

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MÁRCIO LUÍS LOMBARDI MARTINEZ

**Efeitos da Lercanidipina sobre alterações cardiovasculares
presentes em modelos de Hipertensão Arterial e Diabetes
Mellitus em ratos**

Ribeirão Preto – SP

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MÁRCIO LUÍS LOMBARDI MARTINEZ

Efeitos da Lercanidipina sobre alterações cardiovasculares presentes em modelos de Hipertensão Arterial e Diabetes Mellitus em ratos

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus
dos Santos

Ribeirão Preto – SP

2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Márcio Luís Lombardi Martinez

Efeitos da Lercanidipina sobre alterações cardiovasculares presentes em modelos de Hipertensão Arterial e Diabetes Mellitus em ratos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em: _____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Instituição: FMRP - USP

Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Maria Cristina de Oliveira Salgado

Instituição: FMRP - USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Fernando Morgan de Aguiar Correa

Instituição: FMRP - USP

Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Angela de Castro Resende

Instituição: UERJ

Assinatura: _____

Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol

Instituição: UNESC

Assinatura: _____

Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,

Mas lutamos para que o melhor fosse feito...

Não somos o que deveríamos ser,

Não somos o que iremos ser

Mas, graças a Deus

Não somos o que eramos

Martin Luther King

Dedico aos meus pais, pelo amor, dedicação e ensinamentos que foram muito importantes para minha formação.

Aos meus irmãos, pela força e carinho que sempre demonstraram.

Aos meus amigos, que puderam compartilhar comigo todos os momentos desta caminhada.

Agradecimentos

A Deus, pela força, coragem, inspiração, esperança, oportunidade, amor e pelo renascer de cada dia.

A minha querida família que, com inusitado amor, guiou-me até a conquista desta vitória, minha gratidão pela experiência de amor e dignidade que sempre me proporcionaram.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos, por ter me recebido como seu aluno de mestrado e doutorado. Por ser além de orientador, educador e amigo, contribuindo para a minha formação profissional e pessoal. Agradeço pela paciência, incentivo e atenção.

À Prof.^a Lusiane M. Bendhack que além do trabalho em conjunto, é uma amiga muito querida que me acompanha desde o mestrado.

À Prof.^a Raquel F. Gerlach pela amizade, atenção, compreensão e com orientações preciosas que muito contribuíram para a realização deste estudo.

Aos membros da banca examinadora: Prof.^a Dr.^a Maria Cristina O. Salgado, Prof. Dr. Fernando Morgan A. Correa, Prof.^a Dr.^a Angela de Castro Resende e Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol, pela atenção, disponibilidade e sugestões que muito contribuíram para a finalização deste trabalho.

Aos amigos Ricardo, Eduardo, Fernanda e Patrícia pelo incentivo, apoio, por me escutar e compartilhar comigo dos meus anseios, dúvidas, temores, desânimo e entusiasmo para prosseguir neste caminho.

A Michele e Elen, pela impagável e incansável ajuda na parte laboratorial e pela amizade e carinho, que sempre me dispensaram.

A todos do laboratório, pelo convívio, amizade, incentivo e constantes trocas de experiências que nos proporcionaram crescimento profissional e pessoal: Alisson, Ana

Carolina, Anna Laura, Carlos, Caroline, Evandro, Ingrid, Jefferson, Juliana, Karla, Lisandra, Marcelo, Stefany, Valéria Gomes, Valéria Sandrim, Vania e Vivian.

À Juliana, Miriam e Mayara, técnicas do laboratório da Disciplina de Farmacologia da FCFRP – USP, pelo excelente apoio técnico, atenção e disponibilidade a ajudar sempre que foi necessário.

A todos os pós-graduandos do Departamento de Farmacologia da FMRP – USP pelo companheirismo e convivência agradável.

Aos professores do departamento de Farmacologia da FMRP – USP pela participação em minha formação científica.

À Soninha, Fátima e Ramon, secretários do departamento de Farmacologia da FMRP – USP, pela atenção e generosidade.

Agradeço também pelo apoio financeiro concedido a mim pela FAPESP (Processo: 06/58391-1), CAPES e CNPq, sem o qual a realização deste trabalho não seria possível.

O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem.

Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis!

Fernando Pessoa

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

- Ach** – Acetilcolina
- ACTB** – Beta actina
- ADMA** – Dimetil arginina assimétrica
- Angio II** – Angiotensina II
- ANOVA** – Análise de Variância
- APS** – Persulfato de Amônio
- AVE** – Acidente Vascular Encefálico
- BH₄** – Tetrahydrobiopterina
- °C** – Graus Celsius
- Ca²⁺** – Cálcio
- CaCl₂** – Cloreto de Cálcio
- CCB** – Bloqueadores de Canais de Cálcio
- cDNA** – Ácido desoxirribonucléico complementar – cDNA complementar
- CGRP** – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
- CSA** – Área de secção transversal
- cols.** – Colaboradores
- DDAH** – Dimetil argininase
- DHP** – Diidropiridina
- dL** – Decilitro
- DNA** – Ácido desoxirribonucléico
- DM** – Diabetes Mellitus
- ECM** – Matriz extracelular
- EC₅₀** – 50% do efeito máximo de um agonista
- ED** – Diâmetro externo
- EDTA** – Ácido etileno-diamino-tetracético
- E_{max}** – Efeito máximo
- eNOS** – Sintetase endotelial do óxido nítrico
- EP** – Erro Padrão de Média
- ET-1** – Endotelina-1
- FC** – Freqüência cardíaca

g – Grama

GMPc – Guanosina monofosfato cíclico

HA – Hipertensão arterial

HE – Hematoxilina e eosina

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

ID – Diâmetro interno

i.p. – Intraperitoneal

KDa – Kilodalton

Kg – Kilograma

L – Litro

L – NAME – NG-nitro-L-arginina metil éster

LOX-1 – Lectin-like oxidized receptor-1

MDA – Malondialdeído

M – Molar

ml – Mililitros – 10⁻³ do litro

mm – Milímetro

mg – Miligrama

mmol – Milimol

mM – Milimolar

min – Minuto

mmHg – Milímetros de mercúrio

M/L – Taxa da média em relação do lúmen

MMP – Metaloproteinase

N – Número

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

NEM – N-etilmaleimida

nmol – Nanomol

nNOS – Sintetase neuronal do óxido nítrico

NO – Óxido nítrico

NOS – Sintetase do óxido nítrico

NPS – Nitroprussiato de sódio

O₂⁻ – Ânion superóxido

OH[•] – Radical Hidroxil

ONOO⁻ – Peroxinitrito

OMS – Organização Mundial da Saúde

ox-LDL – Lipoproteína oxidada de baixa densidade

PA – Pressão arterial

PAC – Pressão arterial de cauda

PAS – Pressão arterial sistólica

pb – Pares de bases

pD2 – Logaritmo negativo da EC₅₀

pH – Potencial hidrogeniônico

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PMSF – Fenilmetanosulfonilfluoreto

RNA – Ácido ribonucléico

RNAase – Ribonuclease

RNA_m – Ácido ribonucélico mensageiro - RNA mensageiro

R-COO[•] – Radical peroxil de ácido graxo

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RPM – Rotações por minuto

s – Segundo

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SHR – Rato espontaneamente hipertenso

SOD – Superóxido dismutase

Std – Padrão interno

STZ – Estreptozotocina

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TBARS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TIMP – Inibidor tecidual de metaloproteínaes

Tris – HCl – Tris ácido clorídrico

VSM – Músculo vascular liso

VSMC – Célula muscular lisa

μL – Microlitro

μm – Micrômetro

μmol – Micromol

% – Porcentagem

α – Alfa

β – Beta

δ – Gama

2R-1C – Ratos hipertensos renais 2 rins-1 clipe

> – Maior

< – Menor

Sumário

RESUMO	15
ABSTRACT	17
1 - INTRODUÇÃO	19
1.1 - Modelos animais de Hipertensão Arterial e Diabetes Mellitus	21
1.2 - Disfunção vascular na Hipertensão Arterial e Diabetes Mellitus	22
1.3 - Estresse oxidativo e o quadro de disfunção vascular	23
1.4 - Metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) e o processo de remodelamento vascular	29
1.5 - Relevância do estresse oxidativo como um importante fator que modula a atividade das Metaloproteinases	34
1.6 - Drogas antihipertensivas	35
1.7 - Lercanidipina: um bloqueador de canais de Cálcio usado no tratamento da Hipertensão, com possíveis efeitos sobre o estresse oxidativo e sobre a MMP-2	37
HIPÓTESE	41
2 - OBJETIVOS	42
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 - Materiais	45
3.1.1 - Soluções e tampões utilizados nos protocolos experimentais	45
3.1.2 - Drogas utilizadas nos protocolos experimentais	46

3.1.3 - Equipamentos utilizados nos protocolos experimentais	46
3.2 - Métodos	47
3.2.1 - Avaliação do peso corporal, pressão arterial de cauda (PAC) e Glicemia	47
3.2.2 - Reatividade vascular	48
3.2.3 - Análise da estrutura vascular da aorta	48
3.2.4 - Zimografia para MMP-2 na aorta	49
3.2.5 - Real-Time PCR	50
3.2.5.1 - Reação de Real Time RT-PCR	50
3.2.5.2 - Obtenção do RNAm total da aorta	50
3.2.5.3 - Preparação do RNA e síntese do cDNA	50
3.2.6 - Determinação de TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico)	51
ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
4 - RESULTADOS	53
5 - DISCUSSÃO	77
6 - CONCLUSÕES	84
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXOS	99

Lista de Figuras, Gráficos e Tabelas

Figuras:

Figura 1. Produção de espécies reativas de oxigênio	28
Figura 2. Ativação de metaloproteinases	31
Figura 3. Estrutura química da lercanidipina	38
Figura 4. Efeito da lercanidipina nas modificações estruturais induzidas nas aortas dos ratos hipertensos 2R-1C	57
Figura 5. Gel de zimograma representativo das amostras dos ratos hipertensos	59
Figura 6. Falta de modificações estruturais nas aortas dos ratos diabéticos.....	69
Figura 7. Gel de zimograma representativo das amostras dos ratos diabéticos	71

Gráficos:

Protocolo 1: Hipertensão 2R-1C

Gráfico 1. Peso corporal e pressão arterial sistólica	53
Gráfico 2. Vasodilatação dependente do endotélio induzida pela Ach e relaxamento independente do endotélio induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS)	55
Gráfico 3. Efeito da lercanidipina nas modificações estruturas induzidas nas aortas dos ratos hipertensos 2R-1C	58
Gráfico 4. Efeito da lercanidipina na atividade da MMP-2 na aorta.....	60
Gráfico 5. Efeito da lercanidipina na expressão da MMP-2 e TIMP-2 na aorta	61

Gráfico 6. Concentração das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico expressas em termos de malondialdeído (MDA; nmol/ml) no plasma 63

Protocolo 2: Diabetes Mellitus

Gráfico 7. Peso corporal e pressão arterial sistólica 65

Gráfico 8. Vasodilatação dependente do endotélio induzida pela Ach e relaxamento independente do endotélio induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS) 67

Gráfico 9. Efeito da lercanidipina nas modificações estruturas induzidas nas aortas dos ratos diabéticos 70

Gráfico 10. Efeito da lercanidipina na atividade da MMP-2 na aorta 72

Gráfico 11. Efeito da lercanidipina na expressão da MMP-2 e TIMP-2 na aorta 73

Gráfico 12. Concentração das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico expressas em termos de malondialdeído (MDA; nmol/ml) no plasma 75

Tabelas:

Tabela 1. Valores de pD₂ e E_{max} para a vasodilatação dependente do endotélio induzida pela Ach, e relaxamento independente do endotélio induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS) dos animais do Protocolo 1 64

Tabela 2. Valores de pD₂ e E_{max} para a vasodilatação dependente do endotélio induzida pela Ach, e relaxamento independente do endotélio induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS) dos animais do Protocolo 2 76

Resumo

Hipertensão e Diabetes são dois dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da aterosclerose e doença da artéria coronária. Tais enfermidades aumentam o risco cardiovascular a índices muito elevados, e são acompanhadas por uma alteração fisiopatológica comum, que é o remodelamento vascular acelerado, caracterizado pelo desarranjo na regulação da atividade das metaloproteinases (MMPs) associado ao aumento do estresse oxidativo. Um dos modelos mais semelhantes ao quadro de hipertensão renovascular em humanos é o modelo de hipertensão renovascular unilateral (2R-1C), que é produzido pelo clampeamento de uma das artérias renais, e manutenção do rim contra lateral intacto. Por outro lado, a Aloxana tem sido extensivamente utilizada como modelo de indução química dos tipos de diabetes não-insulino dependentes. O remodelamento vascular acelerado presente na hipertensão bem como na diabetes está associado a ativação de um grupo de endopeptidases zinco-dependentes denominadas metaloproteinases, que têm sido implicadas no remodelamento vascular subjacente à aterosclerose. As MMPs têm sido reconhecidas como um grupo de enzimas envolvidas na degradação de componentes da matriz extracelular em processo fisiológicos, bem como patológicos, e uma aumentada expressão e atividade de MMP pode resultar num remodelamento cardiovascular exacerbado e aterosclerose da artéria coronária. Lercanidipina é um bloqueador de canal de cálcio (CCB) da classe das diidropiridinas usada no tratamento da hipertensão. Além de reduzir a pressão arterial, há evidências de que a lercanidipina tenha ações pleiotrópicas que possam significativamente contribuir para os benefícios que ela produz na terapia da hipertensão. É possível que a lercanidipina e outros CCB com efeitos antioxidantes reduzam a atividade/ expressão das MMPs na hipertensão e diabetes. Baseado nestas informações, os objetivos do nosso trabalho foram primeiramente, verificar possíveis aumentos de estresse oxidativo e de MMP-2 (atividade e expressão gênica) nos vasos de ratos nos modelos de hipertensão arterial renovascular e diabetes mellitus citados. Objetivamos ainda estudar os efeitos do tratamento com lercanidipina sobre as alterações mencionadas anteriormente. E como terceiro objetivo, buscamos estudar os efeitos do tratamento com lercanidipina sobre a

disfunção vascular presente nos dois modelos experimentais de hipertensão arterial e de diabetes mellitus. Os resultados deste estudo mostraram que o tratamento com lercanidipina reduziu a pressão arterial sistólica nos ratos hipertensos e diabéticos. Além disso os animais tratados com lercanidipina apresentaram uma redução significativa nos níveis plasmáticos de malondialdeído e na atividade da MMP-2. Os animais diabéticos tratados com lercanidipina, apresentaram ainda um aumento da expressão de RNAm de TIMP-2. Em conclusão, nossos resultados sugerem que a lercanidipina produziu efeitos antihipertensivos e reverteu a disfunção endotelial associada com a hipertensão 2R-1C e diabetes mellitus induzida pela aloxana, provavelmente através de mecanismos envolvendo efeitos antioxidantes, o que levaria a uma menor ativação da MMP-2. Nossos achados sugerem portanto que as drogas antihipertensivas com atividade antioxidante podem inibir a ativação da MMP-2 e colaborar na prevenção a aterosclerose.

Palavras chave: Bloqueadores de Canais de Cálcio, Hipertensão, Diabetes, Lercanidipina, Metaloproteinases e Estresse Oxidativo.

Abstract

Hypertension and Diabetes are two of the main factors of risk for the development of atherosclerosis and disease of the coronary artery. Such diseases increase the cardiovascular risk to the high elevated levels, and are followed by a common physiopatologic alteration, that is the accelerated vascular remodeling, characterized of the disarrangement in the regulation of the activity metalloproteinases (MMPs) associated to the increased of oxidative stress. One of the models most similar to the renovascular hypertension in humans, it is the model of unilateral renovascular hypertension (2R-1C), that is produced by the clamping of one of the renal arteries, and maintenance of intact contralateral kidney. Moreover, Alloxan has been exclusively used as a model of chemical induction of the diabetes not-insulin dependent. The vascular accelerated remodeling present in the hypertension as well in the diabetes is associated with a group of endopeptidases zinc-dependents recognized as metalloproteinases), that have been applied in a vascular remodeling associated to the atherosclerosis. MMPs have been recognized as a group of enzymes involved on the degradation of the components of extracellular matrix in physiologic process, as in the pathologic events, and the increased expression and the activity of MMP can result in an accelerated cardiovascular remodeling and atherosclerosis in the coronary artery. Lercanidipine is a calcium channel blocker (CCB) of the dihydropiridines used for the treatment of hypertension. Beyond reducing the arterial pressure, there is evidences that lercanidipine has pleiotropic actions can significantly contribute for the benefits that its produces in the therapy of hypertension. It is possible that lercanidipine and another CCBs with antioxidant effects reduce the activity/ expression of the MMPs in the hypertension and diabetes. Based in these information, the objectives of our work had been first, to verify possible increases of oxidative stress and MMP-2 (activity and expression) in the vases of rats in the models of cited renovascular arterial hypertension and diabetes mellitus. We still objective to study the effects of the treatment with lercanidipine on the alterations previously mentioned. And as third objective, we search to study the effect of the treatment with lercanidipine on the vascular dysfunction in the two experimental models of arterial hypertension and

diabetes mellitus. The results of this study had shown that the treatment with lercanidipine reduced the systolic arterial pressure in hypertensive and diabetic rats. Moreover, the animals treated with lercanidipine presented a significant reduction in the malondialdehyde levels and in the activity of MMP-2. The treated diabetic animals with lercanidipine, had still presented an increase of the expression of RNAm of TIMP-2. In conclusion, our result suggest that lercanidipine produced antihypertensive effects and reverted the endothelial dysfunction associated with the induced hypertension 2R-1C and diabetes mellitus, probably through mechanisms involving antioxidant effects, what it would lead to a lesser activation of MMP-2. Therefore, our findings suggest that the antihypertensive drugs with antioxidant activity can inhibit the activation of MMP-2 and collaborate in the prevention of atherosclerosis.

Keywords: Calcium channel blockers, Hypertension, Diabetes, Lercanidipine, Matrix metalloproteinases and oxidative stress.

1. Introdução

A hipertensão arterial (HA) é uma doença cardiovascular comum, afetando cerca de 50 milhões de pessoas nos EUA, e um número proporcional a este no Brasil (V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial - SBC/SBH/SBN, 2006). A pressão arterial elevada provoca alterações nos vasos sanguíneos e hipertrofia do ventrículo esquerdo, bem como anormalidades no músculo liso vascular e endotélio associadas ao comprometimento da função destas estruturas (Verdecchia e cols., 1998). Entre estas disfunções, podemos considerar o aumento da vasoconstrição e redução da vasodilatação, tanto dependente como independente do endotélio. A perda do equilíbrio entre o relaxamento e a contração é freqüentemente citada como uma das causas do aumento do tônus vascular na hipertensão (Cohuet e Struijker-Boudier, 2006).

A hipertensão é classificada de forma convencional como pressão arterial $\geq 140/90$ mmHg; o que serve para caracterizar um grupo de pacientes com risco de doença cardiovascular relacionada à hipertensão, alto o suficiente para merecer atenção médica. Entretanto, do ponto de vista da promoção de saúde, deve-se observar que o risco de doença cardiovascular fatal e não-fatal nos adultos é mais baixo com pressões sistólica inferior a 120 mmHg e diastólica inferior a 80 mmHg. Esses riscos aumentam progressivamente com níveis mais elevados das pressões arterial sistólica e diastólica (Izzo e Black, 1998; V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial - SBC/SBH/SBN, 2006).

Embora muitas das pesquisas clínicas classifiquem a gravidade da hipertensão pela pressão diastólica, as elevações progressivas da pressão sistólica também são prognósticas de eventos cardiovasculares adversos, sendo que para cada nível fixo de pressão diastólica, os riscos são maiores com níveis elevados da pressão sistólica (The JNC 7 Report, 2003).

A Hipertensão arterial pode ser a causa ou também o resultado de complicações cardiovasculares, como infarto e acidente vascular encefálico (AVE), bem como de outras complicações, tais como insuficiência renal, entre outros (Izzo e Black, 1998). Além disso, é importante considerar também que, o risco de doença cardiovascular aumenta bastante pelo tabagismo simultâneo, pelo hábito de vida

sedentária, abuso de álcool, diabetes, obesidade, ingestão excessiva de sal bem como pela elevação das lipoproteínas plasmáticas. A coexistência da hipertensão arterial com estes fatores de risco aumenta a morbidade e a mortalidade cardiovascular a um grau excessivamente cumulativo (V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial - SBC/SBH/SBN, 2006).

A Diabetes Mellitus (DM), é uma desordem metabólica crônica, complexa e heterogênea, causada por uma deficiência na secreção ou na ação da insulina (Wolff, 1993), sendo considerada um importante fator de risco para o aparecimento da doença cardiovascular (Laakso e Lehto, 1998; Assman e cols., 1999; Ferreira, 2001). A diabetes é uma doença grave que atinge cerca de 171 milhões de pessoas no mundo (OMS; 2006). No Brasil, um estudo feito por Torquato e colaboradores em 2003 (Ribeirão Preto), mostrou que há cerca de 10 milhões de diabéticos, e cerca de 90 % dos casos de DM consistem no tipo 2 (Torquato e cols., 2003). Em particular, as complicações advindas de doenças cardiovasculares respondem por 80 % das mortes em pacientes com DM tipo 2 (Torquato e cols., 2003; Ruiz, 2001).

Tem sido descrita nos últimos anos uma importante correlação entre a evolução das complicações da Diabetes mellitus e as cifras de pressão arterial (UKPDS, 1998).

Desta forma, os pacientes com hipertensão arterial primária apresentam uma maior probabilidade de desenvolvimento de diabetes, assim como pacientes hipertensos e diabéticos apresentam maior índice de mortalidade e desenvolvimento de lesões órgão-alvo em comparação aos portadores de somente uma das afecções (UKPDS, 1998; Assmann e cols., 1999; Gress e cols., 2000).

Estudos *in vivo* realizados em humanos mostram que a existência destas duas condições acelera o desenvolvimento de neuropatia e retinopatia diabética e, aumenta a incidência de eventos cardiovasculares (UKPDS, 1998; Gress e cols., 2000).

Para entender os mecanismos envolvidos nestas disfunções, muitos estudos utilizam modelos de hipertensão (Doggrell & Brown, 1998; Hiyoshi e cols., 2005; Walter e cols., 2006) e diabetes (Rerup, 1970; Weiss, 1982; Lima e cols., 2001, Lerco e cols., 2003) desenvolvidos em ratos, que exibem características em comum com a hipertensão e diabetes em humanos.

1.1. Modelos animais de Hipertensão Arterial e Diabetes Mellitus

O modelo de hipertensão renal pela constrição das artérias renais (2R-1C) foi descrito pela primeira vez por Goldblatt e cols. (1934) e tem semelhanças com Hipertensão Arterial, especialmente com o quadro de hipertensão renovascular. Ele é produzido pelo clampeamento de uma das artérias renais, e pela manutenção do rim contra lateral intacto. A redução da perfusão arterial para um dos rins clampeado leva a um aumento da produção e atividade da renina plasmática, que por sua vez, aumenta as concentrações de angiotensina II circulante (Angio II), o que resulta em vasoconstrição acentuada, retenção de sódio e água mediados pela aldosterona, dentre outros fatores, com conseqüente aumento da pressão arterial (PA). Esta é considerada a primeira fase deste modelo de hipertensão renovascular (geralmente ocorre entre a 1^a e a 5^a semana depois de colocado o clipe renal). A segunda fase deste modelo (5^a a 8^a semanas) é representada por elevadas concentrações de Angio II e diminuição progressiva de renina plasmática, mantendo ainda a PA elevada. E na terceira fase (considerada fase crônica, > 9^a semana) os animais apresentam redução tanto das concentrações de renina como também da Angio II circulante, embora a pressão continue elevada, o que desencadeia um progressivo dano cardiovascular e renal (Martinez-Maldonado, 1991; Hiyoshi e cols., 2005).

