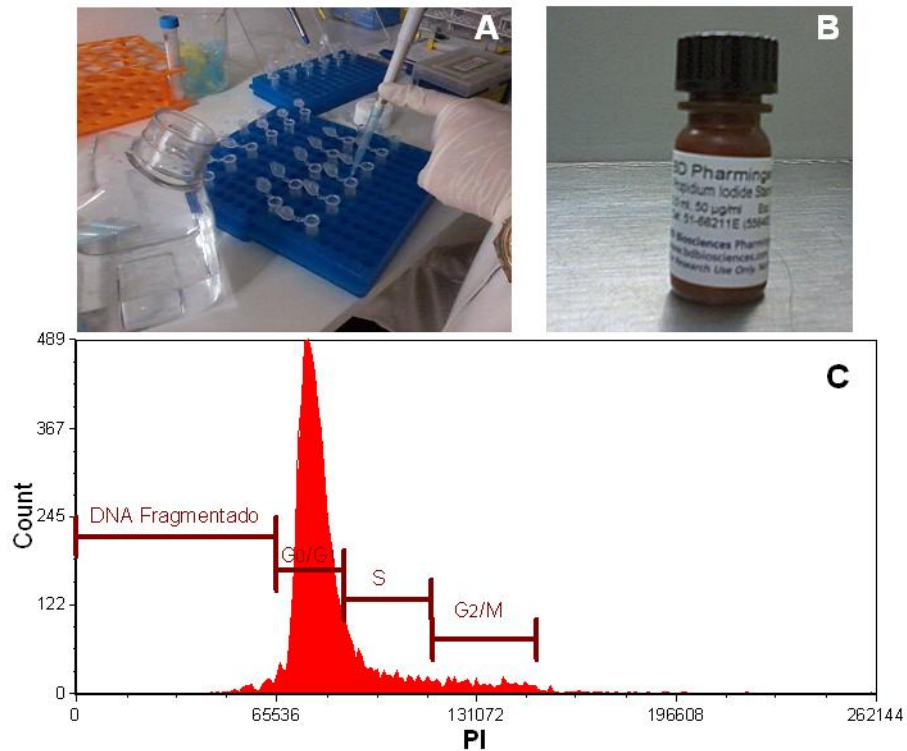


Figura 28: Análise do conteúdo de DNA pela marcação com iodeto de propídeo. A) Marcação das células, B) iodeto de propídeo, C) histograma típico representativo do ciclo celular avaliado por citometria de fluxo com o uso de PI.

5.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

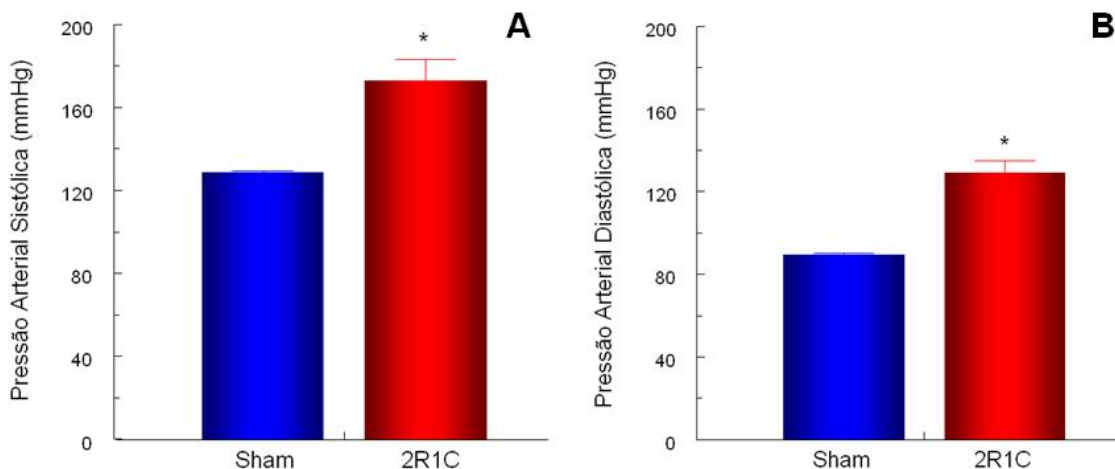
Os dados estão expressos como média±EPM. Os valores de pressão arterial, frequência cardíaca, medidas antropométricas, dosagem de angiotensina II e porcentagem de células positivas foram analisados por meio de Teste *t* de Student para medidas independentes. Já os valores de mediana da intensidade de fluorescência (MFI) foram comparados utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney. A análise estatística dos dados foi efetuada com o auxílio do *software* GraphPad Prism 5.0. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

Foram utilizados 10-12 animais divididos aleatoriamente em dois grupos: Sham (N=5) e 2R1C (N=5-7). Os animais do grupo 2R1C foram submetidos à cirurgia para colocação do clipe de aço ao redor da artéria renal esquerda, levando à hipertensão renovascular, enquanto que os animais do grupo Sham foram submetidos à mesma cirurgia, porém sem a colocação do clipe correspondendo a uma cirurgia fictícia.

6.1 MEDIDAS HEMODINÂMICAS

As medidas hemodinâmicas foram realizadas com os animais acordados, 14 dias após a cirurgia de indução da hipertensão renovascular (2R1C, N=5) ou a cirurgia fictícia (Sham, N=5). Conforme o esperado, verificamos que os animais 2R1C apresentaram pressão arterial sistólica (Sham: $129 \pm 0,7$ vs 2R1C: $173 \pm 10,7$ mmHg – Figura 29A), diastólica (Sham: $90 \pm 0,9$ vs 2R1C: $130 \pm 5,3$ mmHg - Figura 29B) e média (Sham: $103 \pm 0,8$ vs 2R1C: $144 \pm 5,6$ mmHg - Figura 29C) significativamente maior que os animais Sham, mostrando que a cirurgia realizada para indução da hipertensão renovascular foi bem sucedida.



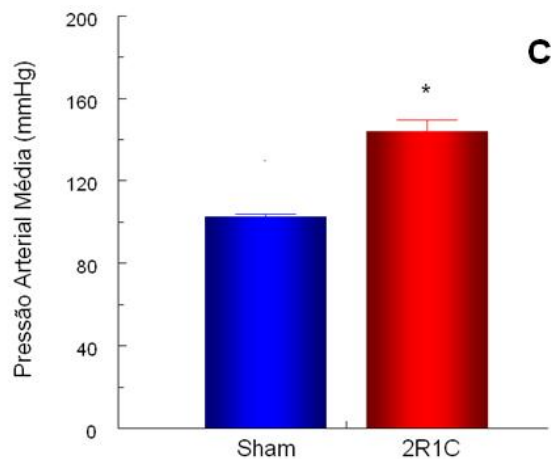


Figura 29: Valores basais da pressão arterial sistólica (A), diastólica (B) e média (C) de camundongos Sham e 2R1C após 14 dias de estenose da artéria renal esquerda. Os valores indicam média±EPM. * $p < 0,05$ vs. Sham (Teste t de Student).

Na figura 30, pode ser observado que nos animais 2R1C a hipertensão arterial foi acompanhada de taquicardia quando comparado aos animais normotensos (Sham: $483 \pm 20,3$ vs 2R1C: $612 \pm 38,0$ bpm).

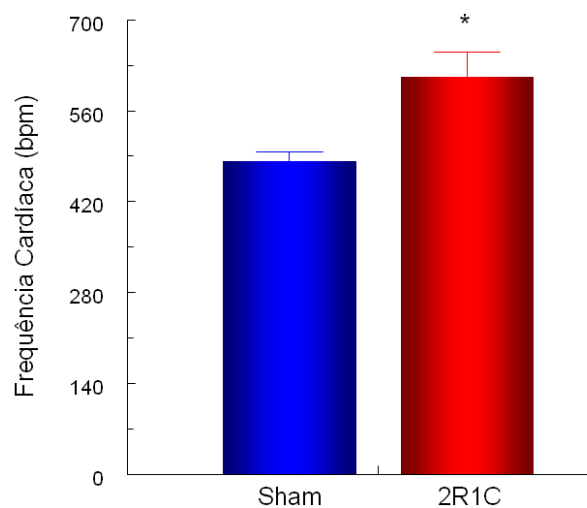


Figura 30: Valores basais de frequência cardíaca de camundongos Sham e 2R1C após 14 dias de estenose da artéria renal esquerda. Os valores indicam média±EPM. * $p < 0,05$ vs. Sham (Teste t de Student).

Além disso, os animais submetidos à cirurgia de indução de hipertensão renovascular apresentaram aumento de aproximadamente quatro vezes nos níveis

plasmáticos do octapeptídeo angiotensina II quando comparado com os animais do grupo Sham (Sham: 29 ± 3 vs 2R1C: 130 ± 3 pmol/ml) (Figura 31).

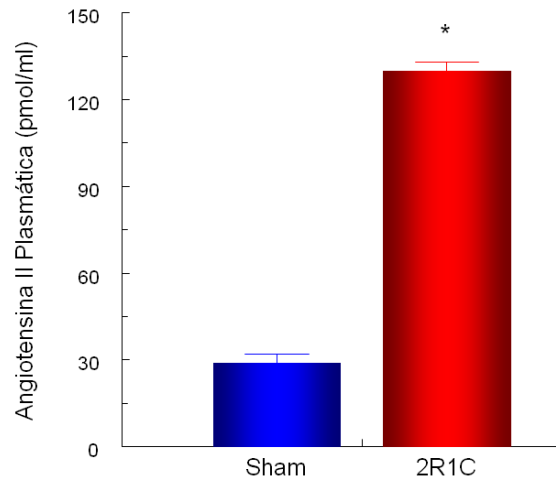


Figura 31: Gráfico de barras mostrando os efeitos da indução da hipertensão renovascular sobre os níveis de angiotensina II plasmática em camundongos Sham e 2R1C após 14 dias de estenose da artéria renal esquerda. Os valores indicam média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. Sham (Teste t de Student).

6.2 MEDIDAS BIOMÉTRICAS DO CORAÇÃO E RINS

Após 14 dias da cirurgia para indução da hipertensão renovascular, os animais 2R1C (N=5) e Sham (N=5) foram pesados, eutanasiados e os rins e coração foram removidos, pesados e colocados para desidratar em estufa à 37°C por 48h. A tabela 2 apresenta os valores obtidos nas análises antropométricas. Como pode ser observado, não houve diferença no peso corporal inicial entre os grupos (Sham: $23,2 \pm 0,1$ vs. 2R1C: $23,1 \pm 0,05$ g). Entretanto, ao final do experimento, ou seja, 14 dias após a indução da hipertensão renovascular, os animais do grupo 2R1C apresentaram diminuição do peso corporal comparado aos animais do grupo Sham (Sham: $24,8 \pm 0,13$ vs. 2R1C: $22,8 \pm 0,05$ g). Portanto, a hipertensão renovascular levou à perda de peso nos animais do grupo 2R1C.

Com relação ao peso dos órgãos, não houve diferença no peso ventricular entre os grupos. Entretanto, o índice de massa cardíaca, determinado pelo peso ventricular corrigido pelo peso corporal (PV/PC), mostrou que nos animais

hipertensos o índice é maior que nos normotensos (Sham: $1,03 \pm 0,04$ vs. 2R1C: $1,19 \pm 0,04$ mg/g), confirmando o desenvolvimento de hipertrofia ventricular nos animais do grupo 2R1C. O peso do rim direito dos animais 2R1C foi significativamente maior que dos animais Sham (Sham: $43,1 \pm 1,1$ vs. 2R1C: $50,7 \pm 0,8$ mg) indicando hipertrofia, enquanto que o peso do rim esquerdo foi significativamente menor indicando atrofia (Sham: $41,1 \pm 1,1$ vs. 2R1C: $22,4 \pm 0,1$ mg). Também é possível observar que nos animais 2R1C ocorreu diminuição da razão peso do rim esquerdo / peso do rim direito quando comparado aos animais Sham (Sham: $0,95 \pm 0,01$ vs. 2R1C: $0,44 \pm 0,02$), confirmando a hipertrofia renal direita e a atrofia renal esquerda, característicos do modelo.

Tabela 2 Peso corporal, peso seco cardíaco e renal 14 dias após a indução da hipertensão

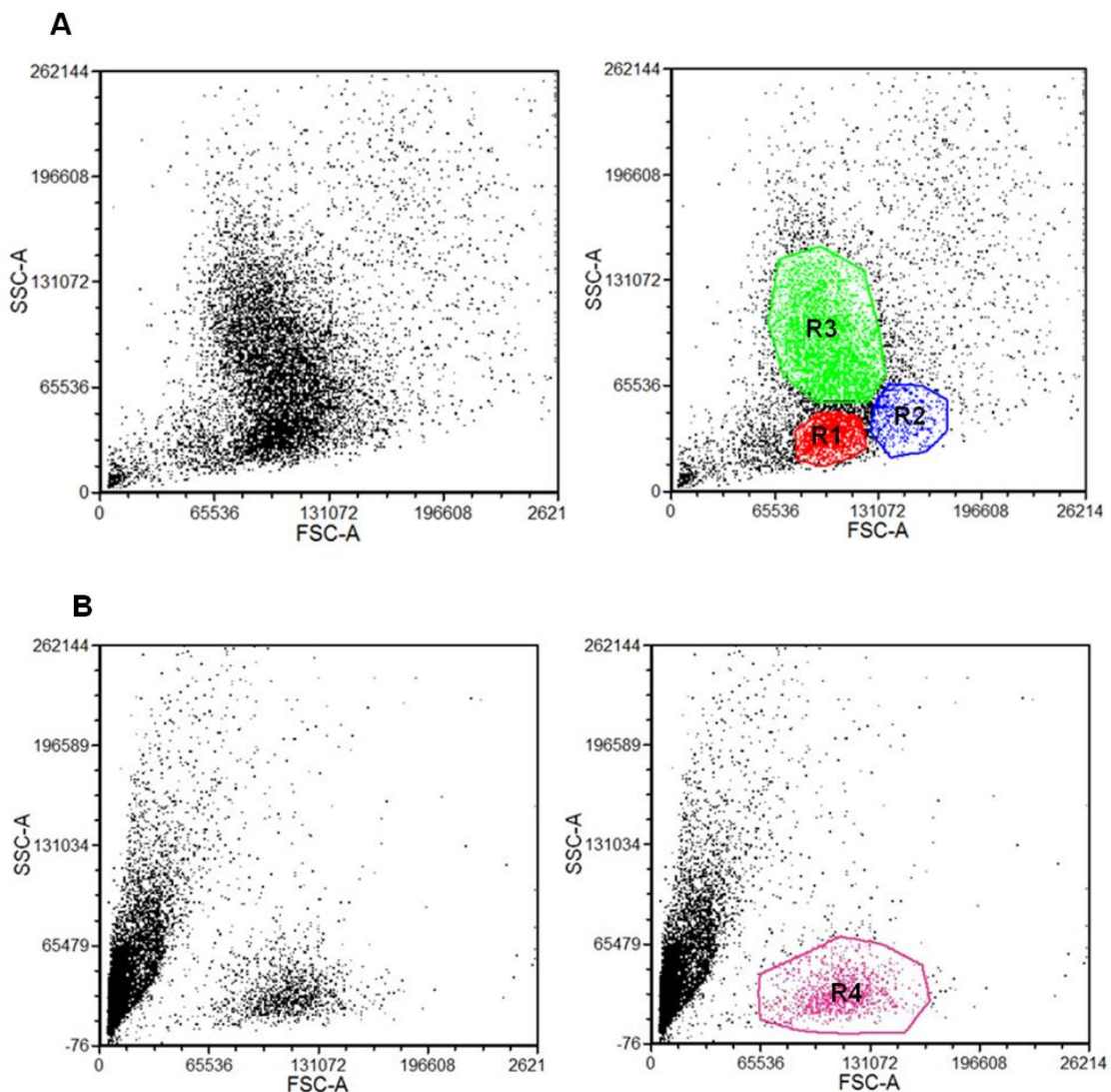
Parâmetros	Sham (n=7)	2R1C (n=7)
Peso Corporal inicial (g)	$23,2 \pm 0,08$	$23,1 \pm 0,05$
Peso Corporal final (g)	$24,8 \pm 0,13$	$22,8 \pm 0,05^*$
Peso Seco Coração (mg)	$25,6 \pm 1,0$	$27,1 \pm 0,9$
Índice Cardíaco (mg/g)	$1,0 \pm 0,04$	$1,2 \pm 0,04^*$
Peso Seco Rim Esquerdo (mg)	$41,1 \pm 1,0$	$22,4 \pm 0,9^*$
Peso Seco Rim Direito (mg)	$43,1 \pm 1,1$	$50,7 \pm 0,8^*$
Razão RE/RD	$0,95 \pm 0,01$	$0,44 \pm 0,02^*$

Nota: Valores expressos como média \pm EPM. RE: rim esquerdo, RD: rim direito. * $p < 0,05$ vs. Sham (Teste *t* de Student)

6.3 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para os estudos de citometria de fluxo foram utilizados 10-12 animais, sendo 5 normotensos (Sham) e 5-7 hipertensos (2R1C). As amostras coletadas foram analisadas em no máximo 2 horas, com exceção do protocolo para análise do conteúdo de DNA, já que as células precisavam ser fixadas. Os dados foram

coletados em triplicata e os resultados apresentados representam a média das três leituras realizadas pelo citômetro de fluxo. A figura 32 apresenta *dot plots* típicos dos dados referentes ao tamanho (FSC) e complexidade interna (SSC) de células do sangue (A), aorta (B) e medula óssea (C) de camundongos. As populações celulares de interesse foram identificadas através de *gates* eletrônicos coloridos. Nas amostras de sangue e medula óssea podemos identificar linfócitos (R1), monócitos (R2) e granulócitos (R3), enquanto que na amostra de aorta podemos identificar células endoteliais (R4). Nas amostras de sangue e medula óssea, foram avaliadas as três populações celulares simultaneamente, enquanto que nas amostras de aorta, apenas as células endoteliais foram analisadas.



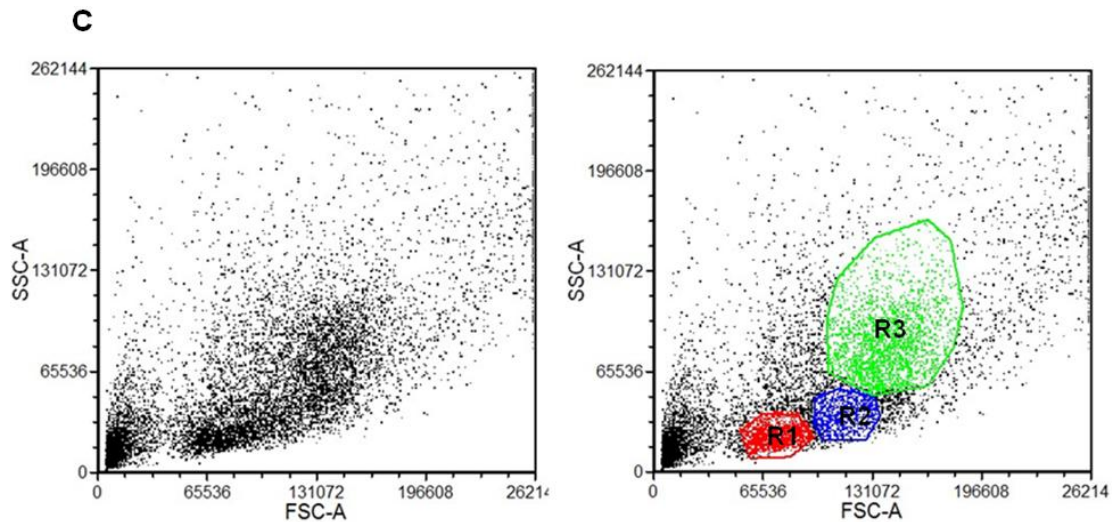


Figura 32: *Dot plots* ilustrativos de células de sangue (A), aorta (B) e medula óssea (C) de camundongos, com populações celulares específicas destacadas por *gates*. R1: linfócitos; R2: monócitos; R3: granulócitos; R4: células endoteliais. FSC: *Forward Scatter*, SSC: *Side Scatter*.

É importante destacar que os histogramas e *dot plots* apresentados tem por objetivo apenas ilustrar o que foi observado durante as análises por citometria de fluxo, ou seja, as populações celulares e suas diferentes respostas de intensidade de fluorescência obtidas para cada grupo estudado.

6.3.1 Identificação de células endoteliais isoladas da aorta torácica

É importante ressaltar que as amostras de aorta foram incubadas com o anticorpo específico para identificação de células endoteliais com objetivo exclusivo de confirmar a presença desta população celular na amostra. Para isso, após isolamento as células foram incubadas com anti-CD31-APC ou com seu controle de isotipo IgG2_a-APC e, como pode ser observado na figura 33, os dados adquiridos por citometria de fluxo confirmaram a presença de células endoteliais nas amostras isoladas da aorta torácica de camundongos. No histograma, o controle de isotipo está representado pela linha pontilhada e, como pode ser verificado na abscissa, não existem células emitindo fluorescência acima de 10^2 sendo este o limite de negatividade utilizado na técnica (M1). A marcação de células endoteliais com

CD31-APC está representada pela área rosa, sendo possível verificar a presença de células emitindo fluorescência entre 10^3 e 10^5 confirmando a existência de células endoteliais na amostra (M2).

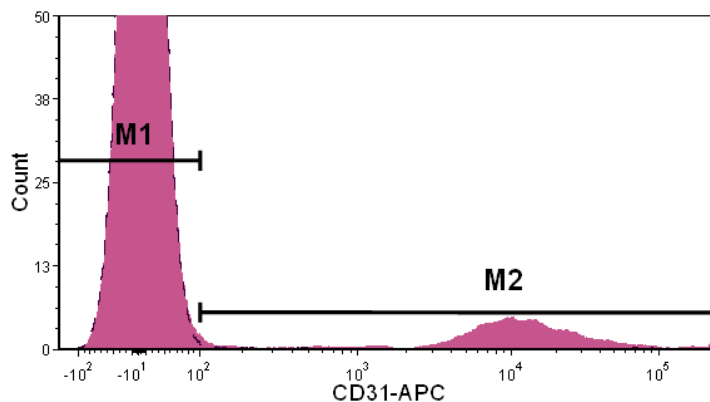


Figura 33: Identificação de células endoteliais por imunofenotipagem. Histograma demonstrando a expressão do antígeno de superfície CD31 (área rosa) e do controle de isotipo IgG_{2a} (linha pontilhada). M1: fluorescência negativa (controle); M2: fluorescência positiva (células endoteliais).

