

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM ALISQUIRENO E L-
ARGININA SOBRE A SENSIBILIDADE BARORREFLEXA E
ESTRESSE OXIDATIVO DE RATOS COM HIPERTENSÃO
RENOVASCULAR**

VINÍCIUS MENGAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

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

**VITÓRIA - ES
JULHO DE 2015**

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM ALISQUIRENO E L-
ARGININA SOBRE A SENSIBILIDADE BARORREFLEXA E
ESTRESSE OXIDATIVO DE RATOS COM HIPERTENSÃO
RENOVASCULAR**

VINÍCIUS MENGAL

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

Aprovada em 01/07/2015 por:

Prof.^a Dr.^a Sonia Alves Gouvea - Orientadora, UFES

Prof.^a Dr.^a Gláucia Rodrigues de Abreu – Co-orientadora, UFES

Prof.^a Dr.^a Nazaré de Souza Bissoli, UFES

Prof. Dr. Henrique de Azevedo Futuro Neto, MULTIVIX

**VITÓRIA - ES
JULHO DE 2015**

Mengal, Vinícius

Efeitos do tratamento com alisquireno e L-arginina sobre a sensibilidade barorreflexa e estresse oxidativo de ratos com hipertensão renovascular. Vitória – 2012.

78 f.

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

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

1. Alisquireno. 2. L-arginina. 3. Hipertensão 2R1C. 4. Sensibilidade Barorreflexa

DEDICO ESTE TRABALHO

Integralmente a Deus, força propulsora para a entrada, permanência e defesa deste trabalho. Aos meus pais, que não pouparam esforços e auxílios, ao meu avô Ângelo (in memoriam) que certamente muito se felicita com essa conquista, minha avó em especial e a todos os amigos e familiares que me apoiaram constantemente!!

AGRADECIMENTOS

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

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

Não podia deixar de mencionar, meus avós! A minha vó que comigo ainda permanece pela clara expectativa que um dia depositou em mim, hoje, consegui. Aos que já se foram por um dia terem passado pela minha vida e me ensinado grande parte do alicerce que hoje possuo!

Agradeço em especial à Prof^o Dr^a Gláucia Rodrigues Abreu por ter aberto às portas do laboratório, e à Prof^a Dr^a Sonia Alves Gouvea por ter acreditado no meu potencial e de forma ímpar ter contribuído para o meu crescimento. Pelos muitos momentos de aprendizado, rizadas, companheirismo e solidariedade, meu muito obrigado!

Deixo meu agradecimento à Mariana Verenez Borgo por ter despertado em mim a busca pela ciência, à Priscilla Ferreira e Silva e Patrick Wander Endlich pela força propulsora da minha chegada ao laboratório. E, ao Fabrício Bragança da Silva, Simone Alves de Almeida, Erick Gonçalves e Suelem Guedes pelo apoio. Enfim, a TODOS do Núcleo de estudos neuro-humorais da circulação – UFES, meu muito obrigado!

Em especial, agradeço ao Paulo Henrique Mattos, pelo companheirismo! Sua ajuda foi primordial para o sucesso deste trabalho. Muitos feriados, finais de semana e noites foram compartilhados pelos laboratórios, mas conseguimos!!

Não podia faltar, é claro, às Dras Cintia Helena Santuzzi e Renata Viana Tiradentes que depois de longos períodos de experimentos, risos e correrias me fizeram crescer, aprender e chegar aonde cheguei. À vocês devo toda técnica, destreza e conhecimento que ora adquiri!

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

Obrigado à minha família, tios e primos e amigos pela compreensão e apoio, e em especial a minha namorada, Scheila. Assim como, todos aqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste sonho.

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida.

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

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Pressão arterial sistólica em ratos com hipertensão renovascular 2R1C....46

Tabela 2: Pressão arterial direta e frequência cardíaca em ratos com hipertensão renovascular 2R1C.....47

Tabela 3: Hipertrofia ventricular esquerda em ratos com hipertensão renovascular 2R1C.....47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos neurais e humorais para ajustes apropriados de ajuste da pressão arterial.....	20
Figura 2: Efeitos renais da implantação do clipe na artéria renal.....	24
Figura 3: Ações sistêmicas da Angiotensina II sobre diferentes sistemas.....	25
Figura 4. Mecanismo enzimático de defesa antioxidante.....	27
Figura 5: Organograma do protocolo Experimental.....	34
Figura 6. Indução da hipertensão renovascular (2R1C Goldblatt).....	35
Figura 7. Cateterização dos vasos femorais (artéria e veia).....	37
Figura 8. Protocolo experimental para avaliação da sensibilidade do barorreflexo.....	38
Figura 9 – Registro típico de bradicardia reflexa.....	44
Figura 10 – Registro típico de taquicardia reflexa.....	45
Figura 11. Sensibilidade do barorreflexo sobre o componente parassimpático usando infusões intravenosas de fenilefrina antes e após da administração de TEMPOL.....	49
Figura 12. Sensibilidade do barorreflexo sobre o componente parassimpático usando infusões intravenosas de nitroprussiato de sódio antes e após da administração de TEMPOL.....	49
Figura 13. Níveis de produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) no plasma sanguíneo (A) e no ventrículo esquerdo (B).....	50
Figura 14. Expressão proteica da SOD (A), catalase (2) e da subunidade gp91phox da NADP(H) oxidase (C) no ventrículo esquerdo.....	51
Figura 15. Atividade da SOD (A) e catalase (B) no ventrículo esquerdo.....	52
Figura 16. Fluorescência emitida por dihidroetídeo na microscopia do ventrículo esquerdo.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

PAS – Pressão arterial sistólica

PAD – Pressão arterial diastólica

FC – Frequência cardíaca

NTS – Núcleo do trato solitário

NA – Núcleo ambíguo

DMX – Dorsal motor do vago

CVLM – Bulbo ventrolateral caudal

RVLM – Bulbo ventrolateral rostral

SRAA – Sistema renina-angiotensina-aldosterona

NO – Óxido nítrico

Ang II – Angiotensina II

EROs – Espécies reativas de oxigênio

NOS – Óxido nítrico sintase

nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial

DCV – Doenças cardiovasculares

2R1C – Dois rins, um clipe

1R1C – Um rim, um clipe

2R2C – Dois rins, dois cliques

Ang I – Angiotensina I

ECA – Enzima conversora de angiotensina

O₂^{•-} – Ânion superóxido

ERNs – Espécies reativas de nitrogênio

SOD – Superóxido dismutase

GPx – Glutathione peroxidase

GDR – Glutathione reductase

CAT – Catalase

GSH – Glutathione

IECAs – Inibidores da enzima conversora de angiotensina

BRAs – Bloqueadores do receptor AT1

ALSK – Alisquireno

L-ARG – L-arginina

PAM – Pressão arterial média

AOPP – Produtos avançados de oxidação proteica

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

DHE – Dihidroetídeo

E – Etídeo

EHO – 2-hidroxi etídeo

EPM – Erro padrão da média

MAPK - Proteínas quinases ativadas por mitógenos

SUMÁRIO

RESUMO	14
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 JUSTIFICATIVA.....	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos Específicos	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Animais Experimentais	33
4.2 Procedimentos Experimentais	33
4.2.1 Tratamento	33
4.2.2 Modelo de hipertensão renovascular (Hipertensão 2R1C de Goldblat).....	34
4.2.3 Análise da medida indireta da pressão arterial sistólica (PAS).....	35
4.2.4 Canulação da artéria e veia femoral para aferição da pressão arterial direta frequência cardíaca e administração de drogas vasoativas	36
4.2.5 Teste da sensibilidade do barorreflexo.....	37
4.2.5.1 Protocolo Experimental para Avaliação da Sensibilidade do Barorreflexo	38
4.2.6 Estimativa da massa do ventrículo esquerdo	38
4.2.7 Determinação dos produtos avançados de oxidação proteica (Advanced Oxidation Protein Products – AOPP)	38
4.2.8 Estudos da expressão proteica	39
4.2.8.1 Western Blot para detecção da Superóxido Dismutase (Mn SOD-2), Catalase e gp91phox no ventrículo esquerdo de ratos.....	39
4.2.8.2 Preparação dos tecidos e quantificação de proteínas.....	39
4.2.8.3 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)	40
4.2.8.4 Transferência das proteínas	41
4.2.8.5 Incubação dos anticorpos.....	41
4.2.9 Ensaio para detecção da atividade da superóxido dismutase no tecido cardíaco	42
4.2.10 Ensaio para detecção da atividade da catalase no tecido cardíaco.....	42
4.2.11 Estudo da geração de espécies reativas de oxigênio no tecido cardíaco – Dihidroestídeo (DHE).....	43
4.3 Análise Estatística	44
5 RESULTADOS	46

5.1 Efeitos dos tratamentos com Alisquireno e L-arginina sobre a Pressão Arterial e Frequência Cardíaca de ratos com hipertensão renovascular	46
5.2 Efeitos do tratamento com Alisquireno e L-arginina sobre o peso do ventriculo esquerdo.....	47
5.3 Efeitos do tratamento com Alisquireno e L-arginina sobre a modulação barorreflexa cardíaca	48
5.4 Determinação dos Produtos Avançados de Oxidação Proteica (Advanced Oxidation Protein Products – AOPP).....	50
5.5 Expressão proteica da Mn SOD-2, Catalase e gp91phox no ventriculo esquerdo de ratos com hipertensão renovascular	50
5.6 Atividade da SOD e CAT no ventriculo esquerdo de ratos com hipertensão renovascular.....	52
5.7 Quantificação da geração de espécies reativas de oxigênio pela oxidação do Dihidroestídeo (DHE) no tecido cardíaco de ratos com hipertensão renovascular ..	52
6 DISCUSSÃO	54
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

RESUMO

A hipertensão renovascular é caracterizada pelo aumento da angiotensina II, estresse oxidativo e disfunção endotelial. O objetivo deste estudo foi testar se a administração de alisquireno (ALSK) e L-arginina (L-Arg), restauraria a sensibilidade barorreflexa prejudicada e reduziria o estresse oxidativo em ratos em um modelo hipertensão renovascular. A hipertensão foi induzida através da clipagem da artéria renal esquerda, sendo dividido os animais em cinco grupos: SHAM, 2-clipagem, 1-clipagem (2R1C); 2R1C mais ALSK (ALSK); 2R1C mais L-arg (L-arg); e 2R1C mais ALSK + L-ARG (ALSK+L-ARG). A expressão e atividade de SOD-2 e catalase foi medida no ventrículo esquerdo, o ensaio de produtos avançados de oxidação proteica foram medidos no plasma e ventrículo esquerdo. Após 21 dias de tratamento apenas o grupo ALSK+L-ARG foi eficaz na normalização da pressão arterial sistólica quando comparado ao grupo 2R1C ($123,91 \pm 1,68$ vs. $200,50 \pm 5,36$ mmHg). Os grupos L-ARG e ALSK+L-arg reverteram a hipertrofia do ventrículo esquerdo quando comparado ao grupo 2R1C ($2,22 \pm 0,15$ e $2,47 \pm 0,09$ vs. $3,32 \pm 0,16$, respectivamente, $P < 0,05$). Todos os tratamentos foram capazes de restaurar a sensibilidade do barorreflexo mostrando valores muito similares ao grupo SHAM em ambos os componentes, parassimpático e simpático. A administração aguda de TEMPOL restaurou a sensibilidade do barorreflexo deprimido no grupo 2R1C aos valores que se assemelha aquelas apresentadas pelos outros grupos. Os níveis de produtos avançados de oxidação proteica no plasma mostrou-se aumentada no grupo 2R1C e reduzido nos demais grupos SHAM, ALSK, L-ARG e ALSK+L-ARG ($5,79 \pm 0,67$ vs. $3,79 \pm 0,41$; $3,96 \pm 0,35$; $4,26 \pm 0,47$ e $3,91 \pm 0,36$ $\mu\text{mol/L}$ chloramine-T, respectivamente, $P < 0,05$). Respostas similares foram encontradas no ventrículo esquerdo. A expressão de SOD-2 e expressão e atividade de catalase no tecido cardíaco foi significativamente aumentada em ALSK, L-ARG e ALSK+L-ARG. A gp91phox no tecido cardíaco foi significativamente diminuída nos grupos L-ARG e ALSK+L-Arg quando comparados com os grupos 2R1C e ALSK. Em conclusão, o tratamento associado de alisquireno e L-arginina normaliza pressão arterial e impede hipertrofia ventricular em ratos com hipertensão 2R1C, um efeito que pode ser parcialmente atribuído ao aumento da sensibilidade do barorreflexo e diminuição do estresse oxidativo.

Palavras Chave: Hipertensão 2R1C, Alisquireno, L-arginina, sensibilidade barorreflexa, estresse oxidativo

ABSTRACT

Renovascular hypertension is characterized by increased angiotensin II, oxidative stress, and by endothelial dysfunction. The purpose of this study was tested if the administration of aliskiren (ALSK) and L-arginine (L-ARG), would restore impaired baroreflex sensitivity and reduce the oxidative stress in a rat renovascular hypertension model. Hypertension was induced by clipping the left renal artery, and the following 5 groups were divided: SHAM, 2-kidney, 1-clip (2K1C); 2K1C plus ALSK (ALSK); 2K1C plus L-ARG (L-ARG); and 2K1C plus ALSK+ L-ARG (ALSK+L-ARG). SOD-2 and Catalase expression was measured in plasma and tissues and Assay of advanced oxidation protein products. After 21 days of treatment, only the ALSK+L-ARG group was effective in normalize the arterial pressure (108.8 ± 2.8 mmHg). The L-ARG and ALSK+L-ARG groups not show hypertrophy of the left ventricle. All treatments restored the depressed baroreflex sensitivity to values found by SHAM group in both parasympathetic and sympathetic component of baroreflex system. Acute administration of TEMPOL restored the depressed baroreflex sensitivity in 2K1C group to values that resembles to those presented by other groups. The advanced oxidation protein products levels in plasma that 2K1C group was significantly increased in 2K1C group compared with SHAM, ALSK, L-ARG and ALSK+L-ARG groups ($5,79\pm 0,67$ vs. $3,79\pm 0,41$; $3,96\pm 0,35$; $4,26\pm 0,47$ and $3,91\pm 0,36$ $\mu\text{mol/L}$ chloramine-T respectively, $P < 0.05$). The similar responses was found in cardiac tissue. The SOD-2 and Catalase expression in the cardiac tissue was significantly increased in ALSK, L-ARG and ALSK+L-ARG. The gp91phox in the cardiac tissue to L-ARG and ALSK+L-ARG groups was significantly decreased when compared with 2K1C and ALSK groups. In conclusion, combined ALSK+L-ARG treatment normalizes SBP and prevents ventricular hypertrophy in 2K1C hypertensive rats, an effect that can be partially attributed to increased baroreflex sensitivity and decreases oxidative stress.

Key words: 2K1C hypertension, Aliskiren, L-arginine, sensitivity baroreflex, oxidative stress

1 INTRODUÇÃO

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

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

O controle neural é determinado em grande parte pela modulação do tono simpático dirigido ao coração e arteríolas. O controle humoral, por sua vez, é feito por um grande conjunto de substâncias químicas lançadas na circulação que atuam como hormônios ou por agentes químicos de ação local (parácrinos ou autócrinos). De forma geral pode-se relacionar o controle neural como mais eficiente nos ajustes rápidos da pressão arterial, ou seja, momento a momento, como por exemplo nas mudanças posturais, no esforço físico e no ciclo vigília-sono. A longo prazo, tanto o controle neural como hormonal estão diretamente envolvidos (Aires, 2012).

As vias neurais reguladoras da pressão arterial são responsáveis por encaminhar informações periféricas como nível pressórico, volemia, pH, temperatura, através de receptores específicos (Franchini & Cowley, 1996). A regulação neural é feita pelo

sistema nervoso autônomo atuando no coração influenciando de forma tônica e reflexa, uma vez que tanto a noradrenalina como a acetilcolina liberadas no coração modificam o débito cardíaco por alterar a força de contração das fibras miocárdicas e a frequência cardíaca (FC). Nos vasos de resistência da circulação sistêmica, a liberação de noradrenalina modifica o estado contrátil do músculo liso vascular, e assim, a resistência vascular periférica. Além disso, respostas reflexas dos sistemas simpático e parassimpático permitem ajustes do débito cardíaco e da resistência vascular periférica contribuindo para a estabilização e manutenção da pressão arterial sistêmica durante diferentes situações fisiológicas (Franchini & Cowley, 1996, Aires, 2012). A manutenção (componente tônico) bem como a variação momento a momento (componente fásico) dependem de mecanismos complexos que determinam ajustes apropriados da frequência e contratilidade cardíaca, do estado contrátil dos vasos de resistência e de capacitância e da distribuição de fluido dentro e fora dos vasos sanguíneos.

Nesse contexto, sabe-se que três arcos reflexos estão envolvidos na modulação autonômica cardiovascular, ligados aos pressorreceptores (ou barorreceptores) arteriais (alta pressão), aos receptores cardiopulmonares (baixa pressão) e aos quimiorreceptores arteriais (Irigoyen et al., 2003).

Os barorreceptores arteriais são mecanorreceptores sensíveis às deformações vasculares e estão presentes no seio carotídeo e arco aórtico, devido a sua associação com o ciclo cardíaco e sua alta sensibilidade em detectar alterações na pressão arterial rapidamente, constituem o principal regulador reflexo de ajuste momento a momento dos níveis pressóricos (Chapleau, Hajduczuk e Abboud, 1989). Os receptores cardiopulmonares estão localizados nos átrios, ventrículos, coronárias, pericárdio, vasos pulmonares e parênquima pulmonar e atuam por diferentes fibras aferentes (vagais ou simpáticas) podendo determinar tanto uma inibição do sistema simpático para os vasos sanguíneos, como uma estimulação vagal para o coração (Kappagoda, Linden e Snow, 1972; Aires, 2012). Por outro lado, o quimiorreflexo é o principal mecanismo de controle e regulação das respostas ventilatórias às mudanças de concentração de gases, podendo atuar causando aumento da atividade simpática, frequência cardíaca, pressão arterial e volume-minuto (Heymans e Bouckaert, 1930; Daly, Hazzldine e Howe, 1965; Aires, 2012).

Os barorreceptores estão localizados em região estratégica, uma vez que estão localizados na saída do coração e entrada do cérebro. A cada batimento cardíaco há um estiramento dos barorreceptores e conseqüente ativação por disparos de potenciais de ação que são enviados para o núcleo do trato solitário (NTS) via nervo vago e glossofaríngeo onde ocorre a primeira sinapse (Chalmers e Pilowsky, 1991). O NTS encaminha projeções para o núcleo ambíguo (NA) e dorsal motor do vago (DMX) e esses por sua vez, quando são ativados geram um aumento da atividade parassimpática para o coração. Simultaneamente, neurônios provenientes do NTS são encaminhados para o bulbo ventrolateral caudal (CVLM) o qual envia neurônios inibitórios para o bulbo ventrolateral rostral (RVLM) que se comunicam com neurônios simpáticos da coluna intermédio lateral (Reis, 1999).

Quando ocorre aumento da pressão arterial, mais potenciais de ação são conduzidos para o NTS, aumentando a estimulação no NA e DMX, desencadeando aumento da atividade parassimpática para a periferia. Adicionalmente, existe uma estimulação aumentada sobre o CVLM, aumentando a inibição do RVLM e reduzindo a atividade simpática à periferia. Entretanto o oposto acontece frente a reduções nos níveis de pressão arterial. Sendo assim, o barorreflexo constitui um sistema de extrema importância para a homeostase corporal, uma vez que ajusta momento a momento a pressão arterial, mantendo-a em níveis estáveis. Adicionalmente, o barorreflexo arterial vem sendo apontado como um importante mecanismo de regulação a longo prazo da pressão arterial, desempenhando um papel importante na prevenção da elevação da pressão sanguínea no modelo de hipertensão renovascular (Tyrslin et al., 2013).

O controle humoral é feito por uma enorme variedade de substâncias que interferem principalmente, na modulação do tono arteriolar. Durante reduções sustentadas dos níveis pressóricos, por exemplo, ocorre maior liberação de epinefrina e norepinefrina pela medula adrenal, maior liberação de vasopressina pela neuro-hipófise e aumento dos níveis plasmáticos de renina. Esses sistemas hormonais prolongam as respostas cardiovasculares comandadas pelos pressorreceptores. Entre eles, um dos sistemas mais amplamente estudado pela grande significância é o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), o qual está mais intimamente relacionado no controle de sódio total no organismo, e conseqüentemente, do volume extracelular, embora também haja evidências clínicas de que interfira na resistência

vascular e função cardíaca (Irigoyen, Consolim-Colombo e Krieger, 2001, Aires, 2012).

O endotélio também apresenta um importante papel na modulação da pressão arterial, uma vez que possui capacidade de controlar o tônus da musculatura lisa vascular através da produção de mediadores que produzem vasodilatação e vasoconstrição. Os principais fatores que desencadeiam relaxamento do vaso sanguíneo são o óxido nítrico (NO) (Palmer, Ferrige e Moncada, 1987), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (Taylor e Weston, 1988) e a prostaciclina (Vanhoutte, 1993) por outro lado os fatores causadores de constrição do vaso sanguíneo podem se destacar a prostaglandina H₂, tromboxana A₂ (Vanhoutte, 1993), angiotensina II (Ang II) (Kifor e Dzau, 1987), endotelina-1 (Yanagisawa et al., 1988) e algumas espécies reativas de oxigênio (EROs) (Rubanyi e Vanhoutte, 1986).

O NO é uma molécula que possui diversas funções na fisiologia orgânica, agindo autócrina ou paracrinamente, está envolvido no relaxamento do músculo liso vascular, sinalização neuronal e respostas imunológicas. É sintetizado a partir do aminoácido básico L-arginina, simultaneamente com a L-citrulina. Para isso, é indispensável a ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual é representada por 3 isoformas: NOS neuronal (nNOS ou tipo I) descrita inicialmente em tecidos neuronais, NOS induzível (iNOS ou tipo II) encontrada em macrófagos e NOS endotelial (eNOS ou tipo III) identificada em células endoteliais (Sreeharan et al., 1986; Durante et al., 1988; Lockette et al., 1986).

Apesar da eficiência dos mecanismos neurais e humorais para ajustes apropriados para regular os parâmetros pressóricos (ilustrado na Figura 1) em distúrbios da homeostase circulatória, como na hipertensão, esses fatores de controle, uma vez suprimidos ou hiperexcitáveis, podem contribuir para a gênese e manutenção do aumento dos níveis pressóricos.