Dentre os modelos de indução química da diabetes, o antibiótico Estreptozotocina (STZ) e a Aloxana são os mais utilizados (Rerup, 1970; Weiss, 1982; Lima e cols., 2001, Lerco e cols., 2003). Essas drogas causam insuficiência insulínica primária do pâncreas, provocando uma resposta trifásica nos níveis glicêmicos durante as primeiras horas da administração, seguida do estabelecimento de diabetes permanente nas 24 horas subseqüentes. Esses métodos químicos, apesar de terem um elevado índice de mortalidade relativa, são de fácil execução e permitem a utilização de um grande número de animais, destruindo a parte endócrina do pâncreas, com preservação de sua função exócrina, tendo ainda, a vantagem de estarem padronizados em nosso laboratório experimental (Lerco e cols., 2003).

A Aloxana é a droga de escolha para este estudo, uma vez que tem custo muito mais baixo que a estreptozotocina, além de ter seu uso amplamente difundido na produção de diabetes experimental (Lima e cols., 2001; Lerco e cols., 2003).

A aloxana é uma substância que possui, comprovadamente, ação seletiva e destrutiva sobre as células β (beta) pancreáticas e que induz ao Diabetes mellitus, em animais experimentais (Lima e cols., 2001). Alguns estudos demonstraram que a formação de radicais superóxido e hidroxila, induzidos por aloxana, é responsável pela citotoxicidade desse composto (Lima e cols., 2001). Outros experimentos sugerem que a inibição da secreção de insulina por aloxana é causada por sua interferência com as proteínas citoplasmáticas que contêm sulfidril e dissulfide (Rerup, 1970; Lerco e cols., 2003). Estudo utilizando o método imunistoquímico, observou que o pâncreas dos animais com Diabetes mellitus, induzido por aloxana, apresentaram redução de 70% da área da ilhota ocupada pelas células beta, chegando até a ausência delas, enquanto houve aumento da área ocupada por células δ (gama) e não houve alteração no conteúdo de células produtoras de glucagon nas ilhotas. Outro estudo concluiu que, aparentemente, a aloxana causa não somente a destruição das células β , como, também, de toda a ilhota, com aumento das células α (alfa) e δ por hiperplasia (Lima e cols., 2001).

Dessa forma, os mecanismos pelos quais a aloxana induz diabetes ainda não estão completamente compreendidos, necessitando estudos complementares para esse fim.

1.2. Disfunção Vascular na Hipertensão Arterial e Diabetes Mellitus

O endotélio está envolvido na modulação vascular através da liberação de vasodilatadores, principalmente o óxido nítrico (NO) e agentes vasoconstritores. Sob condições normais o endotélio induz a vasodilatação mediada por NO, e opõe-se à adesão de células e trombose (Savoia e Schiffrin, 2006).

A disfunção endotelial pode ser definida como uma redução na vasodilatação dependente do endotélio, causada por uma redução na biodisponibilidade de NO na parede do vaso (Cai e Harrison, 2000).

A disfunção endotelial está portanto associada a condições patológicas severas, incluindo hipertensão e diabetes, e é caracterizada pela alteração do tônus vascular, inflamação e trombose na parede vascular (Savoia e Schiffrin, 2006).

Na diabetes por exemplo, um processo aterosclerótico pode-se desenvolver, caracterizado pela deposição de placas de gordura na parede vascular. À medida que se tornam maiores, a passagem no interior dos vasos estreita-se ou

fica bloqueada, o que pode levar ao aumento da pressão arterial ou até mesmo bloquear a passagem de sangue até o coração, resultando assim no infarto do miocárdio. Além disso, a aterosclerose associada à hipertensão facilita a formação de trombos no sangue, que podem levar a algumas complicações graves, tais como infarto do miocárdio, trombose e AVE (Assman e cols., 1999).

Enfim, a Hipertensão arterial e Diabetes são acompanhadas por um quadro de disfunção vascular, definida como uma redução na vasodilatação dependente do endotélio, causada por uma redução na biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (Cai e Harrison, 2000).

Em quadros patológicos, a redução da biodisponibilidade do NO pode estar associada a uma alteração fisiopatológica comum, que é o remodelamento vascular acelerado, que se traduz por um aumento na deposição de proteínas da matriz extracelular, tais como colágeno e elastina, onde há fundamental participação das Metaloproteinases (MMPs) (Galis e cols., 2002; Faxon e cols., 2004; Touyz e Schiffrin, 2004). Estes processos podem ser acompanhados ainda por outros diversos mecanismos que colaboram para o desenvolvimento do processo aterogênico. Entre eles estão: ativação de mediadores inflamatórios, estresse oxidativo, crescimento e proliferação celular bem como apoptose celular, o que em conjunto evidenciam o quadro de disfunção vascular (Faxon e cols., 2004).

1.3. Estresse oxidativo e o quadro de disfunção vascular

O estresse oxidativo pode ser definido como a oxidação de macromoléculas biológicas como lipídios, proteínas, DNA, carboidratos, e ocorre quando a concentração de substâncias oxidantes supera a concentração de antioxidantes (Cai e Harrison, 2000).

Tais substâncias oxidantes são denominadas espécies reativas de oxigênio (ROS), e entre os mais importantes estão o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil (OH^\cdot) e peroxinitrito ($OONO^\cdot$).

Em condições fisiológicas, as espécies reativas de oxigênio (ROS) atuam como moléculas de sinalização regulando o crescimento do músculo liso vascular (VSM), e como fatores de transcrição e expressão de gene. Nestas condições, a produção de radicas livres de oxigênio e peróxidos é balanceada por um eficiente sistema de antioxidantes, que são moléculas capazes de remover ROS, prevenindo,

portanto danos ao tecido. Antioxidantes enzimáticos, tais como a superóxido dismutase (SOD) e catalase têm um importante papel na conversão de ROS a oxigênio e água. Vários outros antioxidantes não-enzimáticos são também importantes em deslocar os radicais livres (vitaminas C, vitamina E e glutathione) (Cai e Harrison, 2000), balanceando desta forma a quantidade de ROS.

Sob condições patológicas, ROS são produzidos em quantidade excessiva. Este desvio no balanço entre substâncias oxidantes e antioxidantes, chamado estresse oxidativo pode ter importantes efeitos na função celular e tecidual, levando à disfunção endotelial, aumento da contratilidade, crescimento do músculo liso vascular, apoptose, migração de monócitos, peroxidação lipídica, inflamação e aumentada deposição da matriz extracelular (Uemura e cols., 2001; Kadoglou e cols., 2005), contribuindo portanto, para o desenvolvimento de diversos estados patológicos tais como hipertensão, aterosclerose, diabetes e sepse (Cai e Harrison, 2000).

A produção celular de espécies reativas de oxigênio pode levar à produção de várias outras espécies reativas, por uma reação de radicais em cadeia. Por exemplo, a reação entre radicais livres e ácidos graxos poliinsaturados na membrana celular, pode resultar em um radical peroxil de ácido graxo (R-COO), que pode atacar cadeias de ácidos graxos adjacentes e iniciar uma produção de outros radicais lipídicos (Cai e Harrison, 2000). Os produtos finais da peroxidação lipídica incluem aldeídos insaturados (como o malondialdeído) e outros metabólitos, que possuem propriedades citotóxicas e mutagênicas (Cai e Harrison, 2000).

Touyz e Schiffrin (2004) mostraram que elevadas concentrações plasmáticas de malondialdeído (MDA), um marcador de peroxidação lipídica, têm sido demonstradas em pacientes com hipertensão, enquanto reduzidas concentrações plasmáticas de superóxido dismutase (SOD) têm sido mostradas em pacientes hipertensos.

Existe portanto, um conjunto de evidências sugerindo que o estresse oxidativo esteja envolvido na patogenia de várias doenças cardiovasculares, incluindo hipercolesterolemia, aterosclerose, diabetes, hipertensão e falência cardíaca, uma vez que a ativação das fontes de produção de ROS, leva a produção em excesso de ROS nestas circunstâncias, resultando assim em disfunção endotelial, com prejudicada capacidade do endotélio vascular em regular a

concentração de mediadores à alteração da resposta homeostásica do organismo a estas doenças (Cai e Harrison, 2000).

Nas células de mamíferos, as potenciais fontes enzimáticas produtoras de espécies reativas de oxigênio incluem a respiração mitocondrial, o ácido aracdônico via enzimas lipoxigenase e ciclooxygenase, o citocromo P450, a xantina oxidase, a NADPH oxidase, a NO sintase, as peroxidases e proteínas heme (Cai e Harrison, 2000). Apesar de muitas dessas fontes serem potencialmente capazes de produzir espécies derivadas de oxigênio que inativem o NO, três dessas fontes têm sido mais estudadas no que se refere ao sistema cardiovascular. Essas incluem a xantina oxidase, NADPH oxidase e NO sintase (Cai e Harrison, 2000).

A xantina oxidase é uma enzima (que contém molibdênio) capaz de catalisar a oxidação de hipoxantina em xantina por um processo do metabolismo de purinas. Esta enzima utiliza oxigênio molecular para a formação de O_2^- e H_2O_2 . Os primeiros estudos mostrando que o O_2^- derivado da xantina oxidase pode alterar a biodisponibilidade do NO, foram realizados com ratos espontaneamente hipertensos (SHRs). Nesses animais, o uso de oxipurinol, um inibidor da xantina oxidase, reduziu a pressão arterial, sugerindo que a xantina oxidase possui um papel nesse processo (Cai e Harrison, 2000).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é outro radical produzido pela xantina oxidase, e tem mostrado efeitos vasoconstritores em células musculares lisas (VSMCs) e em vasos de resistência (Cai e Harrison, 2000).

A xantina oxidase pode existir numa forma deficiente de molibdênio. Nesse estado, a enzima não está apta a usar a xantina como substrato e não é inibida pelo oxipurinol, mas pode usar NADH como um doador de elétrons para formar O_2^- . Usando técnicas clássicas de homogenatos de tecidos, uma fácil conclusão é que tal forma da xantina oxidase é uma NADH oxidase (Cai e Harrison, 2000).

Alguns pesquisadores têm tentado definir as fontes de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), utilizando homogenatos tanto de células vasculares quanto de tecidos. Em estudos com homogenatos de células endoteliais e musculares lisas vasculares, o substrato predominante capaz de direcionar a formação de O_2^- , tem sido o NADH e, em menor proporção, o NADPH (Cai e Harrison, 2000).

De acordo com as evidências anteriores, a NADPH oxidase é considerada a principal fonte de O_2^- na hipertensão, bem como em outras doenças cardiovasculares, e sua atividade pode ser regulada por citocinas, hormônios, e forças mecânicas que estão envolvidas na patogenia de doenças vasculares (Cai e Harrison, 2000). Além disso, a estimulação de células musculares lisas com angiotensina II, trombina e fator de crescimento derivado das plaquetas também aumenta a atividade da NADPH oxidase, e por conseqüência a formação de ROS (Cai e Harrison, 2000). Esta enzima é expressa nas células musculares lisas (VSMCs) e, é um complexo de subunidades consistindo de componentes ligados à membrana (p22^{phox}, Nox-1/Nox-4, gp91^{phox}) e componentes citósolicos (p47^{phox}, Rac-1) (Grote e cols., 2003). Diversos estudos demonstram um importante papel para a subunidade p47^{phox} na produção de ROS em VSMCs (Grote e cols., 2003).

Algumas evidências anteriores relatam que a produção de O_2^- , tanto em condições basais, quanto quando estimulada pela NADPH, está significativamente elevada em ratos com falência cardíaca secundária ao infarto crônico do miocárdio (Bauersachs e cols., 1999). Zalba e cols., 2000 também demonstraram um aumento da produção de O_2^- derivado da NADPH oxidase em ratos espontaneamente hipertensos (SHRs).

Uma terceira fonte de produção de espécies reativas derivadas de oxigênio, é a sintetase endotelial do óxido nítrico (eNOS). A eNOS é uma enzima que catalisa o transporte de elétrons mediada por flavina de um doador de elétrons, o NADPH, para um grupo prostético heme. A eNOS necessita tanto de L-arginina, como substrato para a formação de NO, quanto do cofator tetrahydrobiopterina (BH₄). Na ausência de L-arginina ou tetrahydrobiopterina, a eNOS pode produzir O_2^- e H₂O₂. Esse fenômeno tem sido conhecido como desacoplamento da eNOS. Nos últimos anos, algumas evidências mostraram que a eNOS pode se tornar desacoplada *in vivo* em uma variedade de condições fisiopatológicas. Por exemplo, a tolerância a nitrato tem sido associada com aumentos na produção vascular de O_2^- via desacoplamento da eNOS (Cai e Harrison, 2000). Um prejudicado vasorelaxamento dependente do endotélio tem sido observado em ratos resistentes à insulina e tem sido normalizado por suplementação com BH₄ (Cai e Harrison, 2000). Além disso, a infusão intra-arterial de tetrahydrobiopterina tem mostrado melhorar a vasodilatação endotélio-dependente em fumantes crônicos, sugerindo que em humanos, a depleção de tetrahydrobiopterina pode direcionar a eNOS para formação de O_2^- .

Os mecanismos na qual a eNOS se torna desacoplada *in vivo* ainda não são bem entendidos, mas existem trabalhos como o de Laursen e cols. (2001) sugerindo que o peroxinitrito, o produto da reação do NO e O_2^- , pode oxidar a tetrahidrobiopterina levando ao desacoplamento da eNOS *in vivo*.

O desacoplamento da eNOS no endotélio pode gerar um aumento do estresse oxidativo por pelo menos três mecanismos. Primeiro, a produção enzimática de NO pode estar diminuída, permitindo que radicais que normalmente reagem com o NO ataquem outros alvos celulares. Segundo, a enzima começa a produzir O_2^- , contribuindo para o estresse oxidativo. E finalmente, é possível que a eNOS possa se tornar parcialmente desacoplada, produzindo simultaneamente tanto O_2^- quanto NO. Sob essas circunstâncias, a eNOS pode se tornar uma geradora de peroxinitrito, levando a dramáticos aumentos do estresse oxidativo.

A **Figura 1** mostra um esquema das vias de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem reduzir a biodisponibilidade de NO e predispor a riscos cardiovasculares.

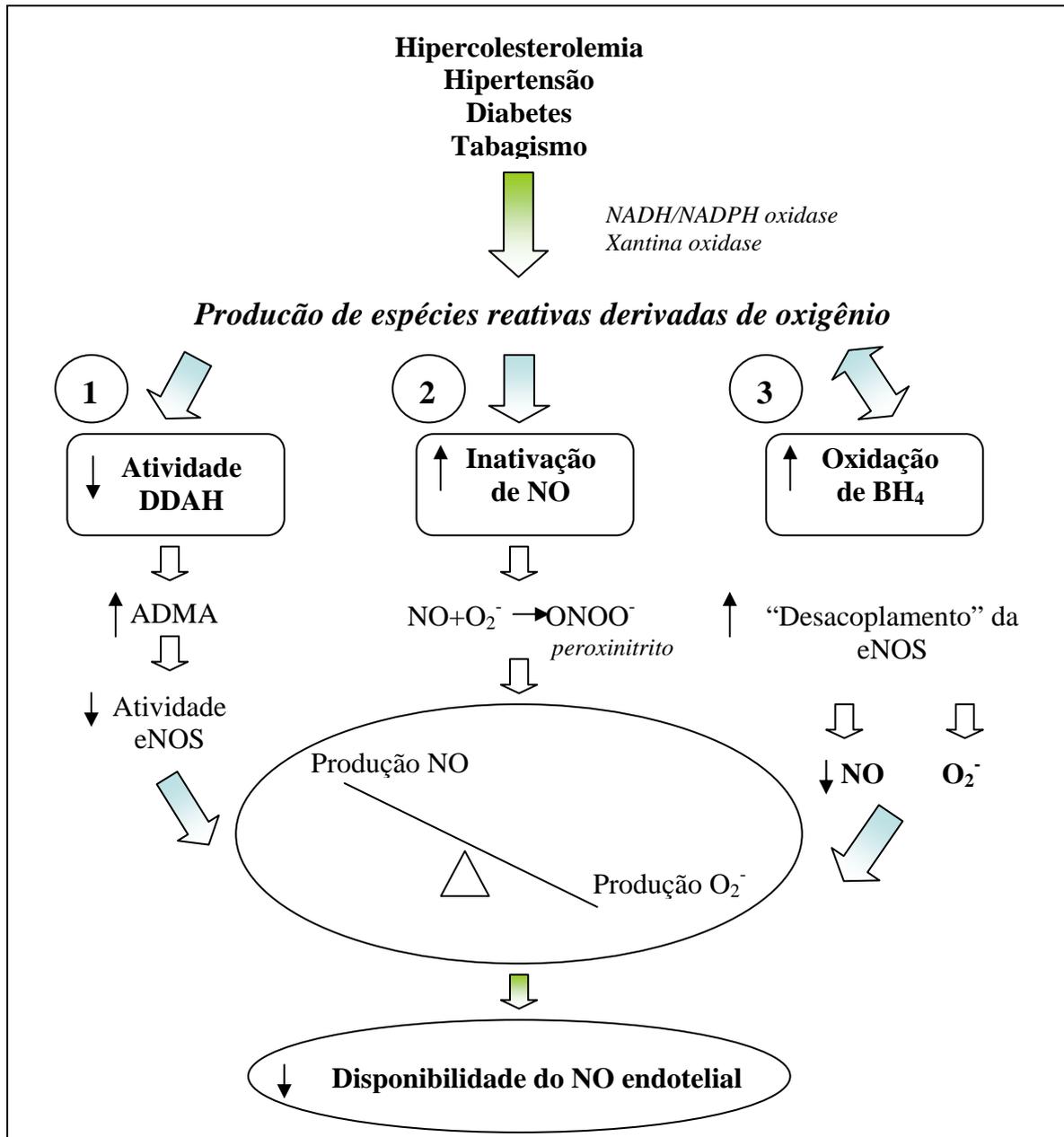


Figura 1. Os maiores fatores de riscos cardiovasculares aumentam a produção vascular de espécies reativas derivadas de oxigênio. A biodisponibilidade de NO endotelial pode estar reduzida por pelo menos três vias: 1) atividade reduzida da NOS devido a aumentos nos níveis de ADMA (dimetil arginina assimétrica, inibidor endógeno da NOS) resultante de uma inibição sensível ao redox da DDAH (dimetil argininase, enzima que degrada ADMA); 2) inativação direta pelo superóxido, resultando na redução na biodisponibilidade de NO; 3) desacoplamento da eNOS, devido a aumentos da oxidação de tetrahydrobiopterina. ONOO⁻ indica peroxinitrito.

A participação do NO pode ter um importante papel ao reagir com ROS, uma vez que já foi demonstrado previamente que o pré-tratamento de células com baixas concentrações de NO pode aumentar a resposta de defesa contra espécies reativas derivadas de oxigênio causadoras de injúrias (Kim e cols., 1995). Ao mesmo tempo, como o NO tem um papel fundamental na manutenção da homeostase, a diminuição da sua produção ou biodisponibilidade contribui para o desenvolvimento de vários estados fisiopatológicos cardiovasculares, tais como hipertensão arterial, aterosclerose (Furlong e cols., 1987; Kubes e cols., 1991; Randomski e cols., 1992; Yao e cols., 1992; Loscalzo e Welche, 1995; Lefer, 1997; Kugiyama e cols., 1999), doença coronariana e hipertensão pulmonar (Linder e cols., 1990; Dominiczak e Bohr, 1995; Forte e cols., 1997).

1.4. Metaloproteinases da Matriz Extracelular (MMPs) e o processo de remodelamento vascular

Metaloproteinases são endopeptidases cálcio-dependente, contendo zinco, expressas em várias células e tecidos, incluindo células da musculatura vascular lisa (VSMCs), endotélio, fibroblastos, células inflamatórias e plaquetas (Sase e Michel, 1995; Nagase e Woessner, 1999, Opdenakker e cols., 2001). A família das MMPs apresenta mais de 20 espécies, e dentre elas estão: colagenases intersticiais (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), gelatinases (MMP-2 ou gelatinase A e MMP-9 ou gelatinase B), *stromelisin*as (MMP-3 e MMP-10) e MMPs de membranas (MT1-MMP a MT6-MMP) (Spinale, 2002).

As MMPs apresentam domínios estruturais semelhantes, e diferem-se principalmente em relação a tipos celulares, regulação de transcrição (Brinckerhoff e cols., 2002) e especificidade de substratos.

Estas endopeptidases são sintetizadas e secretadas em uma pró-forma latente (zimogênios (pró-MMPs)) necessitando serem clivadas em seus domínios pró-peptídicos por outras proteases, como plasmina (fibrinolisin) ou MT-MMPs para poder serem ativadas (Nagase e Woessner, 1999). Elas degradam várias proteínas da matriz extracelular quebrando-as em suas ligações peptídicas específicas, promovendo remodelamento vascular (Galis e cols., 2002), que consiste em um processo fisiológico adaptativo que ocorre nos vasos sanguíneos em resposta às alterações crônicas na hemodinâmica (Ward e cols., 2000).

As MMPs podem ser reguladas por vários fatores incluindo, citocinas, hormônios, fatores de crescimento, estresse de cisalhamento e também estresse oxidativo (**Figura 2**). A regulação pode ser feita em três níveis: (i) indução da expressão gênica; (ii) ativação de suas pró-formas latentes; e (iii) inibição por TIMPs, que são inibidores teciduais específicos das MMPs (Bode e Maskos, 2003; Visse e Nagase, 2003).

Tais inibidores específicos das MMPs (TIMP-1 a -4) recebem grande importância em condições patológicas, uma vez que nestas circunstâncias os níveis de TIMP afetam diretamente a atividade das MMPs (Visse e Nagase, 2003).

A **Figura 2** mostra um dos mecanismos pelos quais as MMPs podem ser ativadas.

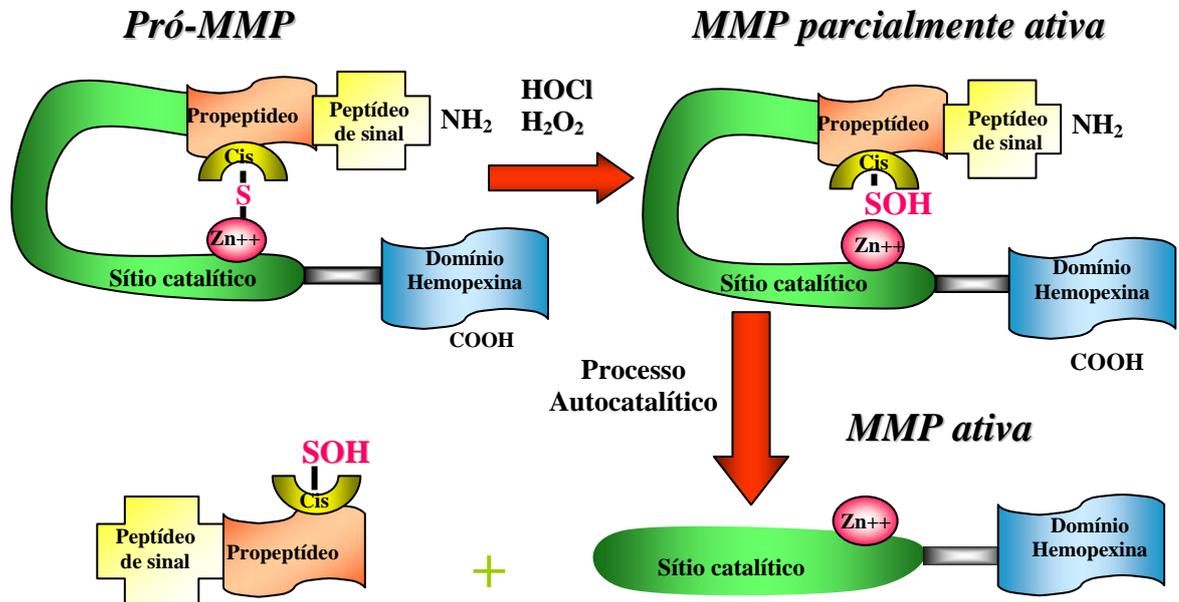


Figura 2. Ativação das Metaloproteinases. As MMPs são secretadas como zimógenos inativos que precisam ser processados para tornarem-se ativos. O sítio catalítico contém o zinco que é ligado a cisteína do propeptídeo. Esta conformação é requerida para que a enzima continue inativa. Sob condições de estresse oxidativo, alguns oxidantes tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) podem atacar e então modificar o resíduo tiol. Tais modificações quebram a ligação com o zinco, e a enzima no seu estado parcialmente ativo, torna-se susceptível a um processo autocatalítico, liberando o domínio propeptídeo e expondo o sítio catalítico, o que ativa a enzima. (Figura modificada de Nelson e Melendez, 2004).

