

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

CARLA SPERONI CERON

**Efeitos da espironolactona e da hidroclorotiazida sobre
o estresse oxidativo e sobre a metaloproteinase-2 da
matriz extracelular na hipertensão renovascular**

Ribeirão Preto – SP

2009

CARLA SPERONI CERON

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Efeitos da espironolactona e da hidroclorotiazida sobre o estresse oxidativo e sobre a metaloproteinase-2 da matriz extracelular na hipertensão renovascular

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Ribeirão Preto

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADO A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Ceron, Carla Speroni

Efeitos da espironolactona e da hidroclorotiazida sobre o estresse oxidativo e sobre a metaloproteinase-2 da matriz extracelular na hipertensão renovascular. Ribeirão Preto, 2009.

81 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Tanus-Santos, José Eduardo.

1. Metaloproteinases. 2. Diuréticos. 3. Remodelamento vascular 4. Estresse oxidativo. 5. Hipertensão renovascular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carla Speroni Ceron

Efeitos da espironolactona e da hidroclorotiazida sobre o estresse oxidativo e sobre a metaloproteinase-2 da matriz extracelular na hipertensão renovascular.

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

Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em: _____

Banca examinadora:

Prof. : _____

Instituição: : _____ Assinatura: _____

Prof. : _____

Instituição: : _____ Assinatura: _____

Prof. : _____

Instituição: : _____ Assinatura: _____

*Dedico esse trabalho aos meus pais, pela
dedicação, amor e apoio incondicional*

AGRADECIMENTOS

`A minha família, que mesmo distante sempre estive ao meu lado, me apoiando e incentivando em todos os momentos.

`A Deus, que sempre me deu forças nos momentos difíceis.

Ao professor José Eduardo Tanus dos Santos pela orientação, confiança e oportunidade ensinamentos acadêmicos oferecidos.

Ao apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

`As professoras Raquel Fernanda Gerlach e Maria Cristina de Oliveira Salgado pelos ensinamentos acadêmicos.

Aos funcionários Jose Waldik Ramon, Fátima Helena Ferreira Petean e Sonia Maria Stefanelli pelo excelente auxílio técnico, colaboração e amizade.

`As amigas Élen e Michele que me acompanharam desde o início desse trabalho, pela amizade, ensinamentos e paciência.

Aos amigos do grupo de trabalho com hipertensão - Alisson, Danielle, Diogo, Jefferson e Marcelo M., pela ajuda nos experimentos e amizade. E ao Marcelo L. pelo apoio e companheirismo.

`As amigas Larissa e Paula, pelo apoio, amizade, compreensão, por dividir os momentos alegres e também os não tão alegres durante essa etapa.

`A todos os amigos do laboratório de farmacologia Cardiovascular, pela amizade e paciência.

`A todos os funcionários e amigos do departamento de Farmacologia pela amizade e serviços prestados.

*“A consciência de sabermos
mais nos leva a consciência
de sabermos pouco.”
(José Saramago)*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO24

1- Hipertensão arterial.....24

1.1- Modelo dois-rins, 1-clipe (2R-1C) de hipertensão arterial e sistema renina-angiotensina-aldosterona.....24

1.2- Remodelamento vascular.....25

2- Metaloproteinases.....27

2.1- Metaloproteinase-2 e hipertensão arterial.....28

3- Estresse oxidativo e hipertensão arterial.....32

4- Aldosterona e seu antagonista espironolactona.....34

5- Hidroclorotiazida.....36

HIPÓTESE39

OBJETIVOS41

MATERIAIS E MÉTODOS43

1- Considerações gerais43

1.1- Hipertensão arterial induzida pela técnica de Goldblatt.....	43
1.2- Grupos experimentais.....	43
2- Materiais	45
2.1- Soluções utilizadas nos experimentos	45
2.2- Drogas administradas diretamente nos animais	46
2.3- Equipamentos utilizados nos experimentos	47
2.4- Programas de aquisição de dados	47
3- Metodologia	48
3.1- Parâmetros hemodinâmicos	48
3.1.1- Avaliação da pressão arterial sistólica e peso corporal.....	48
3.1.2- Avaliação da reatividade vascular	48
3.2- Parâmetros estruturais.....	49
3.2.1- Análise morfológica da aorta	49
3.3- Parâmetros bioquímicos e moleculares.....	50
3.3.1- Determinação de espécies reativas de oxigênio vasculares e níveis plasmáticos de peroxidação lipídica.....	50
3.3.1.A – EROs <i>in situ</i>	50
3.3.1.B – Atividade da NADPH oxidase.....	51
3.3.1.C – Quantificação de peroxidação lipídica plasmática.....	51

3.3.2- Determinação dos níveis de MMP-2 por zimografia em gel.....	52
3.3.2.A- Dosagem de proteína pelo método de Bradford.....	53
3.3.2.B- Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%	53
3.3.3- Determinação da atividade gelatinolítica por zimografia <i>In situ</i>	54
3.3.4- Determinação da atividade gelatinolítica total por fluorimetria.....	55
3.3.5- Imunofluorescencia e Imunohistoquímica	56
3.3.5.A- Imunofluorescencia para MMP-2.....	56
3.3.5.B- Imunohistoquímica para MMP-2 e TIMP-2.....	56
4- Análise estatística	57
RESULTADOS	59
1- Efeitos dos tratamentos sobre a pressão arterial sistólica e peso corporal..	59
2- Tratamentos melhoram a função endotelial em ratos 2R-1C.....	61
3- Efeitos dos tratamentos sobre o remodelamento vascular em ratos 2R-1C.	63
4 - Efeitos dos tratamentos sobre as concentrações vasculares de EROs e nos níveis de peroxidação lipídica plasmáticos	66
5 - Efeitos dos tratamentos sobre os níveis e atividade de MMP-2.....	69
DISCUSSÃO	77
CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

2R-1C – Dois-rins, um-clipe

Ach – Acetilcolina

Ae – Área externa

Ai – Área interna

AM- Adrenomedulina

ANOVA – Análise de Variância

APS- Persulfato de amônio

AST- Área de secção transversal

Big-ET-1- Big endotelina 1

BSA- Albumina do soro bovino

CaCl₂- Cloreto de cálcio

CGRP- Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

DAB- 3-3' diaminobenzidina

DE- Diâmetro externo

DHE- Dihidroetídeo

DI- Diâmetro interno

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DQ gelatin- Substrato fluorescente para determinar a atividade gelatinolítica

EPHESUS- “Eplerenone Post-AMI Heart Failure Efficacy and Survival Study”

EPM- Erro padrão da média

EROS- Espécies reativas de oxigênio

ET1 – Endotelina 1

g- Gramas

µg- Microgramas

H⁺- Hidrogênio

H₂O₂- Peróxido de hidrogênio

i.p.- Intra peritoneal

HCl- Ácido clorídrico

HCTZ- Hidroclorotiazida

H&E- Hematoxilina e eosina

K⁺- Potássio

KCl- Cloreto de potássio

KDa- Quilodaltons

Kg- Quilograma

KH₂PO₄- Hidrogenofosfato de potássio

L- Litro

μL- Microlitros

L-NAME- N^G-nitro-L-arginina

M- Molar

mM- Milimolar

μmol- Micromol

mmol - Milimol

mL- Mililitros

mg- Miligramas

mmHg – Milímetros de mercúrio

MDA – Malonildialdeído

Média- Camada média

M/L- Razão média/lúmen

MMPs- Metaloproteinases

MgSO₄- Sulfato de magnésio

MT-MMPs- MMP de membrana

N- Número

nmol- Nanomol

Na⁺ - Sódio

NaCl- Cloreto de sódio

NADPH - β-Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato

NEM – N-etilmaleimida

NaHCO₃- Bicarbonato de sódio

NO- Óxido nítrico

NPS- Nitroprussiato de sódio

·O₂-Ânion superóxido

OCT- Composto para congelar tecidos

OH⁻- Radical hidroxil

OONO⁻- Peroxinitrito

PA- Pressão arterial

PAD- Padrão interno

PBS- Tampão salina fosfato

pD₂- Logaritmo negativo da EC50

PFA- Paraformaldeído

pH- Potencial hidrogeniônico

PMSF- Fenilmetilsulfonil

RALES – “Randomized Aldactone Evaluation Study”

RLU- Unidades relativas de luminescência

RM- Receptor mineralocorticóide

RNAM- Ácido ribonucleico mensageiro

SDS- Dodecil sulfato de sódio

Sham- Rato controle

SHR- Ratos espontaneamente hipertensos

SPRL- Espironolactona

SRAA- Sistema renina-angiotensina-aldosterona

TBA- Ácido tiobarbitúrico

TBARS- Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico

TEMED- Tetrametil etilenodiamina

TIMPs- Inibidores endógenos de MMPs

μU- Microunidades internacionais

VSMC- Células musculares lisas vasculares

ZnCl₂- Cloreto de zinco

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras:

Figura 1 – Representação esquemática do remodelamento hipertrófico que ocorre em vasos de condutância.....	26
Figura 2 - Principais MMPs e suas características estruturais.....	29
Figura 3 - Ativação proteolítica e não proteolítica da MMP-2.....	30
Figura 4 - Regulação proteolítica do tônus vascular pela MMP-2.....	31
Figura 5 - Efeitos dos tratamentos sobre a pressão arterial sistólica medida por pleitismografia de cauda e sobre o peso corporal	60
Figura 6 - Relaxamento vascular dependente do endotélio induzido por Ach e independente de endotélio induzido por NPS.....	62
Figura 7 - Alterações estruturais induzidas na aorta associadas à hipertensão 2R-1C.....	64
Figura 8 - Efeito dos tratamentos sobre a proliferação de células musculares lisas.....	65
Figura 9 - Efeito dos tratamentos sobre a produção vascular de EROs.....	67
Figura 10 – Efeito dos tratamentos sobre a produção vascular de EROs e níveis de peroxidação lipídica plasmáticos.....	68
Figura 11 - Efeito dos tratamentos sobre os níveis de MMP-2 na aorta dos oito grupos experimentais.....	70

Figura 12 - Efeito dos tratamentos na atividade gelatinolítica, atividade gelatinolítica <i>in situ</i> e nos níveis de MMP-2 nas aortas.....	71
Figura 13 – Efeito dos tratamentos na expressão da MMP-2 em aortas.....	74
Figura 14 – Efeito dos tratamentos na expressão da TIMP-2 em aortas.....	75

Resumo

CERON, C. S. **Efeitos da espironolactona e da hidroclorotiazida sobre o estresse oxidativo e sobre a metaloproteinase-2 da matriz extracelular na hipertensão renovascular.** 2009. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