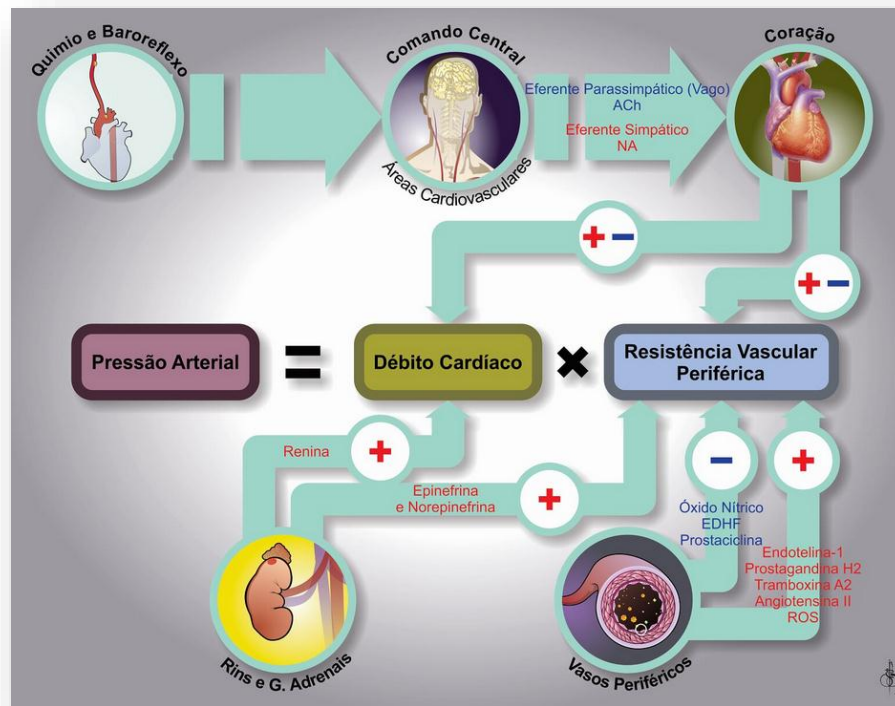


Figura 1. Mecanismos neurais e humorais para ajustes apropriados de ajuste da pressão arterial.

A hipertensão arterial é caracterizada como uma condição clínica multifatorial responsável por níveis elevados e sustentados de pressão arterial, sendo associada a alterações funcionais e até mesmo estruturais de órgãos como o coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos, assim como alterações metabólicas com consequente aumento do risco de patologias cardiovasculares (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010).

A hipertensão arterial apresenta alta prevalência e baixas taxas de controle. A mortalidade por doenças cardiovasculares (DCV) aumenta progressivamente com a elevação da pressão arterial (PA) a partir de 115/75mmHg de forma linear, contínua e independente. Em uma década, aproximadamente 7,6 milhões de mortes no mundo, foram atribuídas à elevação da pressão arterial. Embora tenha ocorrido uma tendência lenta e constante redução nas taxas de mortalidade por DCV no período de 1990 a 2006, são ainda as principais responsáveis pelo aumento dos custos médicos e socioeconômicos em decorrência da alta frequência de internações (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010).

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento da hipertensão arterial, tem-se a idade, o gênero, a etnia, o nível socioeconômico, a obesidade, a taxa de ingestão de sal, o consumo de bebidas alcoólicas, o tabagismo e o sedentarismo. Quando os níveis pressóricos já se encontram elevados, tornam-se um importante fator de risco

para manifestação de doenças coronárias, insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular cerebral e doenças renais, que podem estar ou não associadas e apresentando assim uma alta morbimortalidade. Essa multiplicidade de consequências a caracteriza como uma das causas de maior redução da expectativa e da qualidade de vida dos indivíduos (Duncan, Schimidt e Giugliani, 2006; (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010).

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

Nos casos de hipertensão essencial, as pessoas apresentam uma média aumentada de 40 a 60% da pressão arterial e aumento da resistência periférica total, fluxo renal diminuído com a progressão da doença, assim como, aumento na resistência ao fluxo sanguíneo renal (embora a filtração glomerular encontre-se próxima ao normal) e prejuízo na excreção renal de sal e água. O desenvolvimento da doença implica ainda em outros fatores, como a ativação do SRAA, aumento do estresse oxidativo decorrente do excesso da produção de EROs, diminuição na produção de NO, redução das vias antioxidantes fisiológicas, e recentemente vem sendo correlacionada à alterações do controle reflexo fisiológico da pressão arterial (Montezano e Touyz, 2012; Botelho-Ono et al., 2011).

Antes de se investigar causas secundárias para o aparecimento da hipertensão é necessário que exclua-se a possibilidade de aferições incorretas da pressão arterial, desencadeamento da patologia em decorrência do ambiente (hipertensão do avental branco), tratamento inadequado, progressão das lesões em decorrência da hipertensão não tratada, presença de comorbidades e interação medicamentosa. Dentre as principais causas de hipertensão arterial secundária, tem-se o hiperaldosteronismo primário, feocromocitoma e paragangliomas, hipo e hipertireoidismo, hiperparatireoidismo, síndrome de cushing, acromegalia,

coarctação da aorta e hipertensão renovascular (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010).

A hipertensão renovascular é uma condição secundária gerada pela redução da pressão de perfusão renal, advinda de uma lesão estenótica, obstrutiva ou lesão vascular de uma ou ambas as artérias renais, desencadeando assim um prejuízo da atividade do SRAA alterando também a excreção de sódio e água (Tran et al., 2011; Martins-Oliveira et al., 2012; Bader, 2010). Entretanto, a formação de placas de ateroma provocando a estenose da artéria renal é a principal causa da hipertensão renovascular (Ozsarlak & Parizel, 2004; Textor, 2004; Zeller, 2005). Há uma grande associação entre o grau de oclusão da artéria renal e atrofia renal que pode levar a nefropatia isquêmica (Rimmer & Gennari, 1993; Caps et al., 1998). A hipertensão contribui diretamente para a progressão da doença renal, que por sua vez, pode exacerbar ainda mais a hipertensão (Berend & Levi, 2008). A nefropatia isquêmica ativa o SRAA, podendo levar a hipertensão grave, hipertrofia cardíaca e insuficiência renal (Zeller, 2005). A retenção de sódio e a ativação do SRAA tem sido considerado como mecanismos chaves na elevação da pressão arterial em pacientes com doença renal (Schiffrin et al., 2007). Apesar do avanço na compreensão dessas doenças, ainda é importante a busca por novas informações de modo a melhor elucidar certos mecanismos fisiopatológicos, assim como por buscas de terapêuticas mais eficazes.

O modelo experimental dois rins, um Clipe (2R1C) é um clássico modelo experimental de hipertensão renovascular que foi desenvolvido inicialmente por Goldblatt e colaboradores em 1934. A diminuição da pressão de perfusão renal em decorrência de estenose uni ou bilateral causa hipertensão arterial por causa de uma exacerbação na atividade do SRAA, prejudicando a excreção de sódio e água. Existe um modelo que decorre da constrição de uma artéria renal e nefrectomia contralateral, denominada um rim, um clipe (1R1C), assim como da constrição de uma artéria renal e manutenção do rim contralateral, 2R1C que são considerados como modelos clássicos de hipertensão por redução do fluxo sanguíneo renal. O modelo 1R1C muito se assemelha com um terceiro modelo, o denominado dois rins, dois cliques (2R2C) que mimetiza a redução da perfusão de ambos os rins (Davis, 1977; Kurnjek et al., 1983; Zeng et al., 1998). Apesar de ambos os modelos estarem

relacionados com alterações renais, apresentam diferenças durante as fases de desenvolvimento da hipertensão.

Estudos experimentais com o modelo de hipertensão 2R1C de Goldblatt que, muito se assemelha à hipertensão renovascular humana, apontam três mecanismos principais para o desenvolvimento da hipertensão. Na fase I (inicial) a hipertensão surge imediatamente após a estenose da artéria renal, através da inserção do clipe de prata decorrente do aumento da atividade plasmática de renina e angiotensina II (Ang II). A fase II inicia-se após algumas semanas e há uma diminuição nas concentrações de renina e Ang II, porém um aumento na retenção de água e sal, com persistência da hipertensão. Na fase III existe uma manutenção dos níveis pressóricos elevados, por meio de mecanismos ainda não muito bem elucidados, sendo que fatores neurogênicos e humorais, alteração da atividade barorreflexa e secreção de substâncias pressoras podem estar vinculados a essa manutenção (Davis, 1977).

No modelo de hipertensão 2R1C há uma inserção de um clipe de prata pré-calibrado com uma abertura pré-estabelecida na artéria renal do animal, cujo objetivo é causar diminuição do fluxo sanguíneo para um dos rins. Como descrito na Figura 2, essa redução do fluxo sanguíneo desencadeia aumento na liberação de renina pelo rim clipado. Existem três estímulos para secreção de renina: a estimulação simpática, a diminuição da tensão vascular na arteríola aferente renal e redução da carga filtrada de sódio que alcança a mácula densa. A renina liberada para a circulação age sobre o angiotensinogênio, uma α -globulina sintetizada pelo fígado, clivando uma sequência de 10 aminoácidos, a angiotensina I (Ang I); que por sua vez é clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECA), formando um octapeptídeo, a Ang II, o hormônio responsável pelas principais ações do SRAA no controle da pressão arterial, uma vez que eleva a resistência vascular periférica, aumentando assim os níveis pressóricos. Adicionalmente, o aumento na circulação de Ang II inibe a produção de renina no rim não clipado, assim como aumenta a produção de aldosterona e da atividade do sistema nervoso simpático.

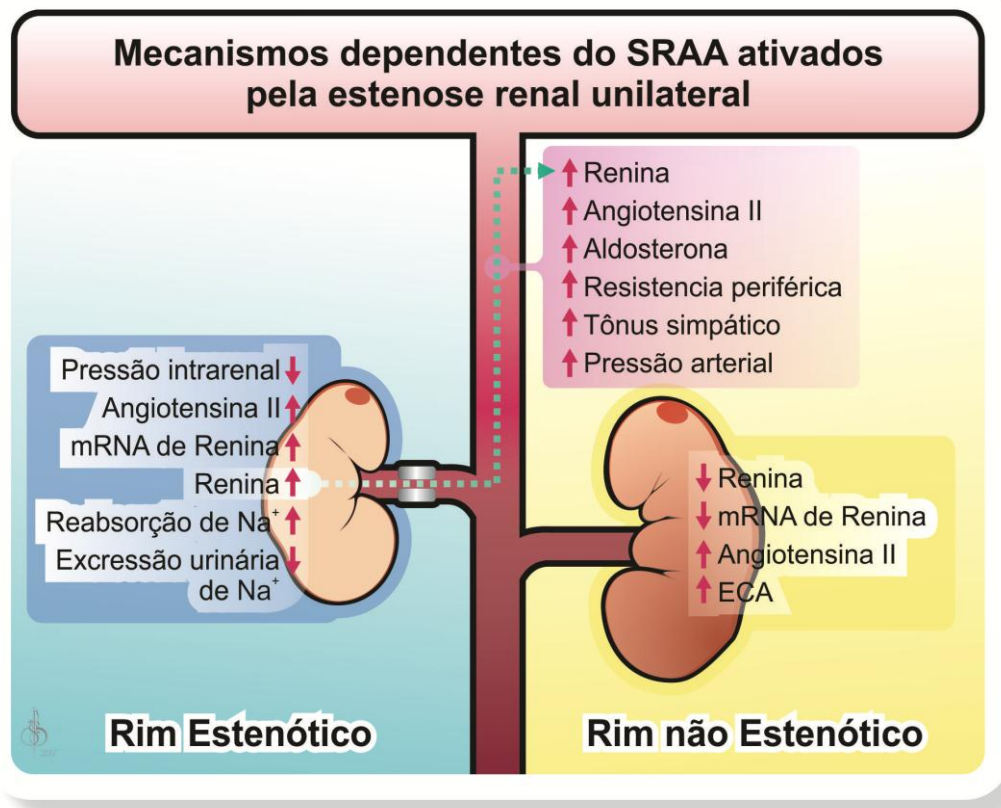


Figura 2: Efeitos renais da implantação do clipe na artéria renal. Modificado de Navar et al., 1998.

O rim não clipado, por sua vez, apresenta baixos níveis de renina e desenvolve hipertrofia compensatória, ao contrário do rim clipado que apresenta atrofia por redução do fluxo sanguíneo renal. Nesse contexto, a manutenção da hipertensão 2R1C se baseia na inabilidade do rim não clipado de excretar o excesso de sódio, assim, aumenta-se a volemia e conseqüentemente mantém-se o aumento dos níveis pressóricos. O rim não clipado por sua vez, não consegue excretar o excesso de sódio por consequência do aumento de Ang II intra-renal. Esta por sua vez se liga a receptores AT1 sendo internalizadas e acumuladas dentro do rim (Navar et al., 1998).

A Ang II é um hormônio que possui efeitos pleiotrópicos em diferentes tecidos, incluindo o rim, os vasos sanguíneos, o coração e o sistema nervoso, sendo considerado o efator primário de uma variedade de ações fisiológicas e fisiopatológicas induzidas pelo SRAA (Figura 3). Apesar de sua ação fisiológica, quando o SRAA encontra-se exacerbado pode causar efeitos deletérios aos rins e contribuir para uma perda progressiva da função renal. A contínua ativação do SRAA desencadeia constrição das arteríolas renais, levando a um aumento na resistência

vascular periférica ou renal, aumento da pressão dos capilares glomerulares, quadros de proteinúria e ao aumento do estresse oxidativo, via ativação da NADP(H) oxidase, desencadeando disfunção endotelial, com consequente proliferação de células mesangiais, assim como hipertrofia cardíaca por aumento da deposição de colágeno e ativação de metaloproteínas (Roscioni, Heerspink e de Zeeuw, 2013).

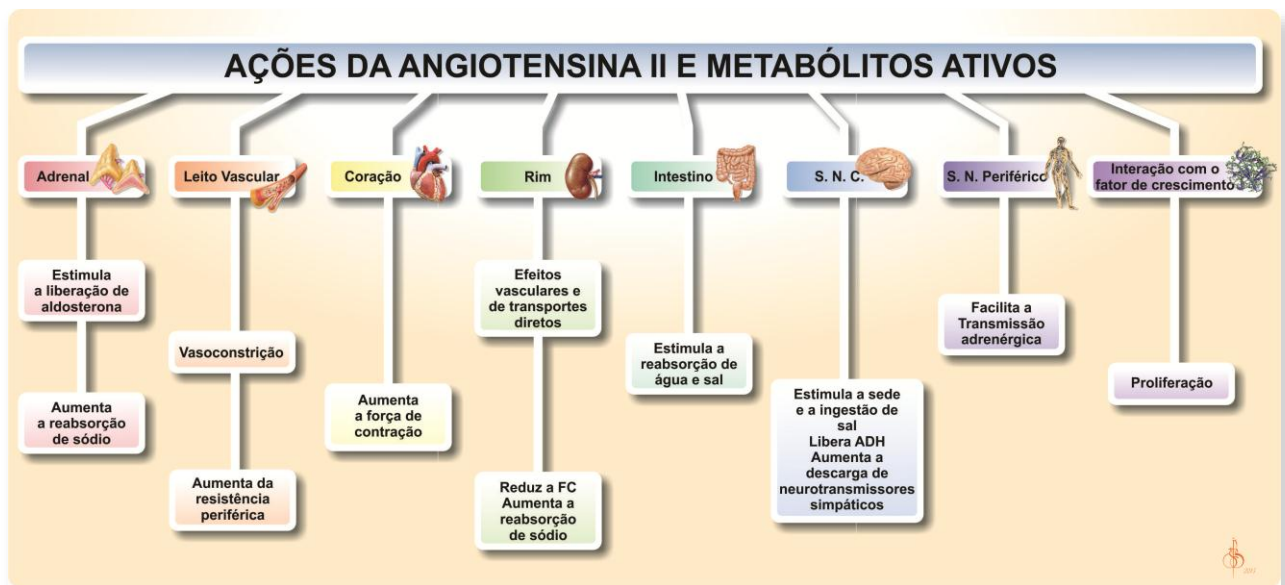


Figura 3: Ações sistêmicas da Angiotensina II sobre diferentes sistemas. Extraído e modificado de Navar et al., 1998.

O modelo de hipertensão 2R1C tem sido exaustivamente utilizado em ratos para mimetizar a hipertensão renovascular clínica (Moysés et al., 1994; Kobori et al., 2007). Embora exista um padrão previsível observado nos diferentes modelos experimentais animais, humanos que apresentam estenose da artéria renal mostram considerável variabilidade na concentração plasmática de renina, em consequência de grandes diferenças nos graus de estenose, coexistência de comorbidades, idade, ingesta de sódio e tratamentos anti-hipertensivos (Lerman et al., 2005). Entretanto, parece existir um aumento inicial da concentração plasmática de renina que se normaliza tardiamente (Vasilev et al., 1978).

Estudos anteriores demonstraram que a Ang II aumenta a liberação de ânion superóxido (O_2^{\bullet}) pelo estímulo da atividade da enzima NADP(H) oxidase (Griendling et al., 2000), assim como possui papel importante no aumento do estresse oxidativo

em ratos com hipertensão renovascular (Ceron et al., 2010). Adicionalmente, os níveis aumentados de Ang II auxiliam indiretamente no remodelamento ventricular através do aumento na formação de EROs (Viridis et al., 2011). No coração, a NADP(H) oxidase (subunidade gp22phox e gp91phox) é a maior fonte de O_2^\bullet .

EROs são metabólitos do oxigênio, formadas por elétrons livres ou não pareados e por possuírem instabilidade elétrica grande, apresentam grande capacidade reativa, sendo classificado como substância oxidante (Harrison & Gongora, 2009). As mitocôndrias são a principal fonte geradora de EROs, logo, a formação desses metabólitos em condições fisiológicas é inevitável (Cai e Harrinson, 2000). Níveis elevados de EROs podem levar ao aumento de resistência das artérias, pois diminuem a biodisponibilidade de NO por peroxidação de lipídeos de membrana, causando prejuízo no relaxamento e promovendo a proliferação de células do músculo liso (Klima et al., 2013). Em diferentes modelos de hipertensão em animais e também em humanos hipertensos observaram-se que as EROs são mediadores importantes responsáveis pela disfunção endotelial (Martínez-Revelles et al., 2013). Adicionalmente, com o aumento do estresse oxidativo em condições patológicas, podemos perceber uma diminuição no controle autonômico da pressão arterial e consequente prejuízo na sensibilidade do barorreflexo, em decorrência de uma modulação da atividade simpática resultando na facilitação da transmissão adrenérgica e inibição do barorreflexo arterial.

A produção de EROs ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs) é um processo inerente aos organismos aeróbicos, desencadeada naturalmente durante o metabolismo celular ou em resposta a alguma disfunção biológica. A regulação nas concentrações dessas espécies reativas é feita pelo sistema antioxidante enzimático (superóxido dismutase [SOD], glutaciona peroxidase [GPx], glutaciona redutase [GDR] e catalase [CAT]) e não enzimático (glutaciona (GSH) e coenzima Q10) presentes no próprio organismo ou adquirido exógenamente (Evans e Halliwell, 2001; Barbosa et al., 2010; Nathan et al., 2011) conforme descrito na Figura 4. No entanto o desequilíbrio a favor da produção de espécies reativas levam a ocorrência de danos a diferentes estruturas celulares caracterizando o estresse oxidativo (Barreiros & David, 2006). O estresse oxidativo vem sendo apontado como um importante componente na fisiopatologia das DCV, bem como na promoção de seus agravos (Montera, 2007; Kurokawa et al., 2011).

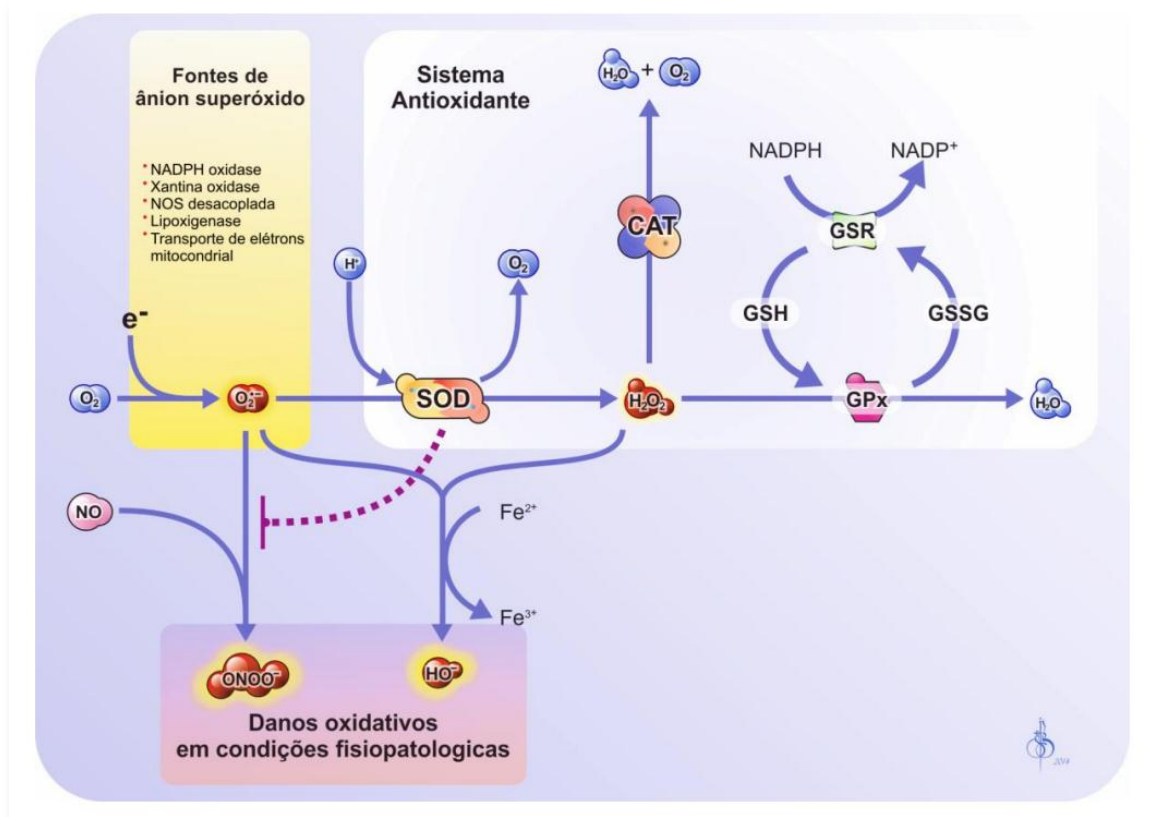


Figura 4. Mecanismo enzimático de defesa antioxidante. Em destaque estão as principais fontes endógenas produtoras de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e as enzimas responsáveis por controlar suas concentrações no organismo. Estruturas em vermelho representam diferentes espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; GPx, glutatona peroxidase; GSR, glutatona redutase, GSH, glutatona; GSSG, glutatona oxidada; NO, óxido nítrico, H_2O_2 , peróxido de hidrogênio, $ONOO^-$, peroxinitrito; HO^\bullet , hidroxila; Fe^{2+} , óxido ferroso; Fe^{3+} , óxido férrico.