Importância das Metaloproteínases em condições fisiopatológicas

As MMPs estão envolvidas na degradação da matriz extracelular que ocorre em vários processos patológicos, incluindo hipertensão e diabetes (Galis e cols., 2002; Grote e cols., 2003; Tayebjee e cols., 2003; 2004^{a,b,c}; Derosa e cols., 2005, 2007; Martinez e cols., 2006). Alterações na regulação das MMPs podem levar a um aumento da expressão e atividade destas enzimas provocando uma degradação excessiva das proteínas da matriz extracelular, além de acentuar a migração de células musculares lisas, podendo ocasionar quadros de injúria tecidual, inflamação, câncer invasivo e metástases (Ray e cols., 1994; Jenkins e cols., 1998). Além disso, estudos têm mostrado também a significativa participação das MMPs em várias doenças vasculares, tais como hipertensão (Johnson e Galis, 2004; Martinez e cols., 2006), diabetes (Galis e cols., 2002; Death e cols., 2003; Taybjee e cols., 2004^b), aterosclerose e insuficiência cardíaca (Spinale, 2002).

Dentre as MMPs, especial atenção tem sido dada a MMP-2, uma vez que o aumento da atividade e expressão da MMP-2, leva possivelmente a disfunção vascular, como tem sido mostrado em modelos experimentais de hipertensão e diabetes mellitus (Death e cols., 2003; Bouvet e cols., 2005; Watts e cols., 2007; Castro e cols., 2008; Rafetto e Khalil, 2008).

Possível participação das Metaloproteínases nas alterações cardiovasculares da Hipertensão Arterial e Diabetes Mellitus: Importância da gelatinase MMP-2

A MMP-2 é sintetizada em praticamente quase todos os tipos celulares, e possui domínios “*fibronectin-like*” responsáveis por clivarem colágeno tipo I, IV, V, VII, e X, gelatina (colágeno desnaturado) e elastina (Yasumitsu e cols., 1992). Alterações na regulação da expressão e atividade desta MMP podem estar envolvidas no processo de remodelamento vascular que acontece na fisiopatologia de várias doenças cardiovasculares (Zhang e cols., 1999). Alguns trabalhos clínicos e experimentais mostraram um aumento da concentração e atividade desta enzima tanto em plasma como em vasos sangüíneos. Tais estudos sugerem que o estiramento e tensão mecânica que acontece nos vasos sangüíneos durante um processo de hipertensão aumentem a expressão e a atividade da MMP-2 nas células da musculatura vascular lisa (Asanuma e cols., 2003; Meng e cols., 1999).

Fernandez-Patron e cols. (1999) demonstraram um importante papel da MMP-2 na modulação vascular, onde foi observado que a MMP-2 cliva um potente neuropeptídeo vasodilatador, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), promovendo assim, vasoconstrição. É ainda provável que a ativação da MMP-2 cause liberação de vasoconstritores, tais como endotelina-1 (ET-1), o que pode agravar quadros de diversas doenças, tais como hipertensão arterial (Belleguic e cols., 2002).

Johnson e Galis (2004) mostraram em um estudo com cultura de células, que a MMP-2 participa do espessamento da neo-íntima e migração das células musculares, mostrando também desta forma que ela pode exercer um papel extremamente importante na hipertensão arterial e diabetes mellitus.

Além disso, Yasmin e colaboradores (2005) mostraram um aumento das concentrações plasmáticas de MMP-2 em pacientes com hipertensão sistólica isolada, quando comparados com os pacientes normais. Em outro estudo, Bouvet e colaboradores (2005) mostraram que ao induzir um processo de hipertensão por administração crônica de L-NAME em ratos, ocorreu um aumento da quantidade e da atividade de MMP-2 em aortas, e um aumento da atividade da MMP-2 em artérias mesentéricas destes animais. Um aumento na expressão e atividade da MMP-2 também foi observado em situações de aterosclerose, ruptura de placas ateroscleróticas, restenose coronariana (não cardíaca) (Galis e cols., 1994; Jenkins e cols., 1998; Newby e cols., 1994) e aneurismas da aorta (Crowther e cols., 2000). Hojo e colaboradores (2001) mostraram também que níveis plasmáticos da MMP-2 aumentaram gradualmente depois de infarto agudo do miocárdio, e em pacientes com angina pectoris estável e instável (Kai e cols., 1998).

Portanto, esta MMP quando ativada, em casos de hipertensão arterial e diabetes por exemplo, pode promover um espessamento da camada média dos vasos sanguíneos com conseqüente redução no lúmen, e alterações na matriz extracelular, o que leva a um aumento da resistência periférica, característico de doenças cardiovasculares (Jenkins e cols., 1998; Baumbach e cols., 1989; Lehoux e cols., 2004). Estas alterações nos vasos sanguíneos estão relacionadas com disfunção endotelial, evidenciada por uma diminuição no relaxamento dependente do endotélio, como tem sido mostrado em modelos experimentais de hipertensão (Panza e cols., 1990; Bouvet e cols., 2005; Watts e cols., 2007; Castro e cols., 2008). A administração de doxiciclina (inibidor de MMP não seletivo) inibiu a

atividade da MMP e reverteu a vasodilação prejudicada dependente do endotélio associada com a hipertensão (Castro e cols., 2008).

Juntos, estes achados são consistentes com a noção de que a MMP-2 tem um importante papel na patofisiologia das doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão e diabetes e que os níveis de MMP-2 podem ter valor prognóstico (Galis e cols., 2002; Grote e cols., 2003; Chung e cols., 2006; Shiao e cols., 2006; Castro e cols., 2008).

1.5. Relevância do estresse oxidativo como um importante fator que modula a atividade das Metaloproteinases

As metaloproteinases são liberadas na forma inativa ou como pró-MMP, e podem ser ativadas por diversos mecanismos, entre eles o estresse oxidativo (**Figura 2**) (Uemura e cols., 2001; Griendling e Fitzgerald, 2003; Grote e cols., 2003).

Teoricamente, a ativação das MMPs poderia agravar o quadro de hipertensão arterial, visto que estas enzimas são capazes de aumentar a biodisponibilidade de ET-1 (Belleguic e cols., 2002) e clivar CGRP (Fernandez-Patron e cols., 1999), o que resulta num aumento da vasoconstrição. Um recente estudo mostrou que a produção de espécies reativas derivadas de oxigênio produzidas via NADPH oxidase durante o estresse mecânico é capaz de aumentar a expressão do RNA da MMP-2 e liberar pró-MMP-2 (Grote e cols., 2003). Da mesma forma estudos recentes têm demonstrado que o estresse oxidativo aumentado é o principal fator que modula a expressão/ atividade das MMPs, e que as espécies reativas de oxigênio estejam envolvidas no remodelamento vascular da hipertensão e diabetes via ativação de MMP (Cai e Harrison, 2000; Grote e cols., 2003).

Contudo, diversos estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo aumentado é o principal fator que modula a expressão/ atividade das MMPs, e que as espécies reativas de oxigênio estão envolvidas no remodelamento vascular da hipertensão e diabetes via ativação de MMP (Cai e Harrison, 2000; Grote e cols., 2003).

1.6. Drogas antihipertensivas

A hipertensão arterial pode ser tratada por diversas classes de drogas antihipertensivas, e de interesse para o nosso estudo destacam-se os bloqueadores de canais de cálcio.

Fortes evidências obtidas de várias pesquisas controladas indicam que o tratamento farmacológico dos pacientes com pressão diastólica de 95 mmHg, ou superior, reduz a morbidade, a incapacidade e a mortalidade decorrentes de doença cardiovascular. A terapia antihipertensiva eficaz evita quase que totalmente, AVEs hemorrágicos, insuficiência cardíaca e insuficiência renal decorrentes de hipertensão (Cominacini e cols., 2003).

As drogas antihipertensivas podem ser classificadas de acordo com seus locais ou mecanismos de ação em: diuréticos, drogas simpatomélicas, vasodilatadores arteriolares, bloqueadores de canais de cálcio, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e antagonistas de receptores de angiotensina. Os bloqueadores de canais de cálcio por sua vez são classificados em 5 classes de compostos: fenilalquilaminas, diidropiridinas, benzotiazepinas, difenilpiperazinas e diarilaminopropilaminas (Cominacini e cols., 2003).

Dentre os bloqueadores de canais de cálcio, a classe das diidropiridinas (DHP) são de maior interesse para o presente estudo.

As diidropiridinas se classificam em 1.^a, 2.^a e 3.^a geração e, constituem uma categoria de antagonistas de canais de cálcio, amplamente usadas para o tratamento das doenças cardiovasculares (Weber, 2002).

É provável que elas induzam a um efeito farmacológico específico pela ligação a canais de cálcio tipo L, o que resulta numa redução do influxo de cálcio, com efeito relaxante direto na musculatura lisa, reduzindo desta maneira, a resistência vascular periférica total (Weber, 2002).

Há poucos anos, foi observado que a remoção ou bloqueio da guanilato ciclase da parede do vaso, reduziu a eficácia das diidropiridinas em promover vasodilatação (Weber, 2002). Isto indica haver uma resposta do endotélio mediada por GMPc (guanosina monofosfato cíclico), por parte da ação da diidropiridina. Visto que as células endoteliais macrovasculares não apresentam o canal de cálcio tipo L, as diidropiridinas devem exercer estes efeitos por outros mecanismos (Berkels e cols., 2001; Weber, 2002; Taddei e cols., 2003). Neste contexto, há trabalhos mencionando que as diidropiridinas podem também exercer efeito antitrombótico e

antiaterosclerótico em diferentes estudos clínicos e experimentais, mas a transdução de sinal ainda permanece obscura (Berkels e cols., 2001).

Além de seus efeitos antihipertensivos, vários bloqueadores de canais de cálcio têm demonstrado possuir propriedades antioxidantes e removedora de radicais livres (Xu e cols., 2002; Cominacini e cols., 2003; Canavesi e cols., 2004). O ânion superóxido pode remover o NO combinando-se quimicamente com ele, forma o peroxinitrito, que é um potente radical oxidante e citotóxico. Assim, os bloqueadores de canais de cálcio podem aumentar a biodisponibilidade de NO através da remoção dos ânions superóxidos (Xu e cols., 2002). Contudo, acredita-se que as diidropiridinas influenciam o sistema do NO aumentando a sua biodisponibilidade através de propriedades antioxidantes, bem como através de mecanismo cinina-dependente, a ser descrito adiante.

O mecanismo cinina-dependente refere-se ao fato de que a produção do NO pode estar facilitada por vários estímulos, tais como acetilcolina, bradicinina, purinas e norepinefrina que atuam estimulando a NO sintase. Com isso, os receptores para uma destas substâncias já estariam estimulados quando do estresse isquêmico, ou mesmo a diidropiridina, poderia aumentar os níveis de uma destas substâncias, a fim de se ligar no receptor. O mecanismo pelo qual este bloqueador de cálcio aumentaria a concentração de um destes mediadores ainda não está muito claro, mas há evidências de que este bloqueador estaria envolvido com a inibição da enzima de conversão de angiotensina (ECA), o que provavelmente leva ao aumento dos níveis de bradicinina, por condições de estresse (Xu e cols., 2002).

Outras diidropiridinas também tem sido bastante estudadas, tais como nifedipina, amlodipina e lacidipina, que também são bloqueadores de canais de cálcio do tipo diidropiridina.

Estudos feitos em animais, humanos e culturas de células mostram que a amlodipina aumentou a produção de NO de células endoteliais da coronária em cães, tanto em tecidos sãos quanto doentes (Xu e cols., 2002; Mason 2003; Tabrizchi, 2003).

Já com relação a nifedipina, alguns estudos sugerem que esta estimule a liberação de NO de outras células que células endoteliais. Levando-se em consideração que a nifedipina aumenta os níveis de NO no coração isquêmico mais do que no coração não isquêmico, a nifedipina pode ter um menor efeito na

produção de NO, do que a amlodipina em corações não isquêmicos (Berkels e cols., 2001; Mason, 2003).

Outros estudos com a nifedipina, comprovaram o efeito deste fármaco sobre a eNOS, onde, utilizando o L-NAME, um inibidor inespecífico da NO sintase, observou-se uma atenuação em grande parte da vasodilatação promovida pela nifedipina em corações isquêmicos (Kitakaze e cols., 2000).

Uma outra diidropiridina estudada é a lacidipina, que também mostrou uma proteção vascular pronunciada nas células musculares lisas, bem como no endotélio e reduziu a formação de placa de ateroma em modelos animais quando administrada em doses terapêuticas (Cominacini e cols., 2003). Estudos eletroquímicos feitos com esta diidropiridina, mostraram que este fármaco atua estimulando a liberação de NO em anéis de aorta em ratos, onde a biodisponibilidade de NO foi avaliada utilizando voltímetro com biosensor específico (Crespi e cols., 2001).

1.7. Lercanidipina: um bloqueador de canais de Cálcio usado no tratamento da Hipertensão, com possíveis efeitos sobre o estresse oxidativo e sobre a MMP-2

A lercanidipina é um antagonista dos canais de cálcio tipo L pertencente ao grupo das 1,4-diidropiridinas de terceira geração (Jalius, 1993; Toyo-Ota e Nayrer, 1996; Van Zwieten e Mancina, 1996).

Do ponto de vista químico, a lercanidipina é o (\pm) cloridrato de ácido piridinedicarboxílico, 1,4 - diidro-2,6-dimetil-4-(3-nitrofenil)-2-[(3,3-difenilpropil) metilamina]-11-dimetil etil metil éster. A presença da porção bifênil (**Figura 3**), confere a lercanidipina uma estrutura única, que é caracterizada por sua flexibilidade e lipossolubilidade.

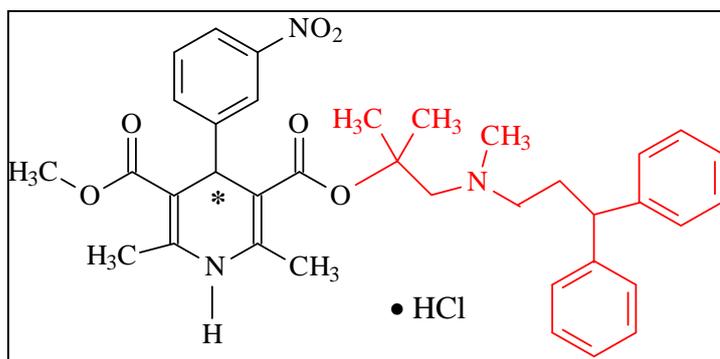


Figura 3. Estrutura química da lercanidipina

(*) Carbono quiral

A molécula da lercanidipina apresenta um centro quiral na posição 4 do anel DHP. O princípio ativo utilizado é, portanto, racêmico, contendo quantidades idênticas dos enantiômeros (+)-(S)- e (-)-(R)-, os quais contribuem de forma diferente para a sua atividade farmacológica. Igualmente às outras 1,4-diidropiridinas assimétricas, a ação antihipertensiva da lercanidipina se deve, principalmente, ao seu enantiômero (S). Corsini e cols. (1998) mostraram em um estudo *in vitro* que o enantiômero (+)-(S)-Lercanidipina é cerca de 2.4 vezes mais ativo em bloquear canais de cálcio tipo L que o enantiômero (-)-(R)-lercanidipina (McCellan e Jarvis, 2000).

Apesar da sua curta meia-vida plasmática, a lercanidipina é dotada de prolongada ação antihipertensiva, devido ao seu alto coeficiente de partição (elevada lipossolubilidade), sendo destituída de efeito inotrópico negativo devido a sua alta seletividade vascular, representando assim um fármaco de maior adequação para o tratamento de primeira linha na hipertensão, quando comparado aos outros fármacos da mesma classe (McCellan e Jarvis, 2000). Evidências pré-clínicas sugerem que a lercanidipina tem um potencial antiaterogênico e pode também proteger contra danos aos órgãos (McCellan e Jarvis, 2000).

A Lercanidipina tem exibido uma boa eficácia terapêutica e tolerabilidade em pacientes com hipertensão arterial, ou em pacientes com hipertensão essencial resistente (McCellan e Jarvis, 2000; Bang e cols., 2003).

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* com animais (Corsini e cols., 1996; Guarneri e cols., 1996; Sironi e cols., 1996; Cerbai e cols., 2000; Sabbatini e cols., 2001) e humanos (Sironi e cols., 1996; Ambrosini e cols., 1997; Mancina e cols., 1998; Acanfora e cols., 2000; McCellan e cols., 2000; Cominacini e cols., 2003) das propriedades farmacodinâmicas da lercanidipina têm sido realizados, comprovando sua eficácia como agente hipotensor e sua possível interferência nos eventos da aterogênese (Boraso e Ferrari, 1997).

Em estudos clínicos bem controlados, uma vez a lercanidipina administrada diariamente nas doses de 10 e 20 mg, reduziu efetivamente a pressão arterial comparada com placebo, em pacientes com hipertensão sem afetar a frequência cardíaca. Taxa de resposta a lercanidipina (porcentagem de pacientes com pressão diastólica <90 mmHg ou reduzida em 10 mmHg) variou entre 50 a 66% naqueles pacientes submetidos ao tratamento com a lercanidipina 10 mg/ dia e foi acima de 86% nos pacientes submetidos ao tratamento com a lercanidipina 20 mg/ dia (Bang e cols., 2003). Estudos comparativos encontraram que a lercanidipina 10 mg dada 1 vez ao dia durante um período de 4 semanas ou mais, foi pelo menos efetiva tanto quanto Atenolol 50 mg/ dia; Candesartan cilexetil 16 mg/ dia; Captopril 25 mg/ 2 x dia; Enalapril 20 mg/ dia; Hidroclorotiazida 12,5 mg/ dia; Irbesartan 150 mg/ dia. Em adição, lercanidipina 20 mg/ dia foi tão efetiva quanto amlodipina 10 mg/ dia (Bang e cols., 2003).

Portanto, pode-se dizer que a lercanidipina é um efetivo e bem tolerado agente antihipertensivo dado 1 vez ao dia em pacientes com hipertensão arterial. Em adição, a droga pode reduzir a pressão arterial quando usada como monoterapia em pacientes com hipertensão grave ou quando usada conjuntamente com outros fármacos em pacientes com hipertensão resistente (Bang e cols., 2003).

Sendo assim, a lercanidipina representa uma opção terapêutica no tratamento de pacientes com hipertensão, além de poder ser particularmente usada em pacientes não responsivos, ou intolerantes à drogas antihipertensivas de outras classes.

Além de ser uma boa opção terapêutica no tratamento da hipertensão (Borghetti, 2005; Prandin e cols., 2007), vários outros estudos demonstraram que esta diidropiridina possui efeitos pleiotrópicos que podem contribuir para seus efeitos benéficos. Por exemplo, a lercanidipina produziu efeitos antioxidantes em pacientes com hipertensão e diabetes mellitus (Incandela e cols., 2001; Rachmani e cols.,

2002; Taddei e cols., 2003; Martinez e cols., 2006). Estudos com cultura de células mostraram que a pré-incubação das células endoteliais de aorta bovina com lercanidipina, diminuiu a formação de ROS induzida por lipoproteínas de baixa densidade (ox-LDL) (Cominacini e cols., 2003). Em processos ateroscleróticos, que normalmente são associados a quadros de hipertensão e/ou diabetes, lipoproteínas de baixa densidade (ox-LDL) aumentam a produção intracelular de ROS, pela ligação a um receptor específico LOX-1. Essa interação ligante-receptor pode ativar a produção de ROS de muitas fontes enzimáticas em quase todos os tipos celulares. É bem provável que a lercanidipina exerça atividade antioxidante por doar elétrons aos radicais livres, reduzindo-os a formas não reativas. Por outro lado, a lercanidipina também pode afetar uma das fontes enzimáticas de ROS, tais como NADPH oxidase, xantina oxidase e ciclooxigenase reduzindo também a produção intracelular destas espécies reativas de oxigênio (Cominacini e cols., 2003; Canavesi e cols., 2004). Um estudo clínico, demonstrou que o tratamento com lercanidipina 10 mg/dia, reduziu os níveis de malondialdeído (MDA) plasmático em pacientes hipertensos e diabéticos, quando comparados ao controle (Rachmani e cols., 2002). Em adição, enquanto os efeitos dos CCBs na atividade/ expressão da MMP ainda precisam ser esclarecidos (Mason e cols., 2003), recentes achados clínicos sugerem que a lercanidipina reduz a atividade/ expressão da MMP (Yue e cols., 2004; Martinez e cols., 2006).

Portanto, levando-se em consideração que o estresse oxidativo aumentado é o principal fator que ativa as MMPs (Rajagopalan e cols., 1996; Grote e cols., 2003; Nelson e Melendez, 2004; Ra e Parks., 2007), e que tem um papel chave nas complicações vasculares da hipertensão e diabetes (Ceriello e cols., 2006), é possível que alguns CCBs com propriedades antioxidantes, tais como a lercanidipina (Incandela e cols., 2001; Rachmani e cols., 2002; Taddei e cols., 2003), possam reduzir a atividade da MMP-2 nos tecidos vasculares e melhorar a disfunção vascular causada pela hipertensão e diabetes mellitus.

Hipótese

A hipótese deste estudo é de que a lercanidipina possa ter efeitos antioxidantes que estejam associados a uma redução na atividade da MMP-2 nos vasos de animais nestes modelos experimentais de hipertensão e diabetes mellitus. Imaginamos que estes efeitos estejam associados à atenuação da hipertensão arterial e das alterações vasculares presentes em ambos modelos experimentais.

2. Objetivos

2.1. Verificar possíveis aumentos de estresse oxidativo e de MMP-2 (atividade e expressão gênica) nos vasos de ratos nos modelos de hipertensão arterial renovascular e diabetes mellitus citados.

2.2. Estudar os efeitos do tratamento com lercanidipina sobre as alterações mencionadas no item 2.1.

2.3. Estudar os efeitos do tratamento com lercanidipina sobre a disfunção vascular presente nos dois modelos experimentais de hipertensão arterial e de diabetes mellitus.

3. Materiais e Métodos

Todos os protocolos e procedimentos cirúrgicos empregados neste estudo estão de acordo com o Guia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, que tem como base o guia publicado pelo Instituto Nacional da Saúde.

Ratos Wistar, machos, normais pesando em média 210 g, obtidos do Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto foram mantidos em ambiente controlado a uma temperatura de 22-25°C em um ciclo de 12:12-horas luz/escuro, com disponibilidade de comida e água à vontade.

O número de animais por grupo varia entre 6 e 10. Este número foi estimado com bases em estudos prévios, dos quais se extraiu a variabilidade esperada (variância) e se estimou estatisticamente o N por grupo entre 6 e 10 animais, pois este número permite que se detecte uma diferença maior ou igual a 20% nos parâmetros a serem investigados ($\alpha=0,05$; $\beta= 0,20$). Entretanto em alguns experimentos este N, pode variar pra mais ou menos deste N inicial estipulado.