O aumento do estresse oxidativo e da atividade das metaloproteinases contribui para as alterações vasculares estruturais e funcionais presentes na hipertensão renovascular. O objetivo desse trabalho foi verificar se o tratamento com espironolactona, hidroclorotiazida, ou ambas as drogas modificam as alterações presentes no modelo dois-rins, um-clipe de hipertensão renovascular na pressão arterial, incluindo-se remodelamento da aorta, alterações de reatividade vascular, estresse oxidativo e níveis e atividade da metaloproteinase-2 da matriz extracelular (MMP-2). Animais controles operados ou ratos submetidos à estenose da artéria renal foram tratados com o veículo, espironolactona ($25 \text{ mg.kg}^{-1}\text{dia}^{-1}$), hidroclorotiazida ($20 \text{ mg.kg}^{-1}\text{dia}^{-1}$), ou a combinação dos dois medicamentos para oito semanas. A pressão arterial sistólica foi monitorada semanalmente por pleitismografia de cauda. Anéis de aorta foram isolados para avaliar o relaxamento vascular dependente e independente do endotélio. A análise morfométrica da parede da aorta foi realizada em coloração de hematoxilina/eosina. Foram avaliados a produção do ânion superóxido na aorta pela β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase vascular, a peroxidação lipídica plasmática, medida como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, os níveis e atividade de MMP-2 determinados por zimografia em gel e fluorimetria em extrato de aorta, imuno-histoquímica e zimografia situ. O tratamento com espironolactona, hidroclorotiazida, ou a

combinação das drogas atenuou a hipertensão arterial, reverteu a disfunção endotelial, atenuou o remodelamento vascular da aorta, assim como o aumento no estresse oxidativo, e reduziu os níveis e a atividade da MMP-2 induzidos pela hipertensão. Estes resultados sugerem que a espironolactona e hidroclorotiazida, isoladamente ou em combinação, produzem efeitos antioxidantes e diminuem o aumento da atividade da MMP-2, melhorando assim a disfunção vascular e remodelamento encontrados nesse modelo de hipertensão renovascular.

Palavras-chave: metaloproteinases, hipertensão renovascular, espironolactona, hidroclorotiazida.

Abstract

CERON, C. S. **Effects of spironolactone and hydrochlorothiazide on oxidative stress and the extracellular matrix metalloproteinase-2 levels in the renovascular hypertension.** 2009. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Increased oxidative stress and upregulation of matrix metalloproteinases may cause structural and functional vascular changes in renovascular hypertension. The aim of this work was to examine whether the treatment with spironolactone, hydrochlorothiazide, or both drugs modify two-kidney, one clip hypertension-induced changes in arterial blood pressure, aortic remodeling, vascular reactivity, oxidative stress, and MMPs levels/activity. Sham operated or hypertensive rats were treated with vehicle, spironolactone ($25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$), hydrochlorothiazide ($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$), or the combination of the two drugs for eight weeks. Systolic blood pressure was monitored weekly by tail-cuff plethysmography. Aortic rings were isolated to assess endothelium dependent and independent relaxations. Morphometry of the aortic wall was carried out in hematoxylin/eosin sections. Aortic nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity and superoxide production was evaluated. Formation of reactive oxygen species was measured in plasma as thiobarbituric acid reactive substances. Aortic metalloproteinase-2 levels and activity were determined by gelatin and *in situ* zymography, fluorimetry, and immunohistochemistry. Treatment with spironolactone, hydrochlorothiazide, or the combination attenuated two-kidney, one-clip induced hypertension and reversed the endothelial dysfunction, reversed the vascular aortic remodeling, attenuated

hypertension-induced increases in oxidative stress, and reduced metalloproteinase-2 levels/activity induced by hypertension. These findings suggest that spironolactone or hydrochlorothiazide, alone or combined, produce antioxidant effects and decrease renovascular hypertension-induced MMP-2 upregulation, thus improving the vascular dysfunction and remodeling found in this model of hypertension.

Keywords: metalloproteinases, renovascular hypertension, spironolactone, hydrochlorothiazide.

INTRODUÇÃO

Introdução

1- Hipertensão arterial

A hipertensão arterial é considerada um grande problema de saúde pública, afeta cerca de 25% da população mundial de adultos, e há um indicativo que até 2025 essa doença atinja 60% da população (Kearney, Whelton *et al.*, 2005).

A alta prevalência da hipertensão contribui para o aumento das doenças cardiovasculares, que são responsáveis por 30% de todas as mortes no mundo (Lawes, Vander Hoorn *et al.*, 2008). Cerca de dois terços do ônus da doença ocorre nos países em desenvolvimento, atingindo principalmente pessoas com idade entre 45 e 69 anos (Lawes, Vander Hoorn *et al.*, 2006).

A hipertensão arterial é classificada como uma doença multifatorial, poligênica, associada com alterações morfológicas e funcionais no aparelho cardiovascular. Estudos mostram que a hipertensão está associada a alterações de diversos fatores, entre eles o aumento de metaloproteinases (MMPs) (Lehoux, Lemarie *et al.*, 2004; Raffetto e Khalil, 2008) de espécies oxidativas de oxigênio (EROs) (Cai e Harrison, 2000; Griending, Sorescu *et al.*, 2000).

1.1- Modelo 2 Rins-1 Clipe (2R-1C) de Hipertensão Arterial e Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

Diferentes modelos experimentais de hipertensão foram desenvolvidos em animais para estudar as principais alterações provocadas por essa doença. O primeiro modelo animal de hipertensão renovascular foi desenvolvido por

Harry Goldblatt, em 1934, pela constrição da artéria renal de cães com auxílio de um clipe, sendo que o rim contra lateral permanece intacto.

Esse modelo de hipertensão é crônico, e a redução da perfusão arterial para o rim com o clipe resulta em ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Níveis aumentados de angiotensina II e aldosterona causam vasoconstrição acentuada, com conseqüente aumento da pressão arterial (PA), retenção de sódio e água, disfunção endotelial, hipertrofia vascular, aumento de MMPs, dentre outros fatores (Griendling, Sorescu *et al.*, 2000; Escobales e Crespo, 2005; Min, Mogi *et al.*, 2005).

Os níveis plasmáticos de renina e angiotensina II aumentam até a quinta semana após a indução da hipertensão, podendo diminuir com o tempo. Porém, até a oitava semana, as ações exercidas pela angiotensina II continuam elevadas, contribuindo para a manutenção do quadro hipertensivo (Martinez-Maldonado, 1991).

Além disso, angiotensina II e aldosterona são sabidamente capazes de aumentar os níveis vasculares do ânion superóxido via ativação de enzimas como a β -Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (Griendling, Lassegue *et al.*, 1996; Cai e Harrison, 2000; Nakano, Kobayashi *et al.*, 2005), reduzir a disponibilidade do óxido nítrico (NO) (Lerman, Chade *et al.*, 2005; Rude, Duhaney *et al.*, 2005) e aumentar a atividade das MMPs (Rude, Duhaney *et al.*, 2005; Johar, Cave *et al.*, 2006).

1.2- Remodelamento vascular

O remodelamento vascular é considerado uma resposta adaptativa ao aumento da pressão arterial que objetiva normalizar a tensão da parede do

vaso (Mayet e Hughes, 2003). De acordo com a teoria de La Place ($T=P \times R$, onde T =tensão, P = pressão e R =raio) o remodelamento pode ser classificado em hipertrófico - artérias de condutância - (Figura 1) e eutrófico - artérias de resistência (Intengan e Schiffrin, 2001; Duprez, 2006; Humphrey, 2008). O remodelamento hipertrófico envolve alterações no tamanho do músculo liso vascular células, além de acúmulo de matriz extracelular proteínas como o colágeno e fibronectina, muitas vezes com aumento da rigidez arterial (Duprez, 2006). Nesse caso há o aumento da camada média, e o lúmen permanece do mesmo tamanho. Algumas das medidas básicas para avaliar o remodelamento são a área da secção transversal e a razão entre a camada média e o diâmetro do lúmen.

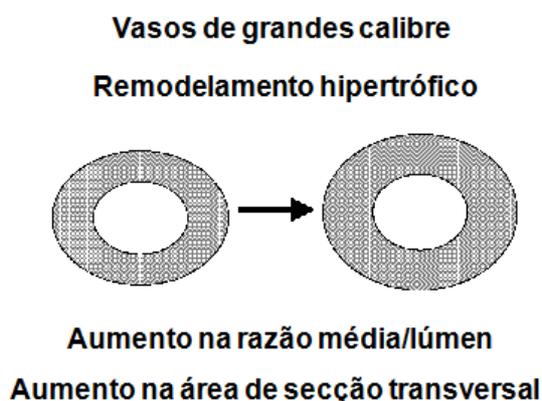


Figura1- Representação esquemática do remodelamento hipertrófico que ocorre em vasos de Condutância (Duprez, 2006).

O remodelamento é considerado um processo adaptativo em sua fase inicial, mas com aumentos constantes de pressão torna-se crônico e mal adaptativo, com alterações estruturais principalmente na camada média das artérias (Intengan e Schiffrin, 2001). A angiotensina II e a aldosterona estão entre os principais efetores do remodelamento vascular, pois levam ao aumento de espécies reativas de oxigênio e vias de sinalização molecular, e da

ativação de metaloproteinases (Duprez, 2006; Humphrey, 2008), entre outros fatores.

2- Metaloproteinases

Metaloproteinases são um grupo endopeptidases cálcio-dependentes que contém zinco em seu sítio ativo, elas fazem parte de uma família constituída por mais de 20 enzimas relatadas (Schulz, 2007). As mais conhecidas são as colagenases intersticial (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), *stromelisin*as (MMP-3 e MMP-10), MMPs de membranas (MT1-MMP a MT6-MMP) e gelatinases (MMP-2 ou gelatinase A e MMP-9 ou gelatinase B). As MMPs são expressas em várias células e tecidos, como células da musculatura vascular lisa (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9), endotélio, fibroblastos e células inflamatórias (Spinale, 2002; Schulz, 2007).

Essas enzimas são primeiramente expressas como pró-forma latente, chamadas zimogênios ou pró-MMPs. Para que sejam ativadas necessitam da clivagem de seus domínios pró-peptídicos por outras proteases, como plasmina (fibrinolisin) ou MT-MMPs (Nagase e Woessner, 1999). As MMPs degradam proteínas da matriz extracelular quebrando-as em suas ligações peptídicas específicas, são importantes reguladoras de algumas funções fisiológicas como embriogênese e angiogênese (Schulz, 2007). Desse modo podem promover alterações como remodelamento vascular (Galis e Khatri, 2002), processo fisiológico adaptativo que ocorre nos vasos sanguíneos em resposta às alterações crônicas na hemodinâmica (Ward, Pasterkamp *et al.*, 2000). Elas podem levar a um espessamento da camada média dos vasos sanguíneos com conseqüente redução no lúmen, e alterações na matriz extracelular, gerando aumento da resistência periférica (Mulvany, 1987; Baumbach e Heistad, 1989;

Greene, Tonellato *et al.*, 1989; Owens, 1989; Jenkins, Crow *et al.*, 1998), que podem levar a disfunção endotelial, (Luscher, Raij *et al.*, 1987; Panza, Quyyumi *et al.*, 1990).