A combinação da hipertensão, nefrosclerose e aumento dos níveis intra-renais de Ang II podem levar a danos permanentes ao rim contralateral, ao passo que a pressão arterial pode não mais retornar aos níveis normais mesmo após o reparo da estenose ou nefrectomia do rim isquêmico, tornando-se necessário a descoberta de terapêuticas para o tratamento precoce na hipertensão renovascular (Izzo & Black, 2003; Zeller, 2005).

Diversos estudos tem demonstrado uma significativa proteção renal com uso de bloqueadores do SRAA comparado com efeito de outras drogas anti-hipertensivas, apontando para um importante papel desse sistema nas doenças renais (Kobori et al., 2007). Existem diferentes grupos farmacológicos sendo utilizados com o intuito de contrapor-se ao SRAA, como os inibidores da ECA (IECAs), bloqueadores do receptor AT1 (BRAs) e recentemente o alisquireno, um inibidor direto da renina

(Wood et al., 2003; Gradman & Kad, 2008). Investigações farmacológicas com IECAs e BRAs apontam para um papel fundamental da Ang II sobre a patogênese da hipertensão e lesão renal por ativação inapropriada dos receptores AT1 (Timmesmans et al., 1993; Navar et al., 2000).

Embora vasodilatadores e antagonistas da angiotensina sejam capazes de reduzir a pressão arterial, também reduzem a pressão de perfusão renal, podendo causar maior retenção volumétrica. Por esse motivo, as diretrizes estabelecidas pelas sociedades de hipertensão recomendam que IECAs e BRAs sejam combinados com diuréticos como primeira linha para reduzir a pressão arterial em pacientes hipertensos com doença renal (Chobanian et al., 2004; Cifkova et al., 2003; Ikeda et al., 2006).

Segundo a VI diretriz brasileira de hipertensão arterial os principais objetivos do tratamento da hipertensão arterial renovascular são a cura ou a melhora da hipertensão arterial e/ou a melhora ou a prevenção da função renal. O tratamento pode ser clínico, cirúrgico ou por meio de revascularização percutânea com ou sem a colocação de próteses endovasculares (stents). Em relação ao tratamento clínico, os IECAs, BRAs, bloqueadores dos canais de cálcio e os betabloqueadores são terapêuticas efetivas para o tratamento da hipertensão associada à estenose unilateral da artéria renal.

Os IECAs estão sendo usados em diversas patologias, incluindo hipertensão, insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio, nefropatia diabética e outras formas de nefropatia (Cheung, 2002). Além de converter Ang I em Ang II, a ECA também inativa as cininas (Gavras & Corcoran, 1994). Nesse contexto, os IECAs aumentam os níveis de bradicinina, contribuindo para seu efeito anti-hipertensivo, além de promover regressão da hipertrofia cardíaca (Dahlof et al., 1992), melhorar disfunção endotelial (Mancini et al., 1996), reduzir a morbimortalidade associada a insuficiência cardíaca (Consensus, 1987), reduzir a mortalidade e melhorar a função cardíaca após o infarto (Pfeffer et al., 1992) e reduzir a progressão das nefropatias (Lewis et al., 1993). O receptor AT1 parece ser o mediador dos efeitos fisiológicos da Ang II no sistema circulatório, apontando para efeitos benéficos com seu bloqueio. Adicionalmente, os BRAs, bloqueiam receptores AT1, mas não o AT2, sugerindo dessa forma um efeito adicional dessa classe, uma vez que contribuem para um

efeito vasodilatador (Horiuchi et al., 1999). Estudos clínicos recentes, sugerem um efeito aditivo com uso associado dessas terapêuticas, embora ainda haja algumas controvérsias na literatura (Stergiou & Skeva, 2004).

Adicionalmente, foi observado em pacientes com estenose da artéria renal aumento dos níveis plasmáticos de noradrenalina e uma hiperatividade simpática, contribuindo possivelmente para o aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares (Johansson et al., 1999). Alguns estudos recentemente tem sugerido que os β -bloqueadores podem retardar a progressão da estenose ou ajudar na melhora da taxa de filtração glomerular após revascularização renal (Cianci et al., 2011).

Em 2007 (Novartis), foi introduzido no mercado um novo medicamento que atua inibindo o SRAA, o alisquireno. O alisquireno é um inibidor direto da renina, ativo por via oral, que atua através da ligação ao sítio ativo da renina. Este fármaco inibe diretamente a atividade da renina plasmática, inibindo assim, a clivagem da Ang I em Ang II a partir do angiotensinogênio (Lizakowski, Tylicki, Rutkowski, 2013). Diversos estudos clínicos têm demonstrado que o alisquireno é eficaz na diminuição da pressão arterial em pacientes com hipertensão arterial leve a moderada (Musini et al., 2008; Verdecchia et al., 2010; Zhu et al., 2012; Robles, Cerezo, Hernandez-Gallego, 2014).

O fato da renina ser a primeira enzima envolvida na cascata enzimática do SRAA e ter notavelmente alta especificidade por apenas um substrato, o angiotensinogênio, era esperado que o alisquireno apresentasse alta eficácia anti-hipertensiva com menores efeitos colaterais do que os IECAs (Friedrich & Schmieder, 2013; Angeli et al., 2014). Por outro lado, o aumento da concentração plasmática de renina que ocorre numa extensão maior com o uso do alisquireno do que com o uso de IECAs ou BRAs, pode ser um problema importante, visto que a (pro)renina e renina parecem estimular o receptor de (pro)renina e induzir fibrose, apoptose e hipertrofia de órgãos em animais experimentais. No entanto, o significado clínico deste achado ainda não está claro (Danser, 2009). Até o momento, alguns estudos clínicos realizados em pacientes com hipertensão que usavam alisquireno demonstraram que este medicamento apresentava segurança e tolerabilidade semelhantes a BRAs (Robles, Cerezo, Hernandez-Gallego, 2014; Angeli et al., 2014; Zhu et al., 2012).

O endotélio vascular é um tecido capaz de controlar importantes funções nos vasos, incluindo a regulação do tônus vascular, angiogênese, processos proliferativos, prevenir a agregação plaquetária e resposta inflamatória e imune (Félètou, 2009; Félètou & Vanhoutte, 2006). O desequilíbrio entre os fatores vasodilatadores e vasoconstrictores derivados do endotélio provocam alterações na função endotelial e aumentam assim, o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Sabe-se que a disfunção endotelial provoca redução da biodisponibilidade de NO (Rajapakse & Mattison, 2009), e que esse é um dos fatores de prognóstico desfavorável em pacientes com hipertensão arterial. Estudos prévios em nosso laboratório, foi capaz de mostrar que o tratamento precoce com L-arginina previne a hipertensão 2R1C (Abreu et al., 1999). Estudos anteriores, demonstraram que a L-arginina é capaz de produzir vasodilatação renal e natriurese, além de aumentar a liberação de nitrito e nitrato, L-citrulina e GMPc e aumentar a biodisponibilidade de NO na circulação renal (Deng et al., 1995; Ackermann et al., 1998).

Corroborando com esses achados, estudos apontam como promissor o tratamento com L-arginina não somente na redução dos níveis pressóricos, mas sobretudo, na proteção de órgãos alvo. Gouvea et al. (2002, 2004) demonstraram que os animais tratados com L-arginina tiveram redução da hipertensão arterial sete dias após o tratamento. Além do efeito sistêmico sobre a pressão arterial, a L-arginina promoveu diurese e natriurese nos animais 2R1C, reverteu a hipertrofia cardíaca, aumentou a massa do rim clipado e reduziu de forma significativa a atividade da ECA no plasma, coração e rim clipado. Recentemente, os estudos de Santuzzi et al. (2014) e Tiradentes et al. (2015) apontaram para efeitos benéficos aditivos da associação de alisquireno e L-arginina, uma vez que o mesmo foi capaz de normalizar os níveis pressóricos encontrados nos animais 2R1C, prevenir a disfunção endotelial e reduzir a hiperexcitabilidade simpática nesses animais.

Apesar destes achados, ainda não está totalmente esclarecido de que maneira estas drogas estariam atuando sobre o sistema nervoso autônomo e sobre o estresse oxidativo, e se de fato teriam atuação, ou se os seus efeitos não afetam estas vias. Portanto a proposta é investigar de forma inédita o papel do alisquireno e L-arginina combinados sobre estes parâmetros.

2 JUSTIFICATIVA

A hipertensão arterial sistêmica é uma condição clínica multifatorial e vem sendo relacionada cada vez mais à mudanças no padrão e qualidade de vida em decorrência de suas alterações funcionais e estruturais de órgãos alvo sendo responsável por alta frequência de internações, ocasionando aumento de custos médicos e socioeconômicos. Essa multiplicidade de consequências coloca a hipertensão como um grave problema de saúde pública. Aproximadamente 5% dos indivíduos hipertensos são caracterizados por possuírem aumento dos níveis pressóricos secundário a estenose da artéria renal, que vem sendo correlacionada com uma significativa taxa de morbidade e mortalidade uma vez que apresenta difícil controle e tratamento. Em vista desta dificuldade, há um interesse cada vez maior em compreender plenamente os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da hipertensão renovascular a fim de desenvolver terapias mais seguras e eficientes, como o tratamento farmacológico.

Sabe-se que o principal mediador da hipertensão renovascular é o SRAA, com consequente disfunção endotelial, aumento do estresse oxidativo e, mais recentemente vem sendo relacionada com disfunção barorreflexa. Portanto, medicamentos que sejam capazes de bloquear o SRAA, restaurar a disfunção endotelial e que ainda sejam capazes de diminuir o estresse oxidativo e melhorar a sensibilidade barorreflexa poderiam reverter não só o quadro hipertensivo, mas restaurar as lesões em órgãos-alvo. Diante disto, a proposta é utilizar o alisquireno, medicamento que atua bloqueando o SRAA, e o aminoácido L-arginina, precursor da síntese do principal vasodilatador derivado do endotélio, o NO, para avaliar seus efeitos isolados e associados sobre a pressão arterial, a sensibilidade barorreflexa e melhora nas vias antioxidantes em ratos com hipertensão renovascular, o que poderia trazer uma nova proposta ao tratamento da hipertensão renovascular.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Elucidar os efeitos e mecanismos envolvidos nos tratamentos isolados e associados do alisquireno e L-arginina sobre a pressão arterial, sensibilidade barorreflexa e estresse oxidativo em ratos com hipertensão renovascular.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Analisar o efeito do tratamento isolado e associado a L-arginina e do alisquireno sobre a pressão arterial direta e indireta de ratos com hipertensão renovascular;
- b) Analisar o efeito do tratamento isolado e associado a L-arginina e do alisquireno sobre a frequência cardíaca de ratos com hipertensão renovascular;
- c) Avaliar o benefício dos tratamentos com L-arginina e alisquireno na resposta simpática e parassimpática na ativação do barorreflexa de ratos com hipertensão renovascular;
- d) Comparar o índice de hipertrofia ventricular em ratos com hipertensão renovascular antes após o tratamento com L-arginina e alisquireno;
- e) Estudar a participação do estresse oxidativo sobre a resposta barorreflexa de ratos com hipertensão renovascular;
- f) Verificar a expressão proteica e a atividade de enzimas antioxidantes (SOD e CAT), e expressão proteica da subunidade da NADP(H) oxidase (gp91phox) nos ratos com hipertensão renovascular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais Experimentais

Neste estudo foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), pesando entre 160 e 180 g, cedidos pelo biotério da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Tais animais foram mantidos em gaiolas sob condições de controle de temperatura e um ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e à ração.

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

4.2 Procedimentos Experimentais

4.2.1 Tratamento

Os ratos foram divididos de maneira aleatória em cinco grupos experimentais (n= 8 por grupo): SHAM (normotensos controle, água por gavagem, 0,3 ml); Dois rins, um clipe (2R1C; hipertensos controle, água por gavagem, 0,3 ml); Dois rins, um clipe tratados com alisquireno (Rasilez®; Novartis, Itália) (ALSK; alisquireno 50 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ diluído em água, por gavagem, 0,3 ml); Dois rins, um clipe tratados com L-arginina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) (L-ARG; L-arginina 10 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ diluído em água, por gavagem, 0,3 ml) e Dois rins, um clipe tratados com alisquireno associado à L-arginina (ALSK + L-ARG; alisquireno 50 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ e L-arginina 10 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ diluído em água, por gavagem, 0,3 ml).

Todos os tratamentos foram iniciados após sete dias do procedimento cirúrgico para produção da hipertensão 2R1C, com duração de vinte e um dias consecutivos, totalizando 28 dias de hipertensão renovascular (Figura 5).

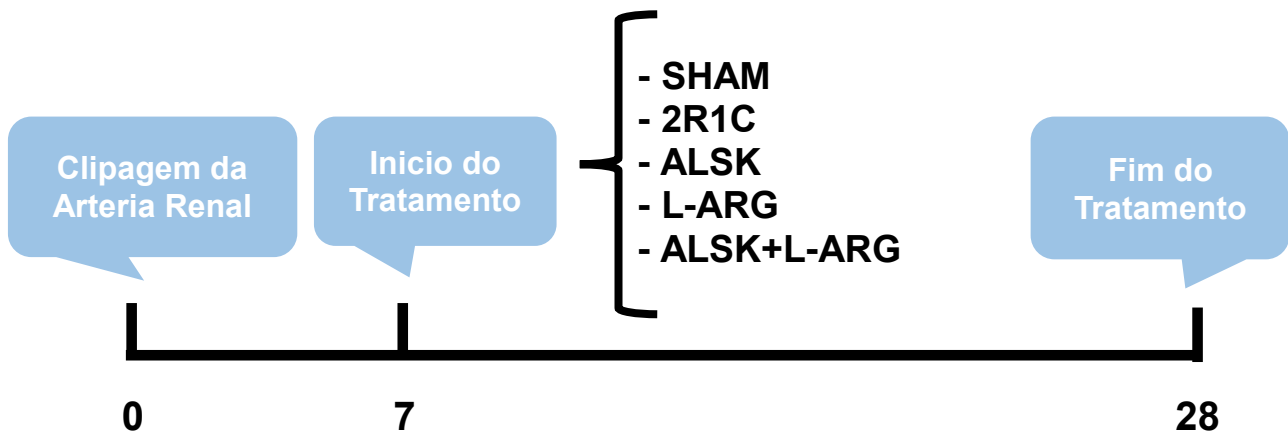


Figura 5: Organograma do protocolo Experimental

4.2.2 Modelo de hipertensão renovascular (Hipertensão 2R1C de Goldblatt)

A hipertensão renovascular foi induzida pelo método desenvolvido por Goldblatt (2R1C). Sob anestesia intraperitoneal com ketamina (80 mg.kg^{-1}) e xilazina (5 mg.kg^{-1}), foi realizada tricotomia, com posterior assepsia com álcool à 70% na região mediana e do flanco direito do animal. Foi realizada uma incisão no flanco direito com exposição do pedúnculo renal. A artéria renal foi isolada da veia renal e posteriormente colocado um clipe de prata pré-calibrado com um grau de constrição equivalente ao diâmetro interno de 0,2 mm na artéria renal direita do animal para indução da hipertensão renovascular 2R1C, conforme figura 6. Após o procedimento, a incisão foi suturada e o animal foi acondicionado em gaiolas individuais e mantido no biotério sob observação constante durante sete dias. Os ratos SHAM foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, com manipulação da artéria renal direita, porém não foi implantado o clipe de prata. O critério de inclusão para a hipertensão, no presente estudo, foi uma PAS maior que 160 mmHg após sete dias da cirurgia.

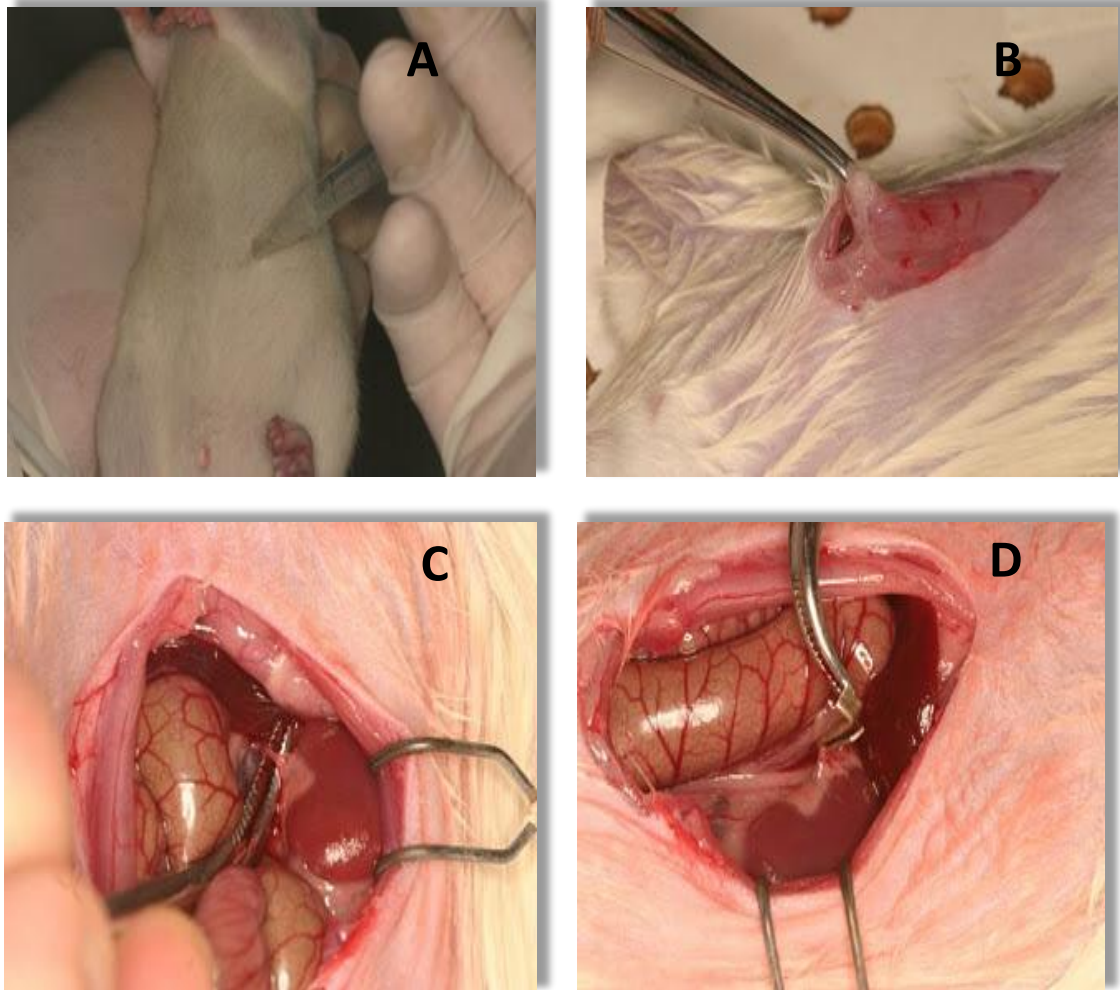


Figura 6. Anestesia com Ketamine e Xylazine intraperitoneal (A). Laparotomia com exposição do pedúnculo renal (B). Separação da artéria renal esquerda (C). Inserção do clipe de prata, ajustável ao peso do animal e pré-calibrado com um grau de constrição equivalente ao diâmetro interno de 0,2 mm (D). Autoria própria.

4.2.3 Análise da medida indireta da pressão arterial sistólica (PAS)

A medida indireta da PAS foi realizada de acordo com Buñag (1973) e modificada segundo Grizzo *et al.* (2008). As medidas foram realizadas nos animais de todos os grupos estudados, no tempo zero (antes do procedimento cirúrgico para produção da hipertensão renovascular), após sete dias do procedimento cirúrgico e após 21 dias de tratamento (28 de pós operatório), através de um pletismógrafo de cauda (IITC Life Science– 23924 Victory Blvd, Woodland Hills, CA). Os animais foram previamente climatizados, durante três dias antes da mensuração, para adaptarem-se ao pletismógrafo, e desta forma, prevenir alterações pressóricas devido ao estresse do animal frente ao procedimento. Após calibração do aparelho, os animais

foram acondicionados em contentores de acrílico, selecionados de acordo com o tamanho do animal e mantidos em temperatura aproximada de 32°C por aproximadamente 20min para obtenção de uma adequada vasodilatação caudal, sendo que a medida indireta é aferida por meio de um transdutor foto elétrico colocado na porção proximal da cauda e posterior inflação do manguito e registro da onda de pulso. A média de três medidas foi utilizada.

4.2.4 Canulação da artéria e veia femoral para aferição da pressão arterial direta frequência cardíaca e administração de drogas vasoativas

Após 3 semanas após a cirurgia, os animais foram novamente submetidos a anestesia com Ketamine (75mg/kg IP) e Xylazine (10mg/kg IP) para cateterização dos vasos femorais (artéria e veia). Inicialmente, foi realizada a tricotomia da superfície da região da pata esquerda, na sua porção ventral e região cervical dorsal interescapular. Foi realizado uma incisão de aproximadamente 2 cm e em seu maior diâmetro foi feita a exposição do plexo femoral para permitir o isolamento dos vasos femorais. Foram utilizados cateteres de polietileno PE-10 previamente unidos a cateteres de polietileno PE-50, tendo o seu comprimento ajustado de acordo com o tamanho do animal. A artéria femoral dos ratos foi canulada, inserindo um cateter preenchido com salina-heparina (100:1/UI) para registro de pressão arterial média (PAM) e FC 24 horas após inserção do cateter, e a veia femoral foi canulada inserindo um cateter também preenchido com salina-heparina (100:1/UI) para administração de drogas durante avaliação da sensibilidade do barorreflexo. Após o implante, os cateteres foram exteriorizados no dorso do animal, através de um trocáter, para permitir os registros de PAM e FC em animais não anestesiados e com livre movimentação (Figura 7).