5.3.2 Conseqüências da hipertensão renovascular sobre a quantificação da concentração citoplasmática de espécies reativas de oxigênio

Para quantificação indireta da concentração citosólica de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , foi realizada a técnica de citometria de fluxo, utilizando-se células sanguíneas, endoteliais e de medula óssea de camundongos normotensos (Sham) e hipertensos (2R1C). Nas próximas figuras estão representados histogramas típicos ilustrativos dos dados referentes à mediana da intensidade de fluorescência (MFI: *median fluorescence intensity*) emitida pela ligação das sondas DHE e DCFH-DA com o $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , respectivamente, produzidos pelas células. Este valor, MFI, é fornecido pelo equipamento. Os histogramas apresentados têm por objetivo apenas ilustrar os dados adquiridos pelo citômetro de fluxo durante as análises, ou seja, as diferentes intensidades de fluorescências. As médias dos valores de MFI encontrados para cada grupo estão plotadas nos gráficos de barra. Além disso, são apresentados *dot plots* típicos das porcentagens de células sanguíneas, endoteliais e de medula

óssea positivas para cada marcador individual (DHE ou DCFH-DA) e simultaneamente (DHE+DCFH-DA). A análise foi realizada em triplicata sendo que em cada repetição 10000 células foram avaliadas. Portanto, todos os dados de citometria apresentados neste tópico foram obtidos a partir de análises feitas conforme descrito acima pelo citômetro de fluxo. Desta forma, os histogramas, gráficos de barra e *dot plots* correspondem aos níveis citoplasmáticos de ROS em células de sanguíneas, endoteliais e de medula óssea de animais com hipertensão renovascular (2R1C) e seus controles normotensos (Sham).

6.3.2.1 Em células sanguíneas

A figura 34 apresenta histogramas típicos que ilustram a MFI observada em células sanguíneas marcadas, respectivamente, com DHE (A) e DCFH-DA (B). Como pode ser observado, a MFI das células sanguíneas expostas tanto ao DHE quanto ao DCF apresentou-se deslocada para direita nos animais do grupo 2R1C (área vermelha) quando comparado aos animais do grupo Sham (linha azul), mostrando aumento da produção de ROS nestes animais.

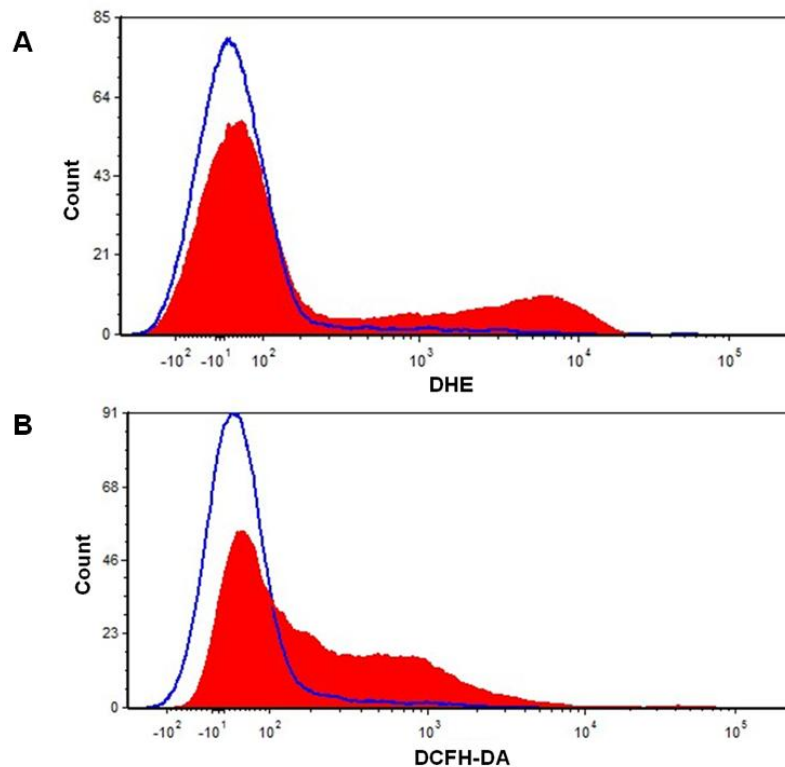


Figura 34: Efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em células sanguíneas de camundongos expostas ao DHE (A) e ao DCFH-DA (B). Histogramas representativos da MFI obtida para animais do grupo Sham (linha azul) e 2R1C (linha vermelha). As fluorescências do DHE e do DCFH-DA são proporcionais aos níveis intracelulares de O_2^\bullet e H_2O_2 , respectivamente. Os dados são representativos de um animal de cada grupo.

No gráfico de barras (figura 35) é possível observar que as células dos animais hipertensos apresentaram maior MFI para DHE (Sham: 941 ± 63 vs. 2R1C: 2155 ± 289 a.u.) e para DCF (Sham: 252 ± 23 vs. 2R1C: 531 ± 48 a.u.) quando comparados às células dos animais do grupo Sham. Estes dados confirmam aumento da produção de ROS levando ao estresse oxidativo em células sanguíneas de animais hipertensos.

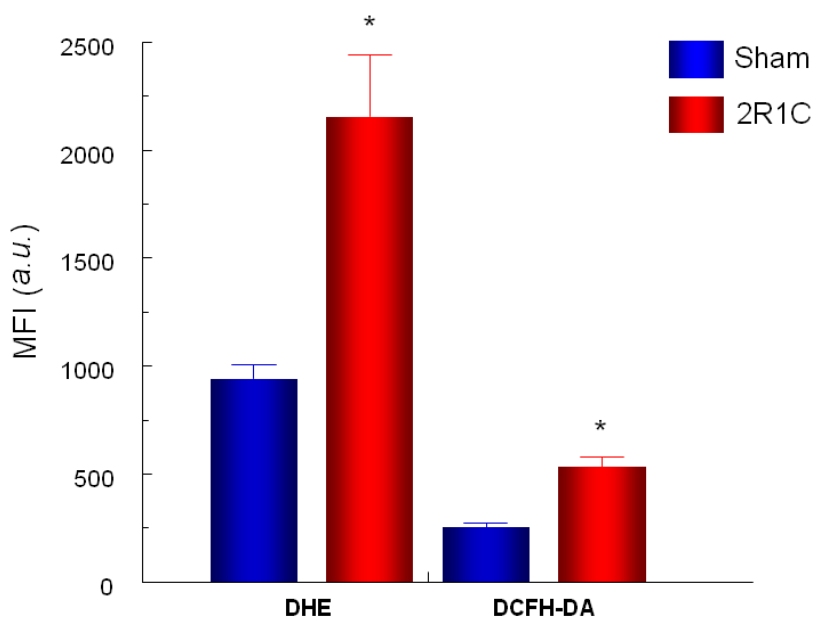


Figura 35: Gráfico de barras dos níveis de O_2^\bullet (fluorescência de DHE) e H_2O_2 (fluorescência de DCFH-DA) em células sanguíneas de camundongos hipertensos (2R1C) e normotensos (Sham). Os valores indicam $MFI \pm EPM$ de experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ vs. Sham (Mann-Whitney).

Além disso, a análise da porcentagem de células positivas para os marcadores utilizados mostrou que os animais 2R1C apresentam mais células

positivas para DHE (Sham: $15,87 \pm 3,3$ vs. 2R1C: $34,17 \pm 5,1$ %) e DCFH-DA (Sham: $1,43 \pm 0,2$ vs. 2R1C: $5,66 \pm 0,23$ %) quando comparado aos animais Sham. Analogamente, a marcação simultânea de DHE e DCFH-DA nas células sanguíneas mostrou que a porcentagem de células duplamente positivas foi maior nos animais do grupo 2R1C quando comparado aos animais do grupo Sham (Sham: $3,14 \pm 0,5$ vs. 2R1C: $9,97 \pm 2,5$ %) (Figura 36).

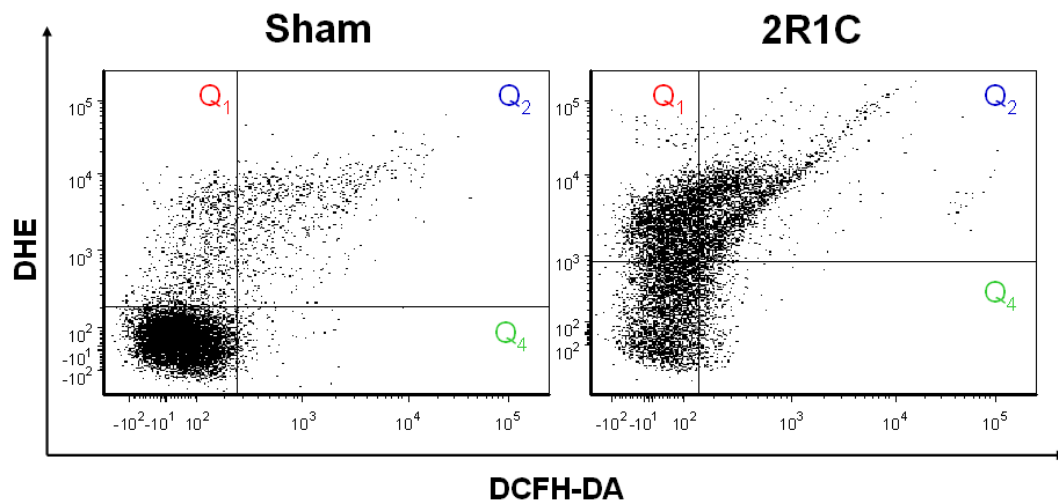


Figura 36: *Dot plots* típicos de células sanguíneas de camundongos Sham e 2R1C, incubadas com as sondas fluorescentes DHE e DCFH-DA. É possível observar aumento da porcentagem de células marcadas com DHE (Q_1), DCFH-DA (Q_4) e com os dois marcadores simultaneamente (Q_2) nos animais 2R1C. Q_1 : células DHE⁺; Q_2 : células DHE⁺/ DCFH-DA⁺; Q_4 : células DCFH-DA⁺. Os dados são representativos de um animal de cada grupo.

Portanto, os dados apresentados acima mostram que nas células sanguíneas de animais hipertensos a produção de $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , medidas pela fluorescência emitida pelo DHE e pelo DCFH-DA, respectivamente, está aumentada quando comparado aos animais normotensos.

6.3.2.2 Em células endoteliais

A figura 37 apresenta histogramas típicos que ilustram a MFI observada em células endoteliais de camundongos marcadas com DHE (A) e DCFH-DA (B). A MFI das células endoteliais expostas tanto ao DHE quanto ao DCFH-DA apresentou-se

deslocada para direita nos animais do grupo 2R1C (área vermelha) quando comparada aos animais do grupo Sham (linha azul), mostrando aumento da produção de ROS nestes animais, semelhante ao observado nas células sanguíneas.

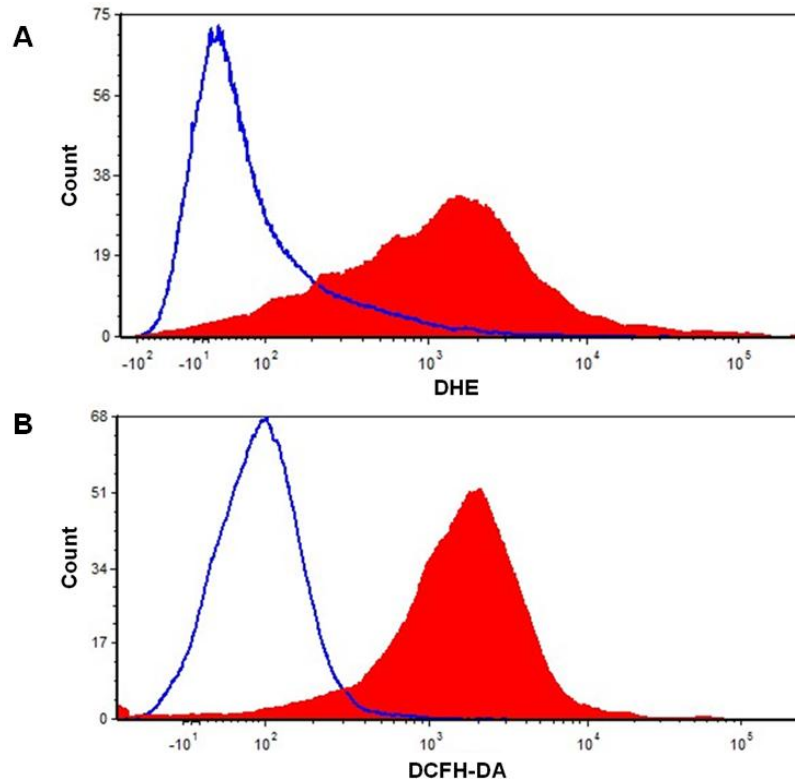


Figura 37: Efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em células endoteliais de camundongos. Histogramas representativos da MFI obtida para animais do grupo Sham (linha azul) e 2R1C (linha vermelha). As fluorescências do DHE e do DCFH-DA foram utilizadas para avaliar os níveis intracelulares de $O_2\cdot$ e H_2O_2 , respectivamente. Os dados são representativos de um animal de cada grupo.

Na figura 38, é possível observar no gráfico de barras que nos animais 2R1C as células endoteliais apresentaram maior MFI para DHE (Sham: 432 ± 51 vs. 2R1C: 2630 ± 184 a.u.) e para DCF (Sham: 300 ± 30 vs. 2R1C: 1049 ± 112 a.u.) quando comparadas às células dos animais do grupo Sham, confirmando o aumento da produção de ROS nos animais hipertensos.

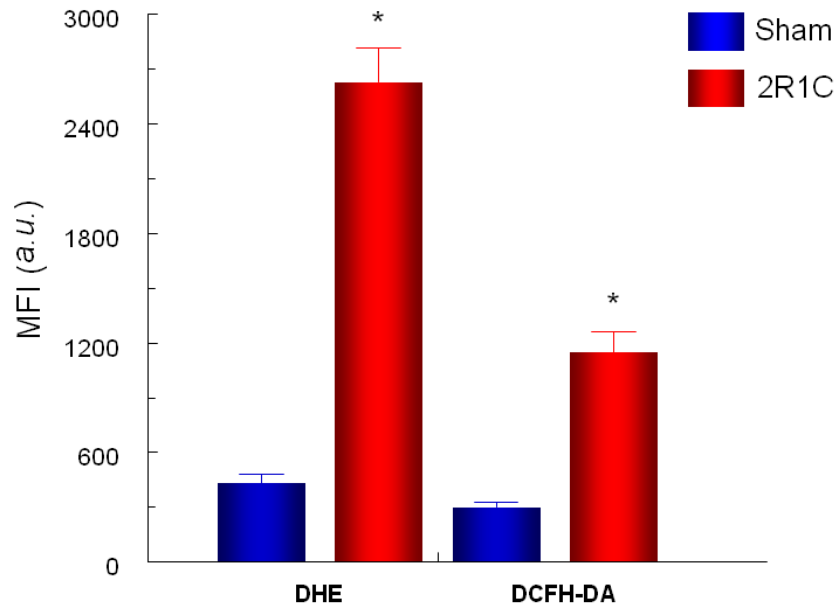


Figura 38: Gráfico de barras dos níveis de $O_2\bullet$ (fluorescência de DHE) e H_2O_2 (fluorescência de DCFH-DA) em células endoteliais de camundongos hipertensos (2R1C) e normotensos (Sham). Os valores indicam $MFI \pm EPM$ de experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ vs. Sham (Mann-Whitney).

Quando avaliamos a porcentagem de células endoteliais que foram positivas para as sondas fluorescentes utilizadas, observamos que os animais do grupo 2R1C apresentaram mais células positivas para DHE (Sham: $3,01 \pm 0,6$ vs. 2R1C: $22,19 \pm 1,4$ %) e DCFH-DA (Sham: $0,29 \pm 0,04$ vs. 2R1C: $2,58 \pm 0,2$ %) quando comparados aos animais do grupo Sham. Analogamente, a marcação simultânea de DHE e DCFH-DA nas células endoteliais mostrou que a porcentagem de células duplamente positivas foi maior nos animais hipertensos (2R1C) quando comparado aos normotensos (Sham) (Sham: $0,16 \pm 0,03$ vs. 2R1C: $1,11 \pm 0,06$ %) (Figura 39).

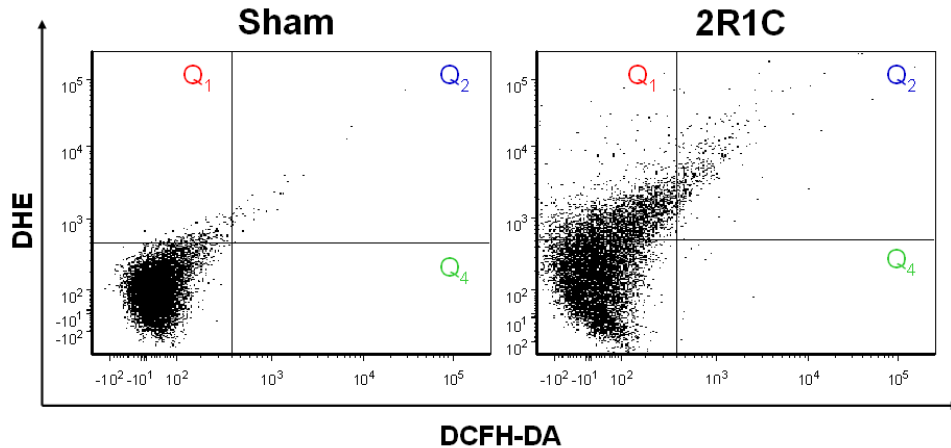


Figura 39: *Dot plots* típicos de células endoteliais de camundongos Sham e 2R1C incubadas com as sondas fluorescentes DHE e DCFH-DA. É possível observar aumento da porcentagem de células marcadas com DHE (Q₁), DCFH-DA (Q₄) e com os dois marcadores simultaneamente (Q₂) nos animais 2R1C. Q₁: células DHE⁺; Q₂: células DHE⁺/ DCFH-DA⁺; Q₄: células DCFH-DA⁺. Os dados são representativos de um animal de cada grupo.

Os dados apresentados acima mostram que a produção de O₂^{•-} e H₂O₂, nas células endoteliais medida pela fluorescência emitida pelo DHE e pelo DCFH-DA, respectivamente, é maior nos animais hipertensos quando comparado aos animais normotensos.

6.3.2.3 Em células da medula óssea

Nas células da medula óssea, semelhante ao observado nas amostras de sangue e de aorta, os histogramas típicos mostraram que os animais 2R1C apresentam maior MFI para DHE (Figura 40A) e DCFH-DA (Figura 40B) que os animais Sham, o que pode ser observado pelo deslocamento para direita da MFI nos animais do grupo 2R1C (área vermelha) quando comparada aos animais do grupo Sham (linha azul).

Além disso, o gráfico de barras confirma que nas células de medula óssea os animais do grupo 2R1C apresentaram aumento da marcação para DHE (Sham: 1309±175 vs. 2R1C: 12036±2205 *a.u.*) e para DCFH-DA (Sham: 2107±222 vs. 2R1C: 7517±1067 *a.u.*) quando comparados aos animais do grupo Sham. Estes

dados demonstram aumento da produção de ROS nos animais hipertensos (Figura 41).

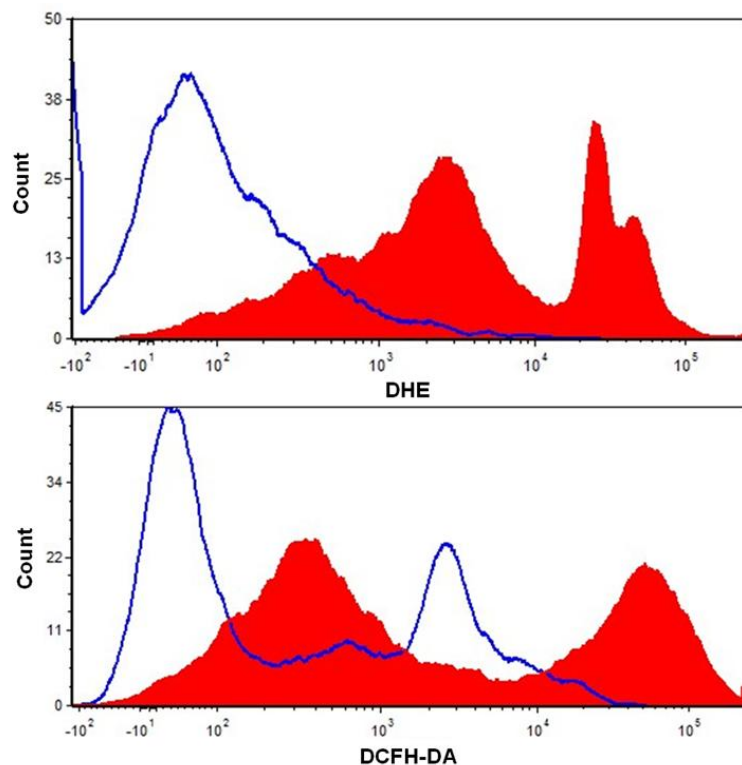


Figura 40: Efeito da hipertensão renovascular 2R1C sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em células de medula óssea de camundongos. Histogramas representativos da MFI obtida para animais do grupo Sham (linha azul) e 2R1C (linha vermelha). As fluorescências do DHE e do DCFH-DA foram utilizadas para avaliar os níveis intracelulares de $O_2\cdot$ e H_2O_2 , respectivamente.

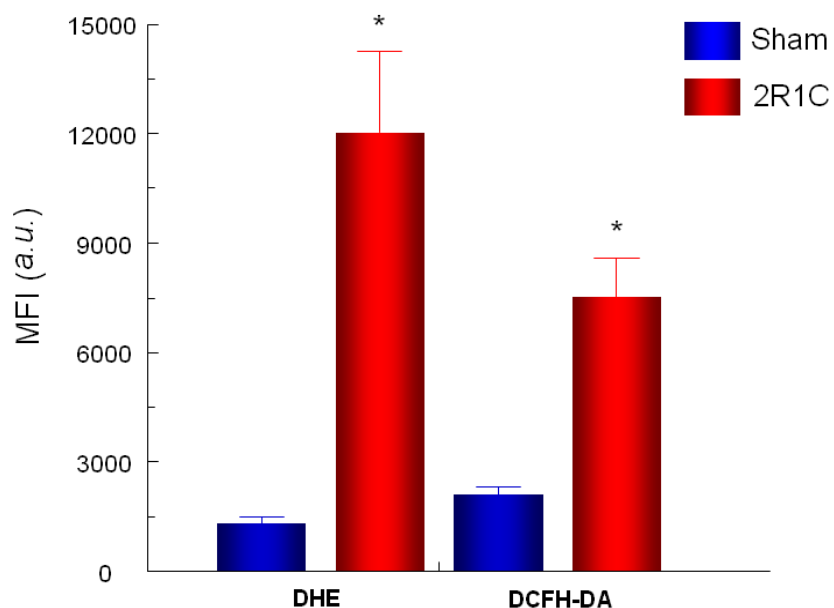


Figura 41: Gráfico de barras dos níveis de $O_2\cdot$ (fluorescência de DHE) e H_2O_2 (fluorescência de DCFH-DA-DA) em células de medula óssea de camundongos hipertensos (2R1C) e normotensos (Sham). Histogramas típicos mostrando a distribuição da fluorescência do DHE e do DCF-DA em células sanguíneas de camundongos. Os dados são representativos de um animal de cada grupo. Os valores indicam $MFI \pm EPM$ de experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ vs. Sham (Mann-Whitney).