O estudo foi dividido inicialmente em 2 protocolos, onde dentro de cada protocolo os animais foram divididos em 4 grupos:

Protocolo 1: Indução da hipertensão

A hipertensão renal 2R-1C foi induzida pelo clampeamento da artéria renal direita com um grampo de prata (abertura interna 0,2 milímetros). Os ratos sham submeteram-se ao mesmo procedimento cirúrgico (sob anestesia geral com ketamina 10 mg/kg e xilazina 10 mg/kg i.p), à exceção do grampo na artéria renal.

Os animais que apresentaram aumento mínimo de pressão arterial sistólica de cauda de pelo menos 30 mmHg foram utilizados no estudo. Três semanas após a indução da hipertensão, os animais foram atribuídos aleatoriamente a um de quatro grupos experimentais como segue:

- 1) *Sham*: sham operado que recebeu água
- 2) *Lerc*: sham operado que recebeu lercanidipina
- 3) *2R-1C*: grupo hipertenso que recebeu água
- 4) *2R-1C+ Lerc*: grupo hipertenso que recebeu lercanidipina

Protocolo 2: Indução da Diabetes

Diabetes foi induzida com uma injeção intravenosa de aloxana (40 mg/kg; Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) dissolvida em 0.01 M de tampão citrato (pH 4.5). Animais foram utilizados no estudo depois que a hiperglicemia foi confirmada (glicemia > 400 mg/dL). Três semanas após a indução da diabetes (ou injeção de veículo), os animais foram distribuídos aleatoriamente a um de quatro grupos experimentais como segue:

- 1) *Controle*: grupo controle que recebeu água
- 2) *Lerc*: grupo controle que recebeu lercanidipina
- 3) *Diab*: grupo diabético que recebeu água
- 4) *Diab+Lerc*: grupo diabético que recebeu lercanidipina

Lercanidipina foi adicionada diariamente à água de beber (2,5 mg/kg/dia) por seis semanas, começando a partir da 3^a semana da indução da hipertensão (ou operação de Sham), ou diabetes (ou injeção de veículo). Estudos prévios mostram que esta dose diária de lercanidipina atenuou a pressão arterial por aproximadamente 50 mmHg em ratos espontaneamente hipertensivos (Sabbatini e cols., 2000; Tomassoni e cols., 2003).

Ao final do período de estudo, as amostras de sangue (4 mL) foram coletadas em tubo falcon (15 ml) contendo 160 µl de EDTA (2 mg/ml). Os plasmas para análise foram obtidos por centrifugação (2.500 RPM x 5 min) das amostras de sangue e armazenados em tubos eppendorf, devidamente identificados a -70 °C, até o momento da análise. As aortas foram retiradas e então dissecadas para análise posterior.

3.1. Materiais

3.1.1. Soluções e Tampões utilizados nos protocolos experimentais

As soluções utilizadas foram:

- EDTA 0.5 M pH 8,0
- Acetilcolina 10^{-11} - 10^{-5} M
- Fenilefrina 10^{-4} M
- Nitroprussiato de sódio 10^{-11} - 10^{-6} M
- Parafina
- Paraformaldeído 4%
- Hematoxilina e eosina
- Agarose
- Gelatina 40 mg/ml
- 1,10-fenantrolina
- NEM
- PMSF
- Persulfato de Amônio (APS) 10%
- Solução de poliacrilamida (acrilamida 30% e bisacrilamida 80%)
- Solução de Triton X-100 2%
- Solução de coloração (Coomassie Blue 0,05%)
- Solução fixadora e de descoloração (30% metanol e 10% ácido acético)
- Solução de Krebs (em mM: NaCl 130, CaCl₂ 1.6, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, KCl 4.7, NaHCO₃ 14.9, glicose 5.5)
- 1,1,3,3-tetrametoxipropano (Padrão de Malondialdeído (MDA))
- Nitrogênio líquido
- Trizol (Invitrogen)

- Isopropanol
- Primers
- β -actina

Os tampões utilizados foram:

- Tampão 4 X Tris Cl/SDS pH 8,8
- Tampão 4 X Tris Cl/SDS pH 6,8
- Tampão Tris-HCl/ CaCl₂ pH 7,4
- Tampão de corrida 5 x
- Tampão citrato pH 4,5

3.1.2. Drogas utilizadas nos protocolos experimentais

- Aloxana (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA)
- Lercanidipina (Medley)
- Ketamina
- Xilazina

3.1.3. Equipamentos utilizados nos procolos experimentais

- Balança de Precisão (Shimadzu AY220)
- Banho Maria (Nova Ética)
- Centrífuga (CELM LS – 3 plus)
- Chromo 4 Detector (Bio-Rad Laboratórios, EUA)
- Estufa (Odonto Bras)
- Espectrofotômetro
- Fluorímetro
- pHmetro (Incibrás)

- Fonte de eletroforese (Eletrophoresis Power Supply – EPS 301)
- Sensor para registro da Pressão Arterial Sistólica
- Sistema de fotodocumentação (KODAK EDAS 2000)
 - Transdutor de tensão isométrica (Letica Scientific Instruments; Barcelona, Espanha)
- Monitor para medida da taxa de glicemia (Accu-Chek)
 - Programa de Aquisição de dados: Chart V4.04. PowerLab AD Instruments (2000); CODAS Data Acquisition (AT-CODAS; DATAQ Instruments) e GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, versão 3.0, 2000).

3.2. Métodos

3.2.1. Avaliação do peso corporal, pressão arterial de cauda (PAC) e Glicemia

O peso dos animais e a PAC foram avaliados semanalmente, durante as 9 semanas do estudo. Para a medida da PAC, os animais foram condicionados por duas semanas antes do início do estudo. A PAC foi avaliada, utilizando-se um manguito colocado em torno da cauda do animal, previamente aquecido, o qual foi conectado a um sensor para registro da pressão arterial sistólica (Zatz e Baylis, 1998).

A glicemia foi determinada através de uma leitura (Monitor Accu-Chek) feita 15 dias após a administração de aloxana.

Foram considerados animais hipertensos, os que apresentaram aumento mínimo de pressão arterial sistólica de cauda de pelo menos, 30 mmHg e animais diabéticos, aqueles que apresentaram glicemia maior ou igual 400 mg/dl.

3.2.2. Reatividade Vascular

Após as 6 semanas de tratamento com lercanidipina (ou veículo), os animais foram mortos por decapitação e a aorta torácica foi isolada e limpada de tecido conectivo e gordura. A aorta foi então cortada em anéis de 4 mm de comprimento, que foram colocados em cubas para órgãos isolados, de 10 mL, contendo solução de Krebs modificada na seguinte composição em mM: NaCl 130, CaCl₂ 1.6, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, KCl 4.7, NaHCO₃ 14.9, glicose 5.5), em uma temperatura de 37 °C e pH de 7.4, com 95% de O₂ e 5% de CO₂ (Castro e cols., 2004).

O sistema foi conectado a um transdutor para medida da tensão isométrica (Letica Scientific Instruments; Barcelona, Espanha), e as respostas foram registradas no programa Chart V4.04, PowerLab ADInstruments (2000).

Após 60 minutos de estabilização sob tensão basal de 1.5 g, os anéis apresentaram um endotélio funcional intacto quando a acetilcolina (10⁻⁶ M) produziu um relaxamento maior que 80%. O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida por fenilefrina (100 μmol/L). Para avaliar o relaxamento dependente e independente do endotélio, os anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (100 μmol/L) foram usados pra construir curvas cumulativas concentração-efeito a acetilcolina (10⁻¹¹-10⁻⁵ M) e ao nitroprussiato de sódio (10⁻¹¹-10⁻⁶ M) respectivamente.

3.2.3. Análise da estrutura vascular da aorta

Depois de 6 semanas do tratamento com lercanidipina (ou veículo), os animais foram mortos por decapitação. A aorta torácica foi então isolada, limpada de tecido conectivo e imediatamente fixada em tampão fosfato com paraformaldeído 4%, pH 7.4, e encaixada em blocos de parafina. Fatias de 4 μm foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). Regiões coradas foram examinadas com microscopia confocal e a imagem foi capturada como descrita anteriormente (Dao e cols., 2001). Área de secção transversal (CSA) foi calculada pela subtração da área do lúmen interno da área externa, que foi medida nas seções do tecido (50x). O diâmetro externo (ED) e o diâmetro interno (ID) foram calculados pela raiz quadrada de $4Ae/\pi$ e de $4Ai/\pi$, respectivamente. Espessura da camada média (M) foi calculada como

(ED-ID)/2. Finalmente a razão de M para o diâmetro do lúmen (M/L) foi também calculada.

O número de células musculares lisas vasculares (VSMC) da parede da aorta foi obtido pelo método tri-dimensional em duas sessões consecutivas, como descrito anteriormente. Este método é independente da orientação do núcleo, forma e tamanho (Dao e cols., 2001).

3.2.4. Zimografia para MMP-2 na aorta

Os níveis de MMP no extrato de aorta foram determinados pelo método da zimografia, conforme padronizado em nosso laboratório, que consiste em uma eletroforese das amostras de plasma ou extrato em um sistema SDS/PAGE (Palei e cols., 2005; de Souza e cols., 2000).

Os tecidos das aortas foram congelados e homogeneizados em tampão contendo 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 1 mmol/L 1,10-fenantrolina e 1 mmol/L PSMF, 1 mmol/L NEM, e 10 mmol/L CaCl₂. Em resumo, os extratos de tecidos normalizados para concentração de proteína (Stoscheck, 1990) foram submetidos à eletroforese num gel a 12% co-polimerizado com gelatina (1%) como substrato num sistema SDS-PAGE. Depois da eletroforese o gel foi incubado por 1 hora a temperatura ambiente com uma solução de Triton X-100 a 2%, em seguida lavado 2 vezes com água e incubado a 37°C por 16 horas em tampão Tris-HCl, pH 7.4, contendo 10 mmol/L de CaCl₂. Os géis foram então fixados numa solução contendo 30% de metanol e 10% de ácido acético. Em seguida, os géis foram corados com 0,05% Coomassie Blue G-250, e então descorados com 30% de metanol e 10% de ácido acético. As atividades gelatinolíticas foram determinadas como bandas descoradas contra um fundo azul corado com Coomassie Blue, avaliando-se a densitometria através de um sistema de documentação (Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System – EDAS 290; Kodak, Rochester, NY) (Souza-Costa e cols., 2005; 2007). Análise intergel foi possível depois da normalização da atividade gelatinolítica com um padrão interno (meio de cultura condicionado por fibroblastos). As formas latente e ativa da MMP-2 foram identificadas através dos seus pesos moleculares, 72 e 67 KDa respectivamente (Souza-Tarla e cols., 2005; Gerlach e cols., 2005; 2007), que foram inibidas com fenantrolina e não por outros inibidores de proteases, além de serem identificadas também por imunoprecipitação com anticorpos

específicos. Drogas e reagentes foram comprados da Sigma-Aldrich. (St. Louis, MO).

3.2.5. Real-Time PCR

3.2.5.1. Reação de Real Time RT-PCR:

Esta reação foi utilizada para validar a expressão do RNAm do gene da gelatinase MMP-2 em aorta de ratos. Real Time RT-PCR foi aplicado utilizando primers específicos para as gelatinases e para β -actina.

3.2.5.2. Obtenção do RNAm total da aorta:

Os animais foram decapitados e a aorta abdominal foi isolada e limpada de tecido conectivo e gordura (\pm 83 mg). Todas as amostras foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C até extração do RNAm. As amostras foram homogeneizadas em TRIZOL (INVITROGEN) para a extração do RNAm presente no tecido, e posteriormente centrifugadas. O sobrenadante foi transferido para microtubos e misturado com isopropanol, e novamente centrifugado. O precipitado foi ressuspendido com água livre de RNAase. A concentração e integridade do extrato contendo RNA total foram observadas com o uso de espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose.

3.2.5.3. Preparação do RNA e síntese do cDNA:

O RNA total foi utilizado para síntese de cDNA por transcrição reversa pela técnica habitual (Gan e cols., 2000). O cDNA foi utilizado para amplificação quantitativa do RNAm para MMP-2 por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).

A técnica de RT-PCR quantitativa em tempo real, foi feita com o aparelho Chromo 4 Detector (Bio-Rad Laboratórios, EUA), usando o sistema de quantificação em fluorescência para amplificação de amplicons. As condições padrão de PCR foram feitas a 95°C por 2 minutos, com 50 ciclos a 95°C (10s), 58°C (30 s), e 72°C (30s). O gene housekeeping (controle) beta-actina (ACTB) foi usado para a padronização interna.

As seqüências de primers foram desenhadas utilizando seqüências de nucleotídeos presentes no banco de dados do GenBank. Os pares de primers foram os seguintes:

ACTB, ID 81822, sense: 5'- TCTGTGTGGATTGGTGGCTCT-3';
antisense: 3'- GACTCATCGTACTCCTGCTTGCT-5', 83 pb;

MMP-2, ID 81686, sense: 5'- GTGCCAAGGTGGAAATCAGAG-3',
antisense: 3'- AAGGTTGAAGGAAACGAGCGA-5', 100 pb;

TIMP-2, ID 29543, sense: 5'- CTACATCTCCTCCCCGGATGA -3',
antisense: 5'- GGTGCCCATTTGATGCTCTTC-3', 68 pb.

As condições de PCR foram otimizadas no que diz respeito a eficiência da amplificação dos genes alvo e do gene controle housekeeping. A linha de base do ponto inicial foi determinada, através dos controles negativos. Os valores médios de Ct obtidos das medidas em triplicata foram usados para avaliar a expressão do gene alvo, comparando-se com o padrão do gene housekeeping e usando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, de acordo com o procedimento já padronizado em nosso laboratório.

3.2.6. Determinação de TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico)

A avaliação da peroxidação lipídica produzida durante a Hipertensão arterial e Diabetes, foi realizada através da determinação dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), representados por níveis plasmáticos de malondialdeído (MDA). O ácido tiobarbitúrico (TBA) reage com aldeídos resultantes da lipoperoxidação, como o malondialdeído (MDA), e é o método mais comum de se verificar a peroxidação lipídica em amostras biológicas (Lapenna e cols., 2001). O teste do ácido tiobarbitúrico no plasma tem sido utilizado clinicamente para investigar a peroxidação lipídica mediada por radicais, e o estresse oxidativo produzido em várias doenças (Lapenna e cols., 2001).

Os níveis plasmáticos de peróxidos lipídicos foram determinados em duplicada pela medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico usando um método fluorométrico como descrito anteriormente (Cau e cols, 2007). Este método requer excitação a 515 nm e emissão a 553 nm e utiliza o 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão. Os níveis plasmáticos de lipoperóxidos foram expressos em termos de malondialdeído (nmol/ml).

Análise Estatística

Os resultados são expressos como média \pm E.P. As comparações entre os grupos foram feitas através da análise de variância de duas vias (SigmaStat for Windows, Jadel Scientific, USA), ou por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey. Uma probabilidade <0.05 foi considerada significativa.

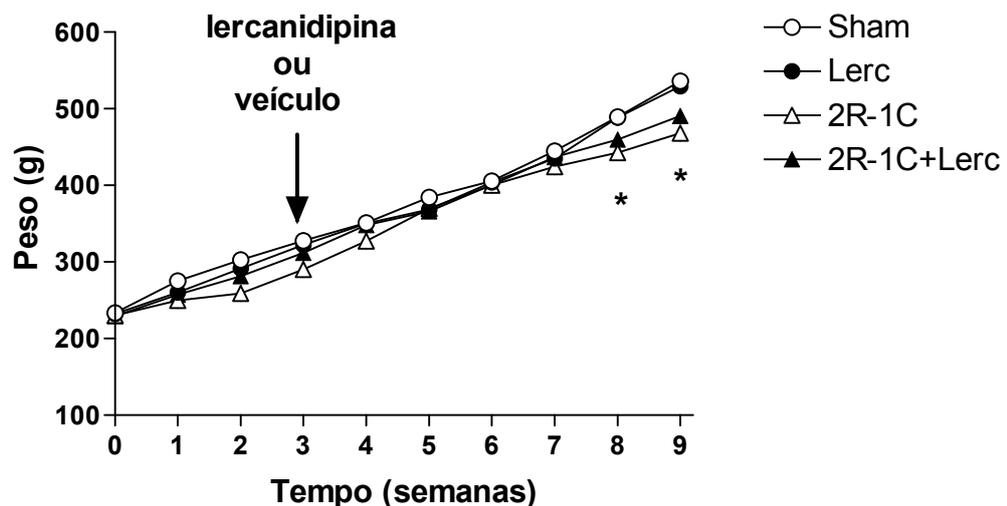
4. Resultados

Protocolo 1: Hipertensão 2R-1C

Tratamento com lercanidipina melhora a hipertensão renal 2R-1C

Os valores de peso corporal e pressão arterial sistólica (PAS) basais foram similares nos 4 grupos experimentais. Enquanto nenhuma alteração significativa foi observada nos grupos Sham e Lerc, PAS começou a aumentar nos grupos 2R-1C e 2R-1C+Lerc depois de uma semana da cirurgia (indução da hipertensão), e um aumento adicional na PAS foi encontrada no grupo 2R-1C até o final do período de estudo. Entretanto, o tratamento com lercanidipina preveniu maiores aumentos na PAS no grupo 2R-1C+Lerc ($P<0.05$). Além disso, os animais dos grupos 2R-1C e 2R-1C+Lerc ganharam menos peso do que os animais Sham operados ($P<0.01$).

A



B

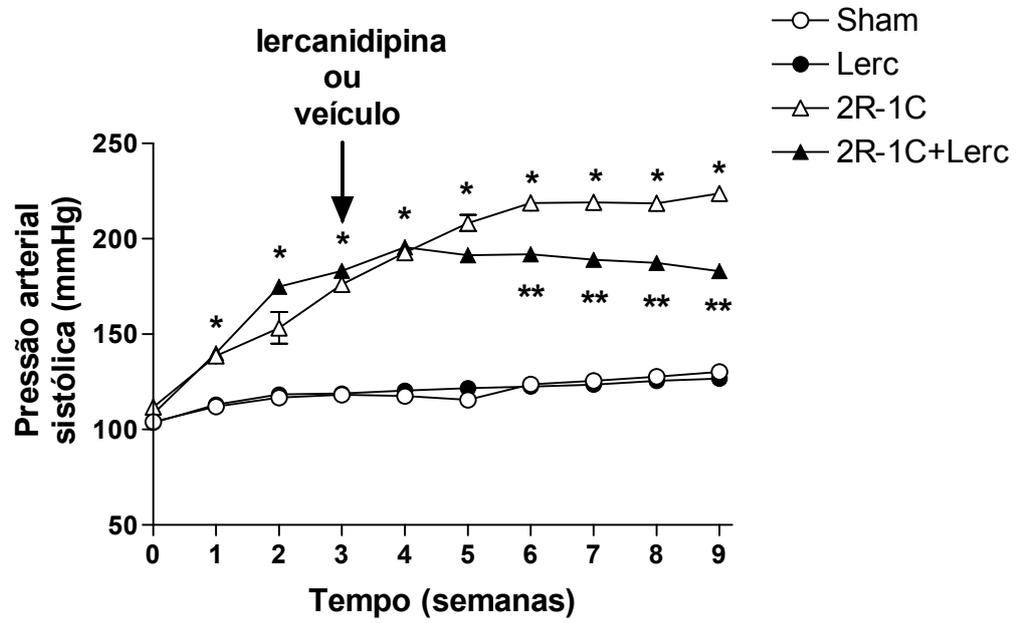


Gráfico 1 - Peso corporal (g; painel A) e pressão arterial sistólica (mmHg; painel B) medida pelo método de pressão arterial de cauda nos 4 grupos experimentais durante o período de estudo.

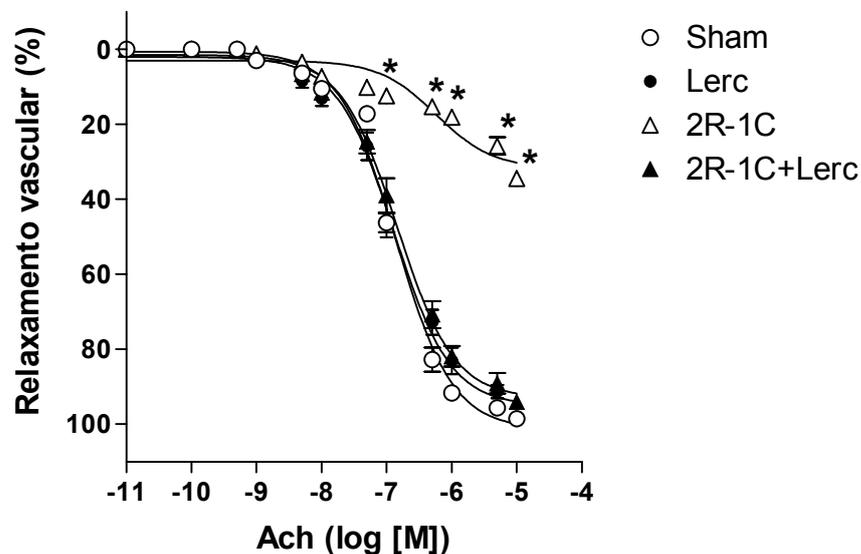
Dados são mostrados como média \pm E.P (n = 13 por grupo)

* P<0.01 para 2R-1C e 2R-1C+Lerc *versus* grupo Sham

** P<0.05 *versus* 2R-1C

Tratamento com lercanidipina reverteu o comprometimento da vasodilatação associado com hipertensão renal 2R-1C

Para testar a hipótese de que a atenuação da hipertensão por lercanidipina poderia estar associada com a melhora da vasodilatação, anéis de aorta de ratos foram isolados e seu desempenho funcional foi avaliado realizando experimentos em câmara de órgão isolado (n=6-10, por grupo). Gráficos 2A e 2B mostram, respectivamente uma vasodilatação dependente do endotélio, e uma independente induzida por acetilcolina (ACh; 10^{-11} - 10^{-5} M), e nitroprussiato de sódio (NPS; 10^{-11} - 10^{-6} M). Pode-se observar que a hipertensão 2R-1C foi associada com um prejuízo nas respostas à ACh ($P<0.0001$; Gráfico 2A e Tabela 1), enquanto nenhuma alteração significativa foi observada nas respostas ao NPS (Gráfico 2B e Tabela 1). O tratamento com lercanidipina reverteu o comprometimento da vasodilatação a ACh associada com hipertensão 2R-1C (Gráfico 2A e Tabela 1).

A

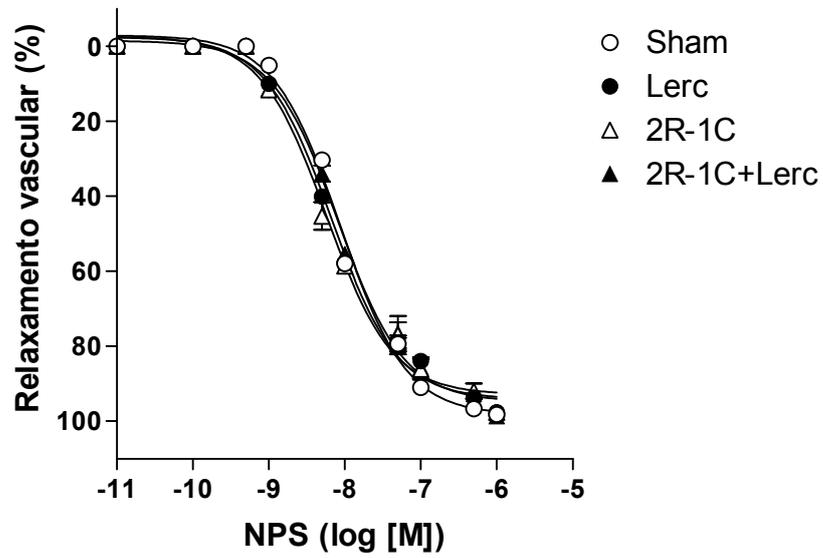
B

Gráfico 2 - Vasodilatação dependente do endotélio induzida pela acetilcolina (Ach, painel A) e relaxamento independente do endotélio induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS, painel B) nas preparações de anéis de aorta. Respostas vasculares foram estudadas depois da pré- contração com fenilefrina (100 $\mu\text{mol/L}$).