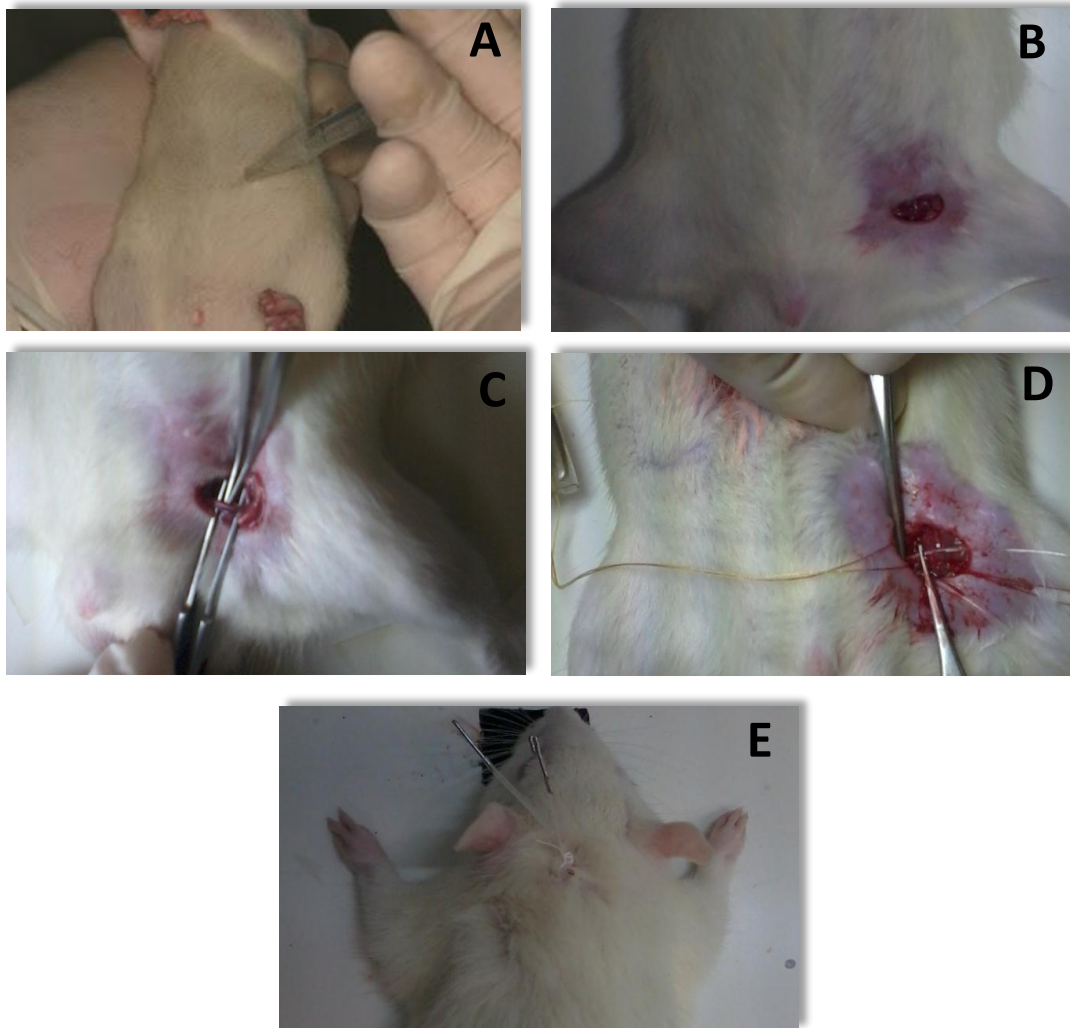


Figura 7. Anestesia com Ketamine e Xylazine intraperitoneal (A). Tricotomia e incisão para exposição do plexo femoral (B). Separação da artéria da veia femoral (C). Inserção do cateter de polietileno PE-10 previamente unido a cateter de polietileno PE-50 (D). Cateteres foram exteriorizados no dorso do animal (E). Autoria própria.

4.2.5 Teste da sensibilidade do barorreflexo

Para os registros de PAM e FC o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (MLT0210 Teaching Force Transducer - ADInstruments Transducers) e este por sua vez conectado a um sistema computadorizado para aquisição dos dados (ADInstruments Bridge Amp Power Lab/400). Os experimentos foram iniciados após um período de quinze minutos de adaptação do animal ao laboratório. Após aferição da pressão arterial média e frequência cardíaca, o barorreflexo foi ativado usando drogas vasoativas. Fenilefrina (8mg/kg-bolus IV) e Nitroprussiato de Sódio (25mg/kg-bolus IV) foram administrados via endovenosa,

sendo permitido um intervalo de 15 minutos entre as drogas. Após as infusões foi realizado bloqueio com TEMPOL por 15 minutos e reiniciado o protocolo com as drogas vasoativas fenilefrina (8mg/kg-bolus IV) e Nitroprussiato de Sódio (25mg/kg-bolus IV). Mudanças na frequência cardíaca produzida pela administração de drogas vasoativas foram quantificados e plotados como alterações na frequência cardíaca sobre as mudanças na pressão arterial média ($\Delta FC/\Delta PAM$) (Botelho-Ono et al., 2011)

4.2.5.1 Protocolo Experimental para Avaliação da Sensibilidade do Barorreflexo

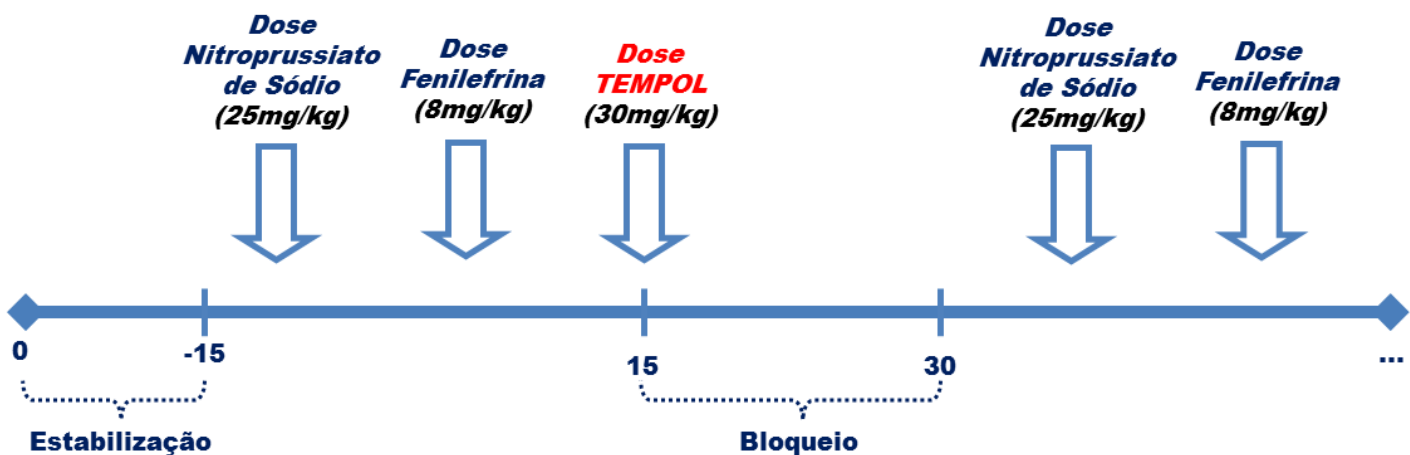


Figura 8. Protocolo experimental para avaliação da sensibilidade do barorreflexo.

4.2.6 Estimativa da massa do ventrículo esquerdo

Após o sacrifício dos animais, o ventrículo esquerdo foi isolado, lavado com salina (10%) e retirado o excesso de líquido da lavagem e pesado de modo a obter o peso úmido dos ventrículos esquerdo (mg). Em seguida, permaneceram por 24h em uma estufa (Modelo 315 SE, SP, Brasil) à 100 °C e o peso seco dos ventrículos foram quantificados (mg).

4.2.7 Determinação dos produtos avançados de oxidação proteica (Advanced Oxidation Protein Products – AOPP)

Os valores de AOPP no plasma e no tecido cardíaco foram determinados por espectrofotometria em leitora de microplacas (Leitora Multidetecção Synergy 2,

Biotek Instruments) de acordo com Witko-Sarsat et al. (1996). A reação foi calibrada com cloramina-T (Sigma, ST Louis, MO, USA) na presença de iodeto de potássio a 340nm. Para as análises no tecido do ventrículo esquerdo um homogenato foi preparado homogeneizando-se aproximadamente 200mg de tecido em 8,0mL de água desionizada com auxílio de um homogeneizador tipo “turrax” (modelo MA-102/MINI, Marconi, Piracicaba, Brasil). 200µl de plasma ou homogenato foi diluído 1/5 em tampão fosfato e adicionado aos poços da microplaca (Becton Dickison Labware, Lincoln Park, NJ, USA) seguidos de 20µl de ácido acético glacial. Em poços padrões, foram adicionados 10µl de iodeto de potássio 1.16M (Sigma) e 200µl de solução de cloramina-T (0-100µl) seguido de 20µl de ácido acético glacial. A densidade óptica da mistura reativa foi imediatamente lida em 340nm contra um controle contendo 200µl de PBS e 20µl de ácido acético glacial. As concentrações de AOPP foram expressas como µM de cloramina-T.

4.2.8 Estudos da expressão proteica

4.2.8.1 Western Blot para detecção da Superóxido Dismutase (Mn SOD-2), Catalase e gp91phox no ventrículo esquerdo de ratos

A técnica de Western Blot foi utilizada para determinar a influência do tratamento com alisquireno e L-arginina de ratos com hipertensão renovascular sobre a expressão proteica da enzima superóxido dismutase 2 (Mn SOD2), Catalase e a subunidade da NADPH oxidase, gp91phox, NOX2, no ventrículo esquerdo de ratos dos grupos Sham, 2R1C, 2R1C tratado com alisquireno, 2R1C tratado com L-arginina e 2R1C tratado com a associação de alisquireno e L-arginina. A expressão protéica de todas as proteínas foi realizada em condições basais

4.2.8.2 Preparação dos tecidos e quantificação de proteínas

As amostras foram preparadas utilizando o ventrículo esquerdo de todos os grupos. Os ventrículos esquerdo foram mantidos a -80° C até o momento da extração proteica, que foi realizada em 4000 µL de tampão de lise (10mM Tris – HCl pH 7,4, 1mM NaVO₃, 1% SDS, 0,5mM DTT, 5 mM EDTA, 1mM PMSF), ao qual se adicionou

10µg/mL coquetel inibidor de proteases. A homogeneização foi realizada com auxílio de sonicador ultra-sônico, sendo seguida de centrifugação a 6000 rpm, 4°C por 15 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos, aliquotados e armazenados a -80 °C. Este extrato total foi utilizado para avaliação da expressão de SOD-2, Catalase e NADPH oxidase (gp91phox).

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

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

4.2.8.3 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)

As amostras foram carregadas em géis de SDS-poliacrilamida 10% para SOD-2, Catalase e NADPH oxidase (gp91phox) (1,5 M Tris HCl pH: 8.8, acrilamida 40%, glicerol 100%, SDS 10%, APS 10% e Temed) previamente imersos em um tampão para eletroforese (25mM de Tris HCl, 190 mM de glicina e 0,1% de SDS). Antes da sua aplicação no gel as amostras foram aquecidas a 100 °C durante 5 min. A eletroforese foi conduzida com o tampão (25 mM de tris-HCl pH 8,3, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS), a 80 volts por aproximadamente 2 horas e 30 minutos

(PowerPac™ HC, BioRad, Singapura). Os procedimentos relativos a eletroforese foram realizados segundo o sistema descrito por Laemmli (1970).

4.2.8.4 Transferência das proteínas

Depois de separadas, as proteínas das amostras para avaliar a expressão da Mn SOD2, Catalase e gp91phox foram transferidas para uma membrana de PVDF utilizando uma cuba molhada (Biorad), por 2:00 hs, 60 volts a 4°C, com tampão de transferência constituído de 25 mM de tris-HCl pH 8,3, 192 mM de glicina e 20% (v/v) de metanol.

4.2.8.5 Incubação dos anticorpos

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

A detecção da ligação proteína-anticorpo foi realizada utilizando-se o Kit comercial NBT/BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate nitroblue tetrazolium (NBT)/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) – Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. As membranas tiveram suas imagens digitalizadas e tratadas utilizando o programa ImageJ (*domínio público*). Em cada ensaio experimental fez-se a normalização em relação ao controle (β -actina), com vista a diminuir os possíveis erros associados às variações nas concentrações das proteínas. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

4.2.9 Ensaio para detecção da atividade da superóxido dismutase no tecido cardíaco

O tecido do ventrículo esquerdo foi homogeneizado a 10% (100mg/ml) em tampão fosfato 50mM pH 7,4 e o homogenado centrifugado a 1.500g (4000rpm) por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado no ensaio. A atividade da SOD foi determinada seguindo o método de Misra e Fradovich (1972). O meio de reação foi composto de 1,0 ml de tampão de carbonato (0,2 M, pH 10,2), KCl 0,8 ml (0,015 M), 0,1 ml de homogenado e água de modo a atingir o volume final de 3,0 ml. A reação foi iniciada pela adição de 0,2 ml de epinefrina (0,025 M). A alteração na absorbância foi registrada a 480nm em intervalos de 15 segundos durante um minuto a 25 °C. Uma unidade de atividade de enzima é definida como a quantidade de enzima que provoca 50% de inibição da auto-oxidação de epinefrina.

4.2.10 Ensaio para detecção da atividade da catalase no tecido cardíaco

O tecido do ventrículo esquerdo foi homogeneizado a 10% (100mg/ml) em tampão fosfato 50mM pH 7,4 e o homogenado centrifugado a 1.500g (4000rpm) por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado no ensaio. A atividade da catalase foi determinada seguindo o método de Aebi (1984) o qual baseia-se na decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) determinada espectrofotometricamente a 240nm durante 5 minutos. O meio de reação foi composto de 898 μ l de tampão fosfato 50mM pH 7.4 e 2 μ l de homogenado do ventrículo esquerdo. A reação foi iniciada com a adição de 100 μ l de H_2O_2 100mM. A queda nos valores de absorbância do H_2O_2 é seguida espectrofotometricamente a 240nm.

O cálculo da atividade da catalase foi feito pela seguinte equação: $(2,3/\Delta t) \cdot (a/b) \cdot (\log A1/A2)$, onde: a = volume de amostra na cubeta; b = volume total da cubeta; A1 = valor da absorbância em t=0 e A2 = os valores da absorbância no tempo final que, em nosso caso, se deu aos 15 segundos após o início da reação (AEBI, 1984).

4.2.11 Estudo da geração de espécies reativas de oxigênio no tecido cardíaco – Dihidroestídeo (DHE)

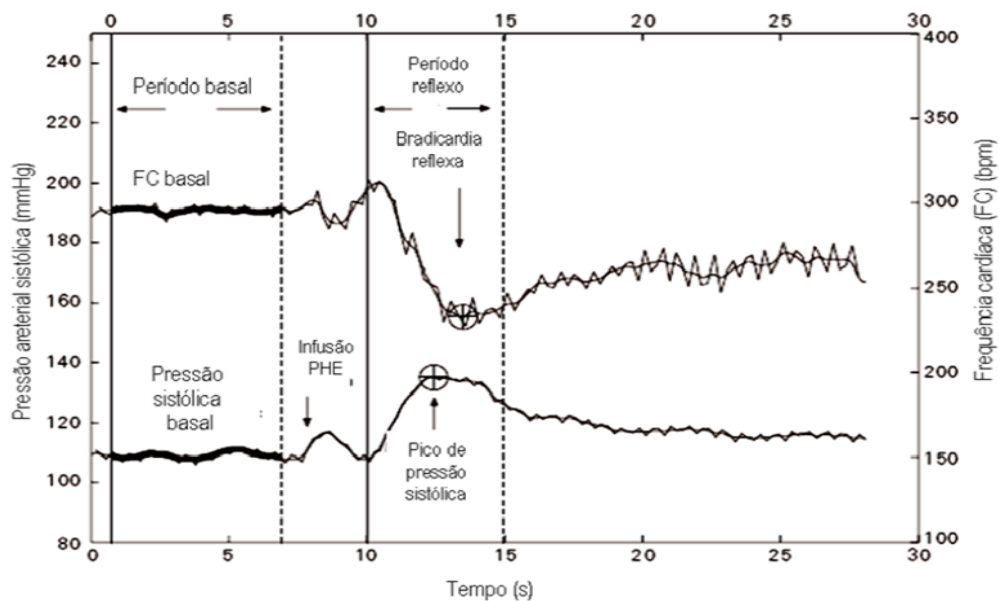
A geração de EROs foi determinada utilizando-se um método que envolve o DHE, um precursor não fluorescente do brometo de etídeo, e que permite analisar a produção “in situ” de radicais livres. Na presença de EROs o hidretídeo é oxidado dentro da célula, produzindo os compostos fluorescentes etídeo (E) e 2-hidroxi etídeo (EHO) que tem afinidade pelo DNA nuclear. A formação do etídeo se deve principalmente a oxidação da DHE pelo ânion superóxido, enquanto o EHO é formado pela oxidação da DHE por outras EROs como o peróxido de hidrogênio. Os ratos foram anestesiados, a artéria mesentérica superior foi rapidamente dissecada e imersa em solução de Krebs (8 mM HEPES, 2mM CaCl₂.2H₂O, 130mM NaCl, 5mM KCl, 2,45mM MgCl₂.6H₂O, 11,1mM glicose, pH 7,4) por um período de 2:00 hs. Após, estas foram congeladas em ojetato (Tissue-Tek OCT Compound, Sakura) e mantidas a -80°C até o momento da análise. Utilizando-se um criostato (CM 1850, Leica Microsystems, Alemanha), cortes transversais dos ventrículos esquerdo (8 µm) foram obtidos e colocados em lâminas silanizadas e secos em estufa a 37°C por 20 minutos. Após, as lâminas contendo os cortes foram lavadas e incubadas com Krebs por 30 minutos a 37°C. Decorrido o tempo, as lâminas tiveram o excesso de líquido removido e, em seguida, foi realizada a incubação DHE 2 µM (30 minutos, 37°C) em câmara úmida e protegidos da luz (Camporez et al., 2011). A fluorescência emitida foi visualizada em microscópio de fluorescência invertido (DM 2500, Leica Microsystems, Alemanha) equipado com câmera fotográfica, utilizando uma objetiva de fluorescência com aumento de 100X. O etídeo unido ao núcleo das células foi visualizado com λ_{exc} : 515-560 nm e detectado com λ_{em} :590 nm. As imagens foram quantificadas pelo programa Image Pro Plus, sendo o resultado expresso como intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias), normalizado pela intensidade do background.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para determinação da sensibilidade do barorreflexo, pode-se utilizar o índice médio de sensibilidade ($\Delta FC/\Delta PAM$) ou a inclinação da reta (*slope*) obtida por regressão linear, embora Farah et al. (1999) tenha confirmado que não há diferença estatística entre os dois métodos quando se utiliza de injeções em *bolus*. Nesse contexto, o presente trabalho utilizou a análise de índice médio de sensibilidade para avaliação do barorreflexo nos diferentes grupos.

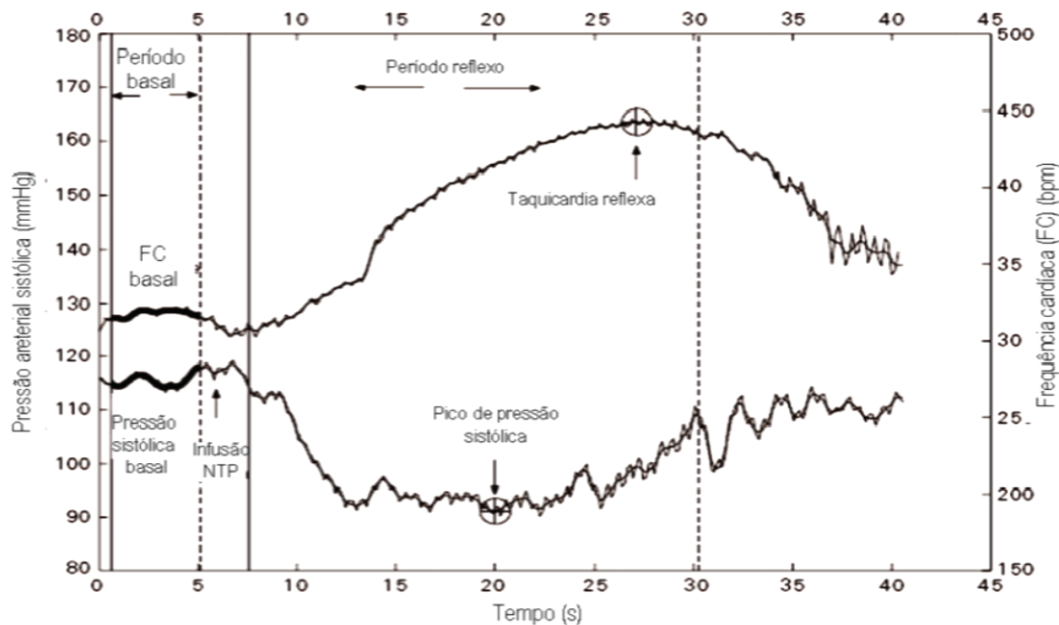
A figura 09, concordante com os registros de Soares et al. (2005), ilustra o exemplo do registro de um animal após infusão de fenilefrina e a figura 10, após infusão de nitroprussiato de sódio, sendo representados também os pontos onde foram realizadas as coletas dos dados.

Figura 09 – Registro típico de bradicardia reflexa.



Exemplo de um registro de pressão sanguínea e frequência cardíaca durante um experimento com infusão em *bolus* de fenilefrina. A linha contínua indica o início da resposta a fenilefrina e a tracejada o fim da resposta. Os círculos indicam os pontos onde os dados foram coletados. Fonte: Soares *et al.*, 2005.

Figura 10 – Registro típico de taquicardia reflexa.