A regulação da atividade das MMPs pode envolver alterações de expressão gênica dessa enzima, ativação de suas pró-formas latentes e inibição dos inibidores teciduais específicos das MMPs (TIMPs), e sofre influência de fatores como citocinas, angiotensina II, aldosterona, estresse de cisalhamento, estresse oxidativo, outras MMPs, etc. (Spinale, 2002; Visse e Nagase, 2003). Os TIMPs são os principais inibidores das MMPs, e sua família é composta por 4 membros – TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4. Esses inibidores exibem diferentes eficácias contra diferentes MMPs. Eles se encontram em equilíbrio com as MMPs (estequiometria 1:1), e uma alteração desse equilíbrio pode resultar em doenças como artrite reumatóide, arteriosclerose, insuficiência cardíaca, fibrose, enfisema pulmonar crescimento tumoral e metástases (Bode e Maskos, 2003; Visse e Nagase, 2003; Kandasamy, Chow *et al.*, 2009).

2.1- Metaloproteinase-2 e hipertensão arterial

A MMP-2 é uma gelatinase, que possui domínios “*fibronectin-like*” responsáveis pela adesão e reconhecimento aos componentes da matriz extracelular (Nagase e Woessner, 1999; Bode e Maskos, 2003) (Figura 2). As gelatinases clivam colágeno tipo I, III, IV, V, elastina, fibronectina, laminina, entre outros (Nagase, Visse *et al.*, 2006).

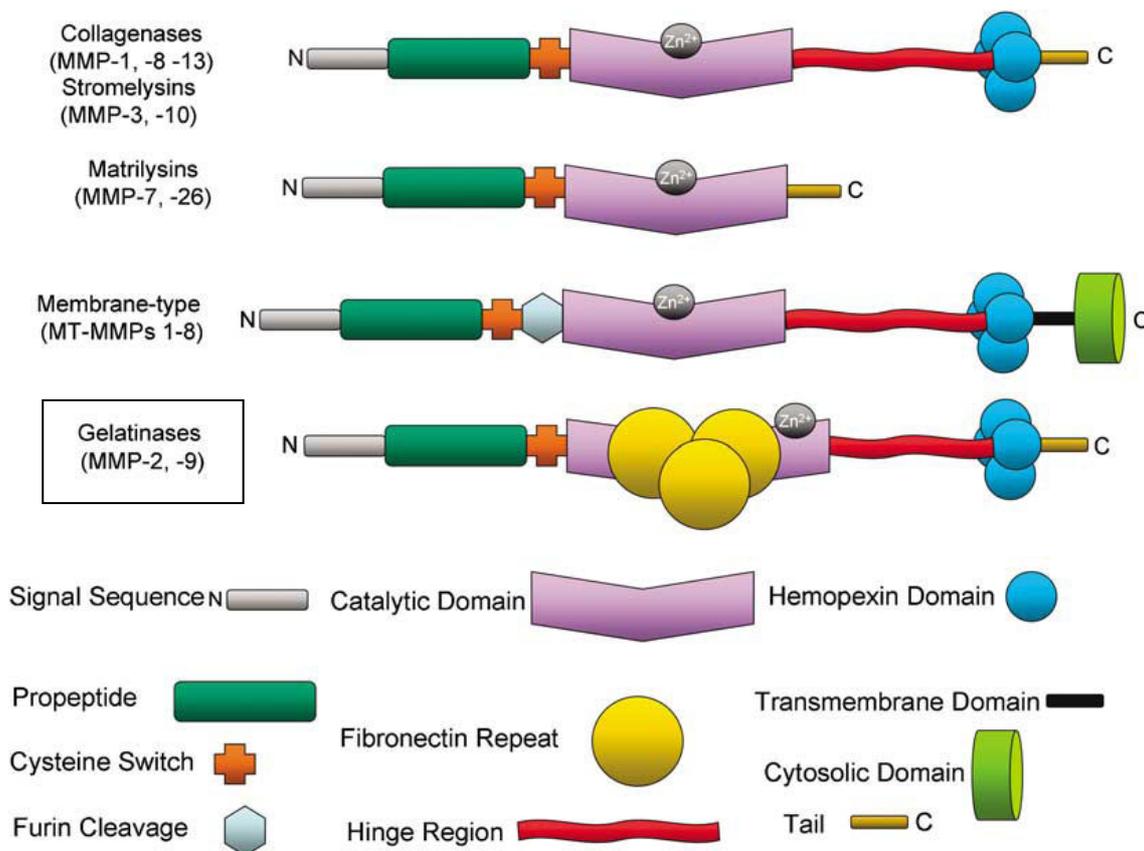


Figura 2- Principais MMPs e suas características estruturais. A MMP-2 é uma gelatinase, que, diferente das demais, apresenta três domínios “*fibronectin-like*” (Chow, Cena *et al.*, 2007).

Embora a MMP-2 seja considerada uma enzima constitutiva, sua ativação também pode ser regulada por alterações de expressão gênica dessa enzima, ativação de suas pró-formas latentes e inibição dos inibidores teciduais específicos das MMPs (TIMPs), como as demais MMPs. A figura abaixo mostra um esquema com alguns dos principais fatores responsáveis pela ativação dessa enzima (Figura 3). O TIMP-2 é o inibidor tecidual endógeno preferencial da MMP-2 (Visse e Nagase, 2003; Kandasamy, Chow *et al.*, 2009).

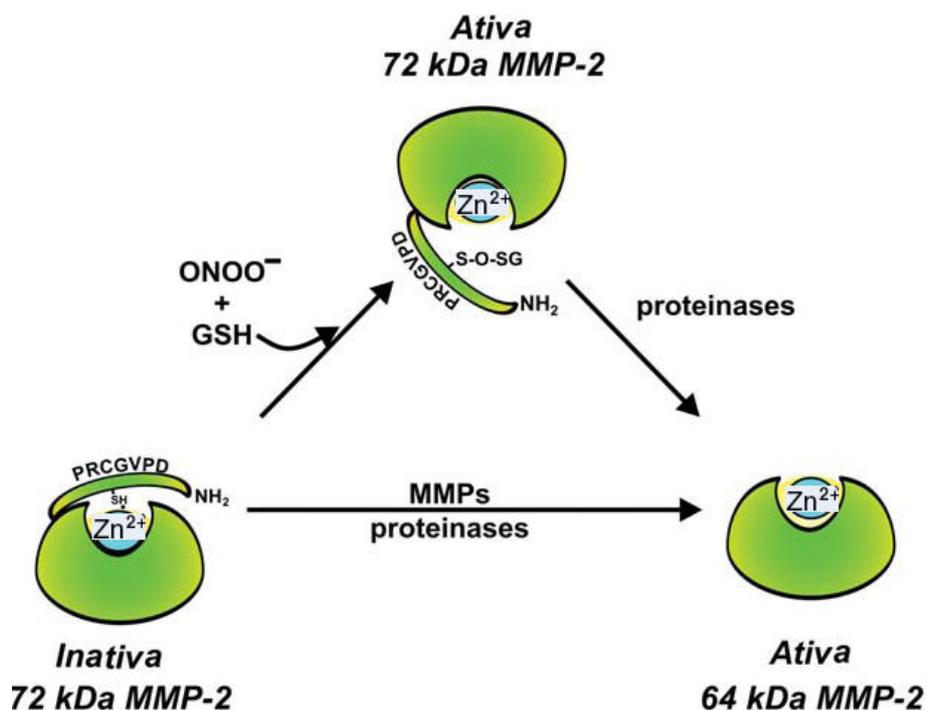


Figura 3– Ativação proteolítica e não proteolítica da MMP-2. Pode ocorrer uma ruptura total do pró-peptídeo ou apenas um deslocamento do sítio catalítico da enzima, que fica na forma ativa (Kandasamy, Chow *et al.*, 2009).

A MMP-2 possui papel importante na regulação do tônus vascular (Figura 4), pois pode clivar o peptídeo vasoativo derivado do endotélio, conhecido como big endotelina-1 (Big-ET-1), em endotelina-1 (ET-1₍₁₋₃₂₎), com potente ação vasoconstritora, assim como cliva um potente neuropeptídeo vasodilatador, o CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina), levando a formação de metabólitos menos vasodilatadores. Além disso cliva o peptídeo vasodilatador adrenomedulina (AM), formando metabólitos menos vasodilatadores, e produz metabólitos com ações vasoconstritoras (AM 11-22) (Fernandez-Patron, Radomski *et al.*, 1999; Fernandez-Patron, Stewart *et al.*, 2000; Martinez, Oh *et al.*, 2004). Assim, essa metaloproteinase pode causar vasoconstrição por aumentar a ação de vasoconstritores, ou diminuir a ação de vasodilatadores, podendo ter papel importante na manutenção da hipertensão arterial.

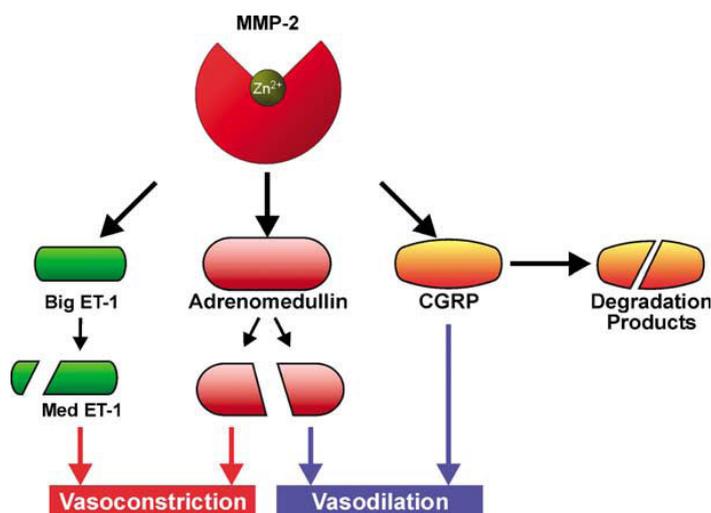


Figura 4– Regulação proteolítica do tônus vascular pela MMP-2 (Chow, Cena *et al.*, 2007).

Como citado anteriormente, as MMPs também participam do remodelamento vascular adaptativo existente em processos hipertensivos. Essas proteases degradam componentes da matriz extracelular, podendo contribuir para o aumento da complacência arterial e do diâmetro existente no início do processo (Flamant, Placier *et al.*, 2007). No decorrer do processo de degradação constante de proteínas da matriz, as MMPs podem promover proliferação e migração de células musculares lisas, e hipertrofia celular (Bouvet, Gilbert *et al.*, 2005).