Dados são mostrados como média \pm E.P. (n = 6-10 por grupo)

* $P < 0.0001$ versus outros 3 grupos

Lercanidipina não produziu efeitos significantes nas alterações histológicas associadas com hipertensão renal 2R-1C

A hipertrofia da parede arterial das artérias de condutância é a principal característica associada com hipertensão (Arribas e cols., 2006). Figura 4 mostra que os animais do grupo 2R-1C apresentaram um aumento da espessura da camada média da aorta comparada ao grupo Sham, com aumento significativo no número de células do músculo liso vascular (VSMC), aumento da área de secção transversal (CSA), e aumento da taxa da média em relação ao lúmen (M/L) no grupo 2R-1C comparado com o grupo Sham (Gráfico 3; todos $P < 0.05$).

Entretanto, o tratamento com lercanidipina não foi associado com atenuação destas mudanças (todos $P > 0.05$; Gráfico 3), como sugerido por mudanças similares no número de VSMC, CSA, e taxa de M/L no grupo 2R-1C+Lerc comparado com o grupo 2R-1C (Gráfico 3).

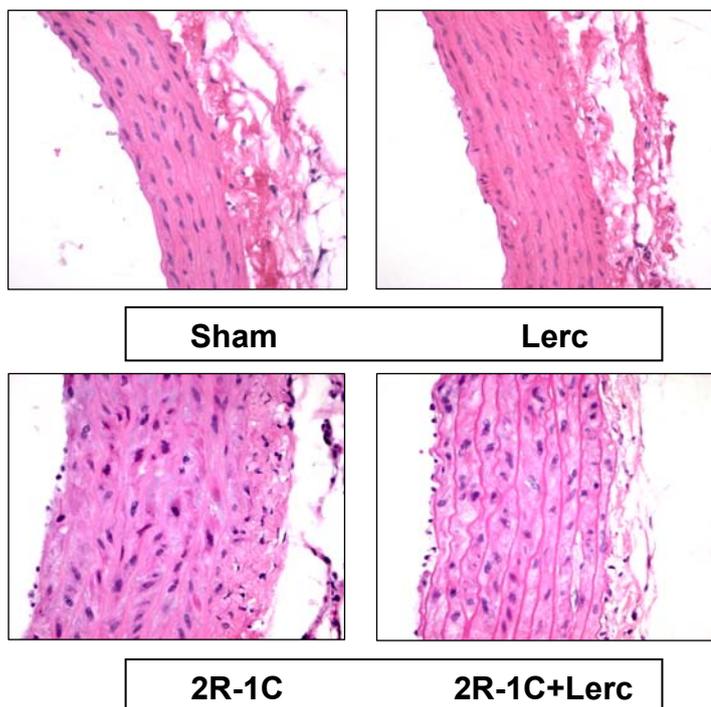


Figura 4 - Efeito da lercanidipina nas modificações estruturais induzidas nas aortas dos ratos hipertensos 2R-1C. Fotografia representativa da amostra de aorta (x400) corada como hetaxilina e eosina (HE).

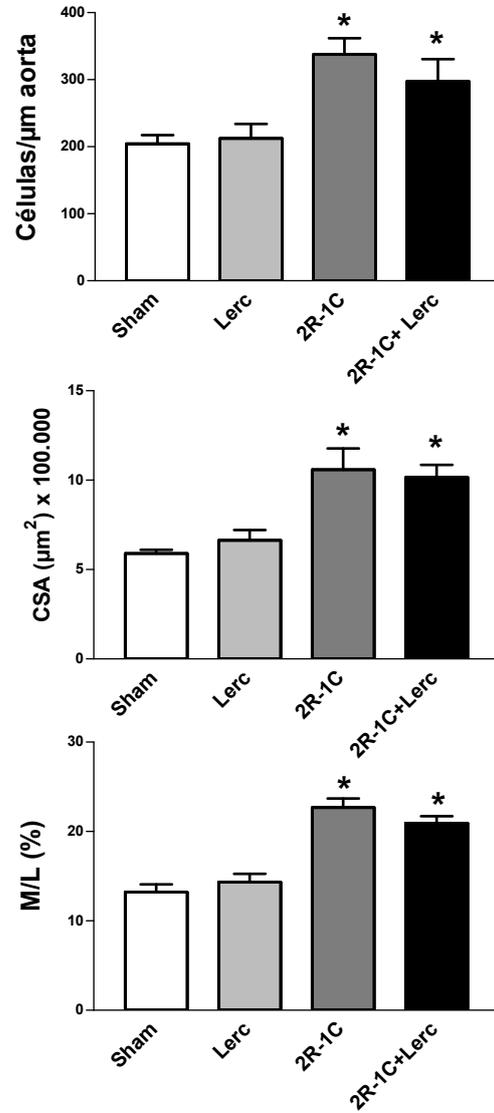


Gráfico 3 - Valores do número de células da musculatura lisa vascular, da área de secção transversal (CSA) e da taxa da média em relação ao lúmen (M/L).

Dados são mostrados como média \pm E.P (n = 6-7 por grupo)

* P<0.05 versus grupo Sham

Tratamento com lercanidipina foi associado com menores níveis de ativação da MMP-2 induzida pela hipertensão 2R-1C

Zimogramas em gel de gelatina foram usados para avaliar os níveis de MMP em extratos de aorta. Figura 5 mostra, um gel representativo dos extratos de aorta indicando as bandas da pro-MMP-2 e da MMP-2 ativa. As aortas dos animais 2R-1C mostraram níveis mais elevados de ambas as formas da MMP-2, e uma maior porcentagem (%) de ativação da MMP-2 comparada com os animais Sham (todos $P < 0.01$; Gráfico 4), indicando assim que a hipertensão 2R-1C induz a um aumento dos níveis e ativação da MMP-2 da aorta. Interessantemente, o tratamento com lercanidipina atenuou significativamente o aumento dos níveis e % de ativação da MMP-2 induzidos pela hipertensão (Gráfico 4), mas não os aumentos da pro-MMP-2 induzidos pela hipertensão ($P > 0.05$; Gráfico 4).

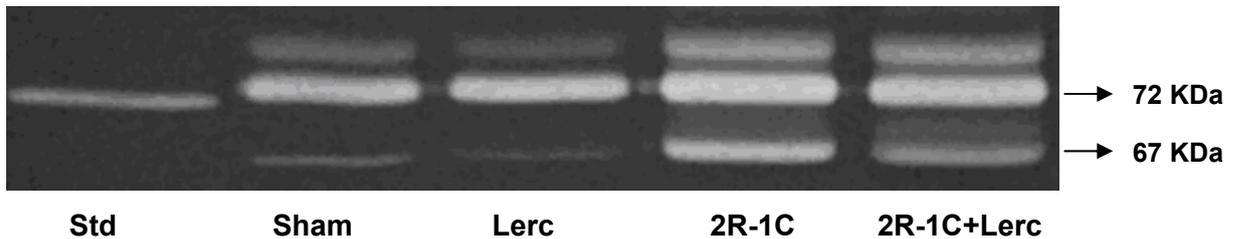


Figura 5 - Gel de zimograma representativo das aortas dos animais hipertensos. As formas latente (pro) e ativa da MMP-2 foram identificadas pelas bandas em 72 KDa e 67KDa respectivamente. Std: padrão interno.

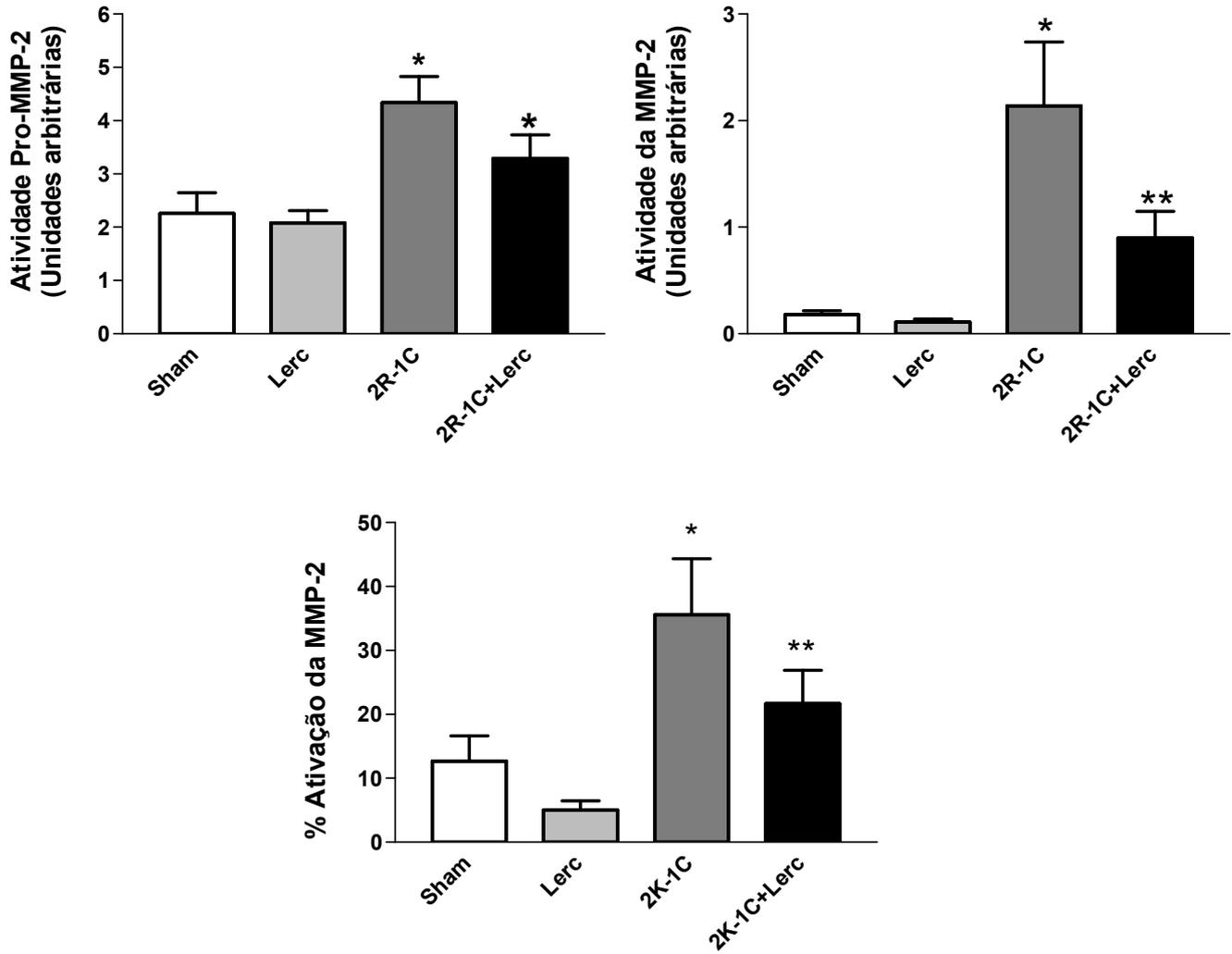


Gráfico 4 - Valores de atividade da pro-MMP-2 e MMP-2, e a % de ativação da MMP-2 nas aortas, que foi calculada como $100\% \times \text{MMP-2} / (\text{MMP-2} + \text{Pro-MMP-2})$.

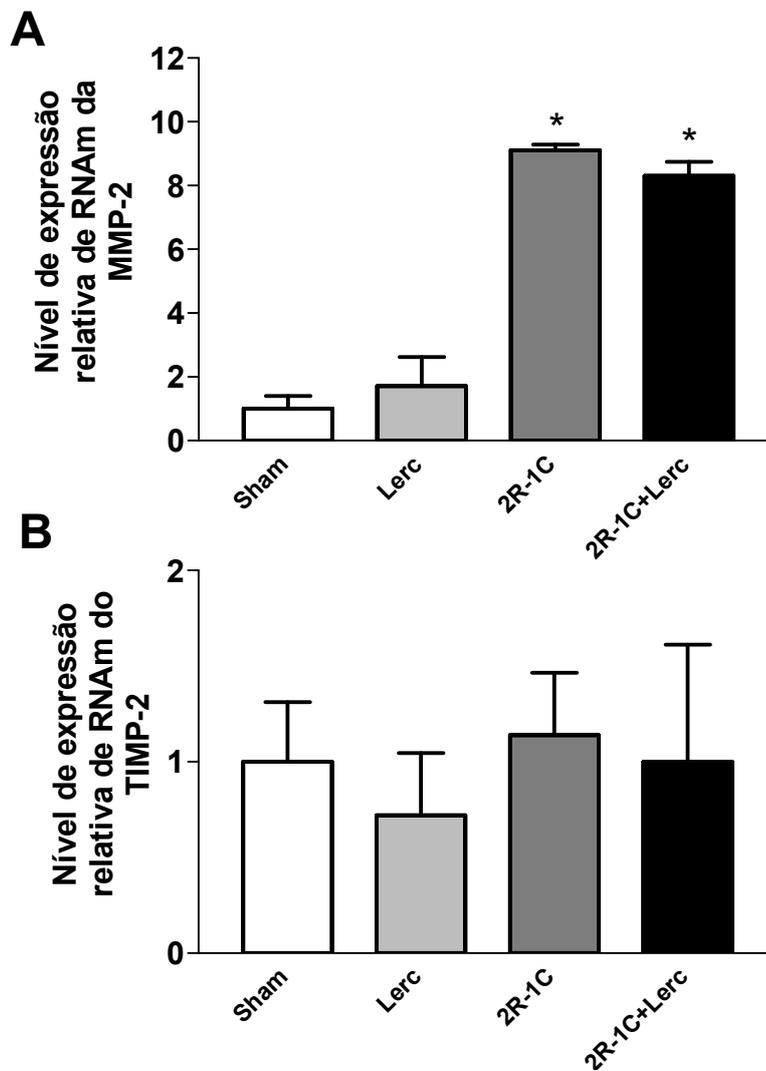
Dados são mostrados como média \pm E.P. (n= 10-13 por grupo)

* P<0.01 versus grupo Sham

** P<0.05 versus 2R-1C e grupo Sham

Lercanidipina não afetou os aumentos da expressão de RNAm da MMP-2 induzidos pela hipertensão 2R-1C

Avaliamos a expressão de RNAm da MMP-2 e TIMP-2 na aorta torácica utilizando um RT-PCR quantitativo em tempo real. Os animais dos grupos 2R-1C e 2R-1C+Lerc apresentaram um aumento de 8-9 vezes nos níveis de RNAm da MMP-2 comparados com o grupo Sham (ambos $P < 0.01$; Gráfico 5A). Entretanto, nenhuma diferença entre os grupos foi encontrada nos níveis de RNAm do TIMP-2 (Gráfico 5B). Portanto, similar aumento de 8-9 vezes na taxa de relação da expressão de MMP-2/TIMP-2 foi encontrado nos grupos 2R-1C e 2R-1C+Lerc comparados com os animais do grupo Sham (ambos $P < 0.01$; Gráfico 5C).



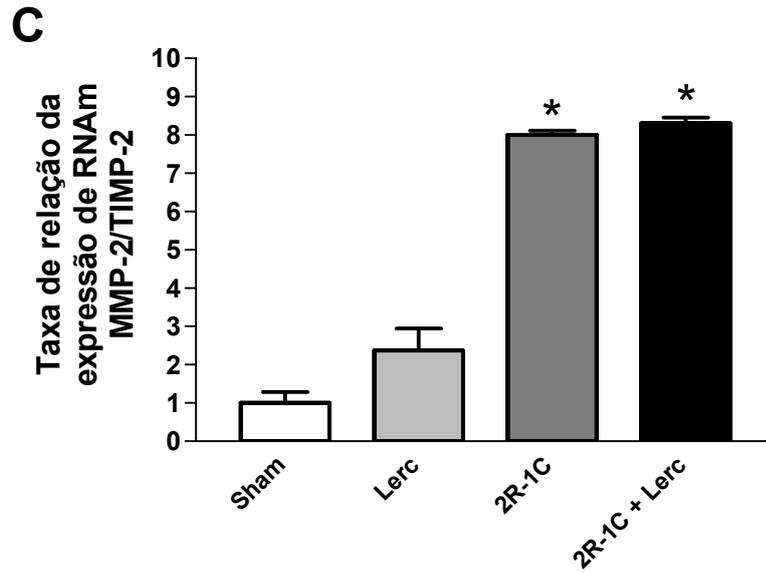


Gráfico 5 - Efeito da lercanidipina na expressão de RNAm da MMP-2 e TIMP-2 na aorta. Os níveis de RNAm de MMP-2 (painel A) e TIMP-2 (painel B) foram quantificadas por RT-PCR quantitativo em tempo real. Os resultados são apresentados como a expressão individual dos RNAsm com a normalização do gene housekeeping ACTB pelo uso do método Ct. Painel C mostra a taxa de relação MMP-2/TIMP-2.

Dados são mostrados como média \pm E.P. (n=5-6 por grupo)

* $P < 0.01$ versus grupo Sham

Tratamento com lercanidipina atenuou o aumento do estresse oxidativo induzido pela hipertensão 2R-1C

Nós encontramos níveis aumentados de peróxidos lipídicos no grupo 2R-1C comparado com o grupo Sham ($P < 0.05$; Gráfico 6). Entretanto, o tratamento com lercanidipina atenuou o aumento do estresse oxidativo induzido pela hipertensão 2R-1C, indicado por baixos níveis plasmáticos de peróxidos lipídicos (MDA) no grupo 2R-1C+Lerc comparado com o grupo 2R-1C ($P < 0.05$; Gráfico 6).

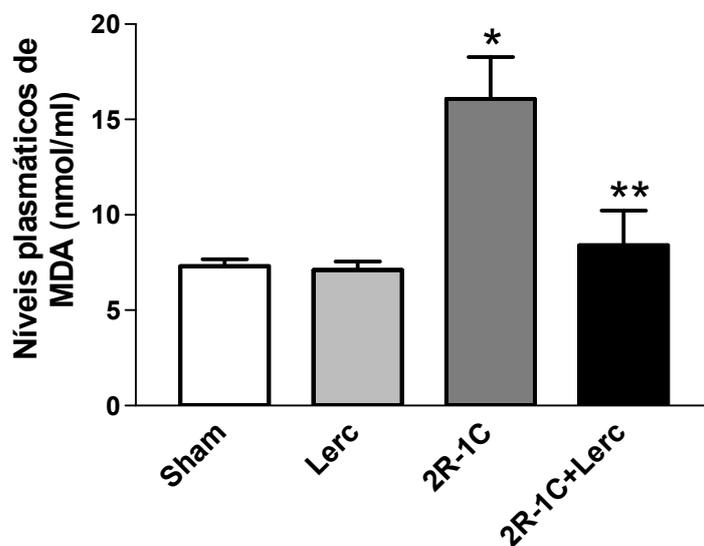


Gráfico 6 - Concentração das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico expressas em termos de malondialdeído (MDA; nmol/ml) no plasma, no final do período de estudo nos quatro grupos experimentais.

Dados são mostrados como média \pm E.P. (n=6-8 por grupo)

* $P < 0.05$ versus outros três grupos

Tabela 1 - Valores de pD2 e Emax para a vasodilatação dependente do endotélio induzida pela Ach, e relaxamento independente do endotélio induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS), nas preparações de anéis de aorta dos animais do Protocolo 1.

	Sham	Lerc	2R-1C	2R-1C+Lerc
pD2 Ach	6.88 ± 0.04	6.85 ± 0.08	6.07 ± 0.40*	6.81 ± 0.07
pD2 NPS	8.08 ± 0.02	8.19 ± 0.02	8.26 ± 0.05	8.09 ± 0.04
Emax Ach	98.55 ± 0.53	98.30 ± 0.37	34.50 ± 1.69*	94.00 ± 1.29**
Emax NPS	98.25 ± 0.62	95.14 ± 1.20	92.86 ± 2.10	95.49 ± 1.65
N	10	10	6	9

Dados são mostrados como média ± E.P.

*P<0.0001 *versus* outros três grupos

**P<0.05 *versus* grupos Sham e Lerc

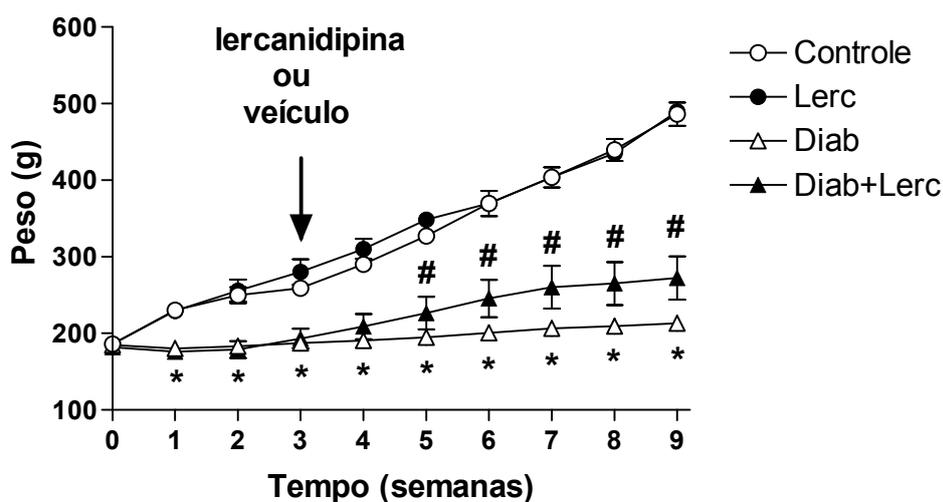
Protocolo 2: Diabetes mellitus

Tratamento com lercanidipina melhorou a hipertensão induzida por diabetes

A injeção intravenosa de aloxana aumentou os níveis basais de glicemia de 98 ± 3 mg/dl para 420 ± 6 mg/dl, e o tratamento com lercanidipina não afetou a hiperglicemia.

Os valores de peso corporal e pressão arterial sistólica (PAS) basais foram similares nos 4 grupos experimentais (Gráficos 7A e 7B). Enquanto nenhuma alteração significativa na PAS foi observada nos grupos Controle e Lerc. PAS começou a aumentar nos grupos Diab e Diab+Lerc uma semana depois da injeção de aloxana (Gráfico 7B). Entretanto, o tratamento com lercanidipina preveniu maiores aumentos na PAS no grupo Diab+Lerc (Gráfico 7B; $P < 0.01$). Além disso, os animais dos grupos Diab e Diab+Lerc ganharam menos peso do que os animais controle (Gráfico 7A, $P < 0.01$), enquanto o tratamento dos animais diabéticos com lercanidipina foi associado com a melhora do ganho de peso (Gráfico 7A; $P < 0.01$).