Exemplo de um registro de pressão sanguínea e frequência cardíaca durante um experimento com infusão em *bolus* de nitroprussiato de sódio. A linha contínua indica o início da resposta ao nitroprussiato de sódio e a tracejada o fim da resposta. Os círculos indicam os pontos onde os dados foram coletados. Fonte: Soares *et al.*, 2005.

Os valores são apresentados como médias \pm erro-padrão das médias (EPM). Foi comparado às FC, PAM, Δ FC, Δ PAM e Δ FC/ Δ PAM entre os grupos. Os dados foram analisados por medidas de variância (ANOVA) 1 via, seguido por um pós-teste de Tukey para comparações múltiplas sempre que adequado. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism (v. 5.0, GraphPad Software, Inc). Significância estatística foi definido como pb0.05.

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos dos tratamentos com Alisquireno e L-arginina sobre a Pressão Arterial e Frequência Cardíaca de ratos com hipertensão renovascular

No início do estudo (dia 0), antes da cirurgia para implantação do clipe na artéria renal, os valores de PAS foram semelhantes em todos os grupos experimentais. Após semana após a colocação do clipe (dia 7) houve um aumento nos níveis pressóricos de maneira semelhante em todos os ratos 2R1C em comparação com ratos SHAM. Após 21 dias de tratamento (dia 28), o alisquireno não foi capaz de reduzir a PAS mantendo valores semelhantes ao grupo 2R1C. Entretanto, o tratamento isolado com L-arginina foi capaz de reduzir os níveis pressóricos quando comparado ao grupo 2R1C e o grupo tratado com a associação de alisquireno e L-arginina conseguiu normalizar os valores de PAS, apresentando valores semelhantes ao grupo SHAM.

Tabela 1: Efeitos do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre a pressão arterial sistólica (PAS, mmHg) em ratos com hipertensão renovascular 2R1C.

	SHAM	2R1C	ALSK	L-ARG	ALSK+L-ARG
PAS dia 0	119,2±2,52	117,6±3,7	115,8±3,54	121,8±2,2	117,2±2,27
PAS dia 7	120,2±3,64	204,4±12,7*	217,8±10,2*	197,5±8,92*	197,14±6,1*
PAS dia 28	114,4±5.2	196,8±6.79*	202,4±17.7*	175,6±9,14*	138,4±4,38 ^{#+}

Valores expressos em média ± EPM; (n = 7 por grupo). PAS aferida nos dias 0, 7 e 28 foram mensuradas por pletismografia de cauda. *P <0,05 em relação ao grupo SHAM; #P <0,05 em relação ao grupo 2R1C; +P <0,05 em relação ao grupo 2R1C ALSK.

A PAS direta demonstrou valores semelhantes aos obtidos por pletismografia de cauda no final do tratamento, assim como as alterações apresentadas na PAS foram acompanhadas da mesma forma quando avaliamos a PAM. Por outro lado, todos os tratamentos foram capazes de reduzir a PAD quando comparado ao grupo 2R1C. Em relação a frequência cardíaca não houve diferença entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2: Efeitos do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre a pressão arterial direta (mmHg) e frequência cardíaca em ratos com hipertensão renovascular 2R1C.

	SHAM	2R1C	ALSK	L-ARG	ALSK+L-ARG
PAS	112,09±3,18	200,50±5,36	195,058±9,03	152,19±5,36	123,91±1,68
PAD	81,06±1,60	130,19±7,15*	105,61±9,68 [#]	103,62±3,20 [#]	87,29±5,52 [#]
PAM	105,62±2,68	167,26±5,85*	160,24±10,26*	135,23±3,34 ^{*#}	108,87±2,88 ^{*#}
FC	80,40±13,72	373,78±26,02	403,02±23,05	357,40±11,46	372,48±9,81

Valores expressos em média ± EPM; (n = 7 por grupo). PAS, PAD, PAM e FC diretas foram mensuradas por cateterização da artéria femoral. *P <0,05 em relação ao grupo SHAM; #P <0,05 em relação ao grupo 2R1C; +P <0,05 em relação ao grupo 2R1C ALSK; ¥ P < 0.05 vs L-ARG

5.2 Efeitos do tratamento com Alisquireno e L-arginina sobre o peso do ventrículo esquerdo

Os dados de peso seco e peso úmido foram quantificados e corrigidos para o peso corporal, tendo como objetivo a detecção da existência de hipertrofia ventricular e a efetividade do tratamento como uma terapia cardioprotetora. Como mostrado na Tabela 3, o peso úmido e peso seco do ventrículo esquerdo apresentam uma diferença estatística maior nos ratos 2R1C quando comparado ao grupo SHAM. Além disso, o tratamento com L-arginina, assim como a associação de alisquireno e L-arginina foram efetivos na reversão da hipertrofia ventricular esquerda, evidenciando um papel protetor do sistema cardiovascular. Entretanto, o tratamento isolado com Alisquireno, não foi capaz de reduzir essa hipertrofia.

Tabela 3: Efeitos do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e associação do alisquireno e L-arginina (ALSK + L-ARG) sobre a hipertrofia ventricular esquerda (mg/g) em ratos com hipertensão renovascular 2R1C.

	SHAM	2R1C	ALSK	L-ARG	ALSK+L-ARG
Peso Úmido	2,23±0,04	3,32±0,16 ^{*#}	3,26±0,31 ^{*#}	2,47±0,09	2,22±0,15
Peso Seco	0,49±0,008	0,71±0,06 ^{*#}	0,64±0,03 ^{*#}	0,43±0,01	0,59±0,04

Valores expressos em média ± EPM; (n = 7 por grupo). Peso úmido e peso seco do ventrículo esquerdo (mg/g). * P <0.05 em relação ao grupo SHAM; + P < 0.05 em relação ao grupo L- ARG; # P < 0.05 em relação ao grupo ALSK+L- ARG

5.3 Efeitos do tratamento com Alisquireno e L-arginina sobre a modulação barorreflexa cardíaca

Para determinação da modulação barorreflexa cardíaca foi utilizado o índice médio de sensibilidade, através do $\Delta FC/\Delta PAM$. A Figura 9 ilustra os valores obtidos nos índices de taquicardia e bradicardia reflexas em resposta a administração de fenilefrina e nitroprussiato de sódio, respectivamente, antes e depois da infusão *in bolus* de TEMPOL. Conforme esperado, o grupo 2R1C apresentou uma sensibilidade barorreflexa reduzida tanto em resposta a fenilefrina como ao nitroprussiato de sódio em relação ao grupo Sham. Entretanto, os tratamentos com alisquireno, L-arginina e a associação de ambos foram capazes de restaurar o prejuízo na sensibilidade barorreflexa cardíaca, uma vez que apresentou valores muito semelhantes ao grupo Sham (Figura 1 – A e C).

Foi realizado bloqueio com TEMPOL (um mimético da superóxido dismutase) de modo a avaliar a participação do estresse oxidativo no prejuízo da sensibilidade barorreflexa no processo fisiopatológico da hipertensão renovascular. Assim, a bradicardia reflexa induzida pela administração de fenilefrina no grupo 2R1C foi restaurada após a administração aguda de TEMPOL, sugerindo a participação do estresse oxidativo na redução da sensibilidade barorreflexa de ratos 2R1C. O mesmo resultado pode ser observado na modulação barorreflexa cardíaca induzida pela administração de nitroprussiato de sódio através da ativação taquicárdica reflexa à redução da pressão arterial, (Figura 1 – B e D).

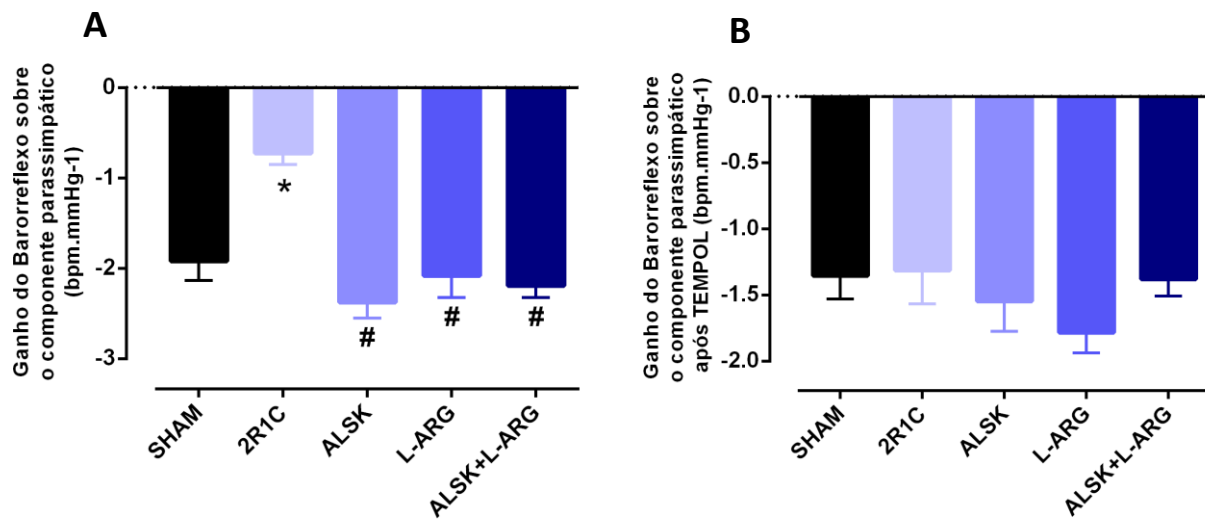


Figura 11. Sensibilidade do barorreflexo sobre o componente parassimpático (bpm/mmHg-1) determinado pelo método de Oxford modificado usando infusões intravenosas de fenilefrina antes da administração de TEMPOL (A) e depois da administração de TEMPOL (B). Valores expressos em média \pm EPM; (n = 7 por grupo). *P < 0.01 em relação ao grupo SHAM; #P < 0.01 em relação ao grupo 2R1C.

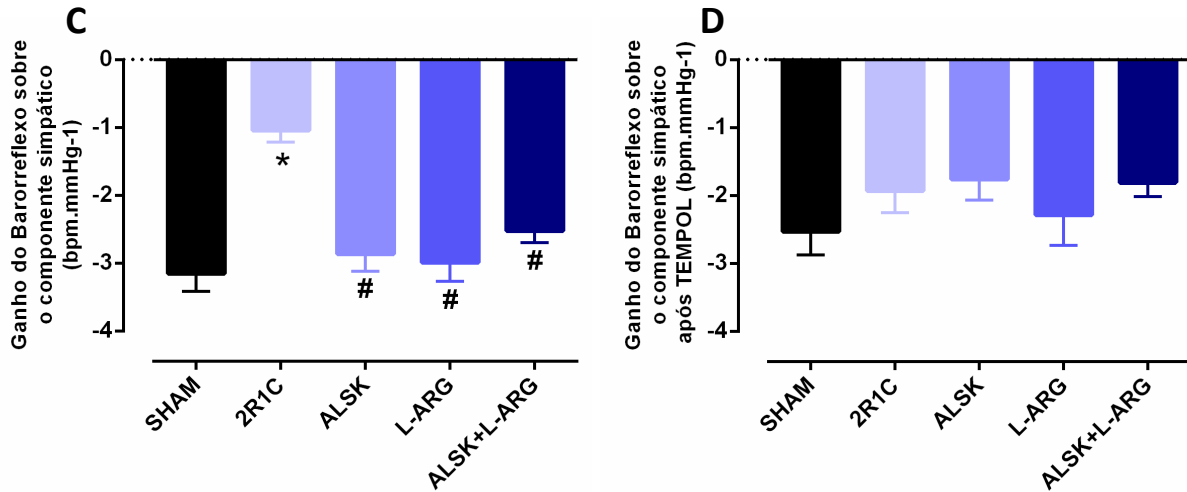


Figura 12. Sensibilidade do barorreflexo sobre o componente simpático (bpm/mmHg-1) determinado pelo método de Oxford modificado usando infusões intravenosas de nitroprussiato de sódio antes da administração de TEMPOL (C) e depois da administração de TEMPOL (D). Valores expressos em média \pm EPM; (n = 7 por grupo). *P < 0.01 em relação ao grupo SHAM; #P < 0.01 em relação ao grupo 2R1C.

5.4 Determinação dos Produtos Avançados de Oxidação Proteica (Advanced Oxidation Protein Products – AOPP)

O AOPP tem sido considerado um novo marcador de oxidação proteica e de inflamação. É formado na presença do estresse oxidativo como um produto da reação de proteínas plasmáticas com oxidantes clorados (106). No grupo 2R1C podemos observar um aumento nos níveis plasmáticos e no ventrículo esquerdo de AOPP (Figura 2 – A e B, respectivamente). No entanto, após o tratamento com alisquireno, L-arginina e com a associação de ambos podemos perceber uma redução significativa quando comparado ao grupo 2R1C se assemelhando ao grupo Sham.

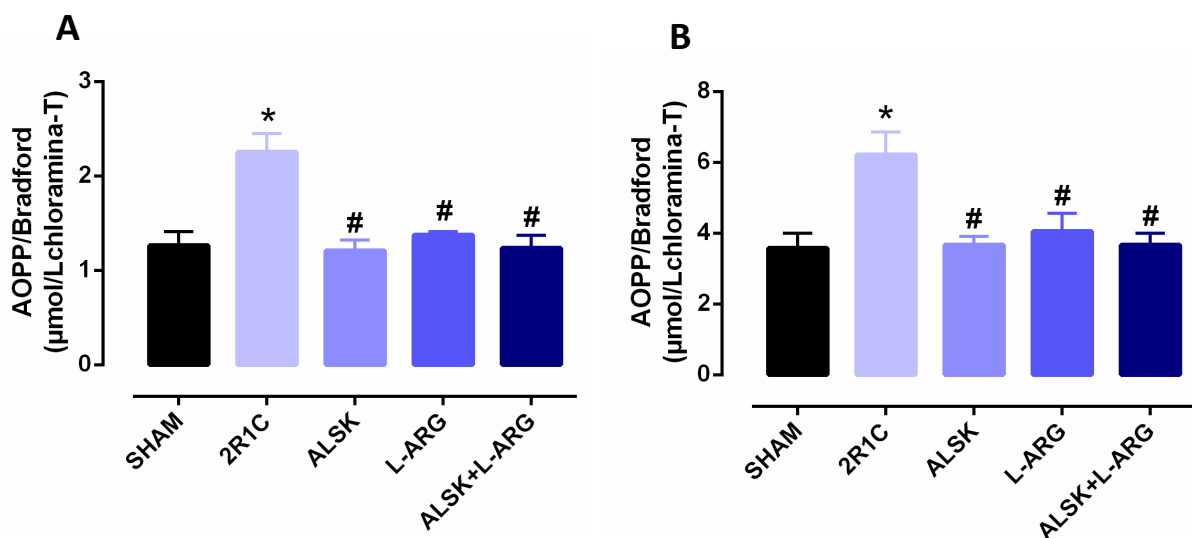


Figura 13. Efeitos do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e a associação de alisquireno e L-arginina (ALSK+L-ARG) sobre os níveis de produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) no plasma sanguíneo (A) e no ventrículo esquerdo (B). Valores expressos em média \pm EPM; (n = 7 por grupo). * P < 0.05 em relação ao grupo SHAM; # P < 0.05 em relação ao grupo 2R1C.

5.5 Expressão proteica da Mn SOD-2, Catalase e gp91phox no ventrículo esquerdo de ratos com hipertensão renovascular

Visando melhor elucidar qual mecanismo estaria atuando no processo de melhora sobre a redução da sensibilidade do barorreflexo nos ratos tratados com alisquireno, L-arginina e com a associação de ambas as terapias, a SOD 2, catalase e gp91phox foram avaliadas de modo a melhor compreender a participação do estresse oxidativo e do sistema antioxidante nesse processo. Assim, em condições basais (o ventrículo esquerdo foi retirado logo após o animal ter sido sacrificado) a expressão da SOD,

catalase e gp91phox foram detectadas através da técnica de Western Blot nos diferentes grupos estudados (Figura 3 – A, B e C respectivamente). A expressão da SOD no tecido do ventrículo esquerdo foi reduzida nos animais 2R1C quando comparado ao grupo Sham. Entretanto o tratamento com alisquireno, L-arginina e com a associação de ambas as drogas foi capaz de proporcionar um upregulation da SOD, aproximando os valores aos valores do grupo Sham. A expressão da catalase foi reduzida nos animais 2R1C quando comparado ao grupo Sham e aumentada nos grupos alisquireno, L-argina e com a associação de ambas as drogas quando comparado ao grupo Sham e ao grupo 2R1C. Foi observado no tecido do ventrículo esquerdo que a hipertensão renovascular (2R1C), independente do tratamento, que houve um aumento na expressão proteica de gp91phox, participante importante da via oxidante. Por outro lado, o tratamento com L-arginina e a associação de L-arginina e alisquireno foram capazes de reduzir essa expressão quando comparado ao grupo 2R1C.

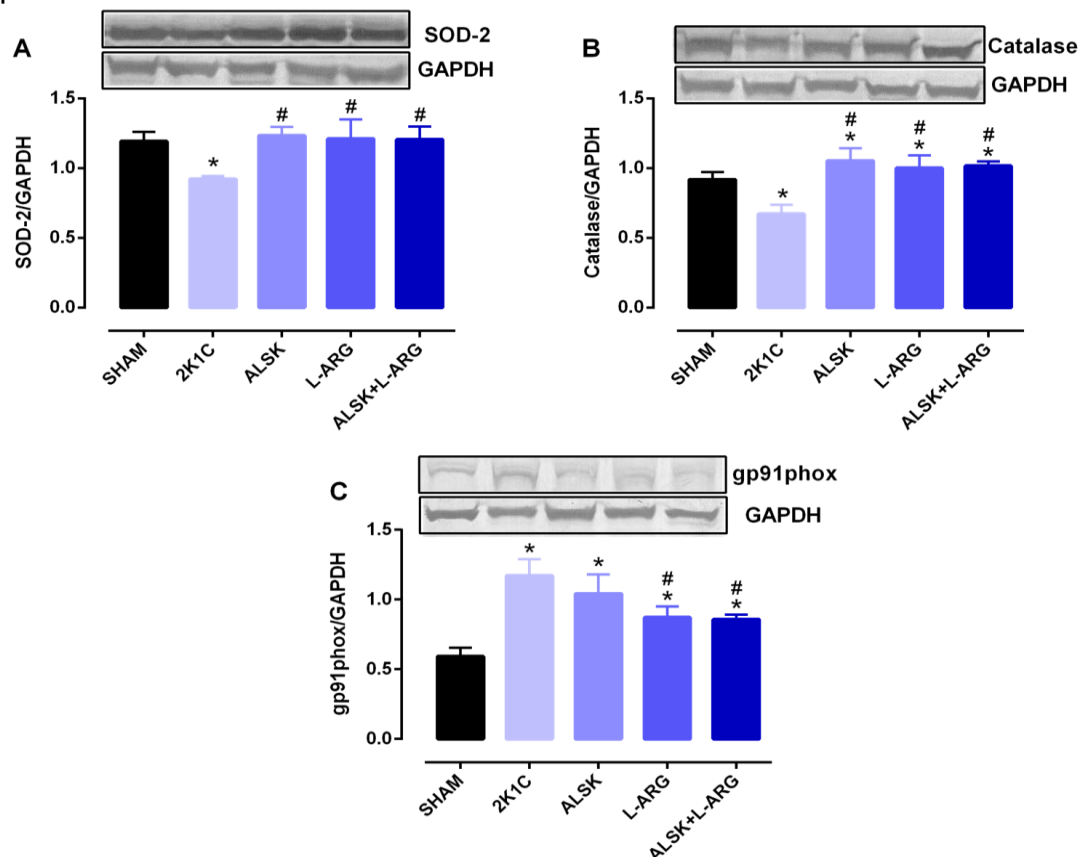


Figura 14. Efeitos do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e a associação de alisquireno e L-arginina (ALSK+L-ARG) sobre a expressão proteica da SOD (A), catalase (B) e da subunidade gp91phox da NADPH oxidase (C) no ventrículo esquerdo. Na parte superior estão as bandas representativas da expressão proteica. Valores expressos em média \pm EPM entre a densidade das bandas de SOD, catalase e gp91phox e da GAPDH; (n = 7 por grupo). * P < 0.05 em relação ao grupo SHAM; # P < 0.05 em relação ao grupo 2R1C.

5.6 Atividade da SOD e CAT no ventrículo esquerdo de ratos com hipertensão renovascular

Na Figura 4 (A e B) estão expressos os resultados das atividades das enzimas SOD e CAT respectivamente. Corroborando com os dados apresentados sobre a expressão proteica de SOD, a atividade da SOD no ventrículo esquerdo foi reduzido no grupo 2R1C quando comparado ao Sham. No entanto, houve um aumento significativo na atividade da SOD apenas no grupo tratado com a associação de alisquireno e L-arginina. Da mesma forma, a atividade da CAT encontrou-se reduzida no grupo 2R1C comparado ao grupo Sham e o tratamento com alisquireno, L-arginina e a associação de ambos os fármacos foram capazes de aumentar a atividade enzimática aproximando os valores ao grupo Sham.

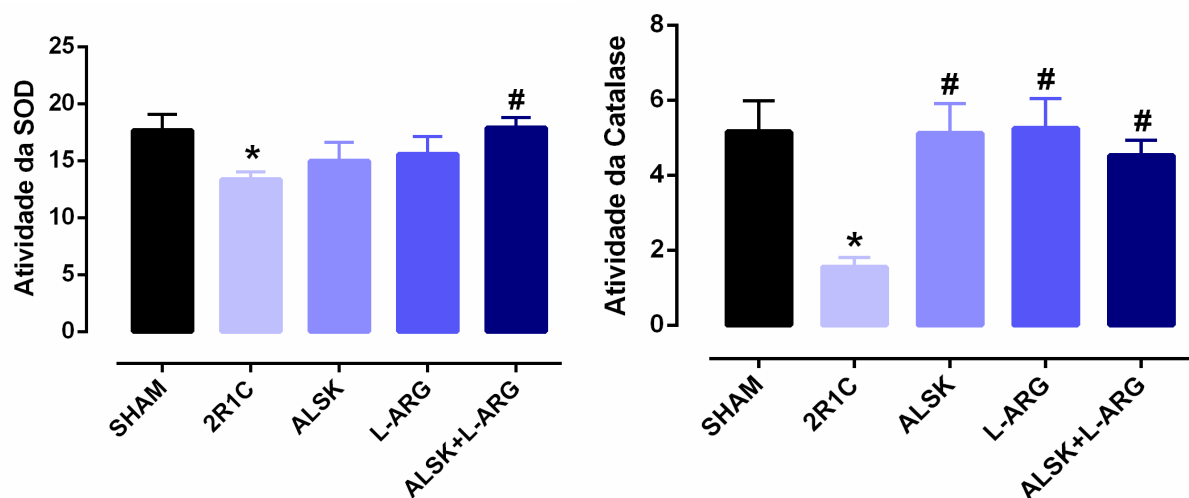


Figura 15. Efeitos do tratamento com alisquireno (ALSK), L-arginina (L-ARG) e a associação de alisquireno e L-arginina (ALSK+L-ARG) sobre a Atividade da SOD (A) e catalase (B) no ventrículo esquerdo. Valores expressos em média \pm EPM; (n = 7 por grupo). * P < 0.05 em relação ao grupo SHAM; # P < 0.05 em relação ao grupo 2R1C.