Alguns estudos clínicos associam um aumento das concentrações plasmáticas tanto de MMP-2 como de MMP-9 em pacientes com hipertensão arterial quando comparados com os pacientes normais (Yasmin, Mceniery *et al.*, 2005; Derosa, D'angelo *et al.*, 2006; Martinez, Lopes *et al.*, 2006). Em modelos animais de hipertensão tem sido observada a participação das metaloproteinases da matriz extracelular, principalmente da MMP-2, no remodelamento vascular. Entre eles estão o modelo de administração crônica

de L-NAME em ratos (Bouvet, Gilbert *et al.*, 2005), e no modelo 2R-1C de hipertensão renovascular em ratos (Castro, Rizzi *et al.*, 2008; Martinez, Castro *et al.*, 2008; Castro, Rizzi *et al.*, 2009).

3- Estresse oxidativo e hipertensão arterial

O estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre a produção de EROs e sua inativação por sistemas antioxidantes endógenos (Oliveira-Sales, Dugaich *et al.*, 2008). Entre os principais EROs estão o ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), peróxido de hidrogênio, (H_2O_2), radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), e entre as espécies reativas de nitrogênio, o óxido nítrico (NO) e peroxinitrito (ONOO^-) (Touyz e Schiffrin, 2004). O $\cdot\text{O}_2^-$ é um dos principais, produzido nos vasos sanguíneos principalmente pela ação da enzima NADPH oxidase (Griendling, Sorescu *et al.*, 2000).

Em condições fisiológicas, EROs são essenciais a alguns processos de regulação e sinalização intracelular, participando de mecanismos de síntese protéica e transcrição gênica (Touyz e Schiffrin, 1999; Griendling, Sorescu *et al.*, 2000).

Em condições fisiopatológicas, o aumento da produção de EROs é associado a disfunções do sistema cardiovascular, tais como aterosclerose, hipertensão, insuficiência cardíaca, entre outras (Warnholtz, Nickenig *et al.*, 1999; Rueckschloss, Duerschmidt *et al.*, 2003). Esse aumento pode promover disfunção endotelial, aumento da contratilidade dos vasos, crescimento das células da musculatura vascular lisa, peroxidação lipídica, e em certos casos, o aumento da atividade das metaloproteinases, resultando em remodelamento vascular (Rao e Berk, 1992; Harrison, 1997).

Diferentes estudos mostram o envolvimento prejudicial de EROs em modelos experimentais de hipertensão. Em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) a produção de $\cdot\text{O}_2^-$ aumenta em vênulas e arteríolas (Suzuki, Swei *et al.*, 1995). Em modelos de infusão crônica de angiotensina II e em modelo de infusão crônica de aldosterona, há o aumento da expressão de subunidades da enzima NADPH oxidase, com conseqüente aumento na produção de $\cdot\text{O}_2^-$ (Fukui, Ishizaka *et al.*, 1997; Park, Lim *et al.*, 2008). Assim como no modelo de hipertensão renovascular 2R-1C, trabalhos mostram ocorrer aumento de produção de $\cdot\text{O}_2^-$ nas aortas dos animais, o que está associado a um aumento na atividade da NADPH oxidase vascular promovido pela ação da angiotensina II circulante (Heitzer, Wenzel *et al.*, 1999).

Evidências experimentais *in vitro* e *in vivo* sugerem que o estresse oxidativo participa do remodelamento vascular e aumenta a expressão e atividade MMPs. Em situações de estiramento mecânico, como o que acontece na hipertensão arterial, ocorre aumento acentuado de EROs derivados da NADPH oxidase vascular, com conseqüente aumento da expressão e atividade da MMP-2 (Grote, Flach *et al.*, 2003). A administração de angiotensina II a células da musculatura lisa vascular (VSMC) leva a um aumento na atividade da NADPH oxidase, no RNAm de MMP-2 e na atividade dessa enzima (Luchtefeld, Grote *et al.*, 2005). Em resposta à aldosterona, miócitos cardíacos apresentam produção aumentada de EROs, que participa da regulação da atividade da MMP-2 nessas células (Rude, Duhaney *et al.*, 2005).

No modelo 2R-1C de hipertensão renovascular, o tratamento dos animais com o antioxidante tempol reduziu a expressão da MMP-2, com

conseqüente redução da disfunção endotelial e remodelamento vascular (Castro, Rizzi *et al.*, 2009).

4- Aldosterona e seu antagonista espironolactona

A aldosterona é um hormônio mineralocorticóide, secretado na zona glomerular do cortex supra-renal, e que atua no túbulo distal e coletores, aumentando a reabsorção de sódio e excreção de potássio. Esse hormônio se liga a um receptor mineralocorticóide (RM), que é encontrado em locais como rins, cólon, glândulas salivares e sudoríparas, hipocampo, miócitos cardíacos, células da musculatura lisa vascular (Fiebeler, Muller *et al.*, 2007).

Esse hormônio mineralocorticóide penetra na célula epitelial pela membrana basolateral e liga-se ao RM. Então o complexo RM-aldosterona desloca-se até o núcleo, onde se liga a sequências específicas de DNA (elementos responsivos a hormônios), regulando assim a expressão de muitos produtos gênicos, como as proteínas induzidas pela aldosterona. Estas proteínas tem efeito final em aumentar a condutância do Na⁺ da membrana luminal e a atividade da bomba de sódio da membrana basolateral, com consequente retenção de sódio, e aumento na secreção de K⁺ e H⁺ na luz tubular. Fármacos como a espironolactona inibem competitivamente a ligação da aldosterona ao RM, impossibilitando a síntese das proteínas induzidas pela aldosterona (Adam, 1980).

Assim como a angiotensina II, a aldosterona participa de processos hipertensivos, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, e doença renal (Funder, 2004). Estudos clínicos recentes mostram que a adição de antagonistas do receptor de aldosterona (espironolactona – estudo

denominado RALES, e eplerenone – estudo denominado EPHESUS) aos medicamentos de escolha terapêutica (diuréticos, inibidores da enzima conversora de angiotensina) prescritos a pacientes com insuficiência cardíaca severa reduziu a mortalidade e a morbidade dessa doença (Pitt, Zannad *et al.*, 1999; Pitt, Remme *et al.*, 2003).

Em estudos com animais, cães com insuficiência cardíaca induzida foram tratados com eplerenone e observou-se inibição do remodelamento ventricular esquerdo, diminuição da atividade genatínolítica no ventrículo esquerdo (Suzuki, Morita *et al.*, 2002). Em modelo de arteriosclerose desenvolvido em coelhos, o antagonismo do receptor mineralocorticóide melhorou a disfunção endotelial e reduziu a formação de superóxido (Rajagopalan, Duquaine *et al.*, 2002). Em modelo de insuficiência cardíaca induzida pós-infarto do miocárdio em ratos, o antagonismo do RM melhorou a disfunção endotelial provavelmente por inibir o aumento de enzima conversora de angiotensina e por melhora da sintase endotelial de óxido nítrico (Sartorio, Fraccarollo *et al.*, 2007).

Estudos recentes sugerem que a aldosterona possa ativar as MMPs. Em cachorros com insuficiência cardíaca induzida, o uso de antagonista de aldosterona levou à diminuição da expressão de várias proteínas do citoesqueleto e metaloproteinases (principalmente MMP-1, MMP-2 e MMP-9) (Rastogi, Mishra *et al.*, 2007). A administração de aldosterona em cultura de células de miócitos cardíacos de ratos adultos levou ao aumento da atividade e expressão das MMPs (MMP-2 e MMP-9) via ativação do receptor mineralocorticóide (Rude, Duhaney *et al.*, 2005). O uso de antagonistas de aldosterona também vem sendo associado com redução nos níveis de estresse

oxidativo em modelos de hipertensão por infusão de angiotensina II e aldosterona (Viridis, Neves *et al.*, 2002; Nakano, Kobayashi *et al.*, 2005; Rude, Duhaney *et al.*, 2005; Sartorio, Fraccarollo *et al.*, 2007).

5- Hidroclorotiazida

Hidroclorotiazida (HCTZ) é um diurético amplamente utilizado no tratamento da hipertensão. Os diuréticos tiazídicos foram desenvolvidos em 1950 pela modificação química dos inibidores da anidrase carbônica. O principal local de ação dessa classe de fármacos é o túbulo contorcido distal, onde inibe um sistema luminal transmembrana acoplados transportes de NaCl, inibindo a reabsorção de Na⁺ e Cl⁻, mas são moderadamente eficazes, pois 90% do sódio é reabsorvido antes de chegar no túbulo contorcido distal (Pickkers, Garcha *et al.*, 1999) . Além disso, a HCTZ é capaz de causar vasodilatação e inibir o crescimento vascular, mas o mecanismo desses efeitos ainda não estão totalmente elucidados (Pickkers, Garcha *et al.*, 1999; Zhu, Zhu *et al.*, 2005).

Esse diurético produz efeitos anti-hipertensivos que poderiam diminuir a pressão transmural e a ativação das MMPs (Chesler, Ku *et al.*, 1999), mas também podem causar ou agravar a depleção de volume e assim aumentar os níveis de renina, (Traub, Nemes *et al.*, 1976; Kohzuki, Kanazawa *et al.*, 1996), angiotensina II e aldosterona (Koenig, Binner *et al.*, 1991), possivelmente ativando as MMPs (Rude, Duhaney *et al.*, 2005; Johar, Cave *et al.*, 2006).

Sabe-se ainda que, em longo prazo, as tiazidas reduzem a pressão por redução da resistência periférica, mais que seus efeitos diuréticos (Van Brummelen, Man In't Veld *et al.*, 1979). Alguns trabalhos mostram que a HCTZ

possui ações vasodilatadoras diretas, por possíveis alterações na homeostase de canais iônicos. (Calder, Schachter *et al.*, 1992; 1993; 1994).

HIPÓTESE

Hipótese

Levando-se em consideração que:

1. no modelo 2R-1C de hipertensão há um aumento nos níveis de angiotensina II e aldosterona, que participam do desenvolvimento das alterações vasculares estruturais e funcionais;
2. estes mediadores podem aumentar a produção de ânion superóxido pela ativação da NADPH oxidase vascular e reduzir a disponibilidade do óxido nítrico;
3. EROs e MMPs participam do processo de remodelamento vascular;
4. o antagonismo do receptor mineralocorticóide tem sido associado à redução de estresse oxidativo e da atividade das MMPs em condições de alterações cardiovasculares;
5. tiazidas produzem efeitos anti-hipertensivos que podem diminuir a ativação das MMPs pela pressão transmural, e ao mesmo tempo pode causar depleção de volume e assim aumentar os níveis de angiotensina II e aldosterona, possivelmente aumentando a atividade das MMPs;

formulamos a hipótese de que é possível que SPRL possa impedir o aumento dos níveis de MMPs vasculares, a disfunção vascular e o remodelamento associado à hipertensão 2R-1C, e que a combinação de SPRL e HCTZ possa produzir efeitos melhores do que os produzidos pela SPRL ou pela HCTZ sozinha.