De forma semelhante ao observado nas amostras de sangue e aorta, os animais 2R1C apresentam mais células positivas para DHE (Sham: $15,87 \pm 3,3$ vs. 2R1C: $34,17 \pm 5,1$ %) e DCFH-DA (Sham: $1,43 \pm 0,2$ vs. 2R1C: $5,66 \pm 0,23$ %) quando comparado aos animais Sham. A marcação simultânea de DHE e DCFH-DA nas células sanguíneas mostrou que a porcentagem de células duplamente positivas foi maior nos animais do grupo 2R1C quando comparado aos animais do grupo Sham (Sham: $3,14 \pm 0,5$ vs. 2R1C: $9,97 \pm 2,5$ %) (Figura 42).

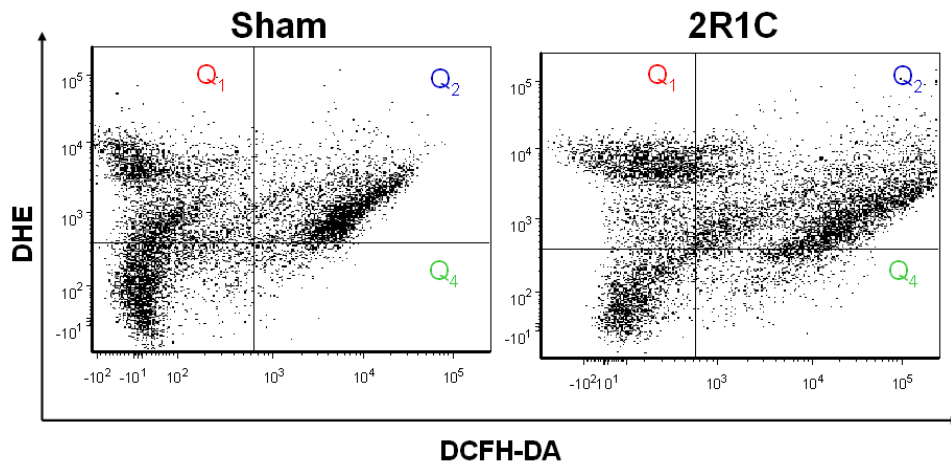


Figura 42: *Dot plots* típicos de células de medula óssea de camundongos Sham e 2R1C. É possível observar aumento da porcentagem de células marcadas com DHE (Q_1), DCFH-DA (Q_4) e com os dois marcadores simultaneamente (Q_2) nos animais 2R1C. Q_1 : células DHE⁺; Q_2 : células DHE⁺/ DCFH-DA⁺; Q_4 : células DCFH-DA⁺. Os dados são representativos de um animal de cada grupo.

Os dados apresentados acima mostram que, semelhante ao observado nas células sanguíneas e endoteliais, a produção de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 medida pela fluorescência emitida pelo DHE e pelo DCFH-DA, respectivamente, está aumentada nas células isoladas da medula óssea dos animais hipertensos quando comparado aos animais normotensos.

Portanto, nos animais com hipertensão renovascular, angiotensina II-dependente, a produção de espécies reativas de oxigênio nos três tipos celulares avaliados neste estudo está aumentada quando comparado aos animais normotensos mostrando, conseqüentemente, aumento do estresse oxidativo.

6.3.3 Conseqüências da hipertensão renovascular sobre apoptose e viabilidade celular

A análise de estresse oxidativo, mostrou aumento da produção de ROS nos animais hipertensos. Sabendo que as ROS desempenham papel importante na ativação de mecanismos indutores de apoptose, o próximo passo foi avaliar os efeitos da hipertensão renovascular sobre a viabilidade e apoptose em células de

sanguíneas, endoteliais e de medula óssea isoladas de camundongos hipertensos e compará-las com seus controles.

Para análise de viabilidade, apoptose e necrose em células sanguíneas, endoteliais e de medula óssea de camundongos normotensos (Sham) e hipertensos (2R1C), foi realizada a detecção da externalização de fosfatidilserina e da perda da integridade da membrana plasmática por citometria de fluxo utilizando a proteína anexina V conjugada à fluoresceína (FITC) e o marcador de viabilidade iodeto de propídeo (PI). Nas próximas figuras estão representados *dot plots* típicos ilustrativos dos dados referentes à porcentagem de células viáveis (sem marcação), inviáveis (positivas para PI), em estágio inicial de apoptose (positivas para Anexina V-FITC) e em estágio tardio/avançado de apoptose ou necrose (positivas para Anexina V-FITC e PI). Os *dot plots* apresentados têm por objetivo apenas ilustrar os dados adquiridos pelo citômetro de fluxo durante as análises, ou seja, as porcentagens de células encontradas em cada estado (vivas, apoptóticas e necróticas). A análise foi realizada em triplicata sendo que em cada repetição 10000 células foram avaliadas. As médias das porcentagens encontradas para cada grupo estão plotadas nos gráficos de barra. Desta forma, os *dot plots* e gráficos de barra correspondem às porcentagens de células viáveis, apoptóticas e necróticas observadas em amostras de células de sangue, aorta e medula óssea de animais hipertensos e normotensos.

6.3.3.1 Em células sanguíneas

A figura 43 apresenta os *dot plots* típicos, obtidos por citometria de fluxo, da análise de apoptose e viabilidade celular das células sanguíneas dos animais 2R1C e seus controles Sham. A tabela 3 apresenta as médias dos valores encontrados para os animais do grupo 2R1C e Sham obtidos na análise de apoptose / viabilidade de células sanguíneas. Estes valores também estão plotados no gráfico apresentado na figura 44.

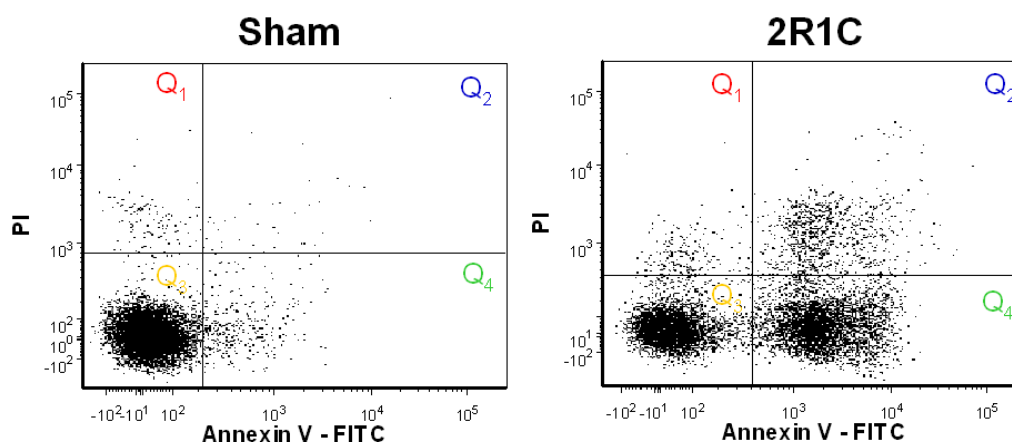


Figura 43: *Dot plots* típicos utilizados na análise dos efeitos apoptóticos da hipertensão renovascular sobre células sanguíneas. É possível observar aumento da porcentagem de células em Q₄ (estágio inicial de apoptose) e Q₂ (estágio tardio de apoptose ou necrose), assim como em Q₁ (inviáveis). Simultaneamente, ocorre diminuição da porcentagem de células em Q₃ (viáveis) nos animais do grupo 2R1C quando comparados aos animais Sham. Q₁: células PI⁺ / Anexina V-FITC⁻; Q₂: células PI⁺ / Anexina V-FITC⁺; Q₃: células PI⁻ / Anexina V-FITC⁻; Q₄: células PI⁻ / Anexina V-FITC⁺. Os dados são representativos de um animal de cada grupo.

Tabela 3: Viabilidade, apoptose e necrose de células sanguíneas de camundongos.

	Viáveis (Q ₃)	Inviáveis (Q ₁)	Apoptose Inicial (Q ₄)	Apoptose Tardia / Necrose (Q ₂)
Sham (n=5)	94,3±0,7%	2,5±0,7%	1,5±0,1%	1,6±0,2%
2R1C (n=7)	60,1±4,0%*	6,2±0,7%*	15,3±3,8%*	18,3±4,3%*

Nota: Valores expressos como média±EPM de experimentos realizados em triplicata.

*p<0,05 vs. Sham (Teste *t* de Student).

Como pode ser observado na tabela 3 e na figura 44, nos animais do grupo Sham foi observado que, em média, 94,3% das células eram viáveis, enquanto que as células em estagio inicial de apoptose perfizeram 1,5%. A porcentagem de células inviáveis e em estágio tardio de apoptose ou em necrose foi de 2,5 e 1,6%, respectivamente. Antagonicamente, os animais do grupo 2R1C apresentaram

diminuição de células viáveis (60,1%) com aumento simultâneo na porcentagem de células em estágio inicial de apoptose (15,3%), células inviáveis (6,2%) e células em estágio tardio de apoptose ou em necrose (18,3%).

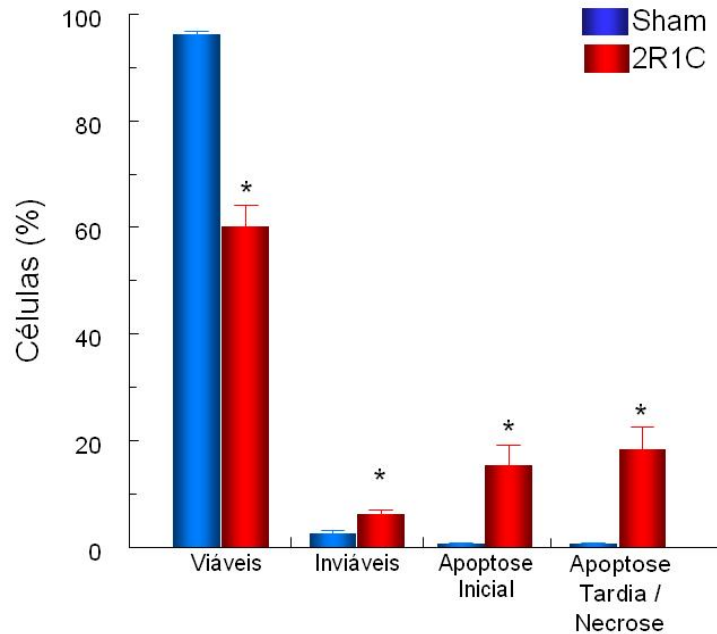


Figura 44: Porcentagem de células sanguíneas viáveis (sem marcação), inviáveis (marcadas com PI), em apoptose precoce (marcadas com Anexina V-FITC) e em estágio de apoptose tardia ou em necrose (duplamente marcadas). Os valores indicam média±EPM de experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ vs. Sham (Teste t de Student).

6.3.3.2 Em células endoteliais

A figura 45 apresenta os *dot plots* típicos de células endoteliais, obtidos por citometria de fluxo, para os animais 2R1C e seus controles Sham. A tabela 4 apresenta as médias dos valores encontrados para os marcadores de morte celular e viabilidade de células endoteliais isoladas da aorta de camundongos. Estes valores também estão plotados em um gráfico de barras (Figura 46).

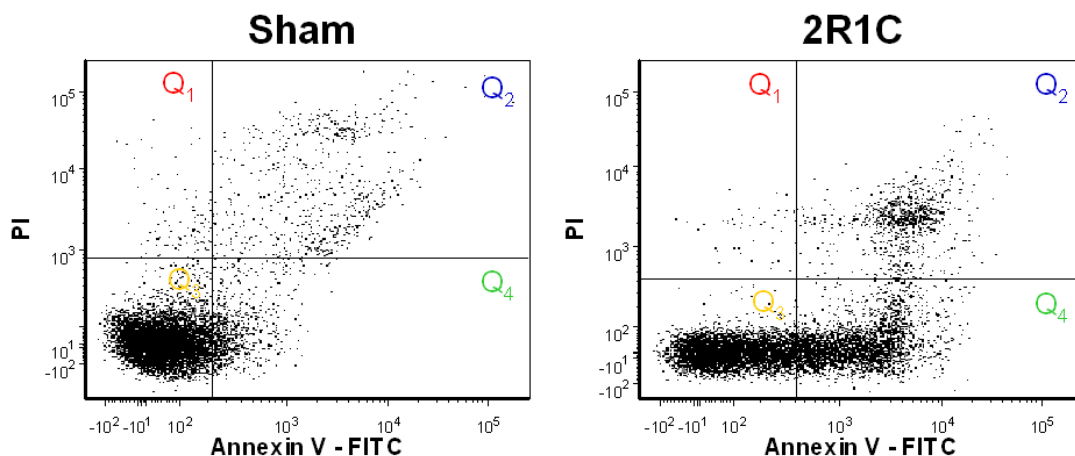


Figura 45: *Dot plots* típicos utilizados na análise dos efeitos apoptóticos da hipertensão renovascular sobre células endoteliais. É possível observar aumento da porcentagem de células em Q₄ (estágio inicial de apoptose) e Q₂ (estágio tardio de apoptose ou necrose), assim como em Q₁ (inviáveis). Simultaneamente, ocorre diminuição da porcentagem de células em Q₃ (viáveis) nos animais do grupo 2R1C quando comparados aos animais Sham. Q₁: células PI⁺/ Anexina V-FITC⁻; Q₂: células PI⁺ / Anexina V-FITC⁺; Q₃: células PI⁻ / Anexina V-FITC⁻; Q₄: células PI⁻ / Anexina V-FITC⁺. Os dados são representativos de um animal de cada grupo.

Tabela 4: Viabilidade, apoptose e necrose de células endoteliais de camundongos

	Viáveis (Q ₃)	Inviáveis (Q ₁)	Apoptose Inicial (Q ₄)	Apoptose Tardia / Necrose (Q ₂)
Sham (n=5)	79,2±2,9%	7,0±0,6%	1,2±0,2%	12,5±2,6%
2R1C (n=7)	39,1±3,1%*	8,6±0,4%*	21,1±3,0%*	31,2±2,4%*

Nota: Valores expressos como média±EPM de experimentos realizados em triplicata.

*p<0,05 vs. Sham (Teste *t* de Student).

Como pode ser observado na tabela 4 e na figura 46, os animais Sham apresentaram 79% de células viáveis e 7% de inviáveis. As células em estágio inicial de apoptose perfizeram 1,2% e as células em apoptose tardia/necrose 12,5%. Diferente do observado nos animais normotensos, a maior parte das células dos

animais 2R1C foi marcada por anexina V-FITC (Q2+Q4), sendo que 21,1% das células endoteliais isoladas de aorta estavam em estágio inicial de apoptose (positivas apenas para Anexina V-FITC) e 31,2% em estágio avançado de apoptose/necrose (duplamente positivas para Anexina V-FITC e PI), evidenciando processo de morte celular por apoptose. Além disso, observou-se aumento da porcentagem de células marcadas com iodeto de propídeo, caracterizando células inviáveis pela perda de integridade da membrana plasmática (Figura 46). Simultaneamente, os animais 2R1C apresentaram diminuição na porcentagem de células viáveis (39,1%).

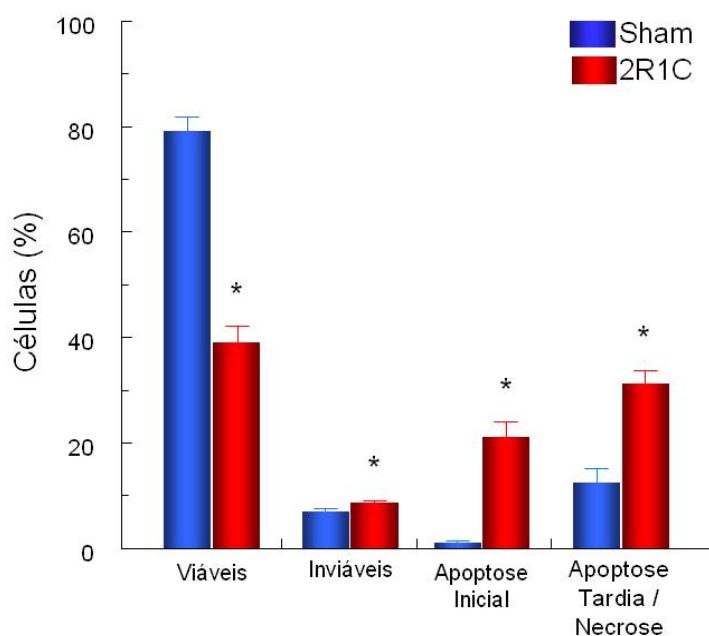


Figura 46: Porcentagem de células endoteliais viáveis (sem marcação), inviáveis (marcadas com PI), em apoptose precoce (marcadas com Anexina V-FITC) e em estágio de apoptose tardia ou em necrose (duplamente marcadas). Os valores indicam média±EPM de experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ vs. Sham (Teste *t* de Student).

6.3.3.3 Em células de medula óssea

A figura 47 apresenta os *dot plots* típicos, obtidos por citometria de fluxo, da análise de apoptose e viabilidade de células da medula óssea de animais com hipertensão renovascular (2R1C) e seus controles normotensos (Sham). A tabela 5

apresenta as médias dos valores encontrados para os animais dos grupos 2R1C e Sham, assim como a figura 48.

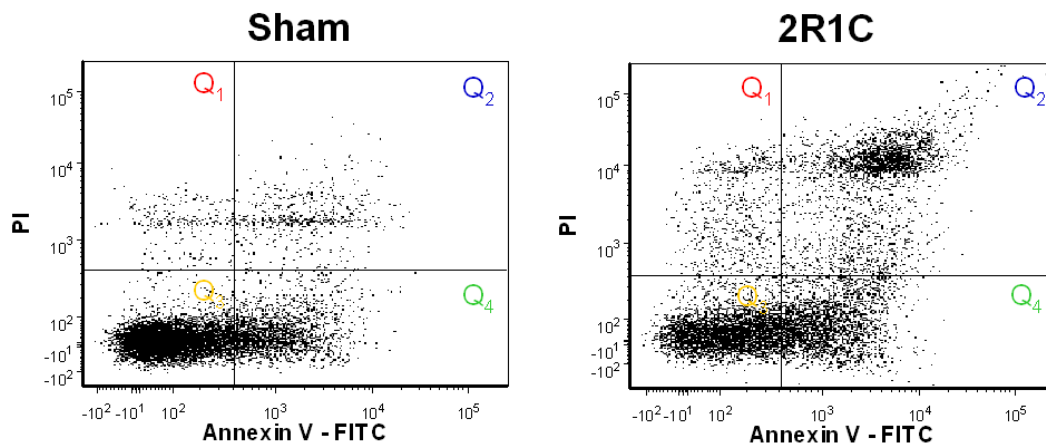


Figura 47: *Dot plots* típicos utilizados na análise dos efeitos apoptóticos da hipertensão renovascular sobre células de medula óssea. É possível observar aumento da porcentagem células em Q₄ (estágio inicial de apoptose) e Q₂ (estágio tardio de apoptose ou necrose), assim como em Q₁ (inviáveis). Simultaneamente, ocorre diminuição da porcentagem de células em Q₃ (viáveis) nos animais do grupo 2R1C quando comparados aos animais Sham. Q₁: células PI⁺/ Anexina V-FITC⁻; Q₂: células PI⁺ / Anexina V-FITC⁺; Q₃: células PI⁻ / Anexina V-FITC⁻; Q₄: células PI⁻ / Anexina V-FITC⁺. Os dados são representativos de um animal de cada grupo.

Tabela 5: Viabilidade, apoptose e necrose de células da medula óssea de camundongos

	Viáveis (Q₃)	Inviáveis (Q₁)	Apoptose Inicial (Q₄)	Apoptose Tardia / Necrose (Q₂)
Sham (n=5)	78,4±1,1%	2,9±0,5%	5,7±0,6%	12,9±1,1%
2R1C (n=7)	46,7±2,5%*	3,6±0,5%	22,5±2,5%*	27,2±2,5%*

Nota: Valores expressos como média±EPM de experimentos realizados em triplicata.
*p<0,05 vs. Sham (Teste *t* de Student).

A tabela 5 e a figura 48 apresentam dados de porcentagem obtidos na análise de viabilidade das células de medula óssea, identificando as células viáveis (Q₃) e

inviáveis (Q_1), em processo inicial de apoptose (Q_4) e tardio de apoptose ou em necrose (Q_2). Os animais do grupo 2R1C apresentaram diminuição na porcentagem de células viáveis (Q_3) (Sham: $78,4 \pm 1,1$ vs. 2R1C: $46,7 \pm 2,5$ %) e aumento simultâneo de células em processo em estágio inicial de apoptose (Q_2) (Sham: $5,7 \pm 0,6$ vs. 2R1C: $22,5 \pm 2,5$ %) e em estágio final de apoptose ou em necrose (Q_4) (Sham: $12,9 \pm 1,1$ vs. 2R1C: $27,2 \pm 2,5$ %) quando comparados aos animais do grupo Sham. Não houve diferença na porcentagem de células inviáveis (Q_1) entre os grupos (Sham: $2,9 \pm 0,5$ vs. 2R1C: $3,6 \pm 2,5$ %).