5.7 Quantificação da geração de espécies reativas de oxigênio pela oxidação do Dihidroestídeo (DHE) no tecido cardíaco de ratos com hipertensão renovascular

Outra técnica utilizada para investigar a influência da hipertensão e dos tratamentos sobre o estresse oxidativo e sistema antioxidante foi a fluorescência produzida pela oxidação com DHE. Em condições basais, a análise da fluorescência produzida pelo

DHE no ventrículo esquerdo revelou um aumento da produção de EROs nos animais 2R1C, assim como nos animais tratados com monoterapia de alisquireno e L-arginina quando comparado ao grupo Sham. O tratamento com alisquireno e L-arginina de forma isolada foi capaz de reduzir, porém não normalizar os valores de fluorescência e o tratamento com a associação de alisquireno e L-arginina tiveram seus valores de fluorescência normalizados, corrigindo o aumento da produção de EROs (Figura 5).

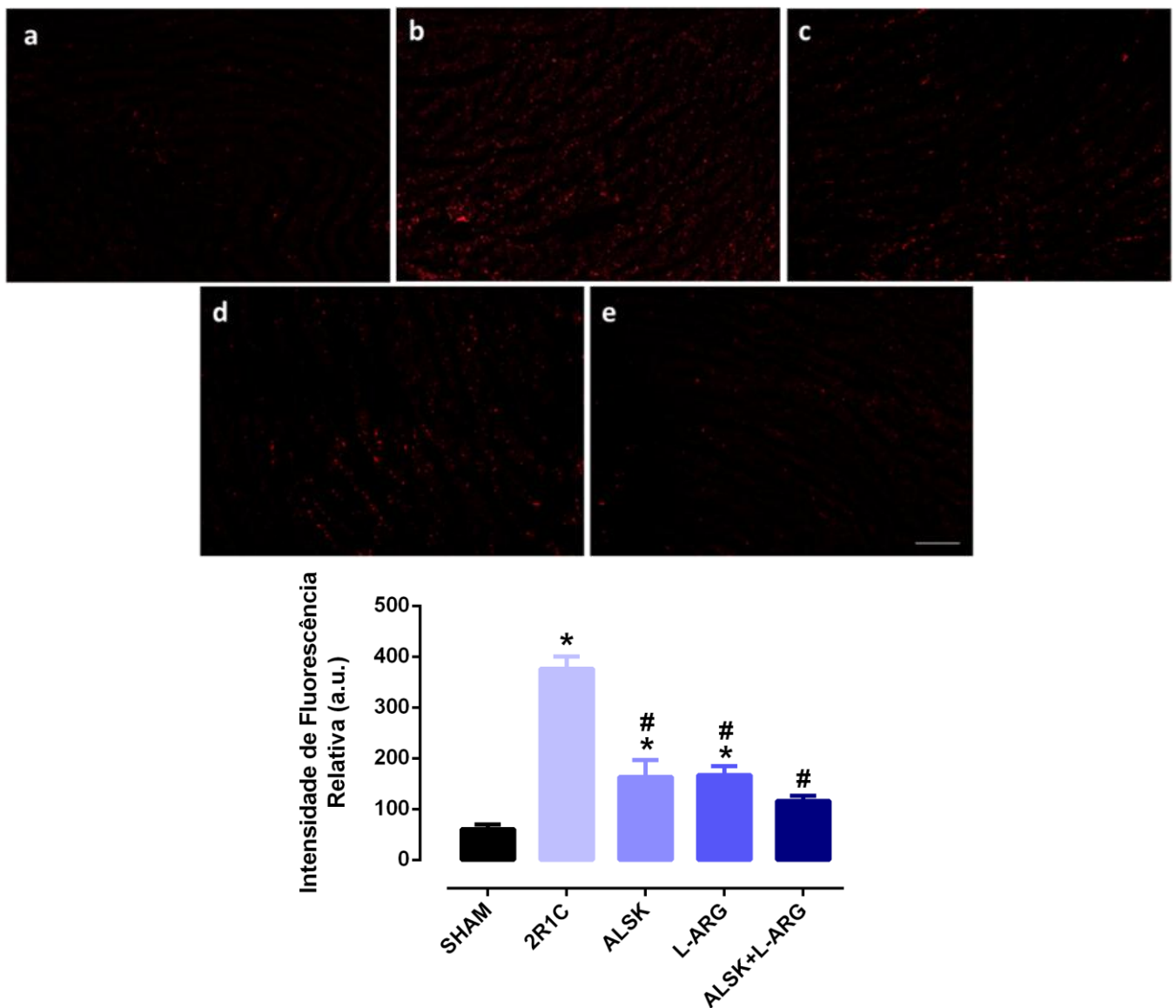


Figura 16. (A) Imagens de microscopia apresentam a fluorescência emitida por dihidroetideo no ventrículo esquerdo dos ratos Sham (A), 2R1C (B), ALSK (C), L-ARG (D) e ALSK+L-ARG (E). (B) Gráfico com valores da fluorescência emitida por dihidroetideo no ventrículo esquerdo. Valores expressos em média \pm EPM; (n = 7 por grupo). * P < 0.05 em relação ao grupo SHAM; # P < 0.05 em relação ao grupo 2R1C.

6 DISCUSSÃO

Vários modelos animais tem sido utilizados na pesquisa sobre a fisiopatologia da hipertensão arterial de modo a mimetizar a hipertensão arterial humana. Como exemplo, a hipertensão experimental Goldblatt 2R1C que em muitos aspectos se assemelha a hipertensão renovascular humana.

Sabe-se que a fisiopatologia da hipertensão renovascular envolve alterações hormonais, neurais e hemodinâmicas secundárias a estenose da artéria renal. O SRAA, especificamente a formação final de Ang II, tem envolvimento importante na gênese e manutenção da hipertensão advinda da doença renovascular (Navar *et al.*, 2002). Além de disfunção endotelial, aumento da atividade simpática, alteração hidroeletrólítica, já está bem estabelecido que as alterações na pressão arterial também se relaciona diretamente com mudanças na sensibilidade do barorreflexo. Especula-se que um dos mecanismos chave para o desenvolvimento de diferentes alterações fisiopatológicas na hipertensão seja por intermédio do aumento das espécies reativas de oxigênio (Kitiyakara e Wilcox, 1998;Houston, 2005).

Existem diferentes grupos farmacológicos sendo utilizado na pratica clínica de modo a contrapor-se ao SRAA, como os IECA, BRAs e recentemente o alisquireno, um inibidor direto de renina (Gradman & Kad, 2008). Adicionalmente, tem se investigado à capacidade do fármaco em aumentar a biodisponibilidade de NO e diminuir o estresse oxidativo. Diante disto, escolhemos um medicamento que atua bloqueando o SRAA, o alisquireno, e o aminoácido L-arginina, precursor da síntese do principal vasodilatador derivado do endotélio, o NO, para avaliar seus efeitos isolados e associados sobre a pressão arterial, a atividade barorreflexa, hipertrofia cardíaca e sistema oxidante e antioxidante de ratos com hipertensão renovascular, o que poderia propor uma nova abordagem terapêutica contra a progressão da doença. Mediante estas informações, a importância desse estudo reside no fato de avaliar e tornar mais conhecido o efeito do tratamento por 21 dias de alisquireno e L-arginina de forma isolada e associada na hipertensão renovascular sobre o sistema cardiovascular, mais especificamente a participação do estresse oxidativo no prejuízo do barorreflexo e na hipertrofia cardíaca na hipertensão renovascular.

Assim, os principais achados desse estudo foram: (I): os altos níveis pressóricos visto no grupo 2R1C foram parcialmente restaurados pelo tratamento com L-arg e totalmente restaurados pela combinação das drogas ALSK+L-ARG; (II): todos os tratamentos propostos no estudo foram efetivos em restaurar a sensibilidade barorreflexa reduzida com a hipertensão renovascular; (III): a hipertrofia ventricular esquerda foi prevenida com os tratamentos associados e com a monoterapia com L-arginina; (IV): houve redução do estresse oxidativo sistêmico e local de todos os tratamentos propostos. Portanto, nossos dados evidenciam pela primeira vez os efeitos do tratamento com alisquireno e L-arginina sobre a função barorreflexa na hipertensão renovascular.

O recente tratamento com o inibidor direto da renina, alisquireno, vem sendo utilizado por atuar diretamente no bloqueio da renina, promovendo assim um bloqueio mais completo do sistema renina-angiotensina (Bortolotto & Malachias, 2009). Entretanto, em nosso estudo o tratamento com alisquireno de forma isolada não promoveu efeitos anti-hipertensivos no modelo de hipertensão 2R1C. Uma provável explicação para esse achado poderia se relacionar ao fato de que existem vias alternativas para a formação de Ang II, não dependentes de ECA, que estão envolvidas na ativação do SRAA (Strasser *et al.*, 2007). Além da ECA, a quimase pode atuar sobre a angiotensina I e formar a angiotensina II, que também pode ser formada a partir do angiotensinogênio pela via da catepsina G e da tonina (Atlas, 2007). Sendo assim, depois de formada a Ang II pode se ligar a seus receptores e promover sua ação. Adicionalmente, uma ação intermediária de outras enzimas da família das angiotensinas podem estar atuando na manutenção dos níveis pressóricos elevados como na retenção de sódio e água por intermédio da Angiotensina III (Martins-Oliveira *et al.*, 2012; Bader, 2010). No entanto, não podemos contestar a hipótese de que uma dose mais elevada de alisquireno do que a utilizada neste estudo poderia provocar redução da pressão arterial. Como demonstrado no estudo desenvolvido por Hermanowicz *et al.* (2013) que utilizou alisquireno nas doses de 10, 30 e 100mg.kg⁻¹.dia⁻¹ por 10 dias em ratos 2R1C e só com a maior dose houve redução da PAS. Além disso, o estudo de Martins-Oliveira *et al.* (2013) utilizou a mesma dose utilizada em nosso estudo e observou que após 3 semanas de tratamento, a PAS não foi reduzida, porém após 4 semanas houve uma redução significativa da PAS. Rashikh *et al.* (2012) demonstraram que a terapia

apenas com alisquireno foi capaz de reduzir o aumento da frequência cardíaca e pressão arterial justificando o uso do mesmo como fármaco anti-hipertensivo, porém, em doses mais elevadas. Adicionalmente, a ativação do SRAA aumenta o estresse oxidativo principalmente pelo aumento das concentrações de Ang II circulante (Braga et al., 2008; Botelho-Ono et al., 2011). O bloqueio de do SRAA pode reduzir o estresse oxidativo, reduzindo assim o dano oxidativo celular, corroborando com alguns estudos anteriores que apontam para um possível efeito antioxidante do alisquireno (Rashikh et al., 2012; Martins-Oliveira et al., 2012).

Por outro lado, a administração isolada de L-arginina foi capaz de reduzir, apesar de não normalizar, a PAS de ratos com hipertensão renovascular. Corroborando com nossos achados, estudos anteriores demonstram que o tratamento com L-arginina apresenta significativo efeito sobre a redução dos níveis pressóricos, e sobretudo, na proteção de órgãos-alvo, considerando sua capacidade de aumentar a disponibilidade de NO e diminuir o estresse oxidativo (Deng *et al.*, 1995; Ackermann *et al.*, 1998). Adicionalmente, estudos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório (Gouvea *et al.*, 2002; Gouvea *et al.*, 2004, Tiradentes et al., 2015, Santuzzi et al., 2014) apontam para o tratamento com L-arginina como promissor não somente na redução da hipertensão arterial, mas sobretudo, na melhora da diurese e natriurese nos animais hipertensos tratados, reversão da hipertrofia cardíaca, aumento da massa do rim clipado e redução significativa da atividade da ECA no plasma, coração e rim cuja artéria renal recebeu o clipe. Vários mecanismos poderiam justificar as ações do tratamento com L-arginina, um deles seria o aumento na formação de NO no rim. O aumento na formação de NO pode ser um componente importante na reversão da hipertensão renovascular 2R1C por facilitar a reperfusão renal, cardíaca e promover vasodilatação sistêmica. Assim como, tem sido demonstrado que o NO contribui para ambas as fases, inicial e crônica da hipertensão 2R1C, uma vez que o seu efeito vasodilatador é capaz de reduzir a hipertensão e manter a perfusão para ambos os rins por contrabalancear a vasoconstrição independente da Ang II (Sigmon & Beierwaltes, 1998). Adicionalmente, existe um efeito benéfico na L-arginina sobre o controle da pressão arterial, uma vez que o aumento da biodisponibilidade de NO está relacionado a ações antioxidantes, por interações diretas entre NO e EROs.

Corroborando com os achados de Santuzzi (2014) e Tiradentes (2015), a combinação destas terapias resultou numa redução significativa da hipertensão arterial, sugerindo um efeito aditivo das terapias sobre o bloqueio de renina, associado ao aumento na biodisponibilidade de NO, provavelmente por uma ação benéfica sobre a disfunção endotelial e redução da atividade simpática. Adicionalmente, todas as terapias propostas foram capazes de reduzir a PAD no modelo de hipertensão utilizado.

Estudos associam de forma direta a hipertensão renovascular com hipertrofia ventricular esquerda, condição essa relacionada como uma adaptação a uma injúria permanente estando frequentemente relacionada com complicações cardiovasculares ainda mais graves incluindo o aumento da mortalidade por doença cardiovascular (Li et al., 2013; Soares et al., 2011). Sendo assim, torna-se cada vez mais relevante o desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes na reversão ou mesmo na prevenção de lesão de órgãos-alvo. Como esperado, nossos dados demonstraram que a hipertensão renovascular promove hipertrofia do ventrículo esquerdo, corroborando com a literatura que apresenta vários estudos que também encontraram hipertrofia ventricular esquerda em ratos 2R1C (Li et al., 2013; Martins-Oliveira et al., 2012; Soares et al., 2011; Sheng et al., 2007). Sabe-se que a Ang II possui ações inotrópicas e cronotrópicas diretas sobre o coração, participando dessa forma da regulação da função cardíaca. As ações parácrinas, autócrinas e intrácrinas da Ang II nos tecido cardiovascular são responsáveis por determinar o seu envolvimento na proliferação e hipertrofia de fibroblastos cardíacos e hipertrofia dos miócitos via receptor AT1 promovendo remodelamento cardiovascular parcialmente devido ao aumento da atividade da metaloproteinase de matriz 2 (Martins-Oliveira et al., 2012; TRAN et al., 2011). Diante disto, inicialmente hipotetizamos que o alisquireno, ao reduzir a produção de Ang II, poderia reduzir a hipertrofia cardíaca, entretanto este fato não ocorreu. Outros estudos que utilizaram o tratamento com alisquireno em ratos 2R1C também não obtiveram êxito na redução da hipertrofia do ventrículo esquerdo, embora tenha reduzido a concentração de Ang II e, dessa forma, demonstraram que o bloqueio direto da renina reduz a sua capacidade de degradar angiotensinogênio e gerar Ang I, mas não inibe a sinalização pró-fibrotica induzida pelo receptor de renina/(pro)renina (Martins-Oliveira et al., 2012). Este fato pode ser atribuído a uma elevação

compensatória na concentração de renina plasmática com o tratamento com alisquireno na hipertensão 2R1C (Krebs et al., 2007), ativando ainda mais o receptor de renina/(pro)renina, que, por sua vez, ativa vias dependentes de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). Isto resulta na proliferação de células do músculo liso vascular e superexpressão de proteínas de matriz e proteínas profibróticas (Huang et al., 2006; Nguyen & Danser, 2008; Danser, 2010; Liu et al., 2011). Já vem sendo documentado que a ativação do receptor AT1 via Ang II no cardiomiócito leva a um aumento na produção de ânion superóxido em decorrência da ativação da NADPH oxidase, induzindo a hipertrofia do cardiomiócito por mecanismos dependentes de Akt (Hafstad et al. 2013; Lassègue et al. 2012). Adicionalmente, o aumento nos níveis de Ang II desencadeia ativação da Rac1 (outra subunidade da NADPH oxidase) em associação com a gp91phox, aumentando a produção de EROs (Hingtgen et al. 2006). Sendo assim, o aumento na expressão de gp91phox pode ser acompanhado pelo aumento da geração de EROs, e esse por sua vez, provocar ativação de metaloproteinases de matriz e por consequência aumentar deposição de colágeno e hipertrofia ventricular esquerda (Hafstad et al. 2013; Sun et al. 2007) uma possível explicação para que se mantenha a hipertrofia ventricular esquerda nos animais tratados com a monoterapia de alisquireno uma vez que o mesmo apresentou valores aumentados quando avaliado a quantificação proteica no ventrículo esquerdo de gp91phox.

Entretanto, o tratamento com L-arginina isoladamente ou combinada com alisquireno, promove uma reversão da hipertrofia ventricular esquerda. Em nossos estudos anteriores observamos que mesmo com 7 dias de tratamento com L-ARG já há uma redução da atividade da ECA em ratos 2R1C (Gouvea et al., 2004), que, possivelmente, promove uma diminuição da formação de Ang II, reduzindo a ativação de receptores AT₁ e os estímulos profibróticos desencadeados por eles. Achado esse que corrobora com a quantificação proteica de gp91phox que nesses grupos encontra-se reduzida quando comparado ao grupo 2R1C.

Esses dados nos levam a acreditar que o nível pressórico reduzido e normalizado, nos grupos L-arginina e associado de L-arginina com alisquireno, pelo tratamento, não seja a única condição determinante na reversão da hipertrofia ventricular nos animais estudados. Embora os mecanismos pelos quais os nitratos melhoram os

problemas da contratilidade miocárdica e função ventricular sejam complexos, pode-se especular que haja um envolvimento da redução de tensão durante a sístole e diástole, com conseqüente diminuição da pré-carga, pós carga e do trabalho ventricular, aumento da perfusão de áreas isquêmicas e melhora na oferta de oxigênio aos tecidos. Ações essas que, em conjunto, implicam em uma redução da hipertrofia cardíaca presente nos animais com hipertensão renovascular.

O barorreflexo é um reflexo autonômico responsável por tamponar batimento a batimento flutuações na pressão arterial (Thomas, 2011). Por outro lado, Tsyrlin et al. (2013) sugerem que o barorreflexo arterial esteja envolvido também no controle a longo prazo da pressão arterial já que seus resultados são consistentes com os de estudos anteriores que mostram que a hipertensão 2R1C decorre de forma concorrente a inibição do barorreflexo arterial e ativação do SRAA (Lohmeier, 2001; Osborn, Jacob e Guzman, 2005; Malpas, 2004). Além disso, a atividade dos nervos simpáticos renais, responsáveis pela regulação da excreção de sódio pelo rim parece ser, pelo menos em parte, modulada pelos efeitos a longo prazo de barorreflexo arterial. Estudos anteriores mostram que a sensibilidade do barorreflexo encontra-se reduzido em diferentes modelos de hipertensão, inclusive no modelo de hipertensão 2R1C (Botelho-Ono et al., 2011; Guimarães, Carvalho e Braga, 2012; Braga, 2012).

A resposta barorreflexa frente a variações de frequência cardíaca é avaliada mediante situações de aumento ou redução da pressão arterial média provocadas através da infusão de drogas vasoativas. As administrações dessas drogas podem ser feitas em *bolus*, método de steady-state (estado estacionário) ou “rampa de infusão” (Farah et al., 1999). É bem documentado que os barorreceptores arteriais se adaptam (*resetting*) em resposta à hipertensão, assim como de que dentro das primeiras 6 horas existe uma adaptação parcial e a adaptação completa ao aumento da pressão ocorre dentro dos primeiros dois dias (Krieger, 1989). Estudos anteriores também demonstraram que, dentro dos primeiros minutos já existe uma adaptação aguda frente as variações da pressão sanguínea (Xavier-Neto et al., 1996). Nesse contexto, as alterações da PAM obtidas durante curtos períodos de tempo (dentro de 30s, ex. Infusões em *bolus*) são mais apropriadas para evitar adaptações agudas,

justificando, pelo menos em parte nossa escolha pela infusão em *bolus* das drogas vasoativas.

As contribuições dos componentes simpático e parassimpático na promoção de respostas cronotrópicas apresentam características distintas, diante das flutuações da pressão arterial (Alzamora, Santos e Campagnole-Santos, 2006). Enquanto a taquicardia barorreflexa é determinada por atuação concomitante dos componentes autonômicos, a bradicardia barorreflexa é determinada praticamente por uma descarga vagal, uma vez que o simpático atua de forma lenta em resposta a mudanças bruscas da PAM (Head & McCarty, 1987). Sendo assim, a avaliação separada da sensibilidade barorreflexa parece melhor expor as disfunções autonômicas.

Nas avaliações da bradicardia e taquicardia reflexas, os animais com hipertensão 2R1C apresentaram a sensibilidade barorreflexa reduzida em comparação aos animais hipertensos. Diversos estudos indicam que a redução da sensibilidade do barorreflexo não é causado apenas pelo aumento dos níveis pressóricos e estiramento vascular, mas também por substâncias neuro-humorais e fatores parácrinos (Chen et al., 1990; Xie et al., 1990; Li et al., 1992; Alzamora et al., 2006), assim como por influência direta do estresse oxidativo.