A



B

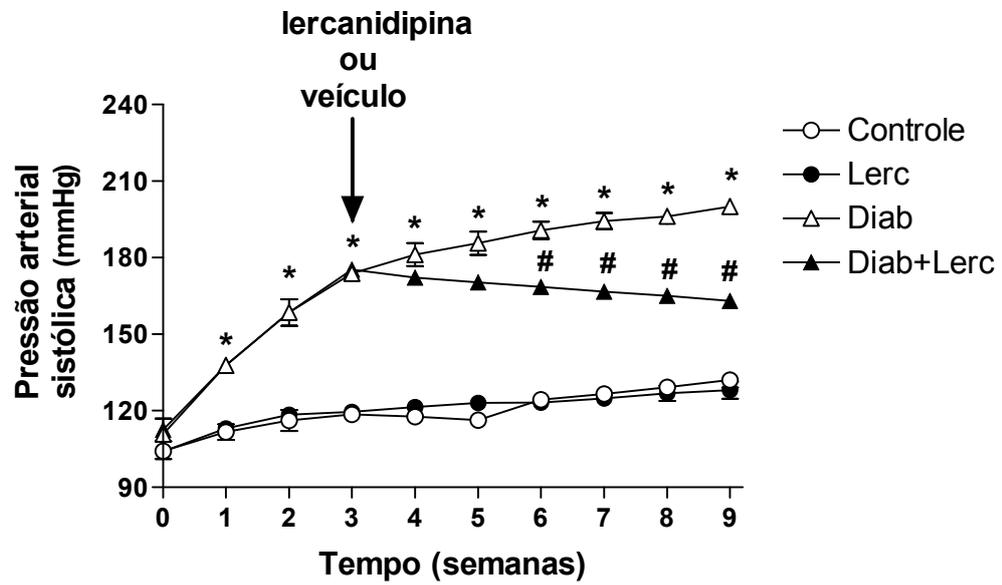


Gráfico 7 - Peso corporal (g; painel A) e pressão arterial sistólica (mmHg; painel B) medida pelo método de pressão arterial de cauda nos 4 grupos experimentais durante o período de estudo.

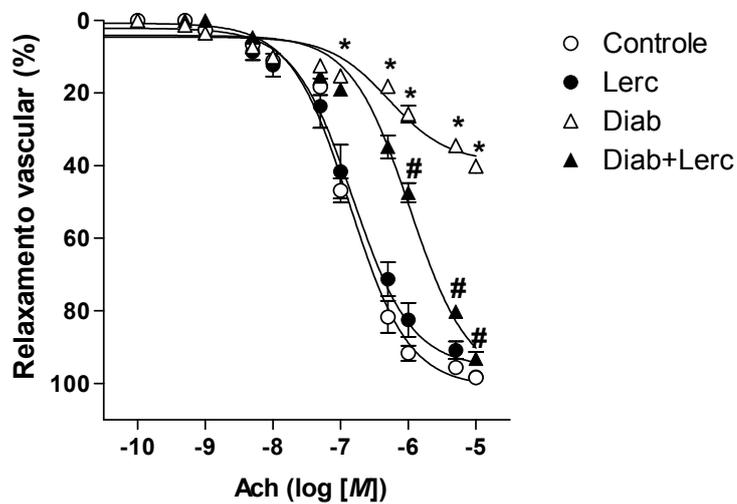
Dados são mostrados como média \pm E.P. (n = 14 por grupo)

* P<0.01 para Diab e Diab+Lerc *versus* grupo Controle

P<0.05 *versus* Diab

Tratamento com lercanidipina reverteu o comprometimento da vasodilatação associada com diabetes

Para examinar os possíveis efeitos benéficos da lercanidipina na disfunção endotelial associada com diabetes, anéis de aorta de ratos foram isolados e o desempenho funcional destes foi avaliado realizando experimentos em câmara de órgão isolado (n=6-10, por grupo). Gráficos 8A e 8 B mostram, respectivamente uma vasodilatação dependente do endotélio, e uma independente induzida por acetilcolina (Ach; 10^{-11} - 10^{-5} M), e nitroprussiato de sódio (NPS; 10^{-11} - 10^{-6} M), respectivamente. Pode-se observar que a diabetes foi associada com um prejuízo nas respostas à Ach ($P<0.0001$; Gráfico 8A e Tabela 2), enquanto nenhuma alteração significativa foi observada nas respostas ao NPS (Gráfico 8B e Tabela 2). Tratamento com lercanidipina reverteu mais que 80% da resposta vasodilatadora associada com a diabetes (Gráfico 8A e Tabela 2).

A

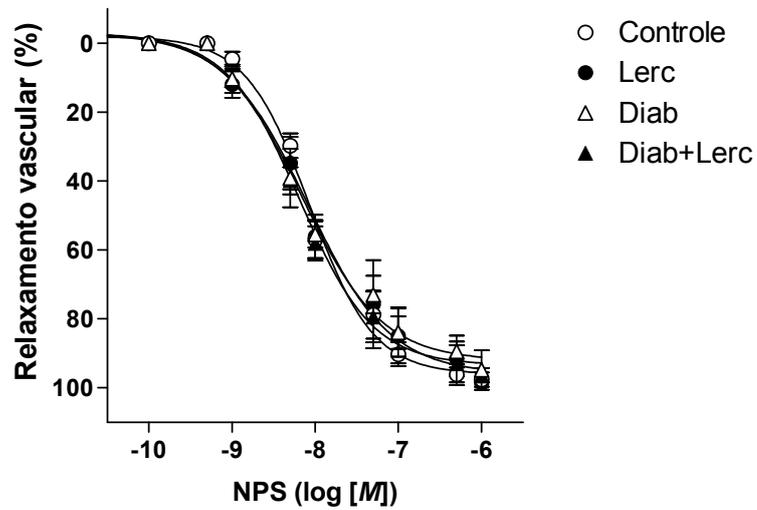
B

Gráfico 8 - Vasodilatação dependente do endotélio induzida pela Ach (painel A) e relaxamento independente do endotélio induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS, painel B) nas preparações de anéis de aorta. Respostas vasculares foram estudadas depois da pré-contração com fenilefrina (100 µmol/L).

Dados são mostrados como média ± E.P. (n = 6-10 por grupo)

* P<0.0001 *versus* outros 3 grupos

P<0.0001 *versus* Diab

Análise histológica da aorta

A análise da aorta dos animais diabéticos não mostrou nenhuma alteração estrutural significativa comparada com os animais controle. Figura 6 mostra fotografias representativas da amostra de aorta. Entretanto, os animais diabéticos apresentaram um pequeno aumento na taxa da média em relação ao lúmen (M/L) comparada com os animais controle (Gráfico 9; $P < 0.05$). Tratamento com lercanidipina não produziu nenhuma atenuação significativa nesta alteração ($P > 0.05$; Gráfico 9).

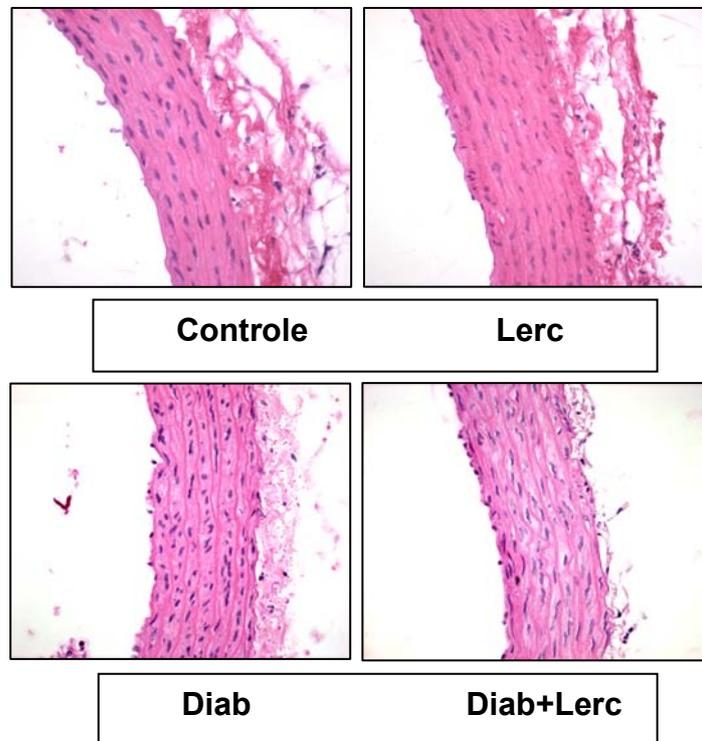


Figura 6 - Falta de modificações estruturais nas aortas dos ratos diabéticos. Fotografia representativa da amostra de aorta (x400) corada como hetaxilina e eosina (HE).

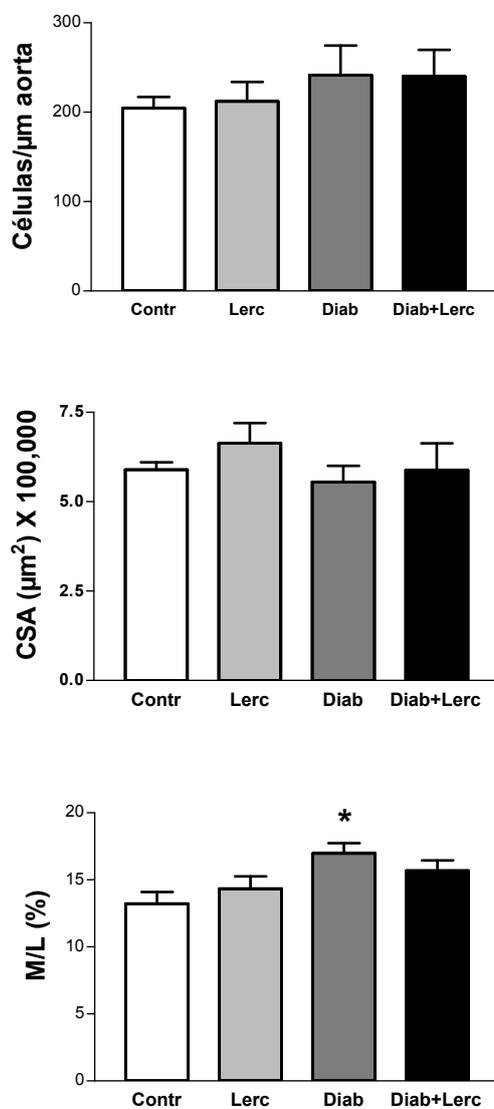


Gráfico 9 - Valores do número de células musculares lisas vasculares por comprimento de aorta, valores da área de secção transversal (CSA), e valores da taxa da média em relação ao lúmen (M/L).

Dados são mostrados como média \pm E.P (n = 4 por grupo)

* P<0.05 *versus* grupo Controle

Tratamento com lercanidipina atenuou o aumento dos níveis de MMP-2 da aorta induzido pela diabetes

Zimogramas em gel de gelatina foram usados para avaliar os níveis de MMP em extratos de aorta. Figura 7 mostra, um gel representativo dos extratos de aorta mostrando as bandas da pro-MMP-2 e da MMP-2 ativa. As aortas dos animais diabéticos mostraram níveis de 3-5 vezes maiores de ambas as formas da MMP-2 comparados com os animais controle (todos $P < 0.001$; Gráfico 10). Interessantemente, o tratamento com lercanidipina atenuou significativamente o aumento dos níveis da MMP-2 (mas não da pro-MMP-2) associado com a diabetes ($P < 0.05$; Gráfico 10).

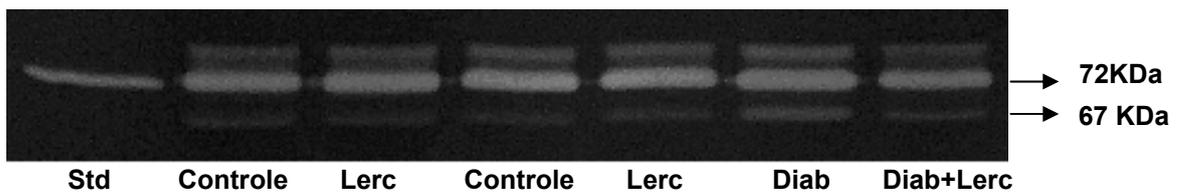


Figura 7 - Gel de zimograma representativo das aortas dos animais diabéticos. As formas latente (pro) e ativa da MMP-2 foram identificadas pelas bandas em 72 KDa e 67KDa respectivamente. Std: padrão interno.

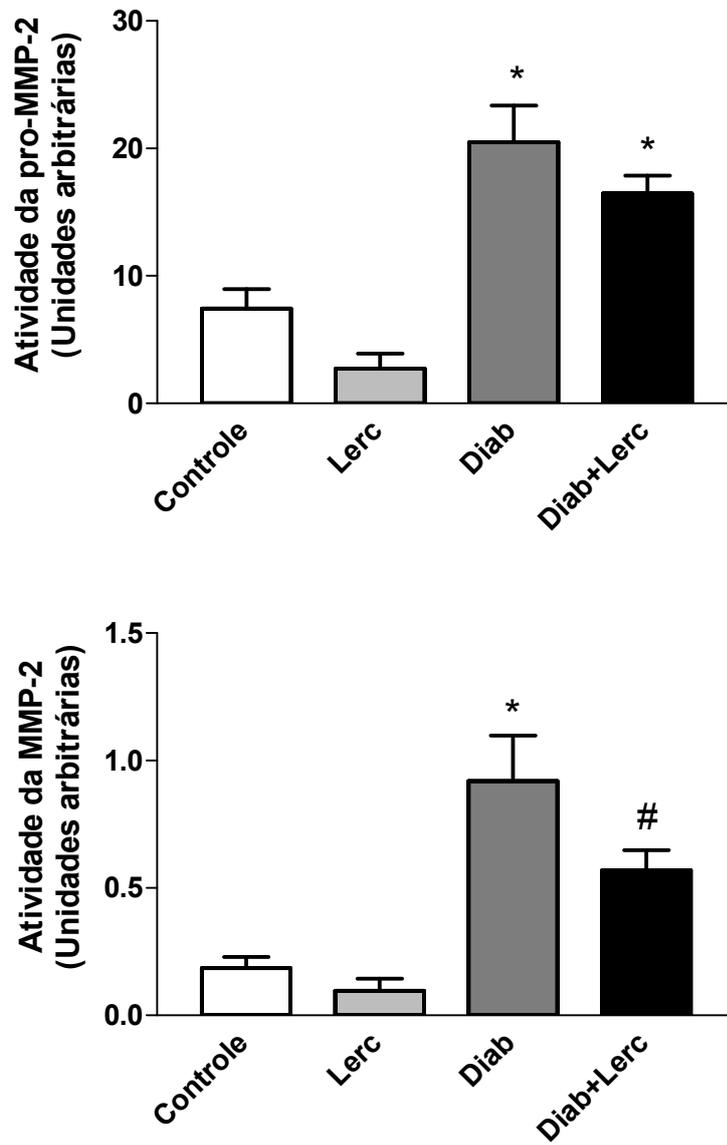


Gráfico 10 - Valores de atividade da pro-MMP-2 e MMP-2 da aorta.

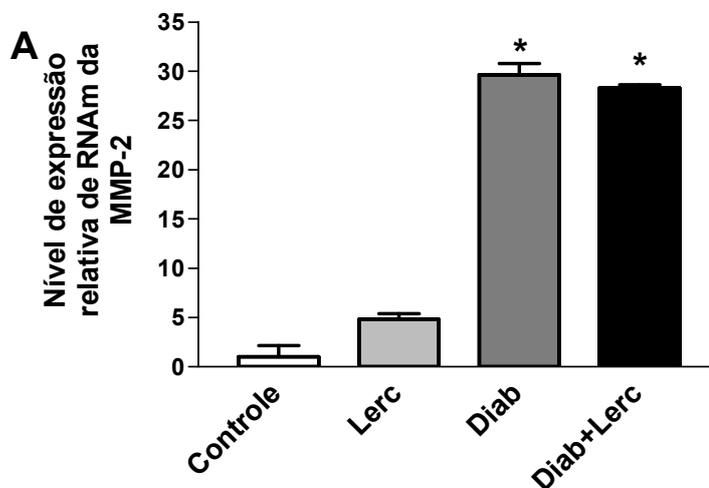
Dados são mostrados como média \pm E.P. (n= 8-12 por grupo).

* P<0.01 versus grupo Controle

P<0.05 versus Diab e grupo Controle.

Lercanidipina preveniu o aumento na taxa de relação da expressão de MMP-2/TIMP-2 associado com a diabetes

Nós avaliamos a expressão de RNAm da MMP-2 e TIMP-2 na aorta torácica utilizando um RT-PCR quantitativo em tempo real. Os animais dos grupos Diab e Diab+Lerc apresentaram um aumento de aproximadamente 30 vezes nos níveis de RNAm da MMP-2 comparados com os animais do grupo controle ($P < 0.001$; Gráfico 11A). Os níveis de RNAm de TIMP-2 foram encontrados cerca de 10 vezes maior no grupo Diab e, aproximadamente 33 vezes maior no grupo Diab+Lerc comparado com os animais do grupo controle (ambos $P < 0.001$; Gráfico 11B). Interessantemente, o tratamento com lercanidipina reverteu completamente o aumento de 16 vezes na taxa de relação da expressão de RNAm MMP-2/TIMP-2 associado com a diabetes ($P < 0.001$; Gráfico 11C).



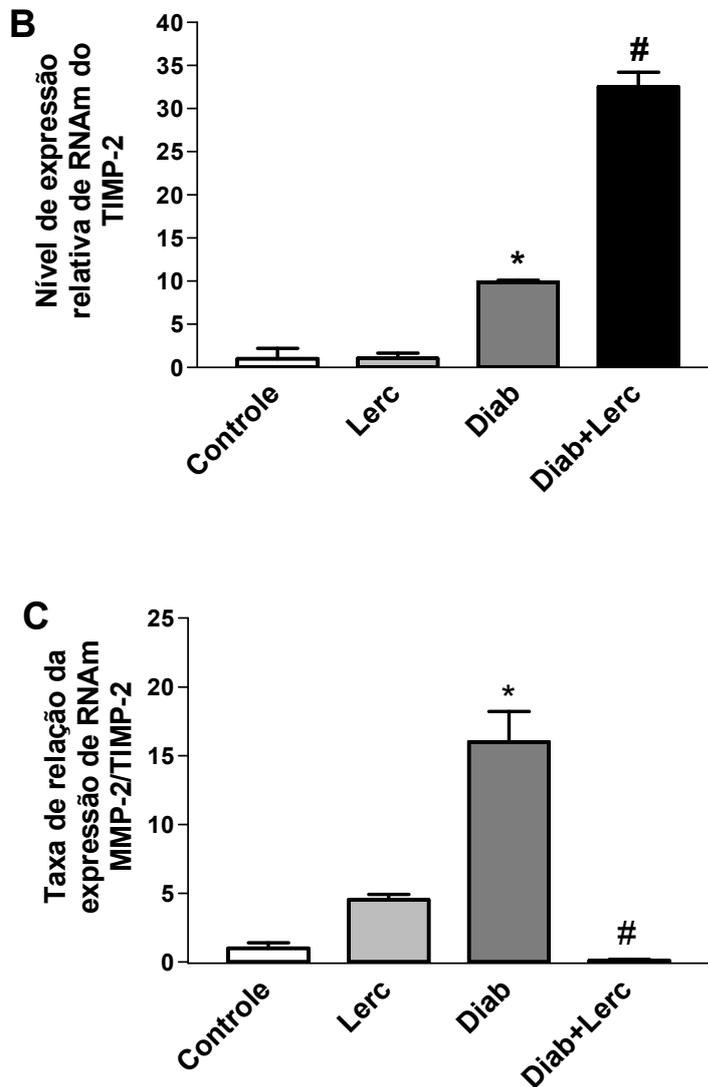


Gráfico 11 - Efeito da lercanidipina na expressão de RNAm da MMP-2 e TIMP-2 na aorta. Os níveis de RNAm de MMP-2 (painel A) e TIMP-2 (painel B) foram quantificadas por RT-PCR quantitativo em tempo real. Os resultados são apresentados como a expressão individual dos RNAsm com a normalização do gene housekeeping ACTB pelo uso do método Ct. Painel C mostra a taxa de relação MMP-2/TIMP-2.

Dados são mostrados como média \pm E.P. (n=6 por grupo)

* P<0.01 *versus* grupo Controle

.# P<0.001 *versus* Diab e grupo Controle

Tratamento com lercanidipina preveniu o aumento do estresse oxidativo associado com diabetes

Nós encontramos níveis aumentados de peróxidos lipídicos no grupo Diab comparado com os animais controle ($P < 0.05$; Gráfico 12). Entretanto, o tratamento com lercanidipina preveniu o aumento do estresse oxidativo, como sugerido por menores níveis plasmáticos no grupo Diab+Lerc comparado com o grupo Diab ($P < 0.05$; Gráfico 12).

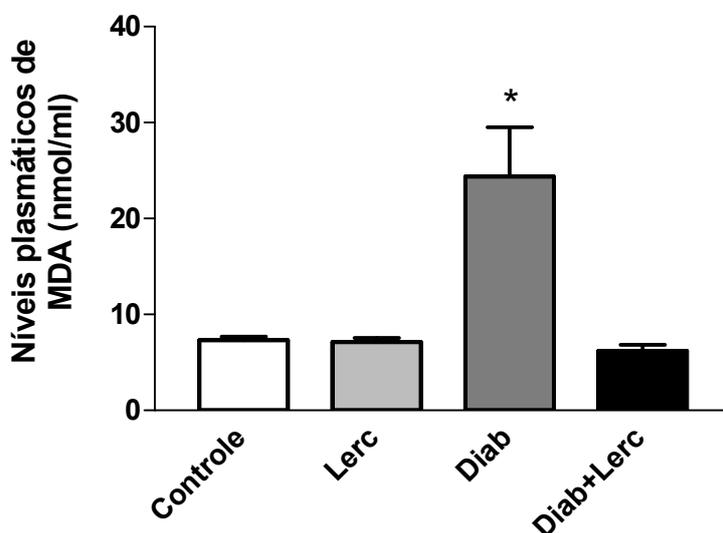


Gráfico 12 - Concentração das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico expressas em termos de malondialdeído (MDA; nmol/ml) no plasma, no final do período de estudo nos quatro grupos experimentais.

Dados são mostrados como média \pm E.P. (n=7-8 por grupo)

* $P < 0.05$ versus outros três grupos

Tabela 2 - Valores de pD2 e Emax para a vasodilatação dependente do endotélio induzida pela Ach, e relaxamento independente do endotélio induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS), nas preparações de anéis de aorta dos animais do Protocolo 2.

	Controle	Lerc	Diab	Diab+Lerc
pD2 Ach	6.91 ± 0.13	6.82 ± 0.12	6.22 ± 0.05*	5.81 ± 0.37
pD2 NPS	8.11 ± 0.03	8.14 ± 0.08	8.20 ± 0.04	8.22 ± 0.03
Emax Ach	98.4 ± 0.78	98.2 ± 0.48	40.2 ± 1.78*	93.2 ± 1.83 [#]
Emax NPS	97.7 ± 0.84	98.2 ± 0.48	96.7 ± 0.760	96.3 ± 0.84
N	6	6	6	6

Ratos controle receberam água. Valores são média Values ± E.P.

* P<0.001 *versus* grupo Controle.

P<0.001 *versus* Diab grupo.

5. Discussão

Protocolo 1: Hipertensão 2R-1C

Os principais achados deste protocolo são que:

- 1) lercanidipina produziu efeitos antihipertensivos e reverteu a disfunção endotelial associada com a hipertensão 2R-1C. Entretanto a lercanidipina não atenuou a hipertrofia da aorta;
- 2) lercanidipina não afetou o aumento na taxa de relação MMP-2/TIMP-2 induzido pela hipertensão 2R-1C;
- 3) lercanidipina reduziu o aumento no estresse oxidativo e a ativação da MMP-2 induzidos pela hipertensão 2R-1C.