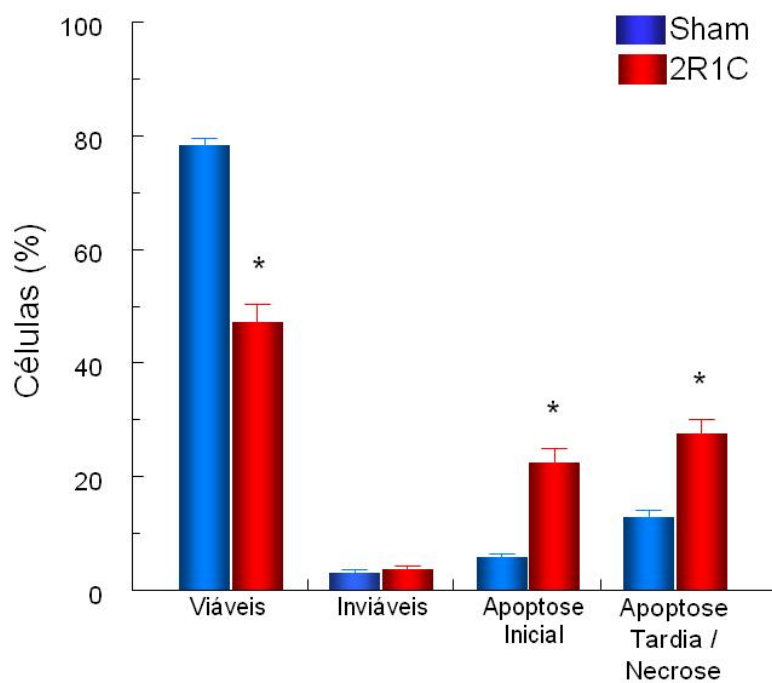


Figura 48: Porcentagem de células viáveis (sem marcação), inviáveis (marcadas com PI), em apoptose precoce (marcadas com Anexina V-FITC) e em estágio de apoptose tardia ou em necrose (duplamente marcadas) de células isoladas da medula óssea de camundongos. Os valores indicam média±EPM de experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ vs. Sham (Teste t de Student).

Portanto, os dados apresentados confirmam aumento de células apoptóticas e diminuição de células viáveis nos três tipos celulares avaliados neste estudo.

6.3.4 Conseqüências da hipertensão renovascular sobre o conteúdo de DNA

Uma população celular típica caracteriza-se por dois picos em G_0/G_1 e em G_2/M e um vale na fase S. As células na G_2/M apresentam o dobro da quantidade de DNA que a fase G_1/G_0 , sendo que a fase S apresenta quantidade variável de DNA. O conteúdo de DNA de cada célula foi mensurado por citometria de fluxo pela coloração com iodeto de propídeo (PI), e utilizado para estimar a distribuição de células nas diferentes fases do ciclo celular, sendo a fase sub- G_0/G_1 a de interesse por apresentar o DNA fragmentado.

Não foi possível determinar o conteúdo de DNA nas células sanguíneas e endoteliais, provavelmente por dificuldades metodológicas.

6.3.4.1 Nas células de medula óssea

A figura 49 apresenta um exemplo do *dot plot* utilizado para excluir *debris* da amostra a ser analisada. Assim, a análise do conteúdo de DNA foi realizada nas células que se encontravam dentro do *gate*.

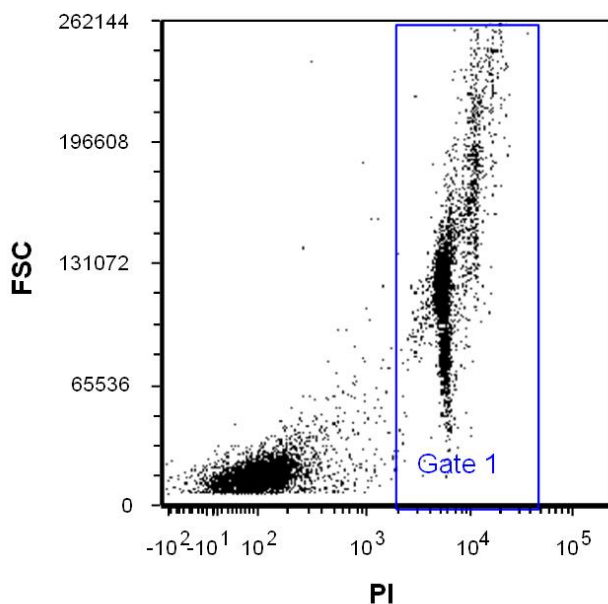


Figura 49: *Dot plot* utilizado para excluir *debris* celulares para posterior análise do conteúdo de DNA.

Após a seleção de células íntegras, foi realizada a análise de fragmentação do DNA. Como apresentado na figura 50 e na tabela 6, os animais hipertensos (2R1C) apresentaram aumento da porcentagem de células na região sub- G_0/G_1 quando comparado aos animais normotensos (Sham). Não houve diferença na porcentagem de células nas fases G_0/G_1 e S entre os grupos. Entretanto, houve diminuição na quantidade de células na fase G_2/M nos animais 2R1C quando comparado aos animais Sham.

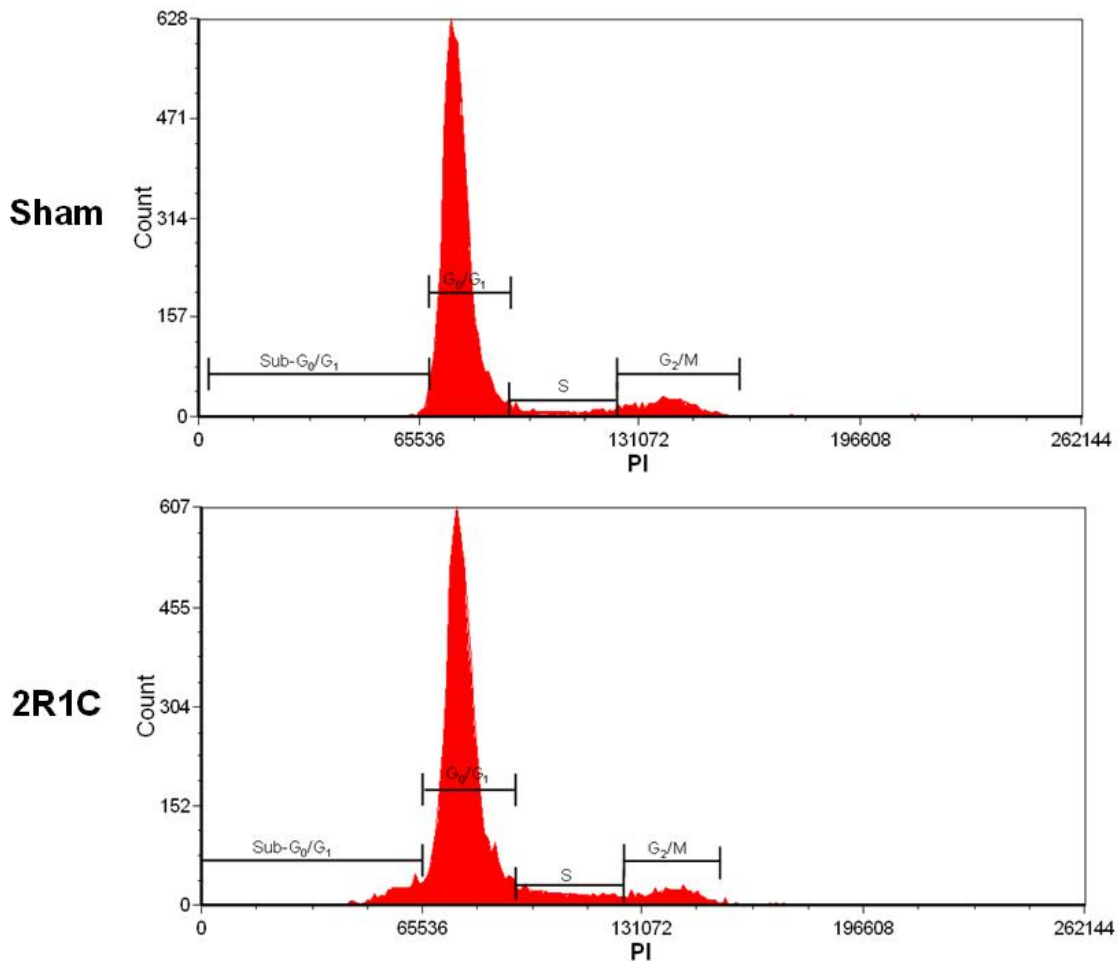


Figura 50: Análise do conteúdo de DNA e do ciclo celular. Histogramas produzidos pela análise por citometria de fluxo das células coradas com PI localizadas dentro do *gate*. A fluorescência relativa do PI está representada no eixo x e o número de células no eixo y.

Tabela 6: Distribuição de células da medula óssea nas diferentes fases do ciclo celular.

	Sub-G₀/G₁	G₀/G₁	S	G₂/M
Sham (n=5)	0,50±0,09%	80,28±0,55%	7,42±0,41%	11,34±0,77%
2R1C (n=5)	1,54±0,26%*	81,36±0,45%	8,65±0,65%	7,67±0,43%*

Nota: Valores expressos como média±EPM. *p<0,05 vs. Sham (Teste t de Student).

7 DISCUSSÃO

Estudos clínicos e epidemiológicos mostram que a hipertensão arterial, doença multifatorial e poligênica relacionada a mudanças morfológicas e funcionais no sistema cardiovascular, é caracterizada pelo aumento da pressão arterial ($PAS \geq 120$ mmHg; $PAD \geq 90$ mmHg) (Bertoia *et al.*, 2011), que acomete mais de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo (Roger *et al.*, 2012). Apesar do aumento de campanhas de conscientização, apenas 78% dos pacientes tem conhecimento de sua condição, sendo que destes 64% tem a doença sob controle (Roger *et al.*, 2012). Além disso, a hipertensão arterial é responsável pela grande taxa de morbimortalidade atribuída às doenças cardiovasculares, uma vez que é considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças graves como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, aterosclerose e insuficiência cardíaca e renal (Chrysochou & Kalra, 2009; Macêdo & Bortolotto, 2009; Ma *et al.*, 2012).

A hipertensão renovascular é a forma mais comum de hipertensão secundária e apresenta patogênese complexa. Na década de 30, Goldblatt e colaboradores (1934) desenvolveram o modelo de hipertensão renovascular 2R1C em cães. Posteriormente, Miksche e colaboradores (1970) estabeleceram o modelo 2R1C no rato e em 1997, Wiesel e colaboradores reproduziram o modelo 2R1C em camundongos. O modelo de hipertensão 2R1C se assemelha em muitos aspectos à hipertensão renovascular observada em humanos, pois o aumento da atividade do SRA desempenha papel fundamental no desenvolvimento, estabelecimento e manutenção da hipertensão.

No modelo de hipertensão renovascular 2R1C ocorre a diminuição crônica do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, da pressão de perfusão renal que causa a elevação dos níveis plasmáticos de angiotensina II que, por sua vez, acarreta em um aumento sustentado da pressão arterial, neste caso, nos animais clipados. Estudos mostram que a elevação da pressão arterial ocorre nos primeiros dias após o clampeamento da artéria renal e a PAS se mantém elevada por até 42 dias (Hiyoshi *et al.*, 2005; Salguero *et al.*, 2008). Nossos resultados mostraram que 14 dias após a cirurgia para indução de hipertensão, os animais 2R1C apresentaram aumento de pressão arterial, confirmando dados anteriores observados tanto em ratos (Melaragno & Fink, 1995) como em camundongos (Hilgers *et al.*, 2000; Hiyoshi *et al.*,

2005; Gava *et al.*, 2008, Salguero *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2012). Além disso, observamos que a hipertensão arterial foi acompanhada de taquicardia, semelhante ao descrito em outros estudos realizados em camundongos (Wiesel *et al.*, 1997; Madeddu *et al.*, 1998; Nogueira *et al.*, 2012).

O mecanismo pelo qual o SRA induz a hipertensão tem sido geralmente atribuído ao efeito vasoconstritor direto da angiotensina II, que é o efector chave deste sistema. A interação da angiotensina II com receptores AT₁ encontrados nos vasos, eleva a pressão arterial devido à potencialização da ação vasoconstritora deste peptídeo. A angiotensina II também pode elevar a pressão arterial pela potencialização do sistema envolvendo noradrenalina nas terminações nervosas simpáticas que inervam os vasos (Guyton & Hall, 2006). Estas ações em conjunto levam ao aumento da resistência vascular periférica (Heeneman *et al.*, 1997). Além disso, a angiotensina II aumenta a produção de hormônio antidiurético (ADH) pela glândula pituitária e atua no córtex adrenal estimulando a secreção de aldosterona. Estes hormônios em conjunto causam o aumento da reabsorção de sódio e da retenção de água no rim, levando ao aumento do volume sanguíneo. O aumento da resistência vascular periférica e da volemia são os principais responsáveis pela elevação da pressão arterial neste modelo.

Sabe-se que no modelo de hipertensão renovascular 2R1C ocorre elevação dos níveis de renina plasmática (Wiesel *et al.*, 1997) 7 dias após a implantação do clipe (Hiyoshi *et al.*, 2005; Salguero *et al.*, 2008), sendo as concentrações mais altas observadas entre 14-28 dias de estenose da artéria renal esquerda (Hiyoshi *et al.*, 2005). Além disso, também ocorre aumento dos níveis plasmáticos de angiotensina II, 3 (Lazartigues *et al.*, 2004) e 6 (Cervenka *et al.*, 2008) dias após a cirurgia para indução da hipertensão renovascular em camundongos. Estes autores também observaram aumento da concentração intra-renal de angiotensina II tanto no rim clipado como no contralateral. Estudo de nosso laboratório publicado recentemente, mostra que neste modelo de hipertensão os níveis plasmáticos de angiotensina II são 4 vezes maiores nos animais 2R1C quando comparados com seus controles normotensos Sham (Nogueira *et al.*, 2012), confirmando que o modelo 2R1C em camundongos apresenta elevação dos níveis plasmáticos de angiotensina II 14 dias após a obstrução parcial da artéria renal.

No estudo realizado por Wiesel e colaboradores (1997) eles observaram que a abertura do clipe é essencial para que os animais desenvolvam hipertensão sem

infarto renal o que é diferente do que ocorre em ratos, nos quais é possível alcançar diferentes níveis de hipertensão dependendo da abertura do clipe utilizado. Os pesquisadores demonstraram que em camundongos estudados 14 dias após a implantação do clipe ao redor da artéria renal e com peso aproximado de 23g, cliques com 0,12 mm de abertura eram capazes de induzir hipertensão sem causar infarto renal significativo, enquanto que cliques com 0,11 mm de abertura causavam aproximadamente 40% de infarto renal e cliques com 0,13 mm não eram capazes de obstruir mais de 70% do fluxo sanguíneo renal e, desta forma, não induziam hipertensão. Portanto, assim como observado em outros estudos desenvolvidos em camundongos (Salguero *et al.*, 2008; Nogueira *et al.*, 2012), a utilização de um clipe com abertura fixa de 0,12 mm em animais com aproximadamente 23g foi essencial para o desenvolvimento de hipertensão renovascular 2R1C.

Foi observado neste estudo que o peso corporal inicial dos animais, ou seja, registrado no dia da cirurgia para indução da hipertensão, não foi diferente entre os grupos, semelhante ao observado em outros estudos (Arruda *et al.*, 2005; Peotta *et al.*, 2007; Gava *et al.*, 2008). Entretanto, nossos resultados apontam que após 14 dias de hipertensão, os animais 2R1C apresentaram perda de peso corporal. Provavelmente, o processo de estabelecimento da hipertensão levou à perda de peso nos animais hipertensos, semelhante ao observado em camundongos (Nogueira *et al.*, 2012) e ratos (Prieto-Carrasquero *et al.*, 2008).

A hipertrofia cardíaca é uma das principais conseqüências da hipertensão arterial e pode ser induzida tanto por fatores mecânicos como hormonais. É definida como o aumento da massa ventricular tipicamente caracterizado pelo aumento do tamanho dos cardiomiócitos juntamente com a fibrose cardíaca, isto é, a formação excedente de tecido conectivo (Swynghedauw, 1999). Na hipertrofia cardíaca os cardiomiócitos passam por mudanças moleculares importantes. Sabe-se que a hipertensão sustentada leva o miocárdio a se adaptar ao aumento de carga e esta resposta adaptativa consiste no aumento da síntese protéica que resulta, eventualmente, no aumento da massa cardíaca (Frohlich *et al.*, 1992; Belichard *et al.*, 2008).

Durante o desenvolvimento da hipertensão 2R1C, o SRA desempenha papel importante no remodelamento cardíaco, ou seja, no aumento da massa ventricular (Lee *et al.*, 2006). A angiotensina II, principal efector do SRA, estimula a síntese de proteínas específicas nas células cardíacas, levando ao estabelecimento da

hipertrofia através da ativação de diferentes vias de sinalização (Sadoshima & Izumo, 1993; Oro *et al.*, 2007; Barry *et al.*, 2008). Além disso, estimula a transcrição de genes que codificam proteínas que normalmente não são expressas no coração de indivíduos adultos, por exemplo, peptídeos natriuréticos e isoformas fetais de proteínas contráteis como a α -actina esquelética (Izumo *et al.*, 1988; Swynghedauw, 1999; Akazawa & Komuro, 2003; Bell *et al.*, 2004). No presente estudo, ao analisar o índice cardíaco, observamos aumento de aproximadamente 20% na massa ventricular dos animais hipertensos, confirmando a hipertrofia cardíaca 14 dias após a indução da hipertensão renovascular 2R1C, semelhante a dados anteriores de nosso Laboratório recentemente publicados (Nogueira *et al.*, 2012).

A hipertrofia cardíaca representa uma característica marcante da hipertensão arterial, sendo observada em diversos modelos animais de hipertensão 2R1C (Peotta *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 2011). Nossos dados sugerem que a presença de hipertrofia ventricular nos animais do grupo 2R1C indica que 14 dias são suficientes para estimular a produção de proteínas cardíacas utilizadas como marcadores de hipertrofia ventricular, como a α -actina, e desta forma, causar aumento da massa ventricular.

Outra característica inerente ao modelo de hipertensão renovascular 2R1C reside em mudanças renais (Amiri & Garcia, 1997; Pereira *et al.*, 2009; Matavelli *et al.*, 2011). A análise da razão entre os pesos do rim esquerdo / rim direito mostrou que nos animais submetidos à estenose de artéria renal ocorre diminuição da massa do rim esquerdo (clipado), que atrofia e, simultaneamente, aumento da massa do rim direito (não-clipado) que hipertrofia. Este resultado indica que o rim contra-lateral (não-clipado), por estar intacto, é capaz de prevenir que ocorra aumento do volume sanguíneo e, conseqüentemente, elevações adicionais na pressão arterial dos animais. Outros trabalhos desenvolvidos em nosso Laboratório corroboram os dados observados no presente estudo sugerindo que o clipe com 0,12mm de abertura obstrui mais de 70% do fluxo sanguíneo renal levando à hipertensão renovascular e, conseqüentemente, sucesso do procedimento cirúrgico (Gava *et al.*, 2008; Nogueira *et al.*, 2012).

Para entender a patogênese e estudar o tratamento e a prevenção de uma doença, é bastante útil o desenvolvimento de modelos animais. No passado, a maioria dos estudos em hipertensão experimental era realizada em cães, porém atualmente esses estudos são desenvolvidos preferencialmente em murinos. Um

modelo animal ideal de hipertensão deve ser de fácil execução e uniformemente reproduzido em animais pequenos, além de ser comparável a alguma forma de hipertensão humana (Badyal *et al.*, 2003). O modelo 2R1C foi adaptado a camundongos em 1997 por Wiesel e colaboradores que verificaram que em animais com aproximadamente 20g, a implantação de um clipe de aço ao redor da artéria renal esquerda era capaz de induzir hipertensão quando a abertura do clipe utilizado era de 0,12 mm. Por outro lado, cliques com 0,11 e 0,13 mm de abertura levavam ao infarto renal e não induziam à hipertensão, respectivamente. Desta forma, os pesquisadores verificaram que o clipe ideal para induzir hipertensão renovascular em camundongos deve ter 0,12 mm de abertura, pois é capaz de reduzir consideravelmente o fluxo sanguíneo renal. Com base nos dados observados no trabalho de Wiesel e colaboradores (1997), em nosso laboratório o modelo 2R1C vem sendo estudado com sucesso em camundongos das linhagens C57BL/6 (Peotta *et al.*, 2007; Gava *et al.*, 2008; Campagnaro *et al.*, 2012; Nogueira *et al.*, 2012) e ApoE-KO (Arruda *et al.*, 2005; Nogueira *et al.*, 2008) 14 e 28 dias após a implantação do clipe com 0,12 mm de abertura ao redor da artéria renal esquerda. Portanto, o desenvolvimento do modelo 2R1C está padronizado em nosso Laboratório e mostra elevação da pressão arterial, hipertrofia renal direita e atrofia renal esquerda, além de elevação dos níveis plasmáticos de angiotensina II.

Um estudo muito interessante realizado por Oikawa e colaboradores em 2010, serviu de inspiração para a idealização deste trabalho. Nele, os autores avaliaram o impacto do diabetes sobre o microambiente medular e a homeostase da medula óssea em camundongos diabéticos. Os resultados obtidos mostraram aumento da produção de ROS, de apoptose e de fragmentação no DNA das células de medula óssea de camundongos diabéticos quando comparados aos controles. Para obter estes resultados, os autores utilizaram a citometria de fluxo para avaliar o estresse oxidativo e a apoptose através dos ensaios de DCFH-DA e anexina V, respectivamente. Já a fragmentação do DNA foi avaliada por imunohistoquímica. Desta forma, os resultados obtidos neste estudo mostraram interação entre os parâmetros avaliados, ou seja, o estresse oxidativo está diretamente relacionado com a apoptose e com a fragmentação no DNA. Levando em consideração que diabetes e hipertensão são doenças cardiovasculares muito comuns e que os indivíduos acometidos por estas doenças desenvolvem estresse oxidativo, resolvemos avaliar os efeitos de um modelo de hipertensão angiotensina II-

dependente que, sabidamente apresenta aumento da produção de ROS, sobre apoptose e fragmentação no DNA.

Nas últimas décadas, o papel do SRA na patogênese da hipertensão renovascular tem sido extensivamente estudado e descrito por ser considerado um importante mediador da hipertensão e dos danos causados aos órgãos-alvo pela mesma. Inicialmente, o SRA era considerado apenas um sistema endócrino, tendo como efector chave a angiotensina II, capaz de exercer suas ações em órgãos-alvo distantes do local de sua produção principalmente através de seus receptores do tipo AT₁. Entretanto, a rápida expansão de técnicas de biologia molecular possibilitou a determinação da distribuição tecidual de seus componentes, o que levou a descoberta de SRA teciduais em órgãos como cérebro (Morimoto *et al.*, 2002), coração (Lindpaintner *et al.*, 1987; Cohn & Tognoni, 2001), tecido vascular (Campbell & Habener, 1987; Dzau, 1988; Samani & Swales, 1991; Ruiz-Ortega *et al.*, 2001b), rim (Sollott *et al.*, 1987; Cheng *et al.*, 1995; Rohrwasser *et al.*, 1999) e medula óssea (Abali *et al.*, 2002; Strawn *et al.*, 2004), desempenhando função autócrina, parácrina e até mesmo intrácrina, em situações patofisiológicas (Carey *et al.*, 2003). Os SRA teciduais permitem a síntese local dos peptídeos deste sistema além de desempenhar papel fundamental na patogênese da hipertensão, explicando os efeitos terapêuticos de inibidores da ECA e de antagonistas de receptor AT₁ quando os níveis plasmáticos de angiotensina II não estão elevados (McInnes, 2001). Portanto, considerando que o SRA é encontrado na circulação e também parede dos vasos sanguíneos e medula óssea, no presente estudo foram avaliadas células endoteliais, sanguíneas e da medula óssea de camundongos hipertensos.