A participação do SRAA nesse prejuízo do barorreflexo observado na hipertensão vem sendo amplamente estudado (Oliveira et al., 1996). Moyses et al. (1994) demonstram por meio de uma análise sigmoideal que o prejuízo do barorreflexo neste modelo aumenta no decorrer do tempo, especulando grande participação do SRAA na gênese desta disfunção nas fases iniciais da hipertensão arterial, uma vez que tardiamente alterações estruturais nos vasos poderiam colaborar com o prejuízo barorreflexo. Brooks (1995) sugeriu uma redução na sensibilidade barorreflexa por ação direta da Ang II, uma vez que após a cessação da infusão crônica de Ang II (fator causador da redução do barorreflexo neste estudo) houve uma melhora da sensibilidade parcialmente, mesmo com a manutenção dos níveis de hipertensão por outro vasoconstritor. Adicionalmente, o tratamento de ratos com hipertensão 2R1C com enalapril (inibidor da ECA) produziu um aumento na bradicardia reflexa induzida por aumento da PAM promovida pela fenilefrina (Britto et al., 1997). Em concomitância, diversos estudos tem demonstrado que o componente vagal do

controle reflexo da frequência cardíaca é prejudicado por intermédio da ação da Ang II (Michelini & Bonagamba, 1990; Michelini, Oliveira e Santos, 1992; Alzamora et al., 2006).

Adicionalmente, há evidências convincentes de que o estresse oxidativo modula a função do barorreflexo na saúde e na doença (Monahan, Eskurza e Seals, 2004; Nish et al., 2010). A administração exógena de “varredores” de radicais livres, tais como a SOD e a catalase no seio carotídeo de coelhos com arteriosclerose induzida experimentalmente, melhora a função barorreflexa deprimida pela condição patológica (Li et al., 1996), sugerindo uma ação inibitória direta das espécies reativas de oxigênio em barorreceptores carotídeos. Além disso, a infusão intravenosa aguda de ácido ascórbico, um conhecido antioxidante, aumenta a sensibilidade barorreflexa em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva (Nightingale et al., 2003; Chapleau et al., 1995). A administração de antioxidantes em estudos anteriores (Li et al., 1996; Nightingale et al., 2003) e também neste estudo, não teve efeito sobre a função barorreflexa de animais normotensos, sugerindo que, a terapia antioxidante na ausência do estresse oxidativo não possui influência sobre a sensibilidade barorreflexa.

Embora não seja possível determinar o mecanismo preciso pelo qual a terapia com alisquirino ou L-arginina exerça influência positiva sobre a função barorreflexa, há evidências recentes de que a melhora na sensibilidade barorreflexa observada em ratos com hipertensão renovascular é causada pela melhora na função autonômica associada a uma redução do estresse oxidativo (Braga et al., 2012; Botelho-Ono et al., 2010). Para além disso, evidências de outros estudos com animais tem sugerido que a sensibilidade diminuída barorreflexa é causada pela disfunção endotelial (Chapleau et al., 1995). Em particular, na disfunção endotelial induzida experimentalmente, a diminuição da prostaciclina e o aumento das concentrações de tromboxano são associados com a redução dos impulsos barorreflexos da artéria carótida (Li et al., 1996). Em resultados anteriores observamos que, após a retirada do endotélio, a resposta contrátil foi reforçada em todos os grupos, no entanto, a magnitude desta resposta, foi maior nos ratos tratados com a associação de alisquirino e L-arginina. Estes dados sugerem que o tratamento associado foi eficaz

na liberação de um fator de relaxamento derivado do endotélio. Assim, a combinação das terapêuticas propostas pareceu restaurar a disfunção endotelial induzida pelo modelo 2R1C (Santuzzi et al., 2014). Observamos também, que a administração oral de alisquireno e L-arginina normalizou a atividade do nervo simpático renal, sugerindo que a Ang II e NO estão envolvidos no reflexo simpático aferente aumentado em ratos com hipertensão renovascular, dados esses que apontam para prováveis efeitos benéficos dos tratamentos propostos em reduzir a pressão arterial (Tiradentes et al., 2015), assim como melhorar a sensibilidade do barorreflexo que encontra-se prejudicada em animais com hipertensão 2R1C.

O fato de que os níveis circulantes aumentados de Ang II no modelo experimental de hipertensão 2R1C vem sendo cada vez mais relacionado a interação do SRAA com o estresse oxidativo. Abundantes evidências sugerem que um dos mecanismos chave pelo qual a Ang II medeia suas ações é através da sua capacidade de estimular a produção de EROs (Griendling et al, 1994; Braga et al, 2008), principalmente ânion superóxido (Griendling et al, 1994; Berry et al., 2000; Zimmerman et al., 2004), através da ativação da NADPH oxidase. A NADPH oxidase é uma enzima composta por duas subunidades de membrana (gp91phox e p22phox), subunidades citoplasmáticas (p40phox, p47phox e p67phox), e uma pequena proteína G, a Rac1a (Lassegue e Clempus, 2003). Após a ativação de receptores AT1 por Ang II, as subunidades citoplasmáticas ligam-se as subunidades de membrana e ativam a enzima, resultando na produção intracelular de superóxido. O acúmulo de superóxido leva a mudanças em canais iônicos, especialmente canais de cálcio e potássio, alterando disparos neuronais em áreas do cérebro, tais como o bulbo ventrolateral rostral resultando em um aumento da atividade nervosa simpática e conseqüente aumento dos níveis pressóricos (Hirooka, 2008). Estudos anteriores sugerem que a atividade da NADPH oxidase está envolvido na redução da sensibilidade barorreflexa em animais com hipertensão renovascular, uma vez que após a administração de apocinina, um inibidor da NADPH oxidase, houve uma restauração da sensibilidade do barorreflexo a valores que assemelham aos de ratos de controlo normotensos (Botelho-Ono et al., 2011).

Nesse contexto, os resultados do presente trabalho, em associação com estudos anteriores consolidam a ideia de que o estresse oxidativo reduz a sensibilidade do

barorreflexo e que efeitos antioxidantes podem restaurar essa condição patológica. Demostramos através do bloqueio agudo com TEMPOL que, após a administração desse mimético da superóxido dismutase, o prejuízo do barorreflexo é restaurado tanto em respostas bradicardicas como em respostas taquicardicas, e que, nossos tratamentos propostos foram capazes de restaurar essa sensibilidade prejudicada, mostrando-se mais uma vez como importantes na redução do estresse oxidativo e restauração da sensibilidade do barorreflexo.

Atualmente, o NO vem sendo associado a um papel importante no controlo autonômico e barorreflexo em seres humanos e em animais experimentais (Spieker et al., 2000; Salgado et al., 2006; Souza et al., 2009). A redução na biodisponibilidade do óxido nítrico pode ser causada pelo estresse oxidativo (Pepine, 2009). Sendo assim, é possível que a redução da biodisponibilidade do óxido nítrico contribua para a redução da sensibilidade do barorreflexo em ratos com hipertensão renovascular secundárias ao aumento dos níveis de estresse oxidativo. Por outro lado, a Ang II também diminui a biodisponibilidade do NO através do aumento do estresse oxidativo (Chowdhary et al., 2000). No modelo de hipertensão 2R1C o equilíbrio entre NO, Ang II e produção de EROs encontra-se alterada, principalmente por alterações na parede da vasculatura e disfunção endotelial, levando assim a um desbalanço entre as vias antioxidantes e oxidantes, desencadeando aumento no estresse oxidativo (Martinez et al., 2008; Reckelhoff e Romero, 2003). Considerando que nós não realizamos a medida da biodisponibilidade de óxido nítrico e da Ang II no presente estudo, e com base em estudos anteriores, só podemos especular que o nosso tratamento aumentou a biodisponibilidade do óxido nítrico e reduziu os níveis de Ang II, contribuindo de forma significativa para a redução do estresse oxidativo e secundariamente na melhora da sensibilidade do barorreflexo.

O estresse oxidativo é definido como um desbalanço entre os sistemas pró e antioxidantes, de maneira que o primeiro predomina, causando dano celular via aumento das EROS. As enzimas antioxidantes, tais como a SOD e Catalase desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostase das EROs (Touyz et al., 2004). Na hipertensão arterial podemos observar de forma significativa o aumento da produção de EROs. Tem sido demonstrado que o complexo enzimático da NADPH oxidase é uma importante fonte na produção de ânion

superóxido nos processos patológicos de hipertensão e que contribui significativamente para o estresse oxidativo. Diante disto, o estresse oxidativo foi avaliado medindo os níveis de AOPP no plasma e no ventrículo esquerdo, a expressão de enzimas antioxidantes endógenas (SOD e CAT) e oxidante (gp91phox), assim como a produção de ânions superóxido *in situ* foram mensuradas no ventrículo esquerdo.

Os principais alvos do estresse oxidativo são o DNA, as proteínas e os lipídeos. Os produtos avançados de oxidação proteica têm sido considerados novos marcadores de oxidação e dano às proteínas, podendo ser utilizado para estimar o dano oxidativo proteico (Witko-Sarsat et al., 1996). O presente estudo mostra pela primeira vez um aumento significativo nos níveis de AOPP no plasma e no tecido cardíaco de animais com hipertensão renovascular, apontando um efeito benéfico em reduzir o estresse oxidativo dos tratamentos propostos, uma vez que ao final do tratamento os animais tratados apresentaram níveis plasmáticos e no ventrículo esquerdo reduzido de AOPP. Adicionalmente, observamos uma redução significativa na atividade e expressão de SOD e CAT, bem como o aumento na expressão gp91phox no tecido cardíaco dos animais com hipertensão 2R1C. Estes resultados sugerem que o aumento das EROs poderiam ser um dos mecanismos através dos quais a hipertensão 2R1C induz um aumento na pressão sanguínea, reduz a sensibilidade do barorreflexo e modula outras alterações estruturais e funcionais dos órgãos alvo, como hipertrofia e disfunção cardíaca. Entretanto, o tratamento com alisquireno e L-arginina diminuiu os níveis de AOPP e aumentou a expressão de SOD e a expressão e atividade da catalase.

A produção de EROs é comprovadamente aumentada no grupo 2R1C. Estudos anteriores demonstram que a Ang II aumenta a atividade de NADPH oxidase, a principal fonte de O_2^\bullet nos vasos sanguíneos, aumentando dessa forma a produção de O_2^\bullet , sistemicamente e no sistema nervoso central (Griendling et al., 1997; Laursen et al., 1997). Adicionalmente, estudos sugerem que uma produção excessiva de EROs diminui os sistemas antioxidantes endógenos no RVLM na hipertensão renovascular, contribuindo dessa forma para reduzir a biodisponibilidade de NO e aumentar a vasoconstrição, além de desencadear aumento na atividade simpática, redução da sensibilidade barorreflexa e alterações estruturais e funcionais

de órgãos alvo. Entretanto, nosso tratamento proposto com alisquireno ou L-arginina, foi capaz de reduzir *in situ* a produção de ânions superóxido no ventrículo esquerdo como demonstrado pela fluorescência ao DHE. Além disso, a associação de tratamentos foi capaz de normalizar os valores, apresentando valores muito próximos ao grupo Sham.

Considerando a redução dos níveis de Ang II causada por alisquireno ou o aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico desencadeada pela administração exógena de L-arginina, podemos explicar pelo menos em parte a redução da produção de EROs no ventrículo esquerdo, uma vez que ambas as terapêuticas já foram relacionadas com efeitos antioxidantes (Wang et al., 1997; Martins-Oliveira et al., 2013; Rashikh et al., 2013; Rajapakse, Nanayakkara e Kaye, 2015; Mohamed e Laseen, 2014). Entretanto, nossos dados apontam pela primeira vez uma normalização nos valores quando associamos as terapias, provavelmente por um efeito aditivo da redução do SRAA, associada a um definido efeito antioxidante de L-arginina, por intermédio do aumento do NO.

O prejuízo do barorreflexo está envolvido na progressão da doença cardiovascular e a associação de outros fatores prejudiciais acentuam o desenvolvimento da hipertensão e/ou danos em órgãos-alvo. Neste trabalho nós avaliamos a sensibilidade do barorreflexo na presença de dois importantes fatores relacionados a doença cardiovascular, hipertrofia ventricular esquerda e aumento do estresse oxidativo, e demonstramos que o tratamento com alisquireno ou L-arginina restaura a sensibilidade do barorreflexo em ratos com hipertensão renovascular. Além disso, o estresse oxidativo parece desempenhar um papel importante na sensibilidade barorreflexo presente na hipertensão renovascular. O local exato de ação onde os tratamentos desempenham seus efeitos benéficos, a fim de melhorar a sensibilidade do barorreflexo é desconhecida. No entanto, o aumento na expressão e atividade de enzimas antioxidantes, bem como a redução na expressão de enzimas oxidantes, acompanhada da redução dos níveis de produtos avançada de oxidação proteica podem estar contribuindo para a restauração da sensibilidade barorreflexa em ratos hipertensão renovascular.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu G.R., Futuro-Neto H.A., Cabral A.M., Vasquez E.C. L-arginine restores the effect of ouabain on baroreceptor activity and prevents hypertension. *Hypertension*. 34[part 2]: 729-732, 1999.
- Ackermann A., Fernández-Alfonso M.S., Sánchez de Rojas R., Ortega T., Paul M., González C. Modulation of angiotensin-converting enzyme by nitric oxide. *British Journal of Pharmacology*. 124: 291-298, 1998.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 105: 121-6, 1984.
- Aires M.M. *Fisiologia*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 1335 p.
- Alzamora A.C., Santos R.A.S. e Campagnole-Santos M.J. Baroreflex modulation by angiotensins at the rat rostral and caudal ventrolateral medulla. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 290: 1027-1034, 2006.
- Angeli F., Reboldi G., Poltronieri P., Angeli E., De Filippo V., Crocetti A., Bartolini C., D'Ambrosio C., Verdecchia P. Efficacy and Safety Profile of Aliskiren: Practical Implications for Clinicians. *Current. Drug. Safety*. 9: 106-117, 2014.
- Atlas S.A. The rennin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J. Manag. Care Pharm*. 13(8 Suppl B): 9-20, 2007.
- Bader M. Tissue renin–angiotensin–aldosterone systems: targets for pharmacological therapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. [S.I.]*. 50: 439-465, 2010.
- Barbosa K.B.F., Costa N.M.B., Alfenas R.C.G., de Paula S.O., Minim V.P.R, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr*. 23(4): 629– 43, 2010.
- Barreiros A.L.B.S., Daid J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quimica Nova*. 29(1): 113–23, 2006.
- Berend K., Levi M. Is it time to celebrate a century of blood pressure management? *Nephrol. Dial. Transplant*. 0: 1-4, 2008.
- Berry C., Hamilton C.A., Brosnan M.J., Magill F.G., Berg G.A., McMurray J.J., Dominiczak A.F. Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. *Circulation*. 101: 2206–2212, 2000.
- Bortolotto L.A., Malachias M.V.B. Novos medicamentos na hipertensão resistente. *Rev. Bras. Hipertens*. 16(supl. 1): S13-5, 2009.
- Botelho-Ono M.S., Pina H.V., Sousa K.H.F., Nunes F.C., Medeiros I.A., Braga V.A. Acute superoxide scavenging restores depressed baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. *Auton. Neurosci*. 159: 38–44, 2011.

Braga V.A. Depressed Baroreflex Sensitivity in Hypertensive Rats: A Role for Reactive Oxygen Species. *J. Hypertens.* 1: e103, 2012.

Braga V.A., Burmeister M.A., Zhou Y., Sharma R.V., Davisson R.L. Selective ablation of AT1a receptors in rostral ventrolateral medulla (RVLM) prevents chronic angiotensin-II-dependent hypertension in part by reducing oxidant stress in this region. *Hypertension.* 52: e36, 2008.

Britto R.R., Santos R.A.S., Fagundes-Moura C.R., Khosla M.C., Campagnole-Santos M.J. Role of Angiotensin-(1-7) in the Modulation of the Baroreflex in Renovascular Hypertensive Rats. *Hypertension.* 30 (Pt 2): 549-556, 1997.

Brooks V.L. Chronic infusion of angiotensin II resets baroreflex control of heart rate by an arterial pressure-independent mechanism. *Hypertension.* 26(3): 420- 424, 1995.

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

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

Caps M.T., Zierler R.E., Polissar N.L., Bergelin R.O., Beach K.W., Cantwell-Gab K., Casadei A., Davidson R.C., Strandness D.E.Jr. Risk of atrophy in kidneys with atherosclerotic renal artery stenosis. *Kidney Int.* 53: 735-742, 1998.

Ceron C.S., Castro M.M., Rizzi E., Montenegro M.F., Fontana V., Salgado M.C., Gerlach R.F., Tanus-Santos J.E. Spironolactone and hydrochlorothiazide exert antioxidant effects and reduce vascular matrix metalloproteinase-2 activity and expression in a model of renovascular hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 160(1): 77-87, 2010.

Chalmers J. & Pilowsky P. Brainstem and bulbospinal neurotransmitter systems in the control of blood pressure. *Journal of Hypertension.* 9: 675-694, 1991.

Chapleau M.W., Cunningham J.T., Sullivan M.J., Wachtel R.E., Abboud F.M. Structural versus functional modulation of the arterial baroreflex. *Hypertension.* 26: 341–347, 1995.

Chapleau M.W., Hajduczuk G., Abboud F.M. Peripheral and central mechanisms of baroreflex resetting. *Clin. and Experim. Pharmacol. and Physiol.* 15(suppl): 31-43, 1989.

Chen H.I., Chapleau M.W., McDowell T.S., Abboud F.M. Prostaglandins contribute to activation of baroreceptors in rabbits: possible paracrine influence of endothelium. *Circ. Res.* 67: 1394-1404, 1990.

Cheung B.M.Y. Blockade of the rennin angiotensin system. *H.K.M.J.* 8: 185-91, 2002;

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

Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the J.N.C. 7 report. *JAMA*, 289: 2560-2572, 2004.

Chowdhary S., Vaile J.C., Fletcher J., Ross H.F., Coote J.H., Townend J.N. Nitric oxide and cardiac autonomic control in humans. *Hypertension*. 36: 264–269, 2000.

Cianci R., Martina P., Borghesi F., di Donato D., Polidori L., Lai S., Ascoli G., de Francesco I., Zaccaria A., Gigante A., Barbano B. Revascularization versus medical therapy for renal artery stenosis: antihypertensive drugs and renal outcome. *Angiology*. 62(1): 92-99, 2011.

Cifkova R., Erdine S., Fagard R., Farsang C., Heagerty A.M., Kiowski W., Kjeldsen S., Luscher T., Mallion J.M., Mancia G., Poulter N., Rahn K.H., Rodicio J.L., Ruilope L.M., van Zwieten P., Waeber B., Williams B., Zanchetti A. ESH/ESC Hypertension Guidelines Committee (2003). Practice guidelines for primary care physicians: 2003 ESH/ESC hypertension guidelines. *J. Hypertens*. 21: 1779-1786, 2003.

Dahlof B., Pennert K., Hansson L. Reversal of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. A metaanalysis of 109 treatment studies. *Am. J. Hypertens*. 5: 95-110, 1992.

Daly B.M., Hazzeldine J.L., Howe A. Reflex respiratory and peripheral vascular responses to stimulation of the isolated perfused aortic arch chemoreceptors of the dog. *J. Physiol*. 177: 300-22, 1965.

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

Danser A.H. The increase in renin during renin inhibition: does it result in harmful effects by the (pro)renin receptor? *Hypertens. Res*. 33: 4–10, 2010.

Davis J.O. The pathogenesis of chronic renovascular hypertension. *Circ. Res. [S.I.]* 40(5): 439-444, 1977.

Deng X., Welch W.J., Wilcox C.S. Renal vasodilation with L-arginine. *Hypertension*. 26: 256-262, 1995.

Duncan B., Schmidt M.I., Giugliani E.R.J. *Medicina ambulatorial: condutas de atenção primária baseada em evidências*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

Durante W., Sen A.K., Sunahara F.A. Impairment of endothelium dependent relaxation in aorta from spontaneously diabetic rats. *British Journal of Pharmacology*. 94(2): 463-468, 1988.

Evans P., Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *The British journal of nutrition*. 85(Suppl 2): S67–S74, 2001.

Farah V.M.A., Moreira E.D., Pires M.D., Irigoyen M.C.C., Krieger E.M. Comparison of three methods for determination of baroreflex sensitivity in conscious rats. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 32: 361-369, 1999.

- Félétou M. & Vanhoutte P.M. Endothelium-Derived hyperpolarizing factor. Where are we now? *Arteriosclerosis, Thromosis and Vascular Biology*. 26: 1215-1225, 2006.
- Félétou M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *British Journal of Pharmacology*. 159: 545-562, 2009.
- Franchini K.G. & Cowley Jr.A.W. Renal cortical and medullary blood flow responses during water restriction: role of vasopressina. *Am. J. Physiol*. 270: p.R1257-R1264, 1996.
- Friedrich S. & Schmieder R.E. Review of direct renin inhibition by aliskiren. *Journal of the Renin-Angiotensin- Aldosterone System*. 14(3): 193–196, 2013.
- Gavras H. Corcoran Lecture. Angiotenin-converting enzyme inhibition and the heart. *Hypertension*. 23: 813-8, 1994.
- Goldblatt H., Lynch J., Hanzal R.F., Summerville W.W. Studies on experimental hypertension. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J. Exp. Med*. 59: 347-349, 1934.
- Gouvea S.A., Moysés M.R., Bissoli N.S., Pires J.G.P., Cabral A.M., Abreu G.R. Oral administration of L-arginine decreases blood pressure and increases renal excretion of sodium and water in renovascular hypertensive rats *Braz. J. Med. Biol. Res*. 36: 943-949, 2002.
- Gouvea S.A., Bissoli N.S., Moysés M.R., Cicilini M.A., Pires J.G.P., Abreu G.R. Activity of Angiotensin-Converting Enzyme After Treatment with L-Arginine in Renovascular Hypertension. *Clinical and experimental hypertension*. 56: 569-579, 2004.
- Gradman A.H. & Kad R. Renin Inhibition in Hypertension. *J.A.C.C.* 51(5): 519-528, 2008.
- Griendling K.K. & Alexander R.W. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation*. 96(10): 3264-3275, 1997.
- Griendling K.K., Minieri C.A., Ollerenshaw J.D., Alexander R.W. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res*. 74: 1141–1148, 1994.
- Griendling K.K., Sorescu D., Ushio-Fukai M. NAD(P)H Oxidase: Role in Cardiovascular Biology and Disease. *Circ. Res*. 86(5): 494-501, 2000.
- Grizzo L.T. & Cordelline S. Perinatal exposure affects nitric oxide and cyclooxygenase pathways in aorta of weaned rats. *Toxicological Sciences*. 1: 207-214, 2008.
- Guimarães D.D., Carvalho C.C., Braga V.A. Scavenging of NADPH oxidase-derived superoxide anions improves depressed baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 39: 373–378, 2012.
- Hafstad A.D., Nabeebaccus A., Shah A.M. Novel aspects of ROS signalling in heart failure. *Basic research in cardiology*. 108(4): 359, 2013.