OBJETIVOS

Objetivos

- 1-** Verificar se a espironolactona atenua o aumento de MMP-2 bem como as alterações funcionais e estruturais presentes nos vasos de ratos com hipertensão renovascular (2R-1C).

- 2-** Verificar se a hidroclorotiazida melhora os possíveis efeitos produzidos pela espironolactona mencionados no objetivo 1.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e Métodos

1 – Considerações gerais

Os experimentos foram realizados utilizando ratos machos Wistar (180 a 200 gramas), provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, em salas com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada (22-25 °C) e livre acesso a ração e água. Esse estudo foi previamente aprovado pelo comitê de ética dessa universidade.

1.1 – Hipertensão arterial induzida pela técnica de Goldblatt:

A indução da hipertensão arterial foi realizada através da introdução de um clipe de prata com abertura de 0,2 milímetros sobre a artéria renal, causando estenose da artéria. Esse procedimento leva a ativação do sistema renina-angiotensina, com conseqüente aumento da pressão arterial (Goldblatt, 1958). Os animais controle foram submetidos a laparotomia, sem introdução do clipe. Como anestésicos foram utilizados ketamina (100mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), via intra-peritoneal (i.p.).

1.2 – Grupos experimentais

Sham: animais controle, submetidos apenas a laparotomia e que receberam água;

Sham+SPRL: animais controle, submetidos apenas a laparotomia e que receberam SPRL na dose de 25 mg/kg/dia;

Sham+HCTZ: animais controle, submetidos apenas a laparotomia e que receberam HCTZ na dose de 20 mg/kg/dia;

Sham+SPRL+HCTZ: animais controle, submetidos apenas a laparotomia e que receberam SPRL e HCTZ na dose de 25 e 20 mg/kg/dia, respectivamente;

2R-1C: animais submetidos a estenose da artéria real que receberam água;

2R-1C+SPRL: animais submetidos a estenose da artéria real que receberam SPRL na dose de 25 mg/kg/dia;

2R-1C+HCTZ: animais submetidos a estenose da artéria real que receberam HCTZ na dose de 20 mg/kg/dia;

2R-1C+SPRL+HCTZ: animais submetidos a estenose da artéria real que receberam SPRL e HCTZ na dose de 25 e 20 mg/kg/dia, respectivamente.

A escolha das doses das drogas foi baseada em estudos prévios em que houve redução da pressão arterial em diferentes modelos de hipertensão (Viridis, Neves *et al.*, 2002; Pu, Neves *et al.*, 2003; Nobre, Da Silva *et al.*, 2006). Somente os animais que apresentaram um aumento mínimo na pressão arterial sistólica de 30 mmHg foram utilizados para o estudo. Os tratamentos iniciaram após duas semanas da indução da hipertensão arterial renovascular, e os animais que ficaram hipertensos foram distribuídos aleatoriamente em cada um dos grupos experimentais de animais hipertensos citados acima. Os tratamentos foram realizados por gavagem, por um período de oito semanas; seguido da coleta de tecidos para análises estruturais bioquímicas e moleculares.

2 – Materiais

2.1- Soluções utilizadas nos experimentos:

- Solução de Krebs modificada (em mmol/L: NaCl 130; CaCl₂ 1,6; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,2; KCl 4,7; NaHCO₃ 14,9 e glicose 5,5);
- Fenilefrina (10⁻⁴ mol/L);
- Acetilcolina (10⁻¹⁰ mol/L a 10⁻⁵ mol/L);
- Nitroprussiato de sódio (10⁻¹⁰ mol/L a 10⁻⁵ mol/L);
- Paraformaldeído (PFA) 4% v/v tamponado;
- Hematoxilina e Eosina (H&E);
- Tampão de extração de proteínas: 20mmol/L de Tris-HCl, 1 mmol/L de 1,10-fenantrolina, 1 mmol/L de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), 1 mmol/L de NEM e 10 mmol/L de CaCl₂.
- Albumina sérica bovina (BSA), 8 mg/mL;
- Reagente de Bradford;
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) 12%, co-polimerizado com gelatina (1 mg/mL);
- Tampão utilizado no gel de separação: Tris-HCl/SDS, pH 8,8;
- Tampão utilizado no gel de largada: Tris-HCl/SDS, pH 6,8;
- Tampão de amostra não-redutor: SDS2%, Tris-HCl 125 mmol/L, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,001%; ph 6,8;
- Solução de TritonX-100 a 2%;
- Solução de Agarose 3%;
- Persulfato de Amônio (APS) 10%;
- TEMED (tetrametil etilenodiamina);
- Solução de acrilamida 30% e bisacrilamida (0,8%);
- Solução de coloração: Coomassie Brilliant Blue G-250 0,05%;

- Solução fixadora e de descoloração: Metanol 30% e Ácido acético 10%;
- Solução tampão de Tris-CaCl₂ (Tris 50 mmol/L, CaCl₂ 10 mmol/L, ZnCl₂ 1 μmol/L);
- Solução de DQ Gelatin 5 μg/mL (Molecular Probes, Oregon, USA)
- Solução de Clostridium sp. 2U/mL (Molecular Probes, Oregon, USA)
- DHE (dihidroetídio) 10 μmol/L
- Solução de Krebs-HEPES, pH 7,2
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,067% v/v;
- 1,1,3,3 tetrametoxipropano 1 μmol/L;
- Ácido sulfúrico 0,04 mol/L;
- Ácido fosfotungstíco 10% v/v;
- N-butanol;
- PBS (tampão salina fosfato);
- Anticorpos monoclonais: anti-MMP-2 (MAB 3308), anti-TIMP-2 (MAB 13446); diluição 1:1000 em PBS, a partir da solução inicial de 1 mg/mL (Chemicon, Termecla, CA USA);
- Anticorpo secundário rodamina (AP 160P), diluição 1:200 em PBS, a partir da solução inicial de 1 mg/mL (Chemicon, Termecla, CA USA);
- Kit de detecção de imunohistoquímica: "Anti-Mouse Poly Horseadish

Os demais reagentes não especificados foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA).

2.2- Drogas administradas diretamente nos animais:

- Espironolactona 25 mg/kg/dia (Aldactone[®]; Pfizer), comprimidos triturados e administrados em suspensão aquosa, por via oral, com agitação prévia;

- Hidroclorotiazida 20/mg/kg/dia (Clorana[®]; Sanofi-Synthelabo), comprimidos triturados e administrados em suspensão aquosa, por via oral, com agitação prévia;
- Ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), via intra peritoneal.

2.3- Equipamentos utilizados nos experimentos:

- Balança de precisão (Shimadzu AY220), pHmetro (Incibrás) e centrífuga refrigerada (CELM – 3 plus);
- Transdutor de pressão acoplado a um manguito (MTL125R pulse transducer/pressure cuff; Castle Hill, Austrália);
- Transdutor de tensão isométrica (FT 03, Grass Instrument Division);
- Micrótopo (Leica RM2025) e criostato (CM 1900; Leica, Alemanha);
- Microscópio de luz branca e fluorescência (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) acoplado a câmera fotográfica;
- Espectrofotômetro;
- Fonte de eletroforese (Electrophoresis Power Supply – EPS 301);
- Sistema de documentação de eletroforese Kodak (Kodak, Rochester, NY);
- Espectrofluorímetro (Gemini EM, Molecular Devices, Sunnyvale, CA);
- Luminômetro marca Berthold 9505 (EG&G Instruments GmbH, Munich, Germany).

2.4- Programas de aquisição de dados:

- PowerLab 4/S analog-to-digital converter (AD Instruments Ltd., Castle Hill, Australia);
- Summit for ACQUIRE e Data viewer (Gould Instruments Systems);
- ImageJ Program (NIH – National Institutes of Health);
- Analysis System (EDAS) 290 (Kodak, Rochester, NY);

- KCJunior e SoftMax Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA);
- SigmaStat for Windows (Jandel Scientific, USA).

3- Metodologia

3.1- Parâmetros hemodinâmicos

3.1.1-Avaliação da pressão arterial sistólica e peso corporal:

A pressão arterial sistólica foi verificada pelo método de pletismografia de cauda. Para isso, um manguito acoplado a um transdutor de pressão foi colocado em torno da cauda dos animais acordados, previamente aquecidos (em cabinets com temperatura de 37 °C). As variações da pressão foram capturadas por um programa específico de aquisição de dados: PowerLab 4/S analog-to-digital converter (AD Instruments Ltd., Gosport, Australia), e os resultados representados por uma média de três medidas consecutivas para cada animal. A pressão arterial e o peso corporal foram avaliados semanalmente, durante as 10 semanas do estudo.

3.1.2- Avaliação da reatividade vascular:

Ao final da oitava semana de tratamento, os animais foram anestesiados, decapitados, e suas aortas foram retiradas delicadamente, e lavadas em solução de Krebs. Essas foram cortadas em anéis de quatro milímetros de comprimento e colocadas em um sistema de cubas para órgãos isolados contendo 10 mL de solução modificada de Krebs à 37 °C, pH 7,4 e aeração constante com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Esse sistema foi previamente conectado a um transdutor de tensão isométrica (FT 03, Grass Instrument Division), e os registros de tensão, em gramas, foram adquiridos utilizando o programa de aquisição de dados: Summit for ACQUIRE e Data viewer (Gould Instruments Systems). Após 60 minutos de estabilização

sob tensão basal de 1,5 g, os anéis foram contraídos com fenilefrina (10^{-7} mol/L), seguido de uma concentração de 10^{-6} mol/L de acetilcolina. Somente os anéis que produziram relaxamento igual ou superior a 80% da contração original foram considerados com endotélio funcional preservado. O relaxamento foi calculado como porcentagem da contração induzida pela fenilefrina. Para avaliar o relaxamento vascular dependente e independente do endotélio foram utilizadas concentrações cumulativas de acetilcolina (10^{-10} mol/L a 10^{-5} mol/L) e nitroprussiato de sódio (10^{-10} mol/L a 10^{-5} mol/L), respectivamente.

3.2- Parâmetros estruturais

3.2.1- Análise morfológica da aorta:

Ao final da décima semana do estudo, os animais foram anestesiados, decapitados, e suas aortas foram retiradas delicadamente, lavadas em solução de Krebs, dissecadas do tecido conjuntivo e gordura, e fixadas imediatamente em solução tamponada de paraformaldeído (PFA) 4% por 24 horas. Após a fixação, as aortas foram desidratadas em diferentes concentrações de álcool e elas foram inseridas em parafina e cortadas transversalmente em um micrótomo (Leica RM2025), a uma espessura de quatro micrômetros. Esses cortes foram feitos em lâmina de vidro e colocados sobre uma chapa de aquecimento a temperatura de 37-39 °C, para promover aderência e abertura dos cortes de parafina. Para cada animal foram feitas duas lâminas, com três cortes cada, em seqüência.