A hipertensão está associada com alterações funcionais e estruturais bem conhecidas em ambas as artérias de condutância e resistência, que podem ser o resultado de hipertensão por longo período de tempo, ou então a causa da manutenção da hipertensão (Arribas e cols., 2006). De acordo com nossas observações prévias (Castro e cols., 2008), o aumento dos níveis e ativação da MMP-2 que foi encontrado no presente estudo é apoiado por achados similares em outros modelos experimentais de hipertensão (Bouvet e cols., 2005; Watts e cols., 2007; Castro e cols., 2008). Os mecanismos precisos que poderiam explicar como o aumento dos níveis de MMP-2 podem ter um papel nas alterações vasculares induzidas pela hipertensão ainda não são conhecidos. Entretanto, a evidência é relevante pela significância da MMP-2 em modular a contratilidade vascular (Fernandez-Patron e cols., 1999; 2000; Martinez e cols., 2004). Esta enzima contribui para os efeitos vasoconstritores da endotelina-1 (ET-1) por clivagem da big-ET-1 num peptídeo tão potente quanto à ET-1 (Fernandez-Patron e cols., 1999). Em adição, a MMP-2 também cliva um componente vasodilatador, o CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) (Fernandez-Patron e cols., 2000) e adrenomedulina (Martinez e cols., 2004), aumentando portanto a vasoconstrição. Além disso, um estudo feito por Lehoux e cols., 2004 mostrou que a atividade/expressão da MMP-2 está aumentada quando os vasos são submetidos a pressão

maior ou igual a 150 mmHg, o que indica também o importante papel da MMP-2 no remodelamento vascular em condições de pressão alta, bem como na patofisiologia de outras doenças cardiovasculares associadas à hipertensão.

Portanto, o aumento da expressão/ atividade da MMP-2 pode levar a uma menor vasodilatação ou aumentada vasoconstrição, contribuindo assim para a disfunção endotelial e aumento da resistência vascular na hipertensão (Moreau e Schiffrin, 2003; Lerman e cols., 2005).

Estes estudos prévios são consistentes com a idéia de que a lercanidipina possa ter revertido o comprometimento da resposta dependente de endotélio, e produzido um efeito antihipertensivo no presente estudo através de mecanismos envolvendo a inibição da MMP-2. Dando mais apoio a esta sugestão, a inibição da MMP-2 com doxiciclina reverteu o comprometimento das respostas a Ach dependente do endotélio, e foi associada com menores aumentos na pressão arterial em ratos com hipertensão renovascular 2R-1C (Castro e cols., 2008).

Comprometimentos da biodisponibilidade de NO, tanto por aumento da sua inativação (aumento do estresse oxidativo), como por redução da sua produção, parecem participar da fisiopatologia de várias doenças cardiovasculares, participando inclusive da fisiopatologia da hipertensão arterial (Cai e Harrison, 2000). Estudos em culturas de células do músculo liso vascular e artérias isoladas de ratos hipertensos, mostram que a produção de ROS está aumentada e a capacidade antioxidante está reduzida (Cuzzocrea e cols., 2004). Ambas as evidências experimental e clínica, sustentam um papel patofisiológico para ROS e estresse oxidativo no desenvolvimento e progressão da hipertensão, bem como de outras doenças (Cuzzocrea e cols., 2004).

Elevadas concentrações de ROS têm sido consistentemente mostradas em modelos animais de hipertensão e diabetes, bem como na hipertensão clínica e diabetes (Griendling e Fitzgerald, 2003).

Além disso, pode-se dizer que o estresse oxidativo aumentado é o principal fator que modula a expressão/ atividade da MMP-2 e MMP-9 (Van Den Steen e cols., 2002; Nelson e Melendez, 2004) e que ROS estejam envolvidos no remodelamento vascular via ativação de MMP (Grote e cols., 2003). O mecanismo pelo qual o estresse oxidativo leva a ativação das MMPs, envolve um ciclo vicioso, onde o estresse oxidativo, aumenta também os níveis níveis de citocinas, fatores de crescimento e neurohormônios. Os neurohormônios assim produzidos por estresse

oxidativo, tais como angiotensina II ajudam a aumentar o estresse oxidativo, por reduzir níveis de antioxidantes, tais como bradicinina e prostaglandina. Em paralelo a angiotensina II induz a NADPH oxidase, uma das enzimas responsáveis pela síntese de ROS, que então são liberados em maior quantidade. Por sua vez, ROS inativam os inibidores teciduais de metaloproteinases, o que culmina na ativação destas enzimas (Cox e cols., 2004).

Neste estudo, encontramos níveis plasmáticos aumentados de peróxidos lipídicos em ratos hipertensos, e este resultado é consistente com achados prévios que mostram um aumento das concentrações de ROS em modelo clínico e experimental de hipertensão (Griendling e cols., 2003). Em adição, os efeitos antioxidantes produzidos pela lercanidipina no presente estudo são suportados por estudos prévios mostrando efeitos antioxidantes da lercanidipina *in vitro* (Cominaci e cols., 2003), e em pacientes com hipertensão (Incandela e cols., 2001; Taddei e cols., 2003; Martinez e cols., 2004; 2006). Uma vez que as MMPs, incluindo a MMP-2 (Grote e cols., 2003), são ativadas por ROS (Ra e Parks, 2007), é possível que a lercanidipina possa ter atenuado o aumento da atividade da MMP-2, associado com a hipertensão renal 2R-1C como consequência de seus efeitos antioxidantes.

Quanto à atividade antioxidante da lercanidipina, é bem provável que esta diidropiridina exerça atividade antioxidante por doar elétrons aos radicais livres, reduzindo-os a formas não reativas. Por outro lado, a lercanidipina também pode afetar uma das fontes enzimáticas de ROS, tais como NADPH oxidase, xantina oxidase e ciclooxigenase reduzindo assim a produção intracelular destas espécies reativas de oxigênio (Cominacini e cols., 2003). Ao reduzir a produção de ROS, a lercanidipina pode estar reduzindo a atividade/ expressão das MMPS.

Enquanto outros CCBs, como a felodipina, lacidipina e amlodipina podem produzir também efeitos antioxidantes (Taddei e cols., 2001; Mason e cols., 2003), e melhoram a vasodilatação a acetilcolina (Taddei e cols., 2001), há apenas um estudo mostrando que a amlodipina diminuiu a expressão da MMP-2 em fibroblastos cardíacos de ratos (Yue e cols., 2004). Portanto, ainda precisa ser avaliado se outros CCBs podem afetar a atividade da MMP em modelo clínico e experimental de hipertensão.

Sendo assim, drogas antihipertensivas que poderiam retardar os mecanismos de progressão destas doenças (aumento do estresse oxidativo e ativação da MMP), como consequência de seus efeitos pleiotrópicos podem ser superiores a outras drogas antihipertensivas que podem simplesmente reduzir a pressão arterial (Bang e cols., 2003; Mason e cols., 2003). Entretanto, esta hipótese ainda necessita ser provada (Taddei e cols., 2002).

O aumento do estiramento e tensão mecânica, que são os principais estímulos para a hipertrofia das artérias de condutância na hipertensão, podem regular a atividade e expressão da MMP-2 nas VSMCs (Chesler e cols., 1999; Asanuma e cols., 2003; Grote e cols., 2003). A expressão e ativação aumentadas da MMP-2 na aorta de ratos hipertensos podem ter um importante papel nas alterações histológicas descritas no presente estudo. De fato, tem sido mostrado que a MMP-2 tem um papel chave no remodelamento vascular associado com a hipertensão, no modelo experimental 2R-1C ou em outros modelos experimentais de hipertensão (Bouvet e cols., 2005; Flamant e cols., 2007; Watts e cols., 2007; Castro e cols., 2008). Embora o tratamento com lercanidipina tenha atenuado a hipertensão 2R-1C no presente estudo, não foi encontrado efeito significativo na hipertrofia da parede da aorta associada com a hipertensão. Isto pode ser explicado pelo fato de que a terapia com a lercanidipina começou três semanas depois que a hipertensão 2R-1C foi induzida, e seis semanas de tratamento com lercanidipina podem não ter sido suficientes para reverter a hipertrofia da parede da aorta.

Confirmando achados prévios, a hipertensão 2R-1C foi associada com níveis aumentados de RNAm da MMP-2 (Castro e cols., 2008). Tratamento com lercanidipina, entretanto, não afetou o aumento da expressão de RNAm da MMP-2. A falta de efeito da lercanidipina no aumento da taxa de relação MMP-2/TIMP-2 nos ratos hipertensos indica que os efeitos benéficos produzidos pela lercanidipina no presente estudo não são explicados pela diminuição da expressão de MMP-2 e aumento da expressão de TIMP-2.

Protocolo 2: Diabetes Mellitus

Os principais achados deste estudo são que:

1) lercanidipina melhorou a hipertensão e reverteu a disfunção endotelial associada com a diabetes;

2) lercanidipina preveniu o aumento do estresse oxidativo associado com a diabetes;

3) embora a lercanidipina não tenha afetado o aumento da expressão de RNAm da MMP-2, este CCB produziu maiores aumentos nos níveis de expressão de RNAm do TIMP-2, revertendo assim completamente o aumento da relação MMP-2/TIMP-2 associado com a diabetes.

A disfunção endotelial comumente encontrada em pacientes diabéticos pode refletir comprometimento da parede do vaso, o que leva a aterosclerose e a eventos clínicos, com prognóstico não favorável (Schalkwijk e Stehouwer, 2005). Enquanto vários mecanismos têm sido propostos para explicar as alterações vasculares associadas com diabetes, o estresse oxidativo aumentado tem sido apontado como o principal contribuinte para estas alterações (Schalkwijk e Stehouwer, 2005; Ceriello e cols., 2006; Mehta e cols., 2006). A hiperglicemia e o aumento dos níveis plasmáticos de peróxidos lipídicos que foram encontrados em ratos diabéticos, é consistente com achados prévios em diabetes mellitus clínica ou experimental (Schalkwijk e Stehouwer, 2005; Ceriello e cols., 2006; Mehta e cols., 2006), e pode explicar, ao menos em parte, a resposta dependente do endotélio prejudicada como visto aqui e por outros estudos (Pinna e cols., 2001). Embora ainda não provado, a hiperglicemia e o aumento do estresse oxidativo podem ter causado a disfunção endotelial por aumento da expressão/ atividade da MMP-2, como sugerido pelo aumento de 3-5 vezes nos níveis da MMP-2 da aorta que foi encontrado em ratos diabéticos. Esta sugestão é apoiada por achados de estudos prévios mostrando aumento nos níveis/ atividade da MMP-2 em modelos experimentais de hipertensão, com resposta vasodilatadora dependente do endotélio prejudicada e remodelamento vascular (Bouvet e cols., 2005; Watts e cols., 2007; Castro e cols., 2008). Os mecanismos precisos que poderiam explicar como o aumento dos níveis/ atividade da MMP-2 poderiam levar a alterações vasculares

associadas com a diabetes ainda não são conhecidos (Derosa e cols., 2005; Signorelli e cols., 2005). Entretanto, conforme mencionamos acima (com relação aos nossos resultados do primeiro protocolo), há evidências indicando que a MMP-2 possa modular a contratilidade vascular (Fernandez-Patron e cols., 1999; 2000; Martinez e cols., 2004). Esta enzima contribui para com os efeitos vasoconstritores da endotelina-1 (ET-1) por clivagem (Fernandez-Patron e cols., 1999). Em adição, a MMP-2 também cliva um componente vasodilatador, o CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) (Fernandez-Patron e cols., 2000) e adrenomedulina (Martinez e cols., 2004), aumentando portanto a vasoconstrição. Portanto, o aumento da expressão/ atividade da MMP-2 pode levar a uma menor vasodilatação ou aumentada vasoconstrição, contribuindo assim para a disfunção endotelial, aumento da resistência vascular na hipertensão, como nós encontramos no presente estudo.

A Lercanidipina produziu efeitos antioxidantes no presente estudo, como sugerido por menores níveis plasmáticos de peróxidos lipídicos em ratos diabéticos que receberam lercanidipina, comparada com aqueles que receberam água (veículo). Este achado é suportado por estudos prévios mostrando efeitos antioxidantes da lercanidipina *in vitro* (Cominacini e cols., 2003), em pacientes com hipertensão (Incandela e cols., 2001; Taddei e cols., 2003; Martinez e cols., 2004) e em ratos diabéticos (Pinna e cols., 2001). Uma vez que as MMPs, incluindo a MMP-2 (Grote e cols., 2003), são ativadas por ROS (Ra e cols., 2007), é possível que a lercanidipina possa ter atenuado o aumento da atividade da MMP-2, associado com a diabetes induzida pela aloxana como consequência de seus efeitos antioxidantes. A atenuação do aumento da MMP-2 vascular pela lercanidipina, pode ter melhorado a função vascular e atenuado a hipertensão associada com a diabetes. Dando mais crédito a esta sugestão, a inibição da MMP-2 com doxiciclina reverteu o prejuízo das respostas a Ach dependente do endotélio, e foi associada com menores aumentos na pressão arterial em ratos com hipertensão renovascular 2R-1C (Castro e cols., 2008). Enquanto outros CCBs, como a felodipina, lacidipina e amlodipina podem produzir também efeitos antioxidantes (Taddei e cols., 2001; Mason e cols., 2003), e melhoram a vasodilatação a acetilcolina (Taddei e cols., 2001), há apenas um estudo mostrando que a amlodipina diminuiu a expressão da MMP-2 em fibroblastos cardíacos de ratos (Yue e cols., 2004). Portanto, ainda precisa ser avaliado se

outros CCBs podem afetar a atividade da MMP em molelo clínico e experimental de diabetes mellitus, e assim proteger a parede vascular.

Embora a lercanidipina não tenha afetado o aumento de 30 vezes nos níveis da expressão de RNAm da MMP-2 associado com diabetes no presente estudo, este CCB aumentou os níveis de RNAm do TIMP-2 em ratos diabéticos. Esta droga reverteu completamente o aumento em 15 vezes na taxa de relação MMP-2/TIMP-2 causado pela diabetes induzida pela aloxana. Estes resultados são importantes porque o TIMP liga-se às formas pro e ativa das MMPs, e o balanço entre as MMPs e TIMPs, determina a atividade proteolítica das MMPs (Knox e cols., 1997). Portanto estes achados sugerem que, em adição aos efeitos antioxidantes, a lercanidipina possa ter revertido a alteração no balanço entre MMP-2 e TIMP-2 causado pela diabetes induzido pela aloxana, e também são consistentes com a atenuação dos níveis da MMP-2 da aorta na diabetes induzida pela aloxana.

Resumidamente, o estudo apresentado sugere que a lercanidipina, além de reduzir a pressão arterial, pode produzir efeitos antioxidantes e atenuadores da ativação da MMP-2, o que pode se traduzir em menor progressão de lesões cardiovasculares associadas a hipertensão arterial e diabetes mellitus.

Não obstante, os achados obtidos neste estudo, ampliam achados clínicos previamente relatados na minha dissertação do mestrado, onde estudamos os efeitos da lercanidipina sobre o estresse oxidativo e atividade da MMP-9 em pacientes hipertensos e hipertensos diabéticos. Neste estudo pudemos observar que o tratamento com a lercanidipina diminuiu o estresse oxidativo e atividade plasmática da fração ativa da MMP-9 em pacientes hipertensos e hipertensos diabéticos (Martinez e cols., 2006).

E por fim, algumas limitações do nosso estudo devem ser levadas em consideração. Primeiramente nós avaliamos a aorta, que tem pouco impacto na pressão sanguínea. Além disso, outros estudos devem ser feitos em artérias de resistência. Outra limitação é que o modelo 2R-1C de hipertensão, e a diabetes induzida por aloxana podem não reproduzir todas as alterações que acontecem na hipertensão ou diabetes mellitus clínica. Seria interessante portanto, examinar a hipótese do presente estudo em outros modelos animais de hipertensão e diabetes mellitus. Além do mais, seria interessante examinar também se outros CCBs produzem tais efeitos.

6. Conclusões

Em conclusão, nossos resultados sugerem primeiramente que há aumento do estresse oxidativo, e atividade/ expressão da MMP-2 nos dois modelos experimentais estudados.

Além disso, pudemos observar que a lercanidipina produziu efeitos antihipertensivos e reverteu a disfunção endotelial associada com a hipertensão 2R-1C e diabetes mellitus induzida pela aloxana, provavelmente através de mecanismos envolvendo efeitos antioxidantes, o que levaria a uma menor ativação da MMP-2.

Portanto, nossos achados sugerem que as drogas antihipertensivas com atividade antioxidante, incluindo a lercanidipina, podem inibir a ativação da MMP-2 e colaborar na prevenção a aterosclerose.

7. Referências Bibliográficas

- ACANFORA D, TROJANO L, GHEORGHIAD E M, PICONE C, FURGI C, GIULIANO F, MAESTRI R, RENGO F. A randomized, double-blind comparison of 10 and 20 mg lercanidipine in patients with stable effort angina: effects on myocardial ischemia and heart rate variability. *Am J Ther* **9(5)**:44-53; 2002.
- AMBROSINI E, CIRCO A. Activity of lercanidipine administered in single and repeated doses once daily as monitored over 24 hours in patients with mild to moderate essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* **29**:S16-S20; 1997.
- ARRIBAS SM, HINEK A, GONZALEZ MC. Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacol Ther* **111**:771-791; 2006.
- ASANUMA K, MAGID R, JOHNSON C, NEREM RM, GALIS ZS, O'CALLAGHAN CJ, WILLIAMS B. Uniaxial strain upregulates matrix-degrading enzymes produced by human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**:H1778-1784; 2003.
- ASSMANN G, CULLEN P, JOSSA F, LEWIS B, MANCINI M. Coronary heart disease: reducing the risk: the scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease. A worldwide view. International Task force for the Prevention of Coronary Heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**:1819-24; 1999.
- BANG LM, CHAPMAN TM, GOAL KL. Lercanidipine: A review of its efficacy in the Management of Hypertension. *Drugs* **63**:2450-60; 2003.
- BAUERSACHS J, BOULOUMIE A, FRACCAROLLO D, HU K, BUSSE R, ERTIL G. Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production. *Circulation* **100**:292-8; 1999.
- BAUMBACH GL, HEISTAD DD. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension* **13(6 Pt 2)**:968-72; 1989.

- BELLEGUIC C, CORBEL M, GERMAIN N, LERNA H, BOICHOT E, DELAVAL P, LAGENTE V. Increased release of matrix metalloproteinase-9 in the plasma of acute severe asthmatic patients. *Clin Exp Allergy* **32**:217-23; 2002.
- BERKELS R, EGINK G, MARSEN TA, BARTELS H, ROESEN R, KLAUS W. Nifedipine Increases Endothelial Nitric Oxide Bioavailability by antioxidative mechanisms. *Hypertension* **37**:240-5; 2001.
- BODE W, MASKOS K. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biol Chem* **384(6)**:863-72; 2003.
- BORGHI C. Lercanidipine in hypertension. *Vasc Health Risk Manag* **1**:173-182; 2005.
- BORASO A, FERRARI. Calcium Channels: multiplicity, function and origin. *Cardiologia* **42(12)**:1237-44; 1997.
- BOUVET C, GILBERT LA, GIRARDOT D, DEBLOIS D, MOREAU P. Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition. *Hypertension* **45(3)**:432-7; 2005.
- BRINCKERHOFF CE, MATRISIAN LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:207-14; 2002.
- CAI H, HARRISON DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases – The role of oxidant stress. *Circ Res* **87**:840; 2000.
- CANAVESI M, BALDINI N, LEONARDI A, SIRONI G, BELLOSTA S, BERNINI F. In vitro inhibitory effect of lercanidipine on cholesterol accumulation and matrix metalloproteinases secretion by macrophages. *J Cardiovasc Pharmacol* **44(4)**:416-22; 2004.
- CASTRO MM, RIZZI E, FIGUEIREDO-LOPES L, FERNANDES K, BENDHACK LM, PITOL DL, GERLACH RF, TANUS-SANTOS JE. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. *Atherosclerosis* **198(2)**:320-31; 2008.
- CASTRO MM, RIZZI E, RASCADO RR, NAGASSAKI S, BENDHACK LM, TANUS-SANTOS JE. Atorvastatin enhances sildenafil-induced vasodilation through nitric oxide-mediated mechanisms. *Eur J Pharmacol* **498**:189-194; 2004.

- CAU SB, DIAS-JUNIOR CA, MONTENEGRO MF, DE NUCCI G, ANTUNES E, TANUS-SANTOS JE. Dose-dependent beneficial hemodynamic effects of BAY 41-2272 in a canine model of acute pulmonary thromboembolism. *Eur J Pharmacol* **581(1-2)**:132-7; 2008.
- CERBAI E, SARTIANI L, DEPAOLI P, MATUCCI R, DAVOLI G, DICIOLLA F, LISI G, MACCHERINI M, SANI G, MUGELLI A. Electrophysiologic effects of lercanidipine on repolarizing potassium currents. *J Cardiovasc Pharmacol* **36**:584-91; 2000.
- CERIELLO A. Controlling oxidative stress as a novel molecular approach to protecting the vascular wall in diabetes. *Curr Opin Lipidol* **17**:510-518; 2006.
- CHESLER NC, KU DN, GALIS ZS. Transmural pressure induces matrix-degrading activity in porcine arteries ex vivo. *Am J Physiol* **277**:H2002-2009; 1999.
- CHUNG AW, HSIANG YN, MATZKE LA, MCMANUS BM, VAN BREEMEN C, OKON EB. Reduced expression of vascular endothelial growth factor paralleled with the increased angiostatin expression resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human type 2 diabetic arterial vasculature. *Circ Res* **99(2)**:140-8; 2006.
- COHUET G, STRUIJKER-BOUDIER H. Mechanisms of target organ damage caused by hypertension: therapeutic potential. *Pharmacol Ther* **111**:81-98; 2006.
- COMINACINI L, FRATTA PASINI A, GARBIN U, PASTORINO AM, DAVOLI A, NAVA C, CAMPAGNOLA M, ROSSATO P, LO CASCIO V. Antioxidant activity of different dihydropyridines. *Biochem Biophys Res Commun* **302**:679-684; 2003.
- CORSINI A, ACCOMAZZO MR, CANAVESI M, SARTANI A, TESTA R, CATAPANO AL, FUMAGALLI R, PAOLETTI R, BERNINI F. The new antagonist lercanidipine and its enantiomers affect major processes of atherogenesis in vitro: is calcium entry involved. *Blood Press Suppl* **2**:18-22; 2002.
- COX MJ, HAWKINS UA, HOIT BD, TYAGI SC. Attenuation of Oxidative Stress and Remodeling by Cardiac Inhibitor of Metalloproteinase Protein Transfer. *Circulation* **109**:2123-8; 2004.
- CRESPI F, VECCHIATO E, LAZZARINI C, GAVIRAGHI G. Electrochemical evidence that lacidipine stimulates release of nitrogen monoxide in rat aorta. *Neuroscience Letters* **298**:171-4; 2001.

- CROWTHER M, GOODALL S, JONES JL, BELL PR, THOMPSON MM. Localization of matrix metalloproteinase 2 within the aneurysmal and normal aortic wall. *Br J Surg* **87(10)**:1391-400; 2000.
- CUZZOCREA S, MAZZON E, DUGO L, DI PAOLA R, CAPUTI AP, SALVEMINI D. Superoxide: a key player in hypertension. *Faseb J* **18**:94-101; 2004.
- DAO HH, LEMAY J, DE CHAMPLAIN J, DEBLOIS D, MOREAU P. Norepinephrine-induced aortic hyperplasia and extracellular matrix deposition are endothelin-dependent. *J Hypertens* **19**:1965-1973; 2001.
- DEATH AK, FISHER EJ, McGRATH KCY, YUE DK. High glucose alters matrix metalloproteinase expression in two key vascular cells: potential impact on atherosclerosis in diabetes. *Atherosclerosis* **168**:263-9; 2003.
- DE SOUZA AP, GERLACH RF, LINE SR. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dent Mater* **16(2)**:103-8; 2000.
- DEROSA G, AVANZINI MA, GEROLDI D, FOGARI R, LORINI R, DE SILVESTRI A, TINELLI C, RONDINI G, D'ANNUNZIO G. Matrix metalloproteinase 2 may be a marker of microangiopathy in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* **70**:119-125; 2005.
- DEROSA G, D'ANGELO A, TINELLI C, DEVANGELIO E, CONSOLI A, MICCOLI R, PENNO G, DEL PRATO S, PANIGA S, CICERO AF. Evaluation of metalloproteinase 2 and 9 levels and their inhibitors in diabetic and healthy subjects. *Diabetes Metab* **33**:129-134; 2007.
- DOGGRELL SA, BROWN L. Rat model of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovascular Research* **39**:89-105; 1998.
- DOMINICZAK AF, BOHR DF. Nitric Oxide and its putative role in hypertension. *Hypertension* **25**:1202-11; 1995..
- FAXON DP, FUSTER V, LIBBY P, BECKMAN JA, HIATT WR, THOMPSON RW. Atherosclerotic vascular disease conference: Writing Group III: pathophysiology. *Circulation* **109**:2617-25; 2004.
- FERNANDEZ-PATRON C, RADOMSKI MW, DAVIDGE ST. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res* **85**:906-911; 1999.