Harrison D.G. & Gongora M.C. Oxidative stress and hyperension. *The Medical Clinicals and North America*. 93: 621-635, 2009.

Head G.A. & McCarty R. Vagal and sympathetic components of the heart rate range and gain of the baroreceptor-heart rate reflex in conscious rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* 21: 203-213, 1987.

Hermanowicz J.M., Hermanowicz A., Buczko P., Leszczynska A., Tankiewicz-Kwedlo A., Mogielnicki A., Buczko W. Aliskiren inhibits experimental venous thrombosis in two-kidney one-clip hypertensive rats. *Thromb. Res.* 131(1): e39-44, 2013.

Heymans C. & Bouckaert J.J. Sinus carotidien et réflexes respiratoires. *C. R. Soc. Biol.* 103: 498-500, 1930.

Hingtgen S.D., Tian X., Yang J., Dunlay S.M., Peek A.S., Wu Y., Sharma R.V., Engelhardt J.F., Davissou R.L. Nox2-containing NADPH oxidase and Akt activation play a key role in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Physiological genomics*. 26(3): 180–91, 2006.

Hirooka Y. Role of reactive oxygen species in brainstem in neural mechanisms of hypertension. *Auton. Neurosci.* 142(1–2): 20–24, 2008.

Horiuchi M., Akishita M., Dzau V.J. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension*. 33: 613-21, 1999.

Houston M.C. Nutraceuticals, vitamins, antioxidants, and minerals in the prevention and treatment of hypertension. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 47: 396–449, 2005.

Huang Y., Wongamorntham S., Kasting J., McQuillan D., Owens R.T., Yu L., Noble N.A., Border W. Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. *Kidney Int.* 69: 105–13, 2006.

Ikeda N., Hasegawa T., Hasegawa T., Saito I., Saruta T. Awareness of the Japanese Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension (JSH 2000) and compliance to its recommendations: surveys in 2000 and 2004. *J. Hum. Hypertens.* 20: 263-266, 2006.

Irigoyen M.C. Lacchini S., de Angelis K., Michelini L.C. Fisiopatologia da hipertensão arterial: o que avançamos? *Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo*. 1: 20-45, 2003.

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

Izzo J.L. & Black H.R. *Hypertension Primer: the essentials of high blood pressure*. Third edition, Dallas, Texas. 2003.

Johansson M., Elam M., Rundqvist B., Eisenhofer G., Herlitz H., Lambert G., Friberg P. Increased sympathetic nerve activity in renovascular hypertension. *Circulation*. 99(19): 2537-2542, 1999.

Kappagoda C.T., Linden R.J., Snow H.M. The effect of stretching the superior vena caval-right atrial junction on right atrial receptors in the dog. *J. Physiol.* 227: p875-887, 1972.

Kifor I. & Dzau V.J. Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensin. *Circul. Res.* 60: 422-428, 1987.

Kitiyakara C. & Wilcox C.S. Antioxidants for hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 7: 531–538, 1998.

Klima Ł., Kawecka-Jaszcz K., Stolarz-Skrzypek K., Menne J., Fijorek K., Olszanecka A., Wojciechowska W., Bilo G., Czarnecka D. Structure and function of large arteries in hypertension in relation to oxidative stress markers. *Kardiol Pol.* 71(9): 917-923, 2013.

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

Krebs C., Hamming I., Sadaghiani S., Steinmetz O.M., Meyer-Schwesinger C., Fehr S., Stahl R.A., Garrelds I.M., Danser A.H., van Goor H., Contrepas A., Nguyen G., Wenzel U. Antihypertensive therapy upregulates renin and (pro)renin receptor in the clipped kidney of Goldblatt hypertensive rats. *Kidney Int.* 72: 725–30, 2007.

Krieger E.M. Arterial baroreceptor resetting in hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 15(suppl): 3-7, 1989.

Kurnjek M.L., Mangiarua E., Basso N., Taquini A.C. Further studies on the development of two-kidney, two clip Goldblatt hypertension in 6-hydroxydopaminetreated rats. *Hypertension.* 5(6 Pt 3): 3-7, 1983.

Kurokawa S., Niwano S., Niwano H., Ishikawa S., Kishihara J., Aoyama Y., Kosukegawa T., Masaki Y., Izumi T. Progression of ventricular remodeling and arrhythmia in the primary hyperoxidative state of glutathione-depleted rats. *Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society.* 75(6): 1386–93, 2011.

Lassègue B. & Clempus R.E. Vascular NAD(P)H oxidase: specific features, expression, and regulation. *Am. J. Physiol. Regul. Comp. Physiol.* 285: R277-R297, 2003.

Lassègue B., Martín A.S., Griendling K.K. Oxidases in the Cardiovascular System. *Circ. Res.* 110(10): 1364–1390, 2012.

Laursen J.B., Rajagopalan S., Galis Z., Tarpey M., Freeman B.A., Harrison D.G. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation.* 95(3): 588-593, 1997.

Lerman O.L., Chade A.R., Sica V., Napoli C. Animal models of hypertension: An overview. *J. Lab. Clin. Med.* 146: 160-173, 2005.

Lewandowski J. Renovascular hypertension: is it only the top of the iceberg? *Pol. Merkuriusz Lek.* 15(88): 371-375, 2003.

Lewis E.J., Hunsicker L.G., Bain R.P., Rohde R.D. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N. Engl. J. Med.* 329:1456-62, 1993.

Li Z., Abboud F.M., Chapleau M.W. Aggregating human platelets in carotid sinus of rabbits decrease sensitivity of baroreceptors. *Circ. Res.* 70: 644-650, 1992.

Li Z., Mao H.Z., Abboudm F.M., Chapleau M.W. Oxygen-derived free radicals contribute to baroreceptor dysfunction in atherosclerotic rabbits. *Circ. Res.* 79: 802–811, 1996.

Li Z.C., Yu H.Y., Wang X.X., Zhang M., Wang J.P. Olmesartan medoxomil reverses left ventricle hypertrophy and reduces inflammatory cytokine IL-6 in the renovascular hypertensive rats. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 17(24): 3318-3322, 2013.

Liu G., Hitomi H., Hosomi N., Shibayama Y., Nakano D., Kiyomoto H., Ma H., Yamaji Y., Kohno M., Ichihara A., Itoh H., Nishiyama A. Prorenin induces vascular smooth muscle cell proliferation and hypertrophy via epidermal growth factor receptor-mediated extracellular signal-regulated kinase and Akt activation pathway. *J. Hypertens.* 29: 696–705, 2011.

Lizakowski S., Tylicki L., Rutkowski B. Direct renin inhibition – a promising strategy for renal protection? *Med. Sci. Monit.* 19: 451-457, 2013.

Lockette W., Otsuka Y., Carretero O. The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension. *Hypertension.* 8(6 Pt 2): II61-66, 1986.

Lohmeier T.E. The sympathetic nervous system and long-term blood pressure regulation. *Am. J. Hypertens.* 14: 147S-154S, 2001.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-276, 1951.

Malpas S.C. What sets the long-term level of sympathetic nerve activity: is there a role for arterial baroreceptors? *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286: R1-R12, 2004.

Mancini G.B., Henry G.C., Macaya C., O'Neill B.J., Pucillo A.L., Carere R.G., Wargovich T.J., Mudra H., Lüscher T.F., Klibaner M.I., Haber H.E., Uprichard A.C., Pepine C.J., Pitt B. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing Endothelial Dysfunction) Study. *Circulation.* 94: 258-65, 1996.

Martinez M.L., Castro M.M., Rizzi E., Fernandes K., Demacq C., Bendhack L.M., Gerlach R.F., Tanus-Santos J.E. Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-2 activity and reverses vascular dysfunction in renovascular hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 4:591(1-3): 224-30, 2008.

Martínez-Revelles S., Avendaño M.S., García-Redondo A.B., Alvarez Y., Aguado A., Pérez-Girón J.V., García-Redondo L., Esteban V., Redondo J.M., Alonso M.J., Briones A.M., Salices M. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxidants & Redox Signaling.* 18(1): 51-65, 2013.

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

Michelini L.C. & Bonagamba L.G.H. Angiotensin II as a modulator of baroreceptor reflexes in the brainstem of conscious rats. *Hypertension.* 15(suppl I): 145-150, 1990.

Michelini L.C., Oliveira M., Santos M. Baroreceptor reflex control of heart rate during development of coarctation hypertension. *Hypertension Dallas.* 19(Suppl. II): 159-163, 1992.

Misra H.P. & Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry.* 244: 6049-6055, 1972.

Mohamed A.El-H. & Lasheen N.N. Comparative study on the protective role of vitamin C and L-arginine in experimental renal ischemia reperfusion in adult rats. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 6(3):153-165, 2014.

Monahan K.D., Eskurza I., Seals D.R. Ascorbic acid increases cardiovascular baroreflex sensitivity in healthy older men. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 286: 2113–2117, 2004.

Montera V. & Dos S.P. Benefícios dos Nutrientes Antioxidantes e seus Cofatores no Controle do Estresse Oxidativo e Inflamação na Insuficiência Cardíaca. *Rev. SOCERJ.* 20(1): 20–7, 2007.

Montezano A.C. & Touyz R.M. Molecular mechanisms of hypertension--reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician. *Can. J. Cardiol.* 28(3): 288-295, 2012.

Moysés M.R., Cabral A.M., Marcal D., Vasquez E.C. Sigmoidal curve-fitting of baroreceptor sensitivity in renovascular 2K1C hypertensive rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27(6): 1419-24, 1994.

Musini V.M., Fortin P.M., Bassett K., Wright J.M. Blood pressure lowering efficacy of renin inhibitors for primary hypertension. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD007066, 2008.

Nathan F.M., Singh V.A., Dhanoa A., Palanisamy U.D. Oxidative stress and antioxidant status in primary bone and soft tissue sarcoma. *B.M.C. Cancer.* 11(1): 382–89, 2011.

Navar L.G., Zou L., Von Thun A., Tarnag Wang C., Imig J.D., Mitchell K.D. Unraveling the Mystery of Goldblatt Hypertension. *News Physiol. Sci.* 13:170-176, 1998.

Navar L.G., Harrison-Bernard L.M., Imig J.D., Cervenka L., Mitchell K.D. Renal responses to AT1 receptor blockade. *Am. J. Hypertens.* 13(1 Pt 2): 45S-54S, 2000.

Navar L.G., Harrison-Bernard L.M., Nishiyama A., Kobori H. Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypertension.* 39: 316-322, 2002.

- Nguyen G., Danser A.H. Prorenin and (pro)renin receptor: a review of available data from in vitro studies and experimental models in rodents. *Exp. Physiol.* 93: 557–63, 2008.
- Nightingale A.K., Blackman D.J., Field R., Glover N.J., Pegge N., Mumford C., Schmitt M., Ellis G.R., Morris-Thurgood J.A., Frenneaux M.P. Role of nitric oxide and oxidative stress in baroreceptor dysfunction in patients with chronic heart failure. *Clin. Sci.* 104: 529–535, 2003.
- Nishi E.E., Oliveira-Sales E.B., Bergamaschi C.T., Oliveira T.G., Boim M.A., Campos R.R. Chronic antioxidant treatment improves arterial renovascular hypertension and oxidative stress markers in the kidney in Wistar rats. *Am. J. Hypertens.* 23: 473–480, 2010.
- Oliveira D.R., Santos R.A.S., Santos G.F.P., Khosla M.C., Campagnole-Santos M.J. Changes in the baroreflex control of heart rate produced by central infusion of selective angiotensin antagonists in hypertensive rats. *Hypertension* 27: 1284-1290, 1996.
- Osborn J.W., Jacob F., Guzman P. A neural set point for the long-term control of arterial pressure: beyond the arterial baroreceptor reflex. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288: R846-R855, 2005.
- Ozarlak O., Parizel P.M. Role of mr angiography in the evaluation of renovascular hypertension. *JBR-BTR.* 87(1): 36-42, 2004.
- Palmer R.M.J., Ferrige A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 327: 524-526, 1987.
- Pepine C.J. The impact of nitric oxide in cardiovascular medicine: untapped potential utility. *Am. J. Med.* 122(5 Suppl): S10-5, 2009.
- Pfeffer M.A., Braunwald E., Moyé L.A., Basta L., Brown E.J.Jr., Cuddy T.E., Davis B.R., Geltman E.M., Goldman S., Flaker G.C. et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N. Engl. J. Med.* 327: 669-77, 1992.
- Rajapakse N.W. & Mattson D.L. Role of L-arginine in nitric oxide production in health and hypertension. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 36: 249-255, 2009.
- Rajapakse N.W., Nanayakkara S., Kaye D.M. Pathogenesis and treatment of the cardiorenal syndrome: Implications of L-arginine-nitric oxide pathway impairment. *Pharmacol. Ther.* 16: S0163-7258(15), 2015.
- Rashikh A., Ahmad S.J., Pillai K.K., Kohli K., Najmi A.K.. Aliskiren attenuates myocardial apoptosis and oxidative stress in chronic murine model of cardiomyopathy. *Biomed. Pharmacother.* 66: 138-143, 2012.
- Reckelhoff J.F. & Romero J.C. Role of oxidative stress in angiotensin-induced hypertension. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284(4): R893-912, 2003.

- Reis D.J. Functional neuroanatomy of central vasomotor control centers. In: Hypertension Primer, 2nd edition, American Heart Association, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, pp 80-82, 1999.
- Rimmer J.M. & Gennari F.J. Atherosclerotic renovascular disease and progressive renal failure. *Ann. Intern. Med.* 118: 712-719, 1993.
- Robles N.R., Cerezo I., Hernandez-Gallego R. Renin–Angiotensin System Blocking Drugs. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics.* 19(1): 14-33, 2014.
- Roscioni S.S., Heerspink H.J.L., de Zeeuw D. The effect of RAAS blockade on the progression of diabetic nephropathy. *Nat. Rev. Nephrol.* Nature Publishing Group, 2013.
- Rubanyi G.M. & Vanhoutte P.M. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 250: H815- H821, 1986.
- Salgado M.C., Justo S.V., Joaquim L.F., Fazan Jr.R., Salgado H.C. Role of nitric oxide and prostanoids in attenuation of rapid baroreceptor resetting. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290(3): H1059–H1063, 2006.
- Santuzzi C.H., Tiradentes R.V., Mengal V., Claudio E.R., Mauad H., Gouvea S.A., Abreu G.R.. Combined aliskiren and L-arginine treatment has antihypertensive effects and prevents vascular endothelial dysfunction in a model of renovascular hypertension. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 48: 65-76, 2014.
- Schiffrin E.L., Lipman M.L., Mann J.F.E. Chronic kidney disease: effects on the vascular system. *Circulation.* 116: 85-97, 2007.
- Sheng H., Zhu J., Wu X., Yang D., Zhang J. Angiotensin-converting enzyme inhibitor suppresses activation of calcineurin in renovascular hypertensive rats. *Hypertens. Res.* 30(12): 1247-54, 2007.
- Sigmon D.H. & Beierwaltes W.H. Influence of Nitric Oxide in the Chronic Phase of Two-Kidney, One Clip Renovascular Hypertension. *Hypertension.* 31: 649-656, 1998.
- Soares E.R., Lima W.G., Machado R.P., Carneiro C.M., Silva M.E., Rodrigues M.C., De Castro U.G., Santos R.A.S., Campagnole-Santos M.J., Alzamora A.C. Cardiac and renal effects induced by different exercise workloads in renovascular hypertensive rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 44(6): 573-582, 2011.
- Soares P.P.S., Ushizima M.R., Krieger E.M., Irigoyen M.C.C. A semi-automatic computerized method to measure baroreflex-mediated heart rate responses that reduces interobserver variability. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38: 949-957, 2005.
- Sociedade Brasileira de Cardiologia / Sociedade Brasileira de Hipertensão / Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq. Bras. Cardiol.* Rio de Janeiro, 95(1 supl.1): 1-51, 2010.

- Souza H.C., De Araújo J.E., Martins-Pinge M.C., Cozza I.C., Martins-Dias D.P. Nitric oxide synthesis blockade reduced the baroreflex sensitivity in trained rats. *Auton. Neurosci.* 150(1–2): 38–44, 2009.
- Spieker L.E., Corti R., Binggeli C., Luscher T.F., Noll G. Baroreceptor dysfunction induced by nitric oxide synthase inhibition in humans. *J. Am. Coll. Cardiol.* 36: 213–218, 2000.
- Sreeharan N., Jayakody R.L., Senaratne M.P., Thomson A.B., Kappagoda C.T. Endothelium-dependent relaxation and experimental atherosclerosis in the rabbit aorta. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* 64(11): 1451-1453, 1986.
- Stergiou G.S. & Skeva I.I. Renin-angiotensin system blockade at the level of the angiotensin converting enzyme or the angiotensin type-1 receptor: similarities and differences. *Curr. Top. Med. Chem.* 4(4): 473-81, 2004.
- Strasser R.H., Puig J.G., Farsang C., Croket M., Li J., van Ingen H. A comparison of the tolerability of the direct renin inhibitor aliskiren and lisinopril in patients with severe hypertension. *J. Hum. Hypertens.* 21(10): 780-7, 2007.
- Sun Y. Oxidative stress and cardiac repair/remodeling following infarction. *The American journal of the medical sciences.* 334(3): 197–205, 2007.
- Taylor S.G. & Weston A.H. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends. Pharmacol. Sci.* 9: 272-274, 1988.
- Textor S.C. Ischemic nephropathy: where are we now? *J. Am. Soc. Nephrol.* 15(8): 1974-1982, 2004.
- The CONSENSUS Trial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N. Engl. J. Med.* 316: 1429-35, 1987.
- Thomas G.D. Neural control of the circulation. *Adv. Physiol. Educ.* 35: 28–32, 2011.
- Timmermans P.B., Wong P.C., Chiu A.T., Herblin W.F., Smith R.D. New perspectives in angiotensin system control. *J. Hum. Hypertens.* 7(Suppl 2): S19-31, 1993.
- Tiradentes R.V., Santuzzi C.H., Claudio E.R.G., Mengal V., Silva N.F., Neto H.A.F., Bissoli N.S., Abreu G.R., Gouvea S.A. Combined Aliskiren and L-arginine treatment reverses renovascular hypertension in an animal model. *Hypertens. Res.* 2015
- Touyz R.M. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells: implications in cardiovascular disease. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37(8): 1263– 73, 2004.
- Tran H.A., Sgchrwartzbard A., Weintraub H.S. Role of RAAS inhibition in the prevention of cardiovascular disease. *Curr. Treat. Options. Cardiovasc. Med.* [S.I], 4, 2011.
- Tsyrlin V.A., Galagudza M.M., Kuzmenko N.V., Pliss M.G., Rubanova N.S., Shcherbin Y.I.. Arterial Baroreceptor Reflex Counteracts Long-Term Blood Pressure Increase in the Rat Model of Renovascular Hypertension. *Plos One.* 6 8(6), 2013.

- Vanhouette P.M. Other endothelium-derived vasoactive factors. *Circulation*. 87(suppl V): V9-V17, 1993.
- Vasilev T., Kiproff D., Puchlev A., Todorova L. Plasma renin activity in patients with renovascular hypertension. *Cor. Vasa*. 20(1): 35-43, 1978.
- Verdecchia P., Angeli F., Mazzotta G., Martire P., Garofoli M., Gentile G., Reboldi G. Aliskiren versus ramipril in hypertension. *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.*; 4: 193-200, 2010.
- Virdis A., Duranti E., Tadde S. Oxidative Stress and Vascular Damage in Hypertension : Role of Angiotensin II. *International Journal of Hypertension*. 7, 2011.
- Wang Z., Liu Y., Han Y., Guan W., Kou X., Fu J., Yang D., Ren H., He D., Zhou L., Zeng C. Protective effects of aliskiren on ischemia-reperfusion-induced renal injury in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 15;718(1-3): 160-6, 2013.
- Witko-Sarsat V., Friedlander M., Capeillere-Blandin C., Nguyen-Khoa T., Nguyen A.T., Zingraff J., Jungers P., Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* v. 19(5): 1304-13, 1996.
- Witko-Sarsat V., Nguyen-Khoa T., Jungers P., Drüeke T.B., Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel molecular basis of oxidative stress en uremia. *Nephrol. Dial. Transplant.* 14[suppl 1]: 76-78, 1999.
- Wood J.M., Maibaum J., Rahuel J., Grütter M.G., Cohen N.C., Rasetti V., Rüger H., Göschke R., Stutz S., Fuhrer W., Schilling W., Rigollier P., Yamaguchi Y., Cumin F., Baum H.P., Schnell C.R., Herold P., Mah R., Jensen C., O'Brien E., Stanton A., Bedigian M.P. Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308: 698-705, 2003.
- Xavier-Neto J., Moreira E.D., Krieger E.M. Viscolelastic mechanisms of aórtic baroreceptor ressetting to hypotension and to hypertension. *American Journal of Physiology*. 271: H1407-H1415, 1996.
- Xie P., Chappleau M.W., McDowell T.S., Hajduczoc G., Abboud F.M. Mechanism of decreased baroreceptor activity in chronic hypertensive rabbits: role of endogenous prostanoids. *J. Clin. Invest.* 86: 625-630, 1990.
- Yanagisawa M., Kurihara S., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mitsui Y., Yazaki Y., Goto K., Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular cells. *Nature*. 322: 411-415, 1988.
- Zeller T. Renal artery stenosis: epidemiology, clinical manifestation, and percutaneous endovascular therapy. *J. Interv. Cardiol.* 18(6): 497-506, 2005.
- Zeng J., Zhang Y., Mo J., Su Z., Huang R. Two-kidney, two clip renovascular hypertensive rats can be used as stroke prone rats. *Stroke*. 29: 1708-1714, 1998.
- Zhu J.R., Sun N.L., Yang K., Hu J., Xu G., Hong H., Wang R., Tu Y.M., Ritter S., Keefe D., trial investigators. Efficacy and safety of aliskiren, a direct renin inhibitor, compared with

ramipril in asian patients with mild to moderate hypertension. *Hypertens. Res.* 35: 28-33, 2012.

Zimmerman M.C., Lazartigues E., Sharma R.V., Davisson R.L. Hypertension caused by angiotensin II infusion involves increased superoxide production in the central nervous system. *Circ. Res.* 95(2): 210–216, 2004.