As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para determinação dos parâmetros estruturais da aorta: área de secção transversal do corte (AST), diâmetro interno e externo (DI e DE, respectivamente),

espessura da camada média (média) e razão média por lúmen (M/L). O número de células musculares lisas foi determinado pela contagem de núcleos.

As imagens dos cortes foram obtidas utilizando microscópio de luz branca (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) acoplado a câmera fotográfica. Essas imagens foram captadas pelo programa Leica IM50, em um aumento de 50 e 400x, e posteriormente analisadas com o programa ImageJ. A partir da análise da área interna (A_i) e externa (A_e) dos cortes, conseguiu-se determinar a AST ($A_e - A_i$), o DI (raiz quadrada de $4A_i/\pi$), o DE (raiz quadrada de $4A_e/\pi$), a média ($(DE-DI)/2$) e a razão M/L ($2 \times \text{Média}/DI$). A contagem do número de células da musculatura lisa vascular também foi realizada com o programa ImageJ, em aumento de 400x. O número de células musculares lisas foi quantificado em dois cortes consecutivos, pelo método tri-dimensional, que é independente da orientação, da forma e do tamanho do núcleo. Os cálculos e a quantificação das células musculares lisas foram realizados com base no artigo publicado por Dao e colaboradores, em 2001 (Dao, Lemay *et al.*, 2001).

3.3- Parâmetros bioquímicos e moleculares

3.3.1- Determinação de espécies reativas de oxigênio vasculares e níveis plasmáticos de peroxidação lipídica

3.3.1.A – EROs *in situ*:

As concentrações vasculares de EROs foram analisadas, *in situ*, na camada média das aortas, utilizando dihidroetídeo (DHE) na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Hao, Nishimura *et al.*, 2006; Viel, Benkirane *et al.*, 2008). Esse “probe” reage com o O_2^- presente nos tecidos, resultando na formação de 2-hidroxi-etídeo e de etídeo, produtos que emitem fluorescência vermelha no local. Os tecidos foram congelados em OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA,

USA), utilizando acetona e gelo seco. Eles foram cortados em criostato, a 4 μm de espessura, e incubados com DHE por 30 minutos em câmara úmida e escura. Após a incubação os cortes foram lavados com tampão salina fosfato (PBS) e fixados em PFA 4%. Com auxílio de um microscópio de fluorescência (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) acoplado a câmera fotográfica, as imagens dos cortes foram fotografadas num aumento de 400x. A quantificação da intensidade de fluorescência vermelha emitida foi realizada utilizando o programa ImageJ.

3.3.1.B – Atividade da NADPH oxidase:

Para a determinação da atividade da enzima NADPH oxidase, utilizou-se a técnica de luminescência com o probe Lucigenina. Em resumo, anéis de aorta provenientes de animais dos diferentes grupos experimentais foram transferidos para frascos de luminescência contendo 1 ml de tampão Krebs-HEPES, pH 7,2, contendo 5 $\mu\text{mol/l}$ de lucigenina. Após avaliação dos valores da linha de base, 300 $\mu\text{mol/l}$ de NADPH foram adicionados e as contagens de luminescência foram medidas continuamente durante 15 min em luminômetro marca Berthold 9505 (EG&G Instruments GmbH, Munich, Germany) a 37 °C. Os valores da linha de base obtidos *sem* a presença de NADPH foram descontados dos valores obtidos na presença de NADPH. Os resultados foram normalizados pelo peso seco dos anéis de aorta e expressos em unidades relativas de luminescência (RLU)/mg/min, como descrito previamente (Janiszewski, Souza *et al.*, 2002).

3.3.1.C – Quantificação de peroxidação lipídica plasmática:

A peroxidação lipídica foi o parâmetro utilizado para avaliar o estresse oxidativo no plasma. Esse processo pode ser analisado pela quantificação de

espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Cau, Dias-Junior *et al.*, 2008). Basicamente, esse ácido reage com aldeídos formados na lipoperoxidação, como malonildialdeído (MDA), formando espécies facilmente quantificadas por espectrofotometria ou fluorimetria.

Para isso, 10 μ L de plasma foram misturados com soluções de ácido sulfúrico 0,04M e ácido fosfotungstíco 10%v/v, para separar os lipídeos de substâncias solúveis interferentes. Após duas centrifugações consecutivas, a 1600g, o sedimento foi re-suspendido em água destilada, e 500 μ L do ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%v/v. Os tubos foram agitados e colocados em banho-maria a 95 °C, por uma hora. Esses foram novamente centrifugados, após acréscimo de 2,5 mL de n-butanol, e 200 μ L do sobrenadante foram transferidos para uma microplaca. Os produtos formados a partir dessa reação foram quantificados em espectrofluorímetro ($\lambda_{\text{excitação}}$: 515 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$: 553 nm; Gemini EM, Molecular Devices, USA), utilizando a seguinte fórmula: $f \times 25/F$ (onde f representa a absorvância da amostra, e F a do padrão). Como padrão foi utilizado 5 μ L de tetrametoxipropano 1 μ M.

3.3.2- Determinação dos níveis de MMP-2 por zimografia em gel:

Método muito utilizado para determinação dos níveis de MMPs no plasma e amostras de tecidos biológicos (Gerlach, Uzuelli *et al.*, 2005; Souza-Tarla, Uzuelli *et al.*, 2005; Gerlach, Demacq *et al.*, 2007). No caso de zimografia de tecidos, é preciso determinar a quantidade de proteína presente em cada amostra, para aplicar no gel a mesma quantidade de proteína por amostra, pois variações protéicas entre uma e outra podem interferir nos resultados finais desse método.

3.3.2.A- Dosagem de proteína pelo método de Bradford:

Para a quantificação de proteínas foi utilizado o método de Bradford, que consiste em um ensaio colorimétrico quantitativo, em que ao se ligar às proteínas do tecido o reagente adquire uma coloração azul. As amostras de aorta foram trituradas e homogeneizadas em tampão de extração de proteínas (CaCl₂ 10 mM, Tris 20 mM pH 7,4, fenantrolina 1 mM, PMSF 1 mM, NEM 1 mM) e incubadas por 16 horas em geladeira. Para cada 0,08 g de tecido foram acrescentados 300 µL do tampão. Após as 16 horas, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos, e os sobrenadantes retirados para determinação protéica. A curva padrão foi realizada com albumina do soro bovino (BSA) diluído em água destilada nas seguintes concentrações em mg/mL: 0,085; 0,0175; 0,035; 0,7; e 1,4.

O reagente de Bradford foi utilizado para determinar as concentrações de proteína para cada amostra analisada. A coloração azul desenvolvida no contato com as proteínas pode ser quantificada em espectrofotômetro de luz visível (595 nm). A intensidade da cor varia de acordo com a quantidade de proteína presente na amostra. Para cada 5 µL de amostra foi adicionado 250 µL de reagente de Bradford. Pelos valores obtidos após a leitura, em µg/µL, foi possível aplicar 30 µg de proteína por "lane" do gel.

3.3.2.B- Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%:

As amostras foram previamente preparadas (SDS 2%, Tris-HCl 125 mM, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,001%) e aplicadas em géis de poliacrilamida a 12% e separadas por eletroforese, conforme a técnica SDS-PAGE. Após o tempo da eletroforese, os géis foram submetidos a dois banhos de Triton X-100 a 2%, para remover o SDS, e colocados em solução de Tris

CaCl₂ 50 mM, por 18 horas, a 37 °C. Posteriormente foram fixados e corados em solução Coomassie Blue 0,05% por 4 horas. Para a visualização das bandas referentes as MMPs os géis foram descorados com metanol a 30% e ácido acético a 10%. Observa-se a formação de bandas claras contra o fundo azul do Coomassie (devido à degradação da gelatina incorporada ao gel pelas MMPs).

Para cada gel foi utilizado um padrão interno (soro fetal bovino a 2%), representado nas figuras como PAD. Por ele foi possível normalizar as quantidades de proteínas obtidas entre os géis, podendo compará-los entre si. A quantificação das bandas da MMP-2 foi feita utilizando o sistema Kodak Eletrophoresis Documentation and Analysis System – EDAS 290 (Kodak, Rochester, NY). As formas da MMP-2 foram identificadas pelos seus pesos moleculares: 75, 72 e 64 KDa. Elas foram inibidas por fenantrolina, mas não por outros inibidores de proteases.

3.3.3- Determinação da atividade gelatinolítica por zimografia *In situ*:

Esse método reflete a atividade *in situ* das MMP-s e não seus níveis como a zimografia convencional. Esse método permite a quantificação dessa atividade diretamente no tecido (Galis, Sukhova *et al.*, 1995). Para essa análise utilizou-se DQ gelatin (E12055, Molecular Probes, Oregon, USA) na concentração de 1,0 µg/mL em tampão Tris-CaCl₂ 50 mM. Os tecidos foram congelados em OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA), utilizando acetona e gelo seco. Eles foram cortados em criostato, a 4 µm de espessura, e incubados com o substrato DQ gelatin por 60 minutos em câmara úmida e escura. Após a incubação os cortes foram lavados com PBS e fixados em PFA 4% v/v por 10 minutos. Com auxílio de um microscópio de fluorescência (Leica Imaging

Systems Ltd., Cambridge, England) acoplado a câmera fotográfica, as imagens dos cortes foram fotografadas num aumento de 400x. A quantificação da atividade gelatinolítica *in situ* observada como intensidade de fluorescência verde emitida foi realizada utilizando o programa ImageJ. Fenantrolina e PMSF foram utilizados para confirmar a atividade das MMPs nos tecidos, que foi significativamente reduzida apenas pela fenantrolina.

3.3.4- Determinação da atividade gelatinolítica total por fluorimetria:

A atividade gelatinolítica total em extrato de aorta foi determinada utilizando o kit EnzChek Gelatinase/Collagenase (E12055, Molecular Probes, Oregon, USA), esse método avalia a atividade gelatinolítica *in vivo* (Lalu, Cena *et al.*, 2006). Antes da execução do ensaio foi realizada a dosagem de proteína das amostras pelo método de Bradford como descrito anteriormente (item 3.3.2.A). Sessenta microgramas de proteína de cada amostra foram aplicados nos poços de uma microplaca. Como substrato foi utilizado DQ gelatin (E12055, Molecular Probes, Oregon, USA) na concentração de 5,0 µg/mL em tampão Tris-CaCl₂ 50 mM. A intensidade de fluorescência foi determinada em espectrofluorímetro ($\lambda_{\text{excitação}}$: 495 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$: 515 nm; Gemini EM, Molecular Devices, USA), após 30 minutos de incubação a 37 °C. A curva padrão foi preparada conforme recomendado pelo fabricante. Para isso, *Clostridium* sp. Foi diluído em tampão Tris-CaCl₂ 50 mM nas concentrações de 1000 µU a 62,5 µU. Fenantrolina 1,0 mM e PMSF 1,0 mM foram utilizados para confirmar a atividade gelatinolítica das MMPs nos extratos, que foi significativamente reduzida apenas pela fenantrolina.