Surgem cada vez mais evidências de que problemas estruturais e funcionais observados nos vasos sanguíneos, como disfunção endotelial, aumento do estresse oxidativo e diminuição da atividade antioxidante, contribuem para a patogênese da hipertensão (Grossman, 2008). O endotélio vascular constitui o principal alvo dos fatores de risco cardiovascular, especialmente da hipertensão, visto que possui papel central na regulação do tônus vascular e do fluxo sanguíneo, podendo ser considerado o maior sistema autócrino, parácrino e endócrino do organismo humano. Além disso, responde a vários estímulos, produzindo e secretando um grande número de compostos metabolicamente ativos, além de modular ou inibir os efeitos de substâncias circulantes (Higashi *et al.*, 2009). Em resposta a estes estímulos, as células endoteliais alteram suas propriedades, visando à manutenção

do equilíbrio vascular. Normalmente, as alterações fenotípicas das células são transientes e não comprometem o restabelecimento da função endotelial. Contudo, em algumas situações patológicas, como na hipertensão, a função endotelial é cronicamente comprometida, contribuindo de forma significativa para o estabelecimento da doença (Dasgupta & Zhan, 2011). Existem vários mecanismos envolvidos na disfunção endotelial associada à hipertensão, entre eles podemos destacar a ativação do SRA que aumenta a síntese de angiotensina II. Esta, por sua vez, via receptores AT₁ localizados nas células endoteliais, aumenta a produção de ROS que inativam o NO e aumentam a expressão gênica de agentes pró-inflamatórios (Cai & Harrison, 2000; Taniyama & Griendling, 2003; Touyz, 2003; Touyz *et al.*, 2003; Schulz *et al.*, 2011).

A parede das grandes artérias é formada por três camadas histologicamente distintas compostas por tipos celulares diferentes (Ross & Glomsed, 1976) desta forma, é necessário utilizar marcadores específicos para identificar as células de interesse. As células endoteliais expressam o antígeno de superfície CD31 (PECAM-1: *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*) que é, portanto, bastante utilizado na sua identificação (Bucciarelli *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2010). Neste estudo, utilizamos o anticorpo anti-CD31 conjugado ao fluorocromo alofocianina (APC) com o objetivo de identificar células endoteliais por citometria de fluxo. Os resultados obtidos mostram que células mecanicamente isoladas da aorta torácica de camundongos foram positivas para o marcador CD31-APC, confirmando a presença de células endoteliais na amostra.

A relação entre estresse oxidativo e aumento da pressão arterial foi demonstrado em vários modelos de hipertensão experimental e genética, como os modelos SHR (Wind *et al.*, 2010); DOCA-sal (Somers *et al.*, 2000; Beswick *et al.*, 2001), 2R1C (Heitzer *et al.*, 1999; Salgueiro *et al.*, 2008) e 1R1C (Dobrian *et al.*, 2001) que apresentam produção excessiva de O₂^{•-} devido ao aumento da atividade da enzima NAD(P)H oxidase (Griendling *et al.*, 1994; Rajagopalan *et al.*, 1996; Beswick *et al.*, 2001; Dzau, 2001; Landmesser & Harrison, 2001; Higashi *et al.*, 2002; Mollnau *et al.*, 2002; Lassegue & Clempus, 2003; Touys *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 2008) que pode ser ativada tanto por forças hemodinâmicas como por agonistas vasoativos, como a angiotensina II (Griendling & Fitzgerald, 2003a; 2003b).

As células vasculares produzem grandes quantidades de ROS, principalmente O₂^{•-} e H₂O₂, que funcionam como importantes sinalizadores

intracelulares, desregulando processos biológicos e levando às alterações estruturais e funcionais observadas na hipertensão (Zalba *et al.*, 2000).

Muitos métodos tem sido utilizados para análise de estresse oxidativo através da quantificação de ROS (Câmera & Picardo, 2002; Tarpey *et al.*, 2004; Palmieri & Sblendorio, 2007; Li *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012b). A produção de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 pode ser avaliada utilizando sondas fluorescentes através de ensaios de microscopia, quimiluminescência e citometria de fluxo. Os níveis de $O_2^{\bullet-}$ podem ser medidos através da fluorescência emitida pelo etídeo, que é produto da oxidação do dihidroetídeo (DHE) (Sharikabad *et al.*, 2001). Enquanto que os níveis de H_2O_2 podem ser medidos através da fluorescência emitida pela diclorofluoresceína (DCF), que é produto da oxidação do 2',7'- diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Sharikabad *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2004).

A NAD(P)H oxidase é a principal fonte de $O_2^{\bullet-}$ nas células vasculares (Jones *et al.*, 1996). Ela é uma enzima constitutiva, mas que pode ser regulada por forças hemodinâmicas (de Keulenaer *et al.*, 1998) mas principalmente por fatores humorais, como angiotensina II (Griendling *et al.*, 1994), que é um importante mediador de estresse oxidativo, sendo que as ROS induzidas por ela funcionam como intermediários na transdução de sinal de várias vias envolvidas na patofisiologia cardiovascular (Touyz *et al.*, 2003; Paravicini & Touyz, 2006; Alvarez *et al.*, 2008). Estudos mostram que culturas de células musculares lisas tratadas com angiotensina II apresentam aumento da produção de $O_2^{\bullet-}$ (Zafari *et al.*, 1998), sendo este efeito mediado por receptores AT_1 e induzido pela ativação da NAD(P)H oxidase (Rajagopalan *et al.*, 1996; Ushio-Fukai *et al.*, 1996). Além disso, animais tratados com depuradores de radicais livres após receberem infusões agudas de angiotensina II não apresentam danos celulares a órgãos-alvo da hipertensão (Wang *et al.*, 2003). Observações semelhantes foram feitas no modelo de hipertensão renovascular 2R1C, no qual a principal fonte de $O_2^{\bullet-}$ é a NAD(P)H oxidase (Heitzer *et al.*, 1999). Portanto, a inibição da produção ou aumento da depuração de ROS em modelos de hipertensão angiotensina II-dependentes podem atenuar ou mesmo inibir a elevação da pressão arterial, indicando que as ROS produzidas pelo aumento de angiotensina II desempenham papel essencial na vasoconstrição e danos em órgãos-alvo observados nestes modelos (Taniyama & Griendling, 2003).

Estudos recentes mostram que modelos de hipertensão em que o SRA está ativado, a produção de ROS, especificamente $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , se encontra aumentada

em células endoteliais. No presente estudo, células endoteliais mecanicamente isoladas da aorta torácica de camundongos com hipertensão angiotensina II-dependente mostraram maior MFI para DHE e DCFH-DA que é proporcional à produção citoplasmática de $O_2^{\bullet-}$ e de H_2O_2 , respectivamente. Corroborando estes dados, Ceron e colaboradores (2010), verificaram aumento da produção de ROS em aorta torácica de ratos com hipertensão renovascular 2R1C. Wu e colaboradores (2012a) mostraram, *in vitro*, que células endoteliais de aorta humana apresentam aumento da produção citoplasmática de $O_2^{\bullet-}$ e de H_2O_2 quando previamente incubadas com angiotensina II entretanto, quando estas células foram tratadas com um inibidor da NAD(P)H oxidase, a ativação da enzima e a produção de ROS induzidas pela angiotensina II foram inibidas, sugerindo efeito direto do inibidor sobre o endotélio vascular. Os dados destes estudos foram obtidos por microscopia e quimiluminescência, enquanto que os nossos resultados foram obtidos por citometria de fluxo. Independente da metodologia utilizada, a angiotensina II é capaz de induzir a produção excessiva de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 em células endoteliais, entretanto a citometria de fluxo é capaz de fornecer rapidamente dados sobre a produção destas ROS em células individuais, o que pode ser considerado uma vantagem sobre os outros métodos.

Ao se ligar aos receptores AT_1 , a angiotensina II ativa vias de sinalização intracelular muito complexas que regulam seus vários efeitos fisiológicos. O estresse oxidativo aumentado na parede dos vasos sanguíneos está diretamente associado ao aumento da atividade da NAD(P)H oxidase, principal fonte celular de ROS, que é encontrada na membrana de células endoteliais (Forstermann, 2008). A NAD(P)H oxidase é formada por um complexo enzimático constituído por 5 subunidades: $p22_{phox}$ e Nox, que estão ligadas à membrana plasmática, e $p40_{phox}$, $p47_{phox}$ e $p67_{phox}$, que são as subunidades citosólicas. Além disso, existe uma proteína G de baixo peso molecular, a Rac, responsável pela regulação da atividade da enzima (Touyz *et al.*, 2002; Wilcox, 2005). Existem atualmente sete isoformas de Nox, que é a subunidade catalítica da NAD(P)H oxidase, sendo que o subtipo 4 é o principal responsável pela produção de $O_2^{\bullet-}$ em aortas de ratos e de camundongos (Sorescu *et al.*, 2002). A atividade da NAD(P)H oxidase pode ser significativamente aumentada por estímulos hipertensivos, entre eles destaca-se a angiotensina II (Ushio-Fukai *et al.*, 1996) capaz de causar *upregulation* de subunidades da enzima

(Touyz *et al.*, 2003) e a ativação aguda de proteínas reguladoras ao se ligar aos receptores AT₁ (Zuo *et al.*, 2004).

Levando em consideração estas informações, acreditamos que a produção aumentada de ROS, especificamente O₂^{•-} e H₂O₂, levam ao estresse oxidativo em células endoteliais mecanicamente isoladas da aorta torácica de camundongos com hipertensão renovascular angiotensina II-dependente, provavelmente através da ativação da NAD(P)H oxidase encontrada na membrana das células endoteliais pelo efector chave do SRA, a angiotensina II.

Tradicionalmente, acreditava-se que as ROS eram apenas subprodutos de reações biológicas (Thannickal & Fanburg, 2003; Schrader & Fahimi, 2004; Balaban *et al.*, 2005; Mata-Greenwood *et al.*, 2005; Mueller *et al.*, 2005). Posteriormente, descobriu-se que elas podem ser o produto principal de reações catalisadas por oxidases, como a NAD(P)H oxidase desempenhando funções biológicas importantes em vias de sinalização celular que envolvem a sobrevivência, proliferação e apoptose (Hancock *et al.*, 2001; Martindale & Holbrook, 2002; Zarubin & Han, 2005).

Os estímulos apoptóticos resultam em diversos eventos moleculares organizados e em cascata que ocorrem em resposta a estímulos intra e extracelulares e que requerem energia e síntese protéica para sua execução. As principais mudanças morfológicas decorrentes da apoptose são retração celular, perda da aderência com a matriz extracelular e com as células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação de corpos apoptóticos (Kerr *et al.*, 1972; Parolin & Reason, 2001; Zimmerman *et al.*, 2001; Tait *et al.*, 2004; Elmore, 2007; Taylor *et al.*, 2008; Wang & Youle, 2009).

Estudos mostram que a apoptose desempenha papel importante na patofisiologia de doenças cardiovasculares uma vez que pode ocasionar alterações na função cardíaca, resistência vascular periférica e nos mecanismos renais de controle eletrolítico (Gobé *et al.*, 1997; Herez-Alvarez & Peix-Gonzalez, 2011). Este tipo de morte celular pode ser ocasionado por estímulos externos ou internos, sendo que as ROS possuem papel de destaque, pois deflagram mecanismos indutores de apoptose ao danificar macromoléculas biológicas como lipídeos, proteínas e DNA (Mates *et al.*, 1999; Redon *et al.*, 2003).

A associação entre apoptose e hipertensão foi demonstrada em diferentes modelos experimentais da doença. Estudos mostram aumento de células apoptóticas em aorta de ratos SHR (Sharifi & Schiffrin, 1998; Rizzoni *et al.*, 2000),

DOCA-sal (Sharifi & Schiffrin, 1997), 2R1C (Worou *et al.*, 2011) e também em ratos submetidos à infusão aguda de angiotensina II (Diep *et al.*, 1999).

Worou e colaboradores (2011) mostraram aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$ em cardiomiócitos devido ao aumento da atividade da NAD(P)H oxidase e que o estresse oxidativo estava diretamente relacionado ao aumento do número de células apoptóticas no coração de ratos com hipertensão renovascular 2R1C. Em 2010, Lavi e colaboradores mostraram aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$ assim como da expressão das subunidades p47_{phox} e p67_{phox} da NAD(P)H oxidase no rim de porcos 2R1C. Os autores também observaram o aumento de células positivas para caspase-3 e para marcação com TUNEL em cortes histológicos de rim avaliados por microscopia, diminuição da expressão de Bcl-xL (anti-apoptótica) e ativação da caspase-3. Além disso, verificaram que nos animais 2R1C, ocorre recrutamento de EPC para o rim entretanto ocorre aumento de células apoptóticas devido à disfunção endotelial renal, ao estresse oxidativo e à atividade inflamatória o que indica que apesar de aumentar o recrutamento das EPC estas células não são capazes de desempenhar sua função de regeneração.

Os métodos disponíveis para avaliação de apoptose são divididos em três classes principais: que identificam alterações na estrutura da membrana plasmática, que avaliam o núcleo apoptótico e que analisam moléculas específicas, como caspases e DNAses (Aref *et al.*, 2011). Entretanto, é importante considerar a combinação de diferentes moléculas com o intuito de aumentar a especificidade e a sensibilidade destas técnicas de forma a refletir a real situação da integridade da membrana plasmática nestas condições.

Neste contexto, a proteína anexina V associada a corantes de viabilidade vem sendo amplamente estudada e utilizada para detectar apoptose em diversos modelos biológicos (Gyls *et al.*, 2004), além de ser empregada como agente de diagnóstico clínico em situações como quimioterapia, rejeição de órgãos transplantados e no infarto agudo do miocárdio (Tait *et al.*, 2004).

A anexina V combinada com moléculas fluorescentes tem sido altamente estudada e utilizada como um marcador de apoptose, por ser uma proteína capaz e se ligar fortemente a fosfolípidos de carga negativa, especificamente à fosfatidilserina, na presença de íons cálcio. Os resíduos de fosfatidilserina residem constitutivamente da face interna da membrana plasmática e, logo no início do processo de apoptose, são rapidamente translocados para a face externa da

membrana em resposta a agentes indutores de apoptose (Martin *et al.*, 1995; Glylys *et al.*, 2004; Tait *et al.*, 2004; Brumatti *et al.*, 2008). Entretanto, a translocação da fosfatidilserina também é observada em situações de necrose fazendo com que a anexina V não seja um marcador absoluto e exclusivo de apoptose. Por esta razão, a anexina V deve ser utilizada em conjunto com corantes vitais capazes de penetrar nas células quando a integridade da membrana plasmática está alterada, o que ocorre apenas nos estágios avançados/tardios de apoptose ou de necrose celular (Vermees *et al.*, 1995; Baatout, 2004).

Células vivas apresentam membranas intactas e, portanto, impermeáveis a um grupo especial de marcadores, conhecidos como marcadores vitais ou de viabilidade celular, como o iodeto de propídeo (PI), capazes de se difundir para o interior da célula morta, devido a permeabilidade celular aumentada, corando-a e tornando sua identificação bastante fácil (De Boer *et al.*, 2002). Como a externalização da fosfatidilserina ocorre no início do processo de apoptose, antes de a membrana celular ter sua permeabilidade comprometida, a anexina V pode ser utilizada para identificar células em estágio inicial ou precoce de apoptose. Células em estágio avançado de apoptose ou em necrose apresentam membrana desestruturada e, conseqüentemente, permeável ao PI. Portanto, a anexina V deve ser utilizada associada a corantes especiais, como o PI, para permitir a identificação de células apoptóticas e discriminar entre apoptose (precoce e tardia) e necrose (Baatout, 2004).

No presente estudo a proteína anexina V conjugada à fluoresceína foi utilizada simultaneamente com o corante de viabilidade PI para verificar apoptose por citometria de fluxo. Os resultados obtidos, baseados nas características morfológicas individuais, dividiu as células em quatro grupos: viáveis (duplamente negativas), em estágio inicial de apoptose (positivas apenas para anexina V), em estágio tardio de apoptose ou em necrose (duplamente positivas) e células inviáveis (positivas apenas para PI). Esta metodologia é bastante vantajosa uma vez que fornece parâmetros diferentes para avaliação do estado funcional das células (Cornelissen *et al.*, 2002).

Os dados obtidos neste estudo mostraram aumento de apoptose em células endoteliais isoladas da aorta torácica de camundongos com hipertensão renovascular angiotensina II-dependente. A angiotensina II é considerada um potencial deflagrador do processo apoptótico (Yamada *et al.*, 1996; Tea *et al.*, 2000)

e seus efeitos pró-apoptóticos estão relacionados, pelo menos em parte, ao aumento da formação de ROS, diminuição da expressão de Bcl-2 (fator anti-apoptótico) e aumento da expressão de Bax (fator pró-apoptótico). Este desequilíbrio entre fatores inibidores e indutores de apoptose, facilitam a ativação da via intrínseca da apoptose (Ruiz-Ortega *et al.*, 2003).

Além disso, estudos mostram que a angiotensina II induz a ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs: *Mitogen-activated protein kinases*), uma das principais vias de sinalização celular em mamíferos. A ativação da cascata de sinalização pode ocorrer por diversos estímulos entre eles o estresse oxidativo (Touyz *et al.*, 2003), sendo que em células endoteliais a subunidade Nox4 da NAD(P)H oxidase é responsável pela ativação da p38^{MAPK} (Goettsch *et al.*, 2009; Jaulmes *et al.*, 2009) uma das principais subfamílias de MAPK, responsáveis por mediar mecanismos intracelulares associados à apoptose (Kolch, 2000; Schieven, 2005; Clerk & Sugden, 2006).

Portanto, no presente estudo observamos aumento da produção de O₂^{•-} e H₂O₂ e, conseqüentemente, de apoptose em células endoteliais de camundongos 2R1C, 14 dias após a indução da hipertensão. Considerando que este é um modelo de hipertensão angiotensina II-dependente, podemos afirmar que os efeitos deste peptídeo são essenciais aos danos observados no endotélio vascular destes animais.

Os efeitos da hipertensão vem sendo exaustivamente estudados na parede dos vasos sanguíneos, especialmente nas células endoteliais, consideradas células-alvo da hipertensão. Entretanto, sabendo que a maioria dos efeitos fisiológicos e patofisiológicos da angiotensina II são mediados por receptores AT₁, e que estes receptores são encontrados em células hematopoiéticas decidimos avaliar os efeitos da hipertensão em células sanguíneas e de medula óssea, constituintes de tecidos que não são classicamente considerados alvo da hipertensão.

A medula óssea, órgão primariamente responsável pela hematopoiese (Whetton & Graham, 1999), é bastante heterogênea pois contém uma grande diversidade de células além de apresentar estrutura anatômica especial que permite a sobrevivência, proliferação, diferenciação e maturação das células hematopoiéticas, sendo o principal órgão responsável pela produção de células sanguíneas. As células hematopoiéticas possuem características específicas e únicas que as diferenciam de outros tipos celulares. Estas características são,

principalmente, tempo de vida limitado e relativamente curto, ampla distribuição no organismo sendo encontradas em virtualmente todos os tecidos e propriedades funcionais e fenotípicas completamente diferentes entre si (Junqueira & Carneiro, 1999).

As células maduras e diferenciadas do sangue originam-se todas de um precursor comum e podem ser divididas em duas linhagens principais: a linhagem mielóeritróide que inclui eritrócitos, megacariócitos, monócitos e granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e a linhagem linfóide que inclui os linfócitos T, B e *natural killer* (NK). Estas células exercem funções específicas e essenciais para manutenção da vida. Os eritrócitos são responsáveis pelo transporte de oxigênio. Neutrófilos compõem a principal população celular envolvida na resposta inflamatória aguda. Eosinófilos agem na defesa contra certos tipos de agentes infecciosos e junto com os basófilos são células efetoras da hipersensibilidade imediata. Monócitos fazem a defesa contra microorganismos. Linfócitos B produzem anticorpos que atuam nos processos de imunidade humoral, os linfócitos T reconhecem e englobam antígenos ligados à superfície de outras células sendo mediadores de resposta imune e os linfócitos NK atacam células cancerosas e infectadas por vírus. As plaquetas, derivadas dos megacariócitos, são responsáveis pela coagulação do sangue (Junqueira & Carneiro, 1999).

Considerando a importância das células hematopoiéticas para homeostase do organismo, o presente estudo avaliou o comportamento de células sanguíneas e de medula óssea em animais hipertensos com o objetivo de verificar se, como o endotélio, sangue e medula óssea podem ser considerados órgãos-alvo da hipertensão.

Apesar de elucidado papel do SRA sobre a produção de ROS no sistema vascular, é necessário estabelecer se pacientes hipertensos apresentam sinais sistêmicos de estresse oxidativo, pois, até o momento, pouco se sabe sobre o comportamento *in vivo* de células sanguíneas e de medula óssea em situações patofisiológicas em que o SRA está ativado.

Em condições fisiológicas normais, a angiotensina II medeia a produção de ROS e regula as vias de sinalização oxidativas (Touyz, 2003). Entretanto, em situações em que ocorre a ativação excessiva do SRA, o aumento da produção de oxidantes estimulado pela angiotensina II contribui de forma significativa para a

oxidação celular e, conseqüentemente, dano tecidual (Touyz, 2000; Paravacini & Touyz, 2006; de Cavanagh *et al.*, 2007).

No presente estudo, células sanguíneas de animais 2R1C apresentaram aumento da produção de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 quando comparado aos animais Sham. A importância do estresse oxidativo sistêmico já foi determinada em diferentes aspectos da hipertensão (Briones & Touyz, 2010). Sabe-se que em indivíduos hipertensos ocorre produção excessiva de ROS e diminuição da ação de mecanismos antioxidantes em células encontradas na circulação sanguínea (Yasunari *et al.*, 2002; Redon *et al.*, 2003; Lavi *et al.*, 2008; Cottone *et al.*, 2009) que podem contribuir para disfunção endotelial e danos adicionais observados em órgãos-alvo da hipertensão (Abdilla *et al.*, 2007).