- FERNANDEZ-PATRON C, STEWART KG, ZHANG Y, KOIVUNEN E, RADOMSKI MW, DAVIDGE ST. Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. *Circ Res* **87**:670-676; 2000.
- FERREIRA C. Doenças cardiovasculares, aterosclerose e fatores de riscos. Disponível em: <http://www.unifesp.br/dmed/cardio/ch/cardio/htm> acesso [19/10/2001](http://www.unifesp.br/dmed/cardio/ch/cardio/htm).
- FLAMANT M, PLACIER S, DUBROCA C, ESPOSITO B, LOPES I, CHATZIANTONIOU C, TEDGUI A, DUSSAULE JC, LEHOUX S. Role of matrix metalloproteinases in early hypertensive vascular remodeling. *Hypertension* **50**:212-218; 2007.
- FORTE P, COPLAND M, SMITH LM, MILNE E, SUTHERLAND J, BENJAMIN N. Basal Nitric Oxide Synthesis in Essential Hypertension. *Lancet* **349**:837-42; 1997.
- FURLONG B, HENDERSON AH, LEWIS MI, SMITH JA. Endothelium-derived Relaxing Factor Inhibits in vivo Platelet Aggregation. *Br J Pharmacol* **90**:687-92; 1987.
- GALIS ZS, KHATRI JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* **90**:251-262; 2002.
- GALIS ZS, SUKHOVA GK, LARK MW, LIBBY P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* **94(6)**:2493-503; 1994.
- GAN LM, SELIN-SJOGREN L, DOROUDI R, JERN S. Temporal regulation of endothelial ET-1 and eNOS expression in intact human conduit vessels exposed to different intraluminal pressure levels at physiological shear stress. *Cardiovasc Res* **48(1)**:168-77; 2000.
- GERLACH RF, UZUELLI JA, SOUZA-TARLA CD, TANUS-SANTOS JE. Effect of anticoagulants on the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Anal Biochem* **344**:147-149; 2005.
- GERLACH RF, DEMACQ C, JUNG K, TANUS-SANTOS JE. Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. *Clin Biochem* **40**:119-123; 2007.

- GOLDBLATT H, LYNCH J, HAMZAL RF, SUMMERVILLE WW. Studies on experimental hypertension. I. the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med* **59**:347-79; 1934.
- GRESS TW, NIETO FJ, SHAHAR E, WOFFORD MR, BRANCATI FL. Hypertension and antihypertensive therapy as risk factors for type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* **342**:905-12; 2000.
- GRIENGLING KK, FITZGERALD GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation* **108**:2034-2040; 2003.
- GROTE K, FLACH I, LUCHTEFELD M, AKIN E, HOLLAND SM, DREXLER H, SCHIEFFER B. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Circ Res* **92**:e80-86; 2003.
- GUARNERI L, ANGELICO P, IBBA M, POGGESI E, TADDEI C, LEONARDI A, TESTA R, FORSCH A. Pharmacological in vitro studies of the new 1,4-dihydropyridine calcium antagonist lercanidipine. *Drug Res* **46**:15-24; 1996.
- HIYOSHI H, YAYAMA K, TAKANO M, OKAMOTO H. Angiotensin type 2 receptor-mediated phosphorylation of eNOS in the aortas of mice with 2-kidney, 1-clip hypertension. *Hypertension* **45(5)**:967-73; 2005.
- HOJO Y, IKEDA U, UENO S, ARAKAWA H, SHIMADA K. Expression of matrix metalloproteinases in patients with acute myocardial infarction. *Jpn Circ J* **65(2)**:71-5; 2001.
- INCANDELA L, BELCARO G, CESARONE MR, DE SANCTIS MT, GRIFFIN M, CACCHIO M, NICOLAIDES A. N, BUCCI M, BARSOTTI A, MARTINES G, CORNELLI U, DI RENZO A. Oxygen-free radical decrease in hypertensive patients treated with lercanidipine. *Int Angiol* **20**:136-140; 2001.
- IZZO JL, BLACK HR. Hypertension Primer – The Essentials of High Blood Pressure. From the Council on High Blood Pressure Research. *American Heart Association* **2**:1-471; 1998.
- JALIUS S. Sympathetic hyperactivity and coronary risk in hypertension. *Hypertension* **21**:886-93; 1993.
- JENKINS GM, CROW MT, BILATO C, GLUZBAND Y, RYU WS, LI Z. Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase and preferential localization of matrix metalloproteinase-2 to the neointima of balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation* **97(1)**:82-90; 1998.

- JOHNSON C, GALIS ZS. Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24(1)**:54-60; 2004.
- JOSHI MS, PONTHER JL, LANCASTER JR. Cellular antioxidant and pro-oxidant actions of nitric oxide. *Free Rad Biol Med* **27**:1357-66; 1999.
- KADOGLOU NP, DASKALOPUOLOU SS, PERREA D, LIAPIS CD. Matrix metalloproteinases and diabetic vascular complications. *Angiol* **56**:173-189; 2005.
- KAI H, IKEDA H, YASUKAWA H, KAI M, SEKI Y, KUWAHARA F. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* **32(2)**:368-72; 1998.
- KIM YM, BERGONHA HA, LANCASTER JR. Nitrogen oxide-induced autoprotection in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett* **374**:228-32; 1995.
- KITAKAZE M, ASANUMA H, TAKASHIMA S, MINAMINO T, UEDA Y, SAKATA Y, ASAKURA M, SANADA S, KUZUYA T, HORI M. Nifedipine-induced coronary vasodilation in ischemic hearts is attributable to bradykinin- and NO-dependent mechanisms in dogs. *Circulation* **101**:311-7; 2000.
- KNOX JB, SUKHOVA GK, WHITTEMORE AD, LIBBY P. Evidence for altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in human aortic diseases. *Circulation* **95**:205-212; 1997.
- KUBES P, SUZUKI M, GRANGER DN. Nitric Oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:4651-5; 1991.
- KUGIYAMA K, YASSUE H, OKUMURA K, OGAWA H, FUJIMOTO K, NAKAO K, YOSHIMURA M, MOTOYAMA T, INOBE Y, KAWANO H. Nitric Oxide activity is deficient in spasm arteries of patients with coronary spastic angina. *Circulation* **94**:266-72; 1999.
- LAAKSO M, LEHTO S. Epidemiology of risk factors for cardiovascular disease in diabetes and impaired glucose tolerance. *Atherosclerosis* **137**:S65-S73; 1998.
- LAPENNA D, CIOFANI G, PIERDOMENICO SD, GIAMBERARDINO MA, CUCCURULLO F. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. *Free Rad Biol Med* **31**:331-5; 2001.

- LAURSEN JB, SOMERS M, JURZ S M, WARNHOLTZ A, MCCANN L, FREEMAN B, TARPEY M, FUKAI T, HARRISON D. Endothelial regulation of vasomotion in Apo(E)-deficiente mice: implication for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* **103(9)**:1282-8; 2001.
- LEFER AM. Nitric Oxide nature's naturally occurring leukocyte inhibitor. *Circulation* **95**:553-4; 1997.
- LEHOUX S, LEMARIÉ CA, ESPOSITO B, LIJNEN HR, TEDGUI A. Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling. *Circulation* **109(8)**:10141-7; 2004.
- LERCO MM, SPADELLA CT, MACHADO JLM, SCHELLINI SA, PADOVANI CR. Caracterização de um modelo experimental de *Diabetes mellitus*, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. *Acta Cir Bras* **18(2)**:133-142; 2003.
- LERMAN LO, CHADE AR, SICA V, NAPOLI C. Animal models of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med* **146**:160-173; 2005.
- LIMA MA, LIMA LMB, RITA DPC, NAVARRO FC, TATSUKAWA RS, PEREIRA GA, REIS LC, ABREU MEA & BORGESMF. Análise quantitativa das células das ilhotas pancreáticas em ratos sob efeito de aloxana. *Medicina* **34**:308-14; 2001.
- LINDER L, KIWISK W, BUHLER FR, LUSCHER TF. Indirect evidence for release of endothelial-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo. Blunted response in essential hypertension. *Circulation* **81**:1762-7; 1990.
- LOPEZ B, GONZALEZ A, DIEZ J. Role of matrix metalloproteinases in hypertension-associated cardiac fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **13**:197-204; 2004.
- LOSCALZO J, WELCH G. Nitric Oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis* **38**:87-104; 1995.
- MANCIA G, OMBONI S, ZANCHETTI A. Clinical advantages of lipophilic dihydropyridines. *Blood Press* **2**:23-26 1998.
- MARTINEZ A, OH HR, UNSWORTH EJ, BREGONZIO C, SAAVEDRA JM, STETLER-STEVENSON WG, CUTTITTA F. Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. *Biochem J* **383**:413-418; 2004.
- MARTINEZ-MALDONADO M. Pathophysiology of renovascular hypertension. *Hypertension* **17(5)**:707-19; 1991.

- MARTINEZ ML, LOPES LF, COELHO EB, NOBRE F, ROCHA JB, GERLACH RF, TANUS-SANTOS JE. Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-9 activity in patients with hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* **47**:117-122; 2006.
- MASON RP, MARCHE P, HINTZE TH. Novel vascular biology of third-generation L-type calcium channel antagonists: ancillary actions of amlodipine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**:2155-2163; 2003.
- McCLELLAN KJ, JARVIS B. Lercanidipine – A review of its use in hypertension. *Drugs* **5**:1123-40; 2000.
- MEHTA JL, RASOULIN, SINHA AK, MOLAVI B. Oxidative stress in diabetes: a mechanistic overview of its effects on atherogenesis and myocardial dysfunction. *Int J Biochem Cell Biol* **38**:794-803; 2006.
- MENG X, MAVROMATIS K, GALIS ZS. Mechanical stretching of human saphenous vein grafts induces expression and activation of matrix-degrading enzymes associated with vascular tissue injury and repair. *Exp Mol Pathol* **66(3)**:227-37; 1999.
- MOREAU P, SCHIFFRIN EL. Role of endothelins in animal models of hypertension: focus on cardiovascular protection. *Can J Physiol Pharmacol* **81**:511-521; 2003.
- NAGASE H, WOESSNER JF, JR. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* **274(31)**:21491-4; 1999.
- NELSON KK, MELENDEZ JA. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radic Biol Med* **37**:768-784; 2004.
- NEWBY AC, SOUTHGATE KM, DAVIES M. Extracellular matrix degrading metalloproteinases in the pathogenesis of arteriosclerosis. *Basic Res Cardiol* **89(Suppl 1)**:59-70; 1994.
- OPDENAKKER G, VAN DEN STEEN PE, DUBOIS B, NELISSEN I, VAN COILLIE E, MASURE S, PROOST P, VAN DAMME J. Gelatinase B functions as regulator and effector in leucocyte biology. *J Leukoc Biol* **69**:851; 2001.
- PALEI ACT, ZANETI RAG, FORTUNA GM, GERLACH RF, TANUS-SANTOS JE. Hemodynamic benefits of matrix metalloproteinase-9 inhibition by doxycycline during experimental acute pulmonary embolism. *Angiology* **56(5)**: 611-7; 2005.
- PANZA JA, QUYYUMI AA, BRUSH JE, JR., EPSTEIN SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* **323(1)**:22-7; 1990.

- PINNA C, CIGNARELLA A, ZANARDO R, BOLEGO C, PUGLISI L. Gender differences and antioxidant treatment affect aortic reactivity in short-term diabetic rats. *Eur J Pharmacol* **431**:71-79; 2001.
- PRANDIN MG, CICERO AF, VERONESI M, COSENTINO E, DORMI A, STROCCHI E, BORGHI C. Persistence on treatment and blood pressure control with different first-line antihypertensive treatments: a prospective evaluation. *Clin Exp Hypertens* **29**:553-562; 2007.
- RACHMANI R, LEVI Z, ZADOK BS, RAVID M. Losartan and lercanidipine attenuate low-density lipoprotein oxidation in patients with hypertension and type 2 diabetes mellitus: a randomized, prospective crossover study. *Clin Pharmacol Ther* **72**:302-307; 2002.
- RADOMSKI MW, REES DD, DUTRA A, MONCADA S. S-nitroso-glutathione inhibits Platelet Activation in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* **107**:745-9; 1992.
- RA HJ, PARKS WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol* **26**:587-596; 2007.
- RAFFETTO JD, KHALIL RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Bioc Pharm* **75**: 346-359; 2008.
- RAJAGOPALAN S, MENG XP, RAMASAMY S, HARRISON DG, GALIS ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* **98**:2572-2579; 1996.
- RAY JM, STETLER-STEVENSON WG. The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* **7(11)**:2062-72; 1994.
- RERUP CC. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmac Rev* **22**:485-518; 1970.
- RUIZ MA. Diabetes é doença que atinge 5 milhões de pessoas no país. Disponível em: <http://www.miranet.com.br/medicina/endocri.htm> acesso 22/10/20001.
- SABBATINI M, VITAIOLI L, BALDONI E, AMENTA F. Nephroprotective effect of treatment with calcium channel blockers in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* **294**:948-954; 2000.
- SASE K, MICHEL T. Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. *Life Sci* **57(22)**:2049-55; 1995.

- SAVOIA C, SCHIFFRIN EL. Inhibition of the renin angiotensin system: implications for the the endothelium. *Curr Diab Rep* **6(4)**:274-8; 2006.
- SCHALKWIJK CG, STEHOUWER CD. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci (Lond)* **109**:143-159; 2005.
- SHIAU MY, TSAI ST, TSAI KJ, HAUNG ML, HSU YT, CHANG YH. Increased circulatory MMP-2 and MMP-9 levels and activities in patients with type 1 diabetes mellitus. *Mt Sinai J Med* **73(7)**:1024-8; 2006.
- SIGNORELLI SS, MALAPONTE G, LIBRA M, DI PINO L, CELOTTA G, BEVELACQUA V, PETRINA M, NICOTRA GS, INDELICATO M, NAVOLANIC PM, PENNISI G, MAZZARINO MC. Plasma levels and zymographic activities of matrix metalloproteinases 2 and 9 in type II diabetics with peripheral arterial disease. *Vasc Med* **10**:1-6; 2005.
- SIRONI G, MONTAGNA E, GRETO L, BIANCHI G, LEONARDI A, TESTA R. Antihypertensive effects of lercanidipine in experimental hypertensive rats and dogs. *Drug Res* **46**:145-52; 1996.
- SOUZA-COSTA DC, FIGUEIREDO-LOPES L, ALVES-FILHO JC, SEMPRINI MC, GERLACH RF, CUNHA FQ, TANUS-SANTOS JE. Protective effects of atorvastatin in rat models of acute pulmonary embolism: involvement of matrix metalloproteinase-9. *Crit Care Med* **35**:239-245; 2007.
- SOUZA-COSTA DC, ZERBINI T, PALEI AC, GERLACH RF, TANUS-SANTOS JE. L-arginine attenuates acute pulmonary embolism-induced increases in lung matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9. *Chest* **128**:3705-3710; 2005.
- SOUZA-TARLA CD, UZUELLI JA, MACHADO AA, GERLACH RF, TANUS-SANTOS JE. Methodological issues affecting the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Clin Biochem* **38**:410-414; 2005.
- SPINALE FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* **90(5)**:520-30; 2002.
- STOSCHECK CM. Quantitation of protein. *Methods Enzymol* **182**:50-68; 1990.
- TABRIZCHI R. Amlodipine and endothelial nitric oxide synthase activity. *Cardiovasc Res* **58**:807-9; 2003.

- TADDEI S, VIRDIS A, GHIADONI L, MAGAGNA A, PASINI AF, GARBIN U, COMINACINI L, SALVETTI A. Effect of calcium antagonist or beta blockade treatment on nitric oxide-dependent vasodilation and oxidative stress in essential hypertensive patients. *J Hypertens* **19**:1379-1386; 2001.
- TADDEI S, VIRDIS A, GHIADONI L, SUDANO I, SALVETTI A. Effects of antihypertensive drugs on endothelial dysfunction: clinical implications. *Drugs* **62**:265-284; 2002.
- TADDEI S, VIRDIS A, GHIADONI L, VERSARI D, SALVETTI G, MAGAGNA A, SALVETTI A. Calcium antagonist treatment by lercanidipine prevents hyperpolarization in essential hypertension. *Hypertension* **41**:950-955; 2003.
- TAYEBJEE MH, NADAR S, BLANN AD, GARETH BEEVERS D, MACFADYEN RJ, LIP GY. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hypertension and their relationship to cardiovascular risk and treatment: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT). *Am J Hypertens* **17**:764-9; 2004 (a).
- TAYEBJEE MH, LIM HS, MACFADYEN RJ, LIP GY. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in type 2 diabetes: effect of 1 year's cardiovascular risk reduction therapy. *Diabetes Care* **27**:2049-51; 2004 (b).
- TAYEBJEE MH, NADAR SK, MACFADYEN RJ, LIP GY. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-9 levels in patients with hypertension. Relationship to tissue Doppler indices of diastolic relaxation. *Am J Hypertens* **17**:770-4; 2004 (c).
- TAYEBJEE MH, MACFADYEN RJ, LIP GY. Extracellular matrix biology: a new frontier in linking the pathology and therapy of hypertension? *J Hypertens* **21**:2211-8; 2003.
- TOMASSONI D, SABBATINI M, AMENTA F. Effect of different dihydropyridine-type Ca^{2+} antagonists on left ventricle hypertrophy and coronary changes in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* **41**:544-552; 2003.
- TORQUATO MT, MONTENEGRO JRM, VIANA LA, DE SOUZA RA, LANNA CM, LUCAS JC, BIDURIN C, FOSS MC. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirão Preto (São Paulo), Brazil. *Sao Paulo Med J* **121**(6):224-30; 2003.

- TOUYZ RM, SCHIFFRIN EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Hist and Cell Biology* **122(4)**:339-52; 2004.
- TOYO-OKA T, NAYRER WG. Third generation calcium entry blockers. *Blood Press* **5**:206-8; 1996.
- UEMURA S, MATSUSHITA H, LI W, GLASSFORD AJ, ASAGAMI T, LEE KH, HARRISON DG, TSAO PS. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress. *Circ Res* **88**:1291-98; 2001.
- UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complication in the type 2 diabetes. UKPDS 38. *Br Med J* **317**:703; 1998.
- VAN DEN STEEN PE, DUBOIS B, NELISSEN I, RUDD PM, DWEK RA, OPDENAKKER G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit Rev Biochem Mol Biol* **37**:375-536; 2002.
- VAN ZWIETEN PA, MANCIA G. Third generation calcium antagonists: Further developments. *Blood Press* **5**:376-7; 1996.
- VERDECCHIA P, SCHILLACI G, BORGIONI C, CIUCCI A, GATTOBIGIO R, ZAMPI I, REBOLDI G, PORCELLATI C. Prognostic Significance of Serial Changes in Left Ventricular Mass in Essential Hypertension. *Circulation* **97**:48-54; 1998.
- VISSE R, NAGASE H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* **92(8)**:827-39; 2003.
- WALTER A, SELLOUM NE, SARR M, KANE MO, BERETZ A, KERTH VBC. Angiotensin II induces the vascular expression of VEGF and MMP-2 in vivo: preventive effect of red wine polyphenols. *J Vasc Res* **45**:386-94; 2008.
- WARD MR, PASTERKAMP G, YEUNG AC, BORST C. Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. *Circulation* **102(10)**:1186-91; 2000.
- WATTS SW, RONDELLI C, THAKALI K, LI X, UHAL B, PERVAIZ MH, WATSON RE, FINK GD. Morphological and biochemical characterization of remodeling in aorta and vena cava of DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**:H2438-48; 2007.
- WEBER MA. Calcium Channel Antagonists in the Treatment of Hypertension. *Am J Cardiovasc Drugs* **2(6)**:415-29; 2002.
- WEISS RB. Streptozotocin: a review of its pharmacology, efficacy, and toxicity. *Cancer Tret Reports* **66**:427-37; 1982

- WOLFF SP. Diabetes mellitus and free radical. *Brit Med Bull* **49**:642-52; 1993.
- YASMIN, MCENIERY CM, WALLACE S, DAKHAM Z, PULSALKAR P, MAKI-PETAJA K, ASHBY MJ, COCKCROFT JR, WILKINSON IB. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**:372; 2005.
- YAO SK, OBER JC, KRISNASWAMI A, FERGUSON J, ANDERSON HV, GOLINO P, BUIA LM, WILLERSON JT. Endogenous Nitric Oxide Protects Against Platelet Aggregation and Cyclic Flow Variations in Stenosed and Endothelium-injured Arteries. *Circulation* **86**:1302-9; 1992.
- YASUMITSU H, MIYAZAKI K, UMENISHI F, KOSHIKAWA N, UMEDA M. Comparison of extracellular matrix-degrading activities between 64-kDa and 90-kDa gelatinases purified in inhibitor-free forms from human schwannoma cells. *J Biochem* **111**(1):74-80; 1992.
- YUE H, UZUI H, SHIMIZU H, NAKANO A, MITSUKE Y, UEDA T, LEE JD. Different effects of calcium channel blockers on matrix metalloproteinase-2 expression in cultured rat cardiac fibroblasts. *J Cardiovasc Pharmacol* **44**:223-230; 2004.
- XU B, XIAO-HONG L, LIN G, QUEEN L, FERRO A. Amlodipine but not verapamil or nifedipine, dilates rabbit femoral artery largely through a nitric oxide-and kinin-dependent mechanism. *Br J Pharmacol* **136**:375-82; 2002.
- ZALBA G, BEAMOUNT FJ, SAN JOSE G, FORTUNO A, FORTUNO MA, ETAYO JC, DIEZ J. Vascular NADH/NAPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **35**:1055-61; 2000.
- ZATZ R, BAYLIS C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension* **32**(6):958-64; 1998.
- ZHANG B, YE S, HERRMANN SM, ERIKSSON P, DE MAAT M, EVANS A. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* **99**(14): 1778-94; 1999.
- V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial - SBC/SBH/SBN 2006.
- VII Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure 2003.

Anexo 1:

Termo da Comissão de Ética e Experimental Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Anexo 2:

Trabalho publicado durante a Realização do Projeto de Doutorado:

1. MARTINEZ ML, CASTRO MM, RIZZI E, FERNANDES K, DEMACQ C, BENDHACK LM, GERALCH RF, TANUS-SANTOS JE. Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-2 activity and reverses vascular dysfunction in renovascular hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology*, accepted in 22 June 2008.

Trabalho submetido durante a Realização do Projeto de Doutorado:

1. MARTINEZ ML, RIZZI E, CASTRO MM, FERNANDES K, BENDHACK LM, GERLACH RF, TANUS-SANTOS JE. Lercanidipine decreases vascular matrix metalloproteinase-2 activity and protects against vascular dysfunction in diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, submitted (04/2008).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)