3.3.5- Imunofluorescencia e Imunohistoquímica

3.3.5.A- Imunofluorescencia para MMP-2:

Método utilizado para determinar os níveis de MMP-2 e co-localizar a atividade gelatinolítica *in situ* com a expressão dessa enzima, uma vez que outras MMPs também possuem a capacidade de degradar a gelatina. Após a incubação com DQ gelatin e PFA 4%, os cortes de aorta foram incubados com anticorpo primário anti-MMP-2 (MAB 3308, Chemicon, USA), na concentração de 0,1 µg/mL por uma hora, em câmara úmida e escura e em seguida os cortes foram lavados com PBS. Após esse período, os cortes foram incubados com anticorpo secundário rodamina (AP160P, Chemicon, USA) PA 5,0 µg/mL por uma hora nas mesmas condições citadas. Esse anticorpo emite fluorescência vermelha quando ligado ao antcorpo primário. Com auxílio de um microscópio de fluorescência (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) acoplado a câmera fotográfica, as imagens dos cortes foram fotografadas num aumento de 400x. Os níveis de MMP-2 foram observados como intensidade de fluorescência vermelha emitida,e a quantificação foi realizada utilizando o programa ImageJ. Para sobreposição da atividade gelatinolítica com a expressão da MMP-2 foi utilizado o programa Adobe Photoshop. As imagens sobrepostas apresentam coloração amarela.

3.3.5.B- Imunohistoquímica para MMP-2 e TIMP-2:

Método utilizado para determinar a expressão e localização de MMP-2 e TIMP-2 diretamente nos tecidos. Para isso foi utilizado o kit de imunohistoquímica: Anti-Mouse Poly Horseradish peroxidase (HRP) (Chemicon, USA). Os tecidos foram congelados em OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA), utilizando acetona e gelo seco. Eles foram cortados em

criostato, a 4 μm de espessura e fixados imediatamente com acetona. Posteriormente, os cortes foram incubados com solução de bloqueio de peroxidase contendo H_2O_2 por 10 minutos, em câmara úmida e escura, e em seguida lavados com PBS. Cada corte foi incubado com anticorpo primário anti-MMP-2 (MAB 3308, Chemicon, USA), ou com anticorpo primário anti-TIMP-2 (MAB 13446, Chemicon, USA), ambos na concentração de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 60 minutos nas condições citadas.

Em seguida os cortes foram lavados com PBS e incubados com o anticorpo secundário do kit por 60 minutos em câmara úmida e escura. Após a incubação os cortes foram lavados com PBS. Por fim os cortes foram incubados com o substrato cromógeno 3,3' diaminobenzidina (DAB) (25 μL do cromógeno para cada 1,0 mL do tampão do DAB) por 20 minutos, e contra-corados com hematoxilina. Com auxílio de um microscópio de luz branca (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) acoplado a câmera fotográfica, as imagens dos cortes foram fotografadas num aumento de 400x. A MMP-2 e o TIMP-2 foram visualizados por uma cor marrom contra o fundo roxo da hematoxilina. Para análise da e quantificação da densidade de marrom foi utilizado o programa ImageJ (Faia, Davis *et al.*, 2002).

4- Análise estatística

Os resultados obtidos nesse estudo foram analisados com ANOVA de duas vias (análise de variância) ou ANOVA de uma via seguido de teste Tukey (SigmaStat for Windows, Jadel Scientific, USA). Foram considerados estatisticamente diferentes valores com $p < 0,05$. Os gráficos foram representados com média \pm erro padrão da média (EPM).

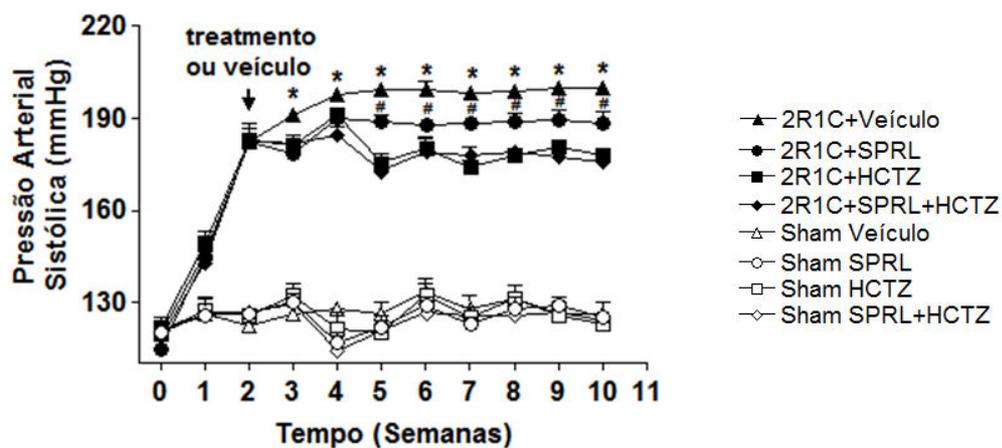
RESULTADOS

Resultados

1- Efeitos dos tratamentos sobre a pressão arterial sistólica e peso corporal:

Os valores basais de pressão arterial sistólica foram similares nos oito grupos experimentais antes da cirurgia. Entretanto, logo na primeira semana após o procedimento cirúrgico, a pressão sistólica aumentou nos ratos dos grupos 2R-1C quando comparados aos controles (Sham) (Figura 5A). Não foram observadas mudanças significativas do tratamento com SPRL e/ou HCTZ sobre a pressão nos quatro grupos controle, porém todos os tratamentos atenuaram os aumentos na pressão dos grupos hipertensos (pressão final: 200 ± 1 , 189 ± 4 , 178 ± 2 , e 175 ± 2 mmHg nos grupos 2R-1C+veículo, 2R-1C+SPRL, 2R-1C+HCTZ e 2R-1C+SPRL+HCTZ, respectivamente; todos $p < 0,05$; Figura 5A). A queda na pressão sistólica dos grupos 2R-1C+HCTZ e 2R-1C+SPRL+HCTZ foi maior comparada ao grupo 2R-1C+SPRL ($p < 0,05$; Figura 5A). Não foram observadas diferenças significativas no peso corporal entre os oito grupos experimentais (Figura 5B).

A



B

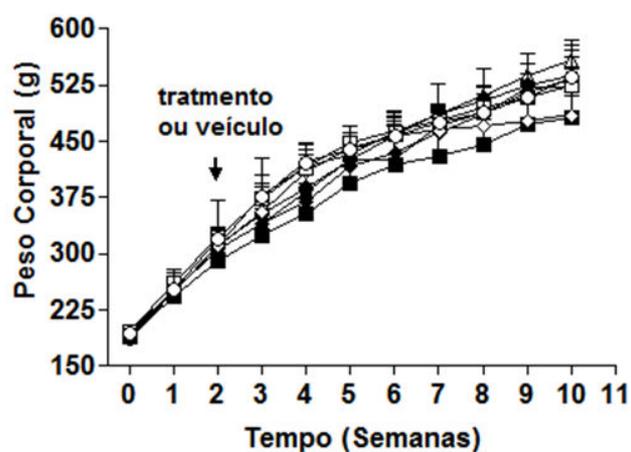


Figura 5 – Efeitos dos tratamentos sobre a pressão arterial sistólica medida por pleitismografia de cauda (A), e sobre o peso corporal (B) durante as 10 semanas de estudo. Valores expressos como média \pm EPM (n=12/grupo) * $P < 0,05$ para 2R-1C+veículo versus todos os outros grupos. # $P < 0,05$ para 2R-1C+SPRL versus 2R-1C+HCTZ e 2R-1C+SPRL+HCTZ.

2- Tratamentos melhoram a função endotelial em ratos 2R-1C:

Para testar o efeito dos tratamentos na função endotelial, o relaxamento vascular, dependente e independente do endotélio, foi analisado em um sistema de banho de órgãos isolados na presença de concentrações cumulativas de acetilcolina (Ach; 10^{-10} - 10^{-5} M), e nitroprussiato de sódio (NPS; 10^{-10} - 10^{-5} M), vistos na Figura 6A e 6B, respectivamente.

Como pode ser observada na figura 6A, uma resposta prejudicada à Ach foi observada no grupo dos ratos hipertensos que receberam apenas veículo, em comparação com os animais controles (Figura 6A; $p < 0,05$). Porém, o tratamento com SPRL, HCTZ ou com a combinação das duas normalizou o comprometimento endotelial dos ratos 2R-1C ($p < 0,05$; Fig.6A), sem produzir nenhuma alteração nos animais controles ($p > 0,05$). Esses efeitos são observados por uma melhora do relaxamento dependente do endotélio pela Ach. Entretanto, a potência da acetilcolina em promover relaxamento, representada pelo pD_2 , também não apresentou diferenças significativas entre os animais dos oito grupos experimentais.

Na figura 6B, o relaxamento independente do endotélio induzido pelo NPS, foi similar em todos os grupos experimentais (Figura 6B, $p > 0,05$).