Em condições fisiológicas normais, a medula óssea se comporta como um nicho celular e bioquímico bastante peculiar, onde se acredita haver tensão de oxigênio extremamente baixa (Chow *et al.*, 2001; [Swartz & Dunn, 2003](#)) fazendo deste um órgão quase anaeróbico e, assim, limitando sua produção de ROS. Apesar disto, os resultados obtidos neste estudo, mostram aumento da produção de ROS nas células isoladas da medula óssea de animais com hipertensão renovascular angiotensina II-dependente. Em condições patofisiológicas, além do SRA sistêmico, que produz a angiotensina II plasmática, ocorre ativação dos RAS locais e, conseqüentemente, a produção deste peptídeo em diferentes órgãos. A existência de um SRA local funcionante na medula óssea já foi descrito (Haznedaroglu *et al.*, 1996; Strawn *et al.*, 2004; Salguero *et al.*, 2008) e acredita-se que este somente seja ativado em condições patológicas.

O papel predominante do SRA parece ser transitório durante o desenvolvimento e manutenção da hipertensão renovascular visto que após a indução da mesma, modelos experimentais ativam vias oxidativas (Lerman *et al.*, 2001). Acredita-se que exista correlação direta entre alguns marcadores de estresse oxidativo e a elevação da pressão arterial, uma vez que é possível reverter o aumento de pressão em alguns modelos tanto com o uso de inibidores da ECA que bloqueiam a produção de angiotensina II, como com o uso de análogos da SOD, como tempol (Welch *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2004), que funcionam como depuradores de radicais livres de oxigênio. Além disso, o tratamento com losartan, ao diminuir o estresse oxidativo, é capaz de inibir o espessamento da parede da aorta (Li *et al.*, 2010). De forma semelhante, Palm e colaboradores (2010)

mostraram que o tratamento com tempol é mais efetivo na redução da pressão arterial do que a utilização de bloqueadores de receptores AT₁ ou inibidores da ECA. Assim, a ativação do SRA é capaz de recrutar sistemas adicionais que sustentam a elevação do tono vasoconstritor e da pressão arterial, sugerindo que o estresse oxidativo pode ser mais importante que a angiotensina II na manutenção da hipertensão arterial.

Apesar de elucidados muitos mecanismos, a determinação de indicadores de dano oxidativo em indivíduos hipertensos é de grande importância. Desta forma, o reconhecimento da relação entre a doença e o estresse oxidativo tem estimulado a utilização de marcadores de dano oxidativo em sistemas biológicos. Entretanto, a dosagem desses marcadores é bastante difícil devido a sua meia-vida curta (apenas poucos segundos) e a difícil reprodutibilidade e aplicabilidade da maioria dos métodos utilizados. Neste contexto, a citometria de fluxo surge como uma metodologia bastante útil devido a sua alta sensibilidade, rapidez e especificidade. A análise da oxidação do DHE e do DCFH-DA por citometria de fluxo tem sido bastante utilizada como indicador da produção citoplasmática de O₂^{•-} e H₂O₂, respectivamente (Vanden Hoek *et al.*, 1997; Sharikabad *et al.*, 2001). Os resultados obtidos neste estudo mostram que ocorre aumento da produção de ROS nas células hematopoiéticas isoladas de sangue e medula óssea de camundongos com hipertensão renovascular 2R1C. A metodologia utilizada para quantificar os níveis citoplasmáticos de O₂^{•-} e H₂O₂ foi a citometria de fluxo por ser considerada uma técnica superior a microscopia e quimiluminescência para o estudo de estresse oxidativo através da quantificação de ROS.

Como mencionado anteriormente, o estresse oxidativo aumentado está diretamente associado ao aumento da atividade da NAD(P)H oxidase, principal fonte celular de ROS, que é encontrada na membrana de várias células hematopoiéticas como macrófagos, monócitos, neutrófilos e eosinófilos (Cave *et al.*, 2006; Guzik *et al.*, 2007), sendo conhecida como NAD(P)H fagocítica, sendo que a atividade da enzima pode ser regulada pela angiotensina II (Morawietz *et al.*, 2001). Ao se ligar ao receptor AT₁ a angiotensina II leva à ativação da fosfolipase C que catalisa a formação de diacilglicerol e inositol trifosfato, mediadores da liberação de cálcio e ativação da proteína quinase C (Lyle & Griendling, 2006), responsável pela fosforilação da subunidade p47^{phox} ativando a NAD(P)H oxidase (Massenet *et al.*, 2005).

É importante lembrar que a angiotensina II não é apenas um hormônio vasoativo que regula a pressão arterial e a homeostase eletrolítica através de seus efeitos hemodinâmicos, mas também atua na regulação do crescimento celular e na produção e liberação de fatores pró-inflamatórios, imunomoduladores e oxidantes de forma não-hemodinâmica (Wolf, 1998; Dzau, 2001; Luft, 2001; Ruiz-Ortega *et al.*, 2001a; Higashi *et al.*, 2002; Mollnau *et al.*, 2002; Marchesi *et al.*, 2008; Salguero *et al.*, 2008). Portanto, os efeitos não-hemodinâmicos da angiotensina II são indispensáveis para os danos causados pela hipertensão.

A relação entre apoptose e hipertensão está bem descrita na literatura, uma vez que estudos mostram aumento de apoptose em coração (Liu *et al.*, 2000), cérebro (Hamet *et al.*, 1995), rins (Rodríguez-Lopez *et al.*, 1998) e vasos (Rizzoni *et al.*, 2000) de ratos hipertensos. Existem inúmeros e complexos moduladores de apoptose entre os mais importantes podemos citar as ROS (Pollman *et al.*, 1996; Irani, 2000) que sabidamente estão envolvidas na patogênese da hipertensão, e são capazes de induzir apoptose (Li *et al.*, 1999).

O papel da apoptose no modelo 2R1C ainda não foi completamente estabelecido. Entretanto, sabe-se que o clampeamento da artéria renal resulta no aumento da produção de angiotensina II e de ROS (Lerman *et al.*, 2001), conhecidos como potentes desencadeadores do processo apoptótico por danificar macromoléculas biológicas ou por regular vias de sinalização intracelular funcionando como mensageiros bioquímicos destas vias (Elsasser *et al.*, 2001; Suematsu *et al.*, 2002; Elahi *et al.*, 2009).

Neste estudo, pelo ensaio de anexina V-FITC e PI, observamos aumento na porcentagem de células apoptóticas em amostras de sangue periférico de camundongos 2R1C avaliadas por citometria de fluxo. Existem evidências que indivíduos hipertensos apresentam aumento dos níveis plasmáticos de marcadores de apoptose, sugerindo que estas moléculas podem participar do desenvolvimento de lesões hipertensivas em órgãos-alvo da doença (Fortuno *et al.*, 2001; Díez, 2007; Sander *et al.*, 2007; Rosello-Lletí *et al.*, 2009). Além disso, pacientes hipertensos apresentam aumento dos níveis plasmáticos da proteína Fas, indicando que a ativação do sistema Fas/FasL pode contribuir para a patogênese da hipertensão ao ativar a via extrínseca da apoptose (Blanco-Colio *et al.*, 2007; Cardinal *et al.*, 2010).

A medula óssea é um órgão altamente especializado e complexo, sendo o principal tecido hematopoieticamente ativo em adultos. O sistema hematopoiético da

medula óssea é caracterizado pela renovação, proliferação, diferenciação, apoptose, comprometimento e sobrevivência de células hematopoiéticas. Os fatores que regulam estes eventos são pouco compreendidos. Entretanto, sabe-se que a hematopoiese é regulada pela combinação de efeitos de citocinas, fatores de crescimento, receptores de superfície específicos e sinais liberados pelo microambiente medular (Clark & Kamen, 1987; Haznedaroglu & Ozturk, 2003). Como a medula óssea é um local de crescimento e renovação celular excessivos, estudos apontam a existência de um SRA intrínseco e localmente ativo na medula óssea capaz de afetar o crescimento, produção, proliferação, apoptose e diferenciação de células hematopoiéticas em situações fisiológicas e patológicas (Haznedaroglu *et al.*, 1996; Strawn *et al.*, 2004; Aksu *et al.*, 2005; Beyazit *et al.*, 2007; Inigo *et al.*, 2009). Corroborando esta hipótese, estudos mostram a existência de receptores AT₁ nas células mononucleares da medula óssea (Shibata *et al.*, 1994) e que células inflamatórias sanguíneas possuem ECA (Dzau *et al.*, 2001).

No presente estudo observamos aumento de células apoptóticas na medula óssea de animais com hipertensão renovascular 2R1C quando comparado aos animais normotensos Sham. A confirmação da existência de um SRA tecidual completo na medula óssea (Strawn *et al.*, 2004), sugere que a produção de angiotensina II por células hematopoiéticas e estromais localizadas no microambiente medular pode regular a hematopoiese de maneira autócrina ou parácrina. Além disso, sabendo que na medula óssea de animais hipertensos ocorre aumento da produção de ROS que apresentam papel de destaque na ativação de vias deflagradoras da morte celular programada, era de se esperar aumento da quantidade de células apoptóticas em amostras isoladas da medula óssea de animais com hipertensão renovascular.

Desta forma, as ROS estão associadas ao dano celular e apoptose devido a seus efeitos oxidantes diretos sobre macromoléculas biológicas como lipídios, proteínas e DNA (Valko *et al.*, 2006), além de atuarem como mensageiros bioquímicos que regulam vias de sinalização intracelular e induzem a abertura de poros na membrana mitocondrial levando à liberação de citocromo c e outros fatores que induzem à apoptose (Tatton *et al.*, 2003; Tsutsui *et al.*, 2009). Portanto, as ROS ativam tanto vias extrínsecas como intrínsecas de apoptose.

Existem evidências de que o aumento da formação de ROS está associado à indução de instabilidade genômica (Imlay & Linn, 1988). Um estudo recente mostra

que linfócitos de sangue periférico de indivíduos acometidos por doença arterial coronariana apresentam danos no DNA causados pelo aumento do estresse oxidativo que ocorre nesta doença (Mahmoudi *et al.*, 2006). Folkman e colaboradores observaram a presença de danos no DNA de hepatócitos de camundongos ateroscleróticos (Folkmann *et al.*, 2007). De forma semelhante, trabalho recentemente publicado pelo nosso laboratório, mostra aumento da fragmentação no DNA de células sanguíneas de camundongos ateroscleróticos idosos (Dalboni *et al.*, 2012). Entretanto, poucos estudos avaliam o dano genético causado às células de medula óssea de indivíduos com hipertensão renovascular 2R1C.

A análise do conteúdo de DNA foi realizada pela coloração das células com PI seguida da aquisição dos dados por citometria de fluxo que é uma técnica utilizada para detecção de danos no DNA de células individuais. Esta análise utiliza corantes fluorescentes que intercalam-se à molécula de DNA, sendo que o sinal fluorescente emitido é diretamente proporcional à quantidade de DNA da célula. Esta metodologia permite estimar a distribuição do ciclo celular e também a quantidade de células que apresentam DNA fragmentado.

Após a aquisição dos dados no citômetro de fluxo, é possível identificar três fases distintas: fase sub- G_1/G_0 , fase G_1/G_0 , fase S e fase G_2/M . O conteúdo de distribuição de DNA numa população celular típica em crescimento caracteriza-se por dois picos, em G_1/G_0 e em G_2/M , e por um vale na fase S. As células na fase G_2/M apresentam o dobro da quantidade de DNA que a fase G_1/G_0 , sendo que a fase S apresenta quantidade de DNA variável entre as fases G_1 e G_2 . As células com DNA fragmentado encontram-se na região sub- G_1/G_0 . O papel das ROS na regulação do ciclo celular ainda não é completamente compreendido. Sabe-se que os níveis de ROS aumentam consideravelmente quando a célula entra na fase S (Conour *et al.*, 2004; Havens *et al.*, 2006) e que o aumento das ROS ativa *checkpoints* do ciclo celular (Menon & Goswami, 2006), indicando que a proliferação/apoptose celular se deve à manutenção de níveis estáveis de ROS.

Neste estudo, observamos diminuição na quantidade de células que se encontram na fase G_2/M na medula óssea de animais hipertensos quando comparado ao Sham. Este resultado sugere uma diminuição na proliferação celular, pois menos células se encontram nas fases proliferativas do ciclo. Dados de nosso laboratório mostraram que na medula óssea de camundongos 2R1C ocorre

diminuição na quantidade de células mononucleares quando comparado ao controle Sham (Campagnaro *et al.*, 2008).

Um estudo realizado em 2003 mostrou uma forte correlação negativa entre o número de células progenitoras endoteliais circulantes e o escore de risco para desenvolver doenças cardiovasculares (Hill *et al.*, 2003). De forma semelhante, existem estudos mostrando que células progenitoras endoteliais (Tepper *et al.*, 2002) e células mononucleares (Heeschen *et al.*, 2004) obtidas da medula óssea de pacientes com doença isquêmica coronariana crônica (Heeschen *et al.*, 2004) ou doenças metabólicas (Tepper *et al.*, 2002) apresentam diminuição na sua capacidade de formação de unidades de colônia, na migração celular, na capacidade angiogênica e proliferativa.

Além disso, a medula óssea de camundongos 2R1C apresentou maior quantidade de células na fase sub-G₁/G₀ e portanto, mais células com DNA fragmentado quando comparada às amostras de animais controles Sham. Não foi possível analisar o conteúdo de DNA de células sanguíneas e endoteliais por dificuldades metodológicas, provavelmente, durante a fixação das amostras, apesar deste procedimento também ter sido utilizado para fixar as células de medula óssea.

Em fisiologia cardiovascular, poucos trabalhos relacionam os danos causados ao DNA com as doenças cardiovasculares, sendo que não existem relatos dos efeitos da hipertensão renovascular sobre o DNA de células medulares avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados obtidos pelo ensaio do PI mostram que nos camundongos do grupo 2R1C, o aumento da produção de ROS levou à fragmentação no DNA das células da medula óssea destes animais quando comparado com os animais do grupo Sham, confirmando a instabilidade do DNA nestas células.

Sabendo que a ativação do SRA tecidual (Dzau, 2001; Lerman *et al.*, 2001; Higashi *et al.*, 2002) assim como aumento da atividade sistêmica do SRA, aumentam a produção vascular de ROS através da ativação de enzimas oxidantes presentes na membrana de diversos tipos celulares entre eles as células da medula óssea (Griendling *et al.*, 1994; Rajagopalan *et al.*, 1996; Dzau, 2001; Higashi *et al.*, 2002; Mollnau *et al.*, 2002), os danos observados no DNA das células de medula óssea dos camundongos hipertensos foram causados pela interação de ROS com a molécula de DNA.

Está claro que a ativação dos receptores AT₁ pela angiotensina II induz a NAD(P)H oxidase levando a produção de O₂^{•-} (Griendling *et al.*, 1994) que é rapidamente reduzido a H₂O₂ espontaneamente ou pela ação da SOD (Ursini *et al.*, 1995; Kirkman *et al.*, 1999; de Haan *et al.*, 2004). O H₂O₂, apesar de não ser considerado um potente radical livre, é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA (Anderson, 2000). Levando em consideração que as principais ROS envolvidas na patogênese de diferentes formas de hipertensão são o O₂^{•-} e o H₂O₂ (Zafari *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2002) e que estas se encontram aumentadas nas células da medula óssea de camundongos 2R1C, é provável que interajam com o DNA destas células, danificando-o.

A superprodução de ROS causa instabilidade de macromoléculas biológicas, o que pode ter conseqüências importantes sobre a função celular. Entre estas moléculas o DNA é especialmente importante uma vez que, diferente de lipídeos e proteínas, não é possível sintetizar uma nova molécula para substituir a danificada. Os tipos de danos causados ao DNA pelas ROS são, principalmente, quebras de fita simples e dupla, modificações nas bases nitrogenadas e cross-links de DNA (Valko *et al.*, 2006).

Estudos desenvolvidos em modelos animais de hipertensão mostraram que a abundância de ROS causada pelo aumento da produção ou pela diminuição de sua degradação, determina o dano oxidativo aos tecidos (Polizio & Pena, 2005). Schupp e colaboradores mostraram, em 2007, que a infusão de angiotensina II em cultura de células renais de porco induz a NAD(P)H oxidase, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio que fragmentam o DNA destas células, o que foi verificado pelo ensaio cometa.

Em nosso laboratório também utilizamos o ensaio cometa para avaliar a fragmentação do DNA e dados não publicados mostram que camundongos 2R1C apresentam maior fragmentação no DNA de células mononucleares da medula óssea quando comparados aos seus controles Sham (Campagnaro *et al.*, 2008).

Em 2009, Fandos e colaboradores avaliaram o impacto de vários fatores de risco cardiovascular sobre o estresse oxidativo e o dano ao DNA em uma população de 527 indivíduos. Neste estudo foram avaliadas células mononucleares isoladas de sangue periférico e os resultados obtidos mostraram que dentre os fatores de risco avaliados, a hipertensão foi o principal determinante do estresse oxidativo, tanto por aumentar a produção de ROS, como por diminuir as defesas antioxidantes do

organismo, levando ao aumento da instabilidade genética, verificada pela fragmentação do DNA.

É inevitável que durante a vida de uma célula, o DNA acumule mutações causadas tanto por fatores ambientais como por erros em sua duplicação. Em situações normais, estes danos levam a interrupção do ciclo celular ou a indução de mecanismos de reparo do DNA que mantêm a estabilidade genômica. Entretanto, doenças como a hipertensão causam um aumento exacerbado destes erros, pois os mecanismos de reparo se tornam insuficientes. Os resultados observados no presente estudo mostram que nas células de medula óssea dos animais hipertensos ocorre aumento da produção de ROS que interagem com a molécula de DNA danificando-a. Entretanto, estes danos podem ser reparados até determinado limite, que depois de alcançado as células ativam mecanismos de morte celular programada. O aumento de ROS e da fragmentação do DNA nestas células pode disparar diferentes vias de sinalização envolvidas no reparo do DNA ou apoptose, com destaque para fatores de transcrição controlados pela proteína p53 (Fandos *et al.*, 2009).

Portanto, a sobrevivência de uma célula danificada depende do equilíbrio entre os sistemas de proteção e reparo celular, que incluem mecanismos de defesa antioxidante e reparo de danos à molécula de DNA, e os processos que levam à morte celular por apoptose ou necrose (Muller *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos por citometria de fluxo no presente estudo sugerem ativação do SRA tecidual em situações patofisiológicas e a síntese local de angiotensina II parece contribuir para as alterações funcionais e morfológicas observadas em células sanguíneas, endoteliais e de medula óssea. A produção de $O_2^{\bullet-}$ e de H_2O_2 mostrou-se aumentada, assim como a quantidade de células apoptóticas, nas amostras isoladas de animais do grupo 2R1C quando comparado com os animais Sham. Estes dados confirmam que ocorre interação entre estresse oxidativo e apoptose, uma vez que as ROS podem induzir a ativação de vias intrínsecas e/ou extrínsecas de apoptose. Além disso, as células da medula óssea dos animais 2R1C apresentaram aumento da fragmentação do DNA, mostrando que além de induzir vias de apoptose, as ROS agem diretamente sobre o DNA das células danificando-as. Este dado não foi observado em células sanguíneas e endoteliais, provavelmente, por dificuldades metodológicas na fixação destas amostras.

8 CONCLUSÕES

A análise de estresse oxidativo por citometria de fluxo, através da marcação com sondas fluorescentes com afinidade pelo ânion superóxido e pelo peróxido de hidrogênio, mostrou que a hipertensão renovascular 2R1C aumenta a produção destas espécies reativas, provavelmente pela ação oxidante da angiotensina II.

A análise de apoptose e viabilidade celular através da utilização da anexina V, mostrou que os animais hipertensos apresentam aumento de células apoptóticas, o que se deve ao aumento do estresse oxidativo que, por sua vez, leva à ativação de mecanismos indutores de apoptose nas células estudadas.

A análise do conteúdo de DNA pelo método de coloração com iodeto de propídeo, mostrou que níveis elevados de angiotensina II, causado pela hipertensão renovascular, aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio que interagem com o DNA das células de medula óssea dos camundongos hipertensos causando a sua fragmentação.

Os achados deste estudo sugerem que a citometria de fluxo é um método extremamente eficiente e que possui grande sensibilidade para determinação de estresse oxidativo, apoptose e fragmentação no DNA, uma vez que é objetivo e fornece dados claros e de fácil interpretação.

Em conclusão, este estudo fornece evidências de que a hipertensão renovascular 2R1C, provavelmente através dos efeitos não-hemodinâmicos da angiotensina II, causa prejuízos às células de sangue, endotélio e medula óssea avaliadas por citometria de fluxo, sugerindo que os tecidos hematopoiéticos também podem ser considerados alvo da hipertensão. Entretanto, os mecanismos envolvidos ainda não são completamente conhecidos sendo, portanto, necessários mais estudos para especificá-los.

9 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O presente trabalho não foi capaz de separar os efeitos hemodinâmicos e não-hemodinâmicos da angiotensina II para determinar se os resultados observados se devem à ação direta da angiotensina II ou à elevação da pressão arterial. Com o objetivo de responder a essas questões, estudos posteriores devem utilizar bloqueadores de canais de cálcio ou antagonistas de receptores de angiotensina para determinar o principal responsável pelas alterações observadas. Além disso, também é necessário determinar as vias envolvidas na indução de estresse oxidativo e apoptose nos animais hipertensos.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Hipertensão, Sociedade Brasileira de Nefrologia. *Arq Bras Cardiol* 2010; 95(1):1-51.

Abali H, Haznedaroglu IC, Goker H, et al. Circulating and local bone marrow Renin-angiotensin system in leukemic hematopoiesis: preliminary evidences. *Hematology* 2002, 7:75-82.

Abdilla N, Tormo MC, Fabia MJ, et al. Impact of the components of metabolic syndrome on oxidative stress and enzymatic antioxidant activity in essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2007; 21:68-75.

Adams DO, Johnson WJ, Marino PA. Mechanisms of target recognition and destruction in macrophage-mediated tumor cytotoxicity. *Fed Proc* 1982; 41:2212-2221.

Akazawa H, Komuro I. Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2003; 92: 1079–1088.

Aksu S, Beyazit Y, Haznedaroglu IC, et al. Enhanced expression of the local haematopoietic bone marrow renin-angiotensin system in polycythemia rubra vera. *J Int Med Res* 2005; 33(6):661-667.

Altenhofer S, Kleikers PW, Radermacher KA, et al. The NOX toolbox: validating the role of NAD(P)H oxidases in physiology and disease. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69(14):2327-2343.

Alvarez Y, Briones AM, Hernanz R, et al. Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. *Br J Pharmacol* 2008; 153(5):926–935.

Amiri F, Garcia R. Renal Angiotensin II Receptor Regulation in Two-Kidney, One Clip Hypertensive Rats Effect of ACE Inhibition. *Hypertension* 1997; 30:337-345.

Anderson D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat Res* 2000; 350(1):103-108.