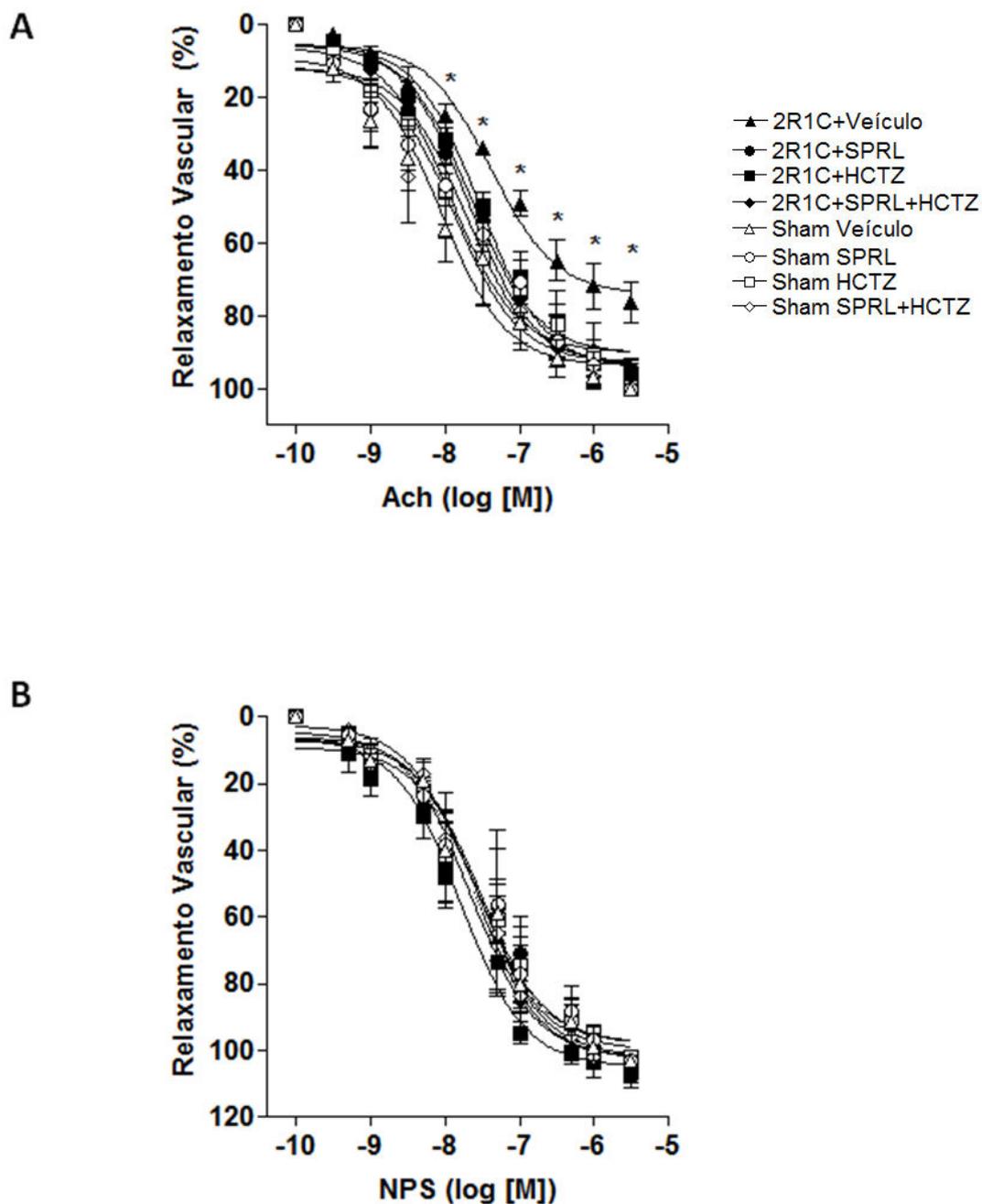


Figura 6 – Relaxamento vascular dependente do endotélio induzido por Ach (A) e relaxamento vascular independente de endotélio induzido por NPS (B) em anéis de aorta, respectivamente. Valores expressos como média \pm EPM (n=5-6/grupo) * $P < 0,05$ para 2R-1C+veículo *versus* todos os outros grupos.

3- Efeitos dos tratamentos sobre o remodelamento vascular em ratos 2R-1C:

Como pode ser observado na figura 7 houve um aumento significativo da razão M/L e na área de secção transversal nas aortas dos ratos 2R-1C+veículo (todos $p < 0,05$). Esse aumento da camada media é conhecido como remodelamento vascular hipertrófico. Os tratamentos com SPRL, HCTZ e a associação das duas drogas foram capazes de reverter essas alterações estruturais (Figura 7A e 7B; $p < 0,05$) nos animais hipertensos, sem alterar a morfologia da aorta dos animais controles. Foi observado também o aumento do DE nas aortas dos animais hipertensos em relação aos controles, e hipertensos tratados (Figura 7C; $p < 0,05$), porém o DI não apresentou diferença significativa entre os grupos.

Na figura 8 observa-se que a hipertrofia observada nos animais hipertensos foi acompanhada de aumento significativo no número de células musculares lisas em relação aos animais controles. Esse aumento também foi atenuado por todos os tratamentos (Figura 8A e 8B, $p < 0,05$), sem alterações na morfologia dos animais controle.

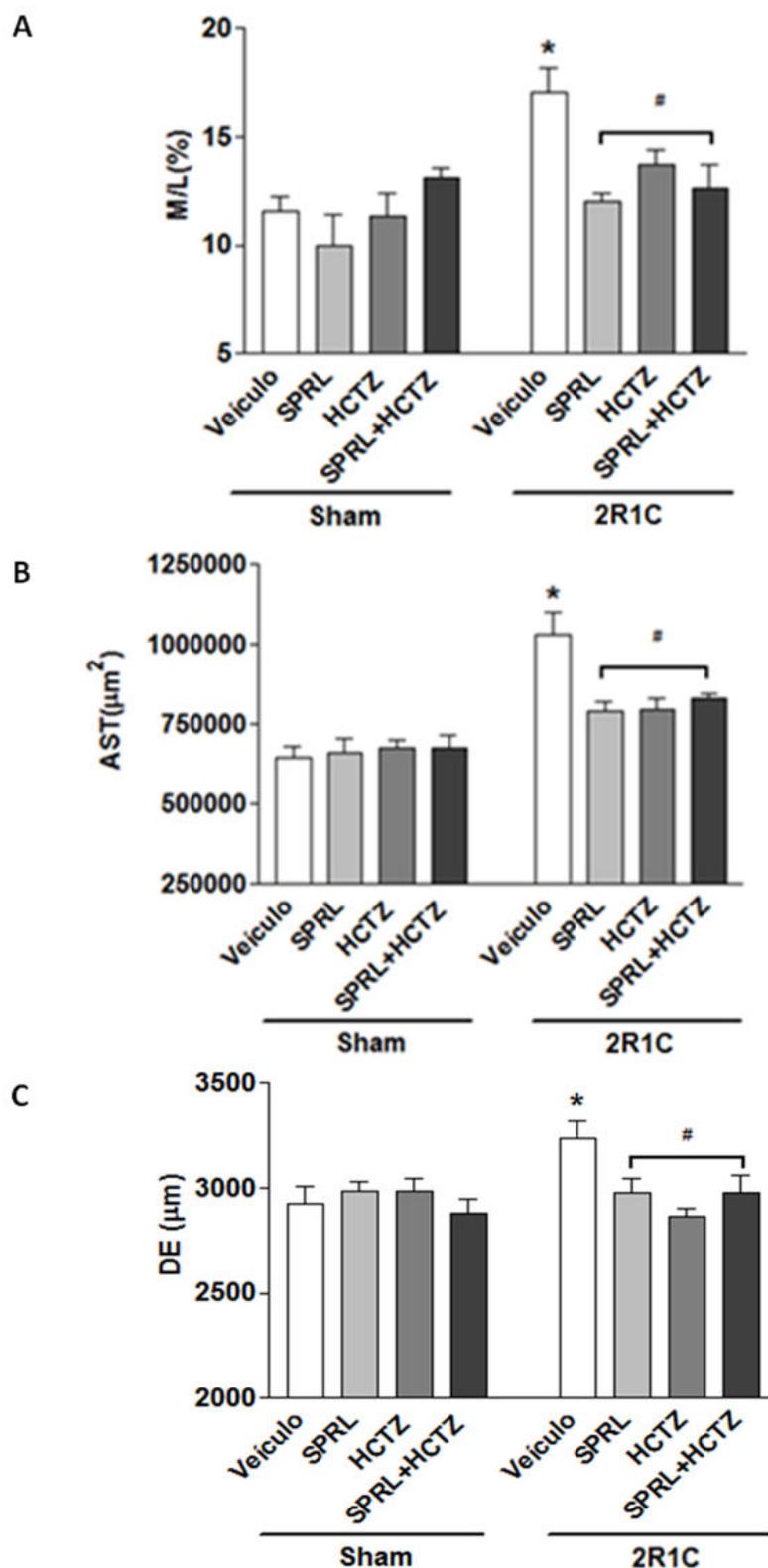
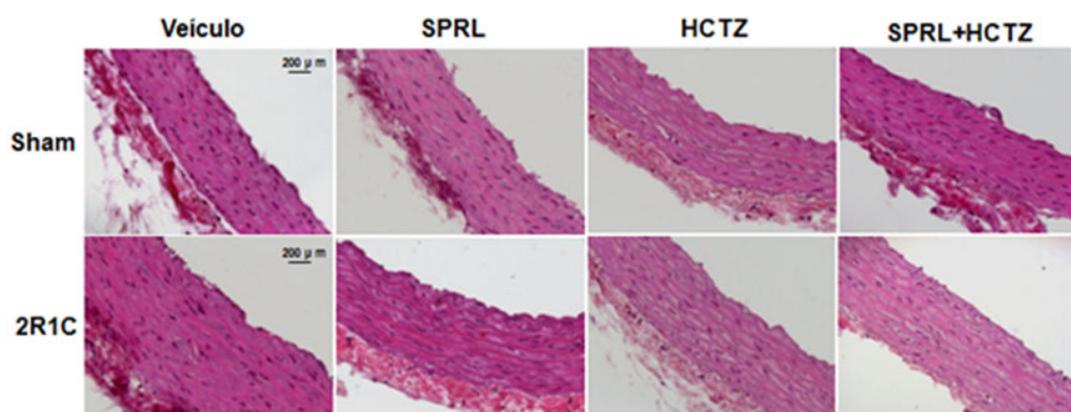


Figura 7 - Alterações estruturais induzidas na aorta associadas à hipertensão 2R-1C. Valores da razão média sobre lúmen (M/L) (A), da área de secção transversal (AST) (B) e do diâmetro externo (DE) (C). Valores expressos como média ± EPM (n=5/grupo) * $P < 0,05$ para 2R-1C+veículo *versus* os quatro grupos controle. # $P < 0,05$ para 2R-1C+tratamentos *versus* 2R-1C+veículo.

A



B

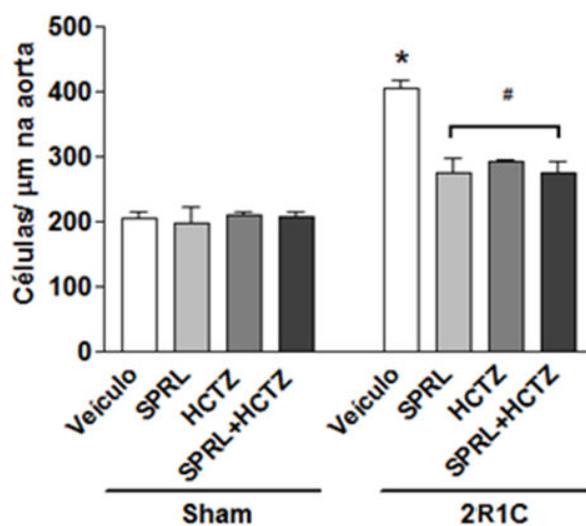