Annuk M, Zilmer M, Fellstrom B. Endothelium-dependent vasodilation and oxidative stress in chronic renal failure: impact on cardiovascular disease. *Kidney Int* 2003; 84:S50-S53.

Aref S, Abdullah D, Fouda M, et al. Neutrophil apoptosis in neutropenic patients with hepatitis C infection: role of caspases 3, 10, and GM-CSF. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2011; 27(2):81-87.

Arruda RMP, Peotta VA, Meyrelles SS, et al. Evaluation of vascular function in apolipoprotein E knockout mice with angiotensin-dependent renovascular hypertension. *Hypertension* 2005; 46(part 2):932-936.

Ashok BT, Ahmad J, Qadri A, et al. Anti-ROS-DNA monoclonal antibody as molecular probe for oxidative DNA damage. *Biochem Mol Biol Int* 1997; 43:1219-1229.

Baatout S, Derradji H. Cytometric methods to analyze radiation effects. *J Biol Regul Homeost Agents* 2004; 18(2):101-105.

Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin in Immunol* 2004; 16:42-47.

Badyal DK, Lata H, Dadhich AP. Animal models of hypertension and effect of drugs. *Indian J Pharmacol* 2003; 35:349-362.

Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, aging. *Cell* 2005; 120:483-495.

Barry SP, Davidson SM, Townsend PA. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 2023–2039.

BD – Becton, Dickinson and Company. Introduction to Flow Cytometry: a learning guide. San José: BD, 2000.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; 87:245-313.

Belichard P, Savard P, Cardinal R, et al. Markedly different effects on ventricular remodeling result in inducibility of ventricular remodeling. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23:505–523.

Bell D, Kelso EJ, Argent CC, et al. Temporal characteristics of cardiomyocyte hypertrophy in the spontaneously hypertensive rat. *Cardiovasc Pathol* 2004; 13: 71–78.

Bennet MR, Gibson DF, Schwartz SM, et al. Binding and phagocytosis of apoptotic vascular smooth muscle cells is mediated in part by exposure of phosphatidylserine. *Circ Res* 1995; 77:1136-1142.

Benhar M, Engelberg D, Levitzki A. ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO J* 2002; 3:420-425.

Bertoia ML, Waring ME, Gupta PS, et al. Implications of new hypertension guidelines in the United States. *Hypertension* 2011; 58: 361–366.

Beswick RA, Dorrance AM, Leite R, et al. NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension* 2001; 38: 1107-1111.

Beyazit Y, Aksu S, Haznedaroglu IC, et al. Overexpression of the local bone marrow renin-angiotensin system in acute myeloid leukemia. *J Natl Med Assoc* 2007; 99(1):57-63.

Blanco-Colio LM, Martin-Ventura JL, de Teresa, et al. Increased soluble Fas plasma levels in subjects at high cardiovascular risk: atorvastatin on inflammatory markers (AIM) study, a subject of ACTFAST. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:168-174.

Blank M, Shiloh Y. Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. *Cell Cycle* 2007; 6(6): 686-695.

Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15:725-731.

Bouby N, Hus-Citharel A, Maechetti J, Bankir L, et al. Expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes and angiotensin II-induced calcium mobilization along the rat nephron. *J Am Soc of Nephrol*. 1997; 8:1658-1667.

Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 2003; 39:615-647.

Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Curr.Hypertens Rep* 2010; 12:135-142.

Brumatti G, Sheridan C, Martin SJ. Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. *Methods* 2008; 44:235-240.

Brunner HR, Kirshman JD, Sealey JE, et al. Hypertension of renal origin: evidence for two different mechanisms. *Science*. 1971; 174:1344-1346.

Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15:269-290.

Bucciarelli LG, Pollreisz A, Kecsichull M, et al. Inflammatory stress in primary venous and aortic endothelial cells of type 1 diabetic mice. *Diab Vasc Dis Res* 2009; 6(4):249-261.

Burson J, Aguilera G, Gross K, et al. Differential expression of angiotensin receptor 1_A and 1_B in mouse. *Am J Physiol*. 1994; 267:E260–E267.

Camera E, Picardo M. Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 781(1-2):181-206.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular disease: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87:840–844.

Campagnaro BP, Tonini CL, Vasquez EC, et al. Analysis of bone marrow cells and DNA damage in renovascular hypertensive mice. *J Hypertens Suppl* 2008; 26:S177, Abstract: PS11/WED/29.

Campagnaro BP, Gava AL, Meyrelles SS, et al. Cardiac-autonomic imbalance and baroreflex dysfunction in the renovascular angiotensin-dependent hypertensive mouse. *Int J Hypertens* 2012; 2012:9p.

Campbell DJ, Habener JF. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest* 1986; 78: 31-39.

Cardinal H, Brophy JM, Bogaty P, et al. Usefulness of soluble fas levels for improving diagnostic accuracy and prognosis for acute coronary syndromes. *Am J Cardiol* 2010; 105:797-803.

Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension* 2000; 35: 155–163.

Carretero OA, Gulati OP. Effects of angiotensin antagonist in rats with acute, subacute and chronic two-kidney renal hypertension. *J Lab Clin Med* 1978; 91:264-271.

Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, et al. NADPH oxidases health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8:691-728.

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. *Brit J Pharmacol* 2010; 160: 77–87.

Cervenka L, Vaneckova I, Huskova Z, et al. Pivotal role of AT1 receptors in the development of two-kidney, one-clip hypertension: study in AT1 receptor knockout mice. *J Hypertens* 2008; 26(7):1379-1389.

Chabrashvili T, Tojo A, Onozato ML, et al. Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Hypertension* 2002; 39:269–274.

Chapman N, Huxley R, Anderson C, et al. Effects of perindopril-based blood pressure-lowering regimen on the risk of recurrent stroke according to stroke subtype and medical history: the progress trial. *Stroke* 2004; 35(1):116-121.

Cheng HF, Becker BN, Burns KD, et al. Angiotensin II upregulates type 1 angiotensin II receptors in renal proximal tubule. *J Clin Invest* 1995; 95(5):2012-2019.

Cheng J, Zhou W, Warner GM, et al. Temporal analysis of signaling pathways activated in a murine model of two-kidney, one-clip hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 297(4):F1055-F1068.

Chilson GM, Steimberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radical Bio Med* 2000; 28:1815-1826.

Chow DC, Winning LA, Miller WM, et al. Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's model. *Biophys J* 2001; 81(2):675-684.

Chrysochou C, Kalra PA. Epidemiology and natural history of atherosclerotic renovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 2009; 52:184-195.

Clark SC, Kamen R. The human haematopoietic colony stimulating factors. *Science*. 1987; 236:1229-1237.

Clerk, A.; Sudgen, P.H. Inflammation my heart (by p38-MAPK). *Circ Res* 2006; 99(5):455-458.

Cohen MV. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? *Ann Intern Med* 1989; 111:918-931.

Cohn JN, Tognoni G. A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. *N Engl J Med* 2001; 345(23):1667-1675.

Conour JE, Graham WV, Gaskins HR. A combined in vitro/bioinformatic investigation of redox regulatory mechanisms governing cell cycle progression. *Physiol Genomics* 2004;18:196-205.

Cornelissen M, Philippe J, De Sitter S, et al. Annexin-V expression in apoptosis peripheral blood lymphocytes: an electron microscopic evaluation. *Apoptosis* 2002; 7:41-47.

Corrêa TD, Namura JJ, Pontes-Silva CA, et al. Hipertensão arterial sistêmica: atualidades sobre sua epidemiologia, diagnóstico e tratamento. *Arq Med ABC* 2005; 31:91-101.

Côrte-Real M, Sansonetty F, Ludovico P, et al. Contribuições da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. *Bol Biotec* 2002; 71:19-33.

Cottone S, Mule G, Guarneri M, et al. Endothelin-1 and F2-isoprostane relate to and predict renal dysfunction in hypertensive patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24:497-503.

Dalboni SP, Campagnaro BP, Tonini CI, et al. The concurrence of hypercholesterolemia and aging promotes DNA damage in apolipoprotein E-deficient mice. *OJBD* 2012; 2:51-55.

Daniel NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical points. *Cell* 2004; 116:205-219.

Daniel PT, Wider T, Sturm I, et al. The Kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia* 2001; 15:1022-1032.

Dasgupta C, Zhang L. Angiotensin II receptors and drug discovery in cardiovascular disease. *Drug Discov Today* 2011; 16(1-2):22-34.

DATASUS – Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde. [Internet] Indicadores e dados básicos para saúde no Brasil. Ministério da Saúde. [citado em: 10/10/2012]. Disponível em: <http://www.tabnet.datasus.gov.br>

de Boer F, Drager AM, Pinedo HM, et al. Early apoptosis largely accounts for functional impairment of CD34 positive cells in frozen-thawed stem cells grafts. *J Hematother Stem Cell* 2002; 11(2):951-963.

de Cavanagh EM, Inserra F, Ferder M, Ferder L. From mitochondria to disease: role of the renin-angiotensin system. *Am J Nephrol* 2007; 27:545-553.

de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, et al. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 2000; 52: 415-472.

de Haan JB, Bladier C, Lofti-Mirim M, et al. Fibroblasts derived from Gpx1 knockout mice display senescent-like features and are susceptible to H₂O₂-mediated cell death. *Free Radic Biol Med* 2004; 36(1):53-64.

de Keulanaer GW, Chappel DC, Ishizaka N, et al. Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affects human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circ Res* 1998; 82(10):1094-1101.

Diep QN, Li JS, Schiffrin EL. In vivo study of AT1 and AT2 angiotensin receptors in apoptosis of rat blood vessels. *Hypertension* 1999; 34:617-624.

Diez J. Mechanisms of cardiac fibrosis in hypertension. *J Clin Hypertens* 2007; 9:546-50.

Dikalov S, Griendling KH, Harrison DG. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* 2007; 49:717-727.

Dizdaroglu M. Free radical-induced formation of an 8,5'-cyclo-2'-deoxyguanosine moiety in deoxyribonucleic acid. *Biochem J* 1986; 238: 247-254.

Dobrian AD, Schriver SD, Prewitt RL. Role of angiotensin II and free radicals in blood pressure regulation in a rat model of renal hypertension. *Hypertension* 2001; 38: 361-366.

Douglas JG, Hopfer U. Novel aspect of angiotensin receptors and signal transduction in the kidney. *Annu Rev Physiol.* 1994; 56: 649-669.

Dzau VJ. Vascular renin-angiotensin system in hypertension. New insights into the mechanism of action of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Am J Med* 1988; 84(4A):4-8.

Dzau VJ. Theodore Cooper Lecture: tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension* 2001; 37:1047-1052.

Eaton JW. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary. *J Lab Clin Med* 1991; 118:3-4.

Elahi MM, Flatman S, Matata BM. Tracing the origins of postoperative atrial fibrillation: the concept of oxidative-stress mediated myocardial injury phenomenon. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2008; 15(6):735-741.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35:495–516.

Elsasser A, Suzuki K, Lorenz-Meyer S, et al. The role of apoptosis in myocardial ischemia: a critical appraisal. *Basic Res Cardiol* 2001; 96: 219-226.

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391: 43-50.

Fandos M, Corella D, Guillén M, et al. Impact of cardiovascular risk factors on oxidative stress and DNA damage in a high risk Mediterranean population. *Free Radic Res* 2009; 43(12):1179-1186.

Fang B, Li Y, Song Y, et al. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the human fetal aorta wall. *Exp Biol Med* 2010; 235(1):130-138.

Fazan RJr, Silva VD, Salgado HC. Modelos de hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens* 2001; 8:19-29.

Ferrario CM. Role of angiotensin II in cardiovascular disease: therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2006; 7:3-14.

Folkmann JK, Loft S, Moller P. Oxidatively damaged DNA in aging dyslipidemic ApoE^{-/-} and wild-type mice. *Mutagenesis* 2007; 2:105-11s .

Forstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Natl Clin Pract Cardioasc Med* 2008; 5:338-349.

Fortuno MA, Ravassa S, Fortuno A, et al. Cardiomyocyte apoptotic cell death in arterial hypertension: mechanisms and potential management. *Hypertension*. 2001; 38:1406-1412.

Fortuno A, José GS, Moreno MU, et al. Oxidative stress and vascular remodeling. *Exp Physiol* 2005; 90:457-462.

Fridovich I. Mitochondria: are they the seat of senescence? *Aging Cell*. 2004; 3(1):13-16.

Frohlich ED, Apsrein C, Chobanian AV, et al. The heart in hypertension. *New Engl J Med* 1992; 327:998-1007.

Gao F, Yi J, Yuan JQ, et al. The cell cycle related apoptotic susceptibility to arsenic trioxide is associated with the level of reactive oxygen species. *Cell Research* 2004; 14:81-85.

Gava AL, Peotta VA, Cabral AM, et al. Overexpression of eNOS prevents the development of renovascular hypertension in mice. *Can J Physio Pharm* 2008; 86:458-464.

Gobé G, Browning J, Howard T, et al. Apoptosis occurs in endothelial cells during hypertension-induced micro-vascular rarefaction. *J Struct Biol* 1997; 118:63-72.

Goettsch C, Goettsch W, Muller G, et al. Nox4 overexpression activates reactive oxygen species and p38 MAPK in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 380:355–360.

Goldblatt H, Lynch J, Hanzel RF, et al. Studies on experimental hypertension-II: The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischaemia. *J Exp Med* 1934; 59:347-379.

Green DR. Apoptosis and sphingomyelin: the flip side. *J Cell Biol* 2000; 150(1):5-8.

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, et al. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74:1141–1148.

Griendling KK, Lassegue B, Alexander RW. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996; 36:281–306.

Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, et al. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2175–2183.

Griendling KK, Fitzgerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003a; 108:1912-1916.

Griendling KK, Fitzgerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part II: animal and humans studies. *Circulation* 2003b; 108:2034-2040.

Grossman E. Does increased oxidative stress cause hypertension? *Diabetes Care* 2008; 31:S185–S189.

Gu JW, Anand V, Shek EW, et al. Sodium induces hypertrophy of cultured myocardial myoblasts and vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1998; 31:1083-1087.

Gupta S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Int J Oncoll* 2003; 22:15-20.

Guyton AC, Hall JE, Lohmeier TE, et al. Blood pressure regulation: basic concepts. *Fed Proc* 1981; 40:2252-2256.

Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. 11th ed. Pennsylvania: Elsevier Saunders. 2006. 223-227p.

Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med* 2007; 204:2449-2460.

Gyllenhammar H. Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production. *J Immunol Methods* 1987; 97:209–213.

Gyllys KH, Fein JA, Wiley DJ, et al. Rapid annexin-V labeling in synaptosomes. *Neurochem Int* 2004; 44:125-131.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal* 1984; 219:1-14.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990; 186:1-85.

Halliwell B, Gutteridge JMC. The chemistry of free radicals and related reactive species. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University press. 1999. 36-104p .

Hamet P, Richard L, Dam TV, et al. Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension* 1995; 26:642-648.

Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Role of reactive oxygen species in cell signaling pathways. *Biochem Soc Trans* 2001; 29(2):345-350.

Harrison DG, Gongora MC, Guzik TJ, et al. Oxidative stress and hypertension. *J Am Soc Hypertens* 2007; 1(1):30–44.

Hassan M, Feyen O, Grinstein E. Fas-induced apoptosis of renal cell carcinoma is mediated by apoptosis signal-regulating kinase 1 via mitochondrial damage-dependent caspase-8 activation. *Cell Oncol* 2009; 31: 437-456.

Haurani MJ, Pagano PJ. Adventitial fibroblast reactive oxygen species as autocrine and paracrine mediators of remodeling: bellwether for vascular disease? *Cardiovasc Res* 2007; 75:679-689.

Havens CG, Ho H, Yoshioka N, et al. Dowdy SF. Regulation of late G1/S phase transition and APCdh1 by reactive oxygen. *Mol Cell Biol* 2006; 26:4701-4711.

Hayakawa H, Coofee K, Raj L. Endothelial dysfunction and cardiorenal injury in experimental salt-sensitive hypertension: effects of antihypertensive therapy. *Circulation* 1997; 96: 2407-2413.

Hayashida W, Horiuchi M, Dzau VJ. Intracellular third loop domain of angiotensin II type-2 receptor. Role in mediating signal transduction and cellular function. *The J Biol Chem* 1996; 271: 21985-21992.

Haynes WG, Sivitz WI, Morgan DA, et al. Sympathetic and cardiorenal actions of leptin. *Hypertension* 1997; 30: 619-623.

Haynes WG, Morgan DA, Walsh SA, et al. Cardiovascular consequences of obesity: role of leptin. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998; 25: 65-69.

Haznedaroglu IC, Tuncer S, Gursoy M. A local renin-angiotensin system in the bone marrow. *Med Hypothesis* 1996; 46(6):507-510.

Haznedaroglu IC, Ozturk MA. Towards the understanding of the local hematopoietic bone marrow rennin-angiotensin system. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35:867-880.

Hebbel RP. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. *J Lab Clin Med* 1986; 107(5):401-404.

Heeneman S, Smits JF, Leenders PJ, et al. Effects of angiotensin II on cardiac function and peripheral vascular structure during compensated heart failure in the rat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(10):1985-1994.

Heeschen C, Lehmann R, Honold J, et al. Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation* 2004; 109(13):1615-1622.

Heitzer T, Wenzel U, Hink U, et al. Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. *Kidney Int* 1999; 55: 252-260.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407:770-776.

Heres-Alvarez F, Peix-Gonzalez A. La proteína C reactiva como blanco terapéutico en la prevención cardiovascular: ficción o realidad? *Rev Esp Cardiol* 2011; 53:267-274.

Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, et al. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *New Engl J Med* 2002; 346:1954–1962.

Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, et al. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 2009; 73(3):411-418.

Hilgers KF, Hartner A, Porst M, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage infiltration in hypertensive kidney injury. *Kidney Int* 2000; 58:2408-2419.

Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function and cardiovascular risk. *New Engl J Med* 2003; 348(7):593-600.

Hilmmestein SI, Klotman PE. The role of thromboxane in two-kidney-one-clip Goldblatt hypertension in rats. *American JPhysiol* 1989; 257:F190-F196

Hiyoshi H, Katsutoshi Y, Masaoki T, et al. Angiotensin type 2 receptor-mediated phosphorylation of eNOS in the aortas of mice with 2-kidney, 1-clip hypertension. *Hypertension* 2005; 45:967-973.

Horton R, Rice-Evans C, Fuller BJ. The effects of iron-mediated oxidative stress in isolated renal cortical brush border membrane vesicles at normothermic and hypothermic temperatures. *Free Radic Res Commun* 1989; 5(4-5):267-275.

Hunot S, Flavell RA. Apoptosis: death of a monopoly? *Science* 2001; 292:865-866.

Imlay JA, Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 1988; 240:1302-1309.

Inigo SI, Jorge CEL, Casares MTG, et al. Induction of apoptosis in leukemic cell lines treated with captopril, trandolapril and losartan: a new role in the treatment of leukaemia for these agents. *Leuk Res* 2009; 33(6):810-816.

Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Cir Res* 2000; 87(3):179-183.

Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Proto-oncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:339-343.

Jaattela M, Tschopp J. Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat Immunol* 2003; 4(5):416-423.

Jaulmes A, Sansilvestri-Morel P, Rolland-Valognes G, et al. Nox4 mediates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 via p38 MAPK pathway in cultured human endothelial cells. *Thromb Res* 2009; 124:439-446.

Jones SA, O'Donnell VB, Wood JD, et al. Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol* 1996; 271(4 Pt 2):H1626-H1634.

Joza N, Kroemer G, Penninger JM. Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. *Trends Genet* 2002; 28:142-149.

Jung O, Schreiber JG, Geiger H, et al. gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. *Circulation* 2004; 109:1795-1801.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 192-205p.

Kakar SS, Sellers JC, Devor DC, et al. Angiotensin II type-1 receptor subtype cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation. *Biochem Bioph Res Co* 1992; 183:1090-1096.

Kam PCA, Ferch NI. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia* 2000; 55:1081-1093.

Karaflou M, Lambrinoudaki I, Christodoulakos G. Apoptosis in atherosclerosis: a mini-review. *Mini Rev Med Chem* 2008; 8: 912-918.

Kaschina E, Unger T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signaling and function. *Blood Pressure* 2003; 12:70-88.

Kelekar A. Autophagy. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1066:259-271.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 6:239-257.

Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev.* 2000; 52(1):11-34.

Kirkman HN, Rolfo M, Ferraris AM, et al. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stochiometry. *J Biol Chem* 1999; 274(20):13908-13914.

Kitada M, Kume S, Takeda-Watanabe A, et al. Sirtuins and renal diseases: relationship with aging and diabetic nephropathy. *Clin Sci* 2012; 124(3):153-164.

Kolch, W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactors. *Biochem J* 2000; 352(2):289-305.

Konat GW. H₂O₂-induced higher order chromatin degradation: a novel mechanism of oxidative genotoxicity. *J Biosci* 2003; 28(1):57-60.

Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000; 6:513-516.

Kroemer G, Jaattela M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:886–897.

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007; 87:99-163.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, et al. Robins Basic Pathology. 8th ed Cambridge: Elsevier; 2007.

Kuppasani K, Reddi AS. Emergency or urgency? Effective management of hypertensive crises. *JAAPA* 2010; 23:44-49.

Kuwana T, Newmeyer DD. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15(6):691-699.

Landmesser U, Harrison DG. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Coron Artery Dis* 2001; 12: 455-461.

Landmesser U, Dikalov S, Price SR, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 2003; 111(8):1201-1209.

Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, et al. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res* 2001; 88(9):888-894.

Lassegue B, Clempus RE. Vacular NAD(P)H oxidases: specific features, expression and regulation. *Am J Physiol Reg I* 2003; 285:R277-R297.

Lavi S, Yang EH, Prasad A, et al. The interaction between coronary endothelial dysfunction, local oxidative stress, and endogenous nitric oxide in humans. *Hypertension* 2008; 51:127-133.

Lavi R, Zhu XY, Chade AR, et al. Simvastatin decreases endothelial progenitor cell apoptosis in the kidney of hypertensive hypercholesterolemic pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30(5):976-983.

Lazartigues E, Lawrence AJ, Lamb FS, et al. Renovascular hypertension in mice with brain-selective overexpression of AT1a receptors is buffered by increased nitric oxide production in periphery. *Circulation Research* 2004; 95(5):523-531.

Lecouer H, Ledru E, Prevost MC, et al. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. *J Immunol Methods* 1997; 209:111-123.

Lee TM, Lin MS, Tsai CH, et al. Effect of paravastatin on left ventricular mass in the two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291(6):H2705-2713.

Lee YH, Mungunsukh O, Tutino RL, et al. Angiotensin II-induced apoptosis requires regulation of nucleolin and Bcl-xL by SHP-2 in primary lung endothelial cells. *J Cell Sci* 2010; 123(10):1634-43.

Lerman LO, Nath KA, Rodriguez-Porcel M, et al. Increased oxidative stress in experimental renovascular hypertension. *Hypertension* 2001; 37:541-546.

Li PF, Maasch C, Haller H, et al. Requirement for protein kinase C in reactive oxygen species-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1999; 100:967-973.

Li F, Shi R, Liao M, et al. Losartan attenuates vascular remodeling of the aorta in spontaneously hypertensive rats and the underlying mechanism. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2010; 35(8):807-813.

Li Z, Wang Y, Vanhoutte PM. Upregulation of Heme Oxygenase 1 by Hemin Impairs Endothelium-Dependent Contractions in the Aorta of the Spontaneously Hypertensive Rat. *Hypertension* 2011; 58:926-934.

Lima LCF, Porto ML, Campagnaro BP, et al. Mononuclear cell therapy reverts cuff-induced thrombosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Lipids Health Dis* 2012; 11:96-105.

Lindpaintner K, Wilhelm MJ, Jin M, et al. Tissue renin-angiotensin systems: focus on the heart. *J Hypertens Suppl* 1987; 5(2):S33-S38.

Liu Y, Zhao H, Li H, et al. Mitochondrial sources of H₂O₂ generation play a key role in flow-mediated dilation in human coronary resistance arteries. *Circ Res* 2003; 93:573-80.

Lockshin RA, Williams CM. Programmed cell death II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol* 1964; 10:643-649.

Lockwood TD. Redox control of protein degradation. *Antioxid Redox Sign* 2000; 2(4):851-878.

Loeffler M, Kremer G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cellular Res* 2000; 256:19-26.

Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med* 1996; 74:297-312.

Luft FC. Workshop: mechanisms and cardiovascular damage in hypertension. *Hypertension* 37: 594-598, 2001.

Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6:439-448.

Lyle AN, Griendling KK. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology* 2006; 21:269–280.

Ma C, Cao J, Lu XC, et al. Cardiovascular and cerebrovascular outcomes in elderly hypertensive patients treated with either ARB or ACEI. *J Geriatr Cardiol* 2012 9(3):252-257.

Macêdo TA, Bortolotto LA. Associação de estenose de artéria renal e doença coronária em pacientes com hipertensão e aterosclerose. *Rev Bras Hipertens* 2009; 16:190-191.

Mackness GB. The monocyte in cellular immunity. *Semin Hematol* 1970; 172-184.

Madeddu P, Milia AF, Salis MB, et al. Renovascular hypertension in bradykinin B2-receptor knockout mice. *Hypertension* 1998; 32:503-509.

Mahmoudi M, Mercer J, Bennett M. DNA damage and repair in atherosclerosis *Cardiovasc Res* 2006; 71(2):259-268.

Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 2008, 29:367-374.

Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 1995; 82(3):349-352.

Martin SJ, Reutelingsperger CPM, Gahon MC, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the

initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995; 182:1545-1556.

Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 2002; 192:1-15.

Martinez-Maldonado M. Pathophysiology of renovascular hypertension. *Hypertension* 1991; 17:707-719.

Massenet C, Chenavas S, Cohen-Addad C, et al. Effects of p47phox C terminus phosphorylations on binding interactions with p40phox and p67phox. Structural and functional comparison of p40phox and p67phox SH3 domains. *J Biol Chem* 2005; 280:13752-13761.

Mata-Greenwood E, Jenkins C, Farrow KN, et al. Endothelial nitric oxide synthase function is developmentally regulated: uncoupling of eNOS occurs postnatally. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 290:L232-L241.

Matavelli LC, Huang J, Siragy HM. Angiotensin AT2 receptor stimulation inhibits early renal inflammation in renovascular hypertension. *Hypertension* 2011; 57(2):308-313.

Matés JM, Pérez-Gómez C, Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32(8):595-603.

Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest* 2000; 106:1521-1530.

May AG, Van de Berg L, Dewese JA, et al. Critical arterial stenosis. *Surgery*. 1963; 54:250-259.

McInnes GT. Clinical potential: angiotensin converting enzyme inhibitor or angiotensin II antagonist? *J Hypertens* 2001; 19:S61-S67.

Melaragno MG, Fink GD. Enhanced Slow Pressor Effect of Angiotensin II in Two-Kidney, One Clip Rats. *Hypertension* 1995; 25:288-293.

Mendis S, Puska P, Norrving B. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. World Health Organization. 2011. Disponível em: <http://www.who.int>

Menon SG, Goswami PC. A redox cycle within the cell cycle: ring in the old with the new. *Oncogene* 2006; 24:1-9.

Miksche LW, Miksche U, Gross F. Effect of sodium restriction on renal hypertension and on renin activity in the rat. *Circ Res* 1970; 27:973-984.

Minotti G, Aust SD. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1987; 262(3):1098-1104.

Mohazzab KM, Kaminski PM, Wolin MS. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol* 1994; 266(6):H2568-H2572.

Mollnau H, Wendt M, Szocs K. Effects of angiotensin infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res* 2002; 90:E58-E65.

Mongeau JG. Heredity and blood pressure. *Semin Nephro.* 1989; 9:208-216.

Montecucco F, Pende A, Quercioli A, et al. Inflammation in the pathophysiology of essential hypertension. *J Nephrol* 2011; 24:23-34.

Morawietz H, Weber M, Rueckschloss U, et al. Upregulation of vascular NAD(P)H oxidase subunit gp91phox and impairment of the nitric oxide signal transduction pathway in hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285:1130-1135.

Morillas P, de Andrade H, Castillo J, et al. Inflammation and apoptosis in hypertension: relevance of the extent of target organ damage. *Rev Esp Cardiol* 2012; 65(9):819-825.

Morimoto S, Cassel MD, Sigmund CD. The brain renin-angiotensin system in transgenic mice carrying a highly regulated human renin transgene. *Circ Res* 2002; 90(1):80-86.

Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, et al. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem* 1993; 268:24539–24542.

Mueller CF, Laude K, McNally JS, et al. ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:274-278.

Muller J, Decordier I, Hoet PH, et al. Clastogenic and aneugenic effects of multiwalled carbon nanotube in epithelial cells. *Carcinogenesis* 2008; 29:427–433.

Napoli C. Oxidation of LDL, atherogenesis, and apoptosis. *Ann NY Acad Sci* 2003; 1010: 698-709.

Navar LG, Zou L, von Thun A, et al. Unraveling the mystery of Goldblatt Hypertension. *News Physiol* 1998; 13:170-176.

Neumann L, Pforr C, Beaudouin J, et al. Dynamics within the CD95 death-inducing signaling complex decide life and death of cells. *Mol Syst Biol* 2010; 6: 352-359.

Nogueira BV, Peotta VA, Meyrelles SS, et al. Evaluation of aortic remodeling in Apolipoprotein E-deficient mice and renovascular hypertensive mice. *Arch Med Res* 2007; 38(8):816-821.

Nogueira BV, Palomino Z, Porto ML, et al. Granulocyte colony stimulating factor prevents kidney infarction and attenuates renovascular hypertension. *Cell Physiol Biochem* 2012; 29:143-152.

Nordberg J, Arnér ES. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001; 31(11):1287-1312.

Oikawa A, Siragusa M, Quaini F, et al. Diabetes Mellitus induces bone marrow microangiopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30:498-508.

Oro C, Qian H, Thomas WG. Type 1 angiotensin receptor pharmacology: signaling beyond G proteins. *Pharmacol Ther* 2007; 113:210–226.

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4:552-565.

Owens WB. Blood pressure control in acute cerebrovascular disease. *J Clin Hypertens* 2011; 13(3):205-211.

Pagano PJ, Ito Y, Tornheim K, et al. An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am J Physiol* 1995; 268(6):H2274-H2280.

Palm F, Onozato M, Welch WJ, et al. Blood pressure, blood flow and oxygenation in clipped kidney of chronic 2K,1C rats: effects of tempol and angiotensin blockade. *Hypertension* 2010; 55(2):298-304.

Palmieri B, Sblendorio V. Oxidative stress tests: overview on reliability and use: part I. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2007; 11(5):309-342.

Paraolin MB, Reason IJM. MCP como um mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. *Arq Gastroenterol* 2001; 38:138-144.

Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res* 2006; 71:247-158.

Patterson C, Ruef J, Madamanchi NR, et al. Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that p47(phox) may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1999; 274(28):19814-19822.

Paul M, Bachmann J, Ganten D. The tissue renin-angiotensin system in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 1992; 2:94-99.

Peotta VA, Gava AL, Vasquez EC, et al. Evaluation of baroreflex control of heart rate in renovascular hypertensive mice. *Can J Physiol Pharm* 2007; 85: 761-766, 2007.

Pereira TMC, Balarini CM, Silva IV, et al. Endogenous angiotensin II modulates nNOS expression in renovascular hypertension. *Bras J Med Biol Res* 2009; 42 :685-691.

Peres CM, Curi R. Como cultivar células. 1ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochem Biophys Acta* 2004; 1644:83-94.

Polizio AH, Pena C. Effects of angiotensin II type 1 receptor blockade on the oxidative stress in spontaneously hypertensive rat tissues. *Regul Pept* 2005; 128(1):1-5.

Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, et al. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis: countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res* 1996; 79:748-756.

Polly DM, Paciullo CA, Hatfield CJ. Management of hypertensive emergency and urgency. *Adv Emerg Nurs J* 2011; 33(2):127-136.

Pollycove M, Feinendegen LE. Radiation-induced versus endogenous DNA damage: possible effect of inducible protective responses in mitigating endogenous damage. *Human Exp Toxicol* 2003; 22:290-306.

Porto ML, Lima LCF, Pereira TMC, et al. Mononuclear cell therapy attenuates atherosclerosis in apoE KO mice. *Lipids Health Dis* 2011; 10:55-61.

Praxedes JN. Hipertensão renovascular: epidemiologia e diagnóstico. *Rev Bras Hipertens* 2002; 9:148-53.

Prieto-Carrasquero MC, Botros FT, Pagan J, et al. Collecting duct renin is upregulated in both kidneys of 2-kidney, 1-clip goldblatt hypertensive rats. *Hypertension* 2008; 51(6):1590-1596.

Pulgar VM, Yamashiro H, Rose JC, et al. Role of the AT2 receptor in modulating the angiotensin II contractile response of the uterine artery at mid-gestation. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2011; 12(3):176-83.

Puyal J, Vaslin A, Mottier V, Clarke PG. Postischemic treatment of neonatal cerebral ischemia should target autophagy. *Ann Neurol* 2009; 66:378-389.

Rahman I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *J Biochem Mol Biol* 2003; 36(1):95-109.

Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996; 97:1916-1923.

Rathore N, John S, Kale M, et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in isoproterenol induced oxidative stress in rat tissues. *Pharmacol Res* 1998; 38(4):297-303.

Redon J, Oliva MR, Tormos C, et al. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension* 2003; 41: 1096–1101.

Richards A. Nuevos biomarcadores em La insuficiencia cardiaca: aplicaciones em el diagnóstico, pronóstico y pautas de tratamiento. *Rev Esp Cardiol* 2010; 63:635-639.

Riley R. Principles and applications of flow cytometry. [Internet]. 2005:[citado em: 06/03/2011]. Disponível em: <http://pathology.vcu.edu>

Rizzoni D, Rodella L, Porteri E, et al. Time course of apoptosis in small resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2000; 18:885-891.

Rodriguez-Lopez AM, Flores O, Arevalo MA, et al. Glomerular cell proliferation and apoptosis in uninephrectomized spontaneously hypertensive rats. *Kidney Int Suppl* 1998; 68:S36–S40.

Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Heart disease and stroke statistics update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2012; 125: e2–e220.

Rohrwasser A, Morgan T, Dillon HF, et al. Elements of a paracrine tubular renin-angiotensin system along the entire nephron. *Hypertension* 1999; 34:1265-1274.

Rosello-Lleti E, Rivera M, Martinez-Dolz L, et al. Inflammatory activation and left ventricular mass in essential hypertension. *Am J Hypertens* 2009; 22:444-450.

Ross E, Glomsed JA. The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl Med* 1976; 295:369-377.

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, et al. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001a; 10:321-329.

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, et al. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. *Hypertension* 2001b; 38(6):1382-1387.

Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, et al. Molecular mechanisms of angiotensin II-induced vascular injury. *Curr Hypertens Rep* 2003; 5:73-79

Rupnarain C, Dlamini Z, Naicker S, et al. Colon cancer : genetics and apoptotic events. *Biol Chem* 2004; 385:449-464.

Sabuhi R, Asghar M, Hussain T. Inhibition of NAD(P)H oxidase potentiates AT2 receptor antagonist-induced natriureis in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010; 299(4):F815-F820.

Sadoshima JI, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts: critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res* 1993; 73:413-423.

Salguero G, Akin E, Templin C, et al. Renovascular hypertension by two-kidney one-clip enhances endothelial progenitor cell mobilization in a p47^{phox}-dependent manner. *J Hypertens* 2008; 26: 257-268.

Samani NJ, Swales JD. Molecular biology of the vascular renin-angiotensin system. *Blood Vessels* 1991; 28:210-216.

Sander K, Horn CS, Briesenick C, et al. High-sensitivity C-reactive protein is independently associated with early carotid artery progression in women but not in men: the INVADE Study. *Stroke* 2007; 38:2881-2886.

Schieven, G.L. The biology of p38 kinase: a central role in inflammation. *Curr Top Med Chem* 2005; 5(10):921-928.

Schmidt-Ott KM, Kagiyama S, Phillips MI. The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis. *Regul Pept* 2000; 93:65–77.

Schrader M, Fahimi HD. Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol* 2004; 122:383-393.

Schulz E, Gori T, Munzel T. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertens Res* 2011; 34:665-673.

Schupp N, Schmid U, Rutkowski P, et al. Angiotensin II-induced genomic damage in renal cells can be prevented by angiotensin II type 1 receptor blockage or radical scavenging. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292(5):F1427-F1434.

Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 1973; 7(3):253-266.

Shanmugam S, Corvol P, Gasc JM. Angiotensin II type 2 receptor mRNA expression in the developing cardiopulmonary system of the rat. *Hypertension* 1996; 28: 91–97.

Sharifi AM, Schiffrin EL. Apoptosis in aorta of deoxycorticosterone acetate–salt hypertensive rats: effect of endothelin receptor antagonism. *J Hypertens* 1997; 15:1441-1448.

Sharifi AM, Schiffrin EL. Apoptosis in vasculature of spontaneously hypertensive rats: effect of an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a calcium channel antagonist. *Am J Hypertens* 1998; 11:1108-1116.

Sharikabad MN, Ostbye KM, Lyberg T, et al. Effect of extracellular Mg²⁺ on ROS and Ca²⁺ accumulation during reoxygenation of rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280(1):H344-H353.

Shibata H, Suzuki H, Murakami M, et al. Angiotensin II type 1 receptor messenger RNA levels in human blood cells of patients with primary and secondary hypertension: reference to renin profile. *J Hypertens* 1994; 12(11):1275-1284.

SISHiperdia – Sistema de cadastramento e acompanhamento de hipertensos e diabéticos [Internet]. Secretaria de Atenção à Saúde. Ministério da Saúde. [citado em: 10/10/2012]. Disponível em: [http://: hiperdia.datasus.gov.br](http://hiperdia.datasus.gov.br)

Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res* 2003; 531(1-2): 231-251.

Smithies O, Kim HS, Takahashi N, et al. Importance of quantitative genetic variations in the etiology of hypertension. *Kidney Int.* 2000; 8:2265-2280.

Soares ER, Lima WG, Machado RP, et al. Cardiac and renal effects induced by different exercise workloads in renovascular hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res* 2011; 44(6):573-582.

Sollott S, Pion I, Michaels S, et al. Intrarenal renin-angiotensin system modulates glomerular angiotensin receptors in the rat. *Am J Physiol* 1988; 254:F345-F350.

Somers MJ, Mavromatis K, Galis ZS, et al. Vascular superoxide production and vasomotor function in hypertension induced by deoxycorticosterone acetate-salt. *Circulation* 2000; 101:1722-1728.

Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, et al. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105(12):1429-1435.

Spiekermann S, Landmesser U, Dikalov S, et al. Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation* 2003; 107(10):1383-1389.

Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 2003; 25(3-4):207-218.

Steinberg D, Witztum JL. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? *Circulation* 2002; 105:2107-2111.

Strawn WB, Richmond RS, Tallant EA, et al. Renin-angiotensin system expression in rat bone marrow haematopoietic and stromal cells. *Brit J Haematol* 2004; 126:120-126.

Suematsu M, Suzuki H, Delano FA, et al. The inflammatory aspect of the microcirculation in hypertension: oxidative stress, leukocytes / endothelial interaction, apoptosis. *Microcirculation* 2002; 9:259-276.

Swartz HM, Dunn JF. Measurements of oxygen in tissues: overview and perspectives on methods. *Adv Exp Med Biol* 2003; 530:1-12.

Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 1999; 79: 215–262.

Tabet F, Savoia C, Schiffrin EL, et al. Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004 ; 44:200 –208.

Tait JF, Gibson DF, Smit HC. Measurement of the affinity and cooperativity of annexin V-membrane binding under conditions of low membrane occupancy. *Anal Biochem* 2004; 329:112-119.

Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 2003; 42(6):1075-1081.

Tarpey MM, Wink DA, Grisham MB. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 286(3):R431-R444.

Tatton W, Chalmers-Redman R, Tatton N. Neuroprotection by deprenyl and other propargylamines: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase rather than monoamine oxidase B. *J Neural Transm* 2003; 110:509-515.

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:231–241.

Tea BS, der Sarkissian S, Touyz RM, et al. Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats in vivo. *Hypertension* 2000; 35:1069-1073.

Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, et al. Human endothelial progenitor cell from type II diabetics exhibit impaired proliferation into vascular structures. *Circulation* 2002; 106(22):2781-2786.

Textor SC, Novick A, Mujais SK, et al. Responses of the stenosed and contralateral kidneys to [Sar1, Thr8]: all in human renovascular hypertension. *Hypertension* 1983; 5:796–804.

Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279:L1005-L1028.

Thollon C, Iliou JP, Cambarrat C, et al. Nature of the cardiomyocyte injury induced by lipid hydroperoxides. *Cardiovasc Res* 1995; 30(5):648-655.

Touyz RM. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2000; 2:98-105.

Touyz RM, Chen X, Tabet F, et al. Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res* 2002; 90:1205-1213.

Touyz RM. Reactive oxygen species in vascular biology: role in arterial hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2003; 1:91-106.

Touyz RM, Tabet F, Schiffrin EL. Redox-dependent signaling by angiotensin II and vascular remodeling in hypertension. *Clin Exp Pharmacol* 2003; 30(11):860-866.

Touyz RM. Molecular and cellular mechanism in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005; 14:125-131.

Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 2008; 31:S170-S180.

Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling. *Cardiovasc Res* 2009; 81:449-456.

Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohé, R, et al. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 1995; 252:38-53.

Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK: p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 23317–23321.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160(1):1-40.

Vandenabeele P, Declercq W, van den Berghe T. Necrotic cell death and 'necrostatins': now we can control cellular explosion. *Trends Biochem Sci* 2008; 33:352–355.

Vanden Hoek TL, Li C, Shao Z, et al. Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29(9): 2571-2583.

Vannucci SJ, Hagberg H. Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol* 2004; 207:3149-3154.

Varin R, Mulder P, Tamion F, et al. Improvement of endothelial function by chronic angiotensin-converting enzyme inhibition in heart failure: role of nitric oxide, prostanoids, oxidant stress, and bradykinin. *Circulation* 2000; 102(3):351-356.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995; 184(1):39-51.

VIGITEL – Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Estatística e informação em saúde. 1ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2012.

Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001; 15(22):2922-2933.

Wang HD, Johns DG, Xu S, et al. Role of superoxide anion in regulating pressor and vascular hypertrophic response to angiotensin II. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282(5):H1697-H1702.

Wang D, Chen Y, Chabrashvili T, et al. Role of oxidative stress in endothelial dysfunction and enhanced responses to angiotensin II of afferent arterioles from rabbits infused with angiotensin II. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2783–2789.

Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis. *Annu Rev Genet* 2009; 43:95–118.

Welch WJ, Mendonça M, Aslam S, et al. Roles of oxidative stress and AT1 receptors in renal hemodynamics and oxygenation in the postclipped 2K,1C kidney. *Hypertension* 2003; 41(3):692-696.

Whetton AD, Graham GJ. Homing and mobilization in the stem cell niche. *Trends Cell Biol* 1999; 9:233-238.

Wiesel P, Mazzolai L, Nussberger J, et al. Two-kidney, one clip and one-kidney, one clip hypertension in mice. *Hypertension* 1997; 29(4):1025-1030.

Wilcox CS. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension? *Am J Physiol* 2005; 289:913-935.

Wind S, Beuerlein K, Eucker T, et al. Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxidase inhibitors. *Br J Pharmacol* 2010; 161(4):885-898.

Wolf G. Angiotensin II is involved in the progression of renal disease: importance of non-hemodynamic mechanisms. *Nephrologie* 1998; 19: 451-456.

Worou ME, Belmokhtar K, Bonnet P, et al. Hemin decreases cardiac oxidative stress and fibrosis in a rat model of systemic hypertension via PI3K/Akt signaling. *Cardiovasc Res* 2011; 91(2):320-329.

Working Group on Renovascular Hypertension. Detection, evaluation, and treatment of renovascular hypertension. Final report. *Arch Int Med*. 1987; 147:820–829.

Wu TC, Chao CY, Lin SJ, et al. Low-Dose Dextromethorphan, a NADPH Oxidase Inhibitor, Reduces Blood Pressure and Enhances Vascular Protection in Experimental Hypertension. *PLoS ONE* 2012a; 7(9): e46067.

Wu KLH, Chan SHH, Chan JYH. Neuroinflammation and oxidative stress in rostral ventrolateral medulla contribute to neurogenic hypertension induced by systemic inflammation. *J Neuroinflammation* 2012b; 9:212-227.

Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:156-160.

Yasunari K, Maeda K, Nakamura M, et al. Oxidative stress in leukocytes is a possible link between blood pressure, blood glucose, and C-reactive protein. *Hypertension* 2002; 39: 777–780.

Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, et al. Novel role of NADH/NADPH oxidase-derived hydrogen peroxide in angiotensin II-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 1998; 32: 488-495.

Zalba G, Beaumont J, San José G, et al. Vascular oxidant stress: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol Biochem* 2000; 56:57–64.

Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 2005; 15:11-18.

Zimmerman KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 2001; 92:57-70.

Zuo L, Ushio-Fukai M, Hilenski LL, et al. Microtubules regulate angiotensin II type 1 receptor and Rac1 localization in caveolae/lipid rafts: role in redox signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1223–1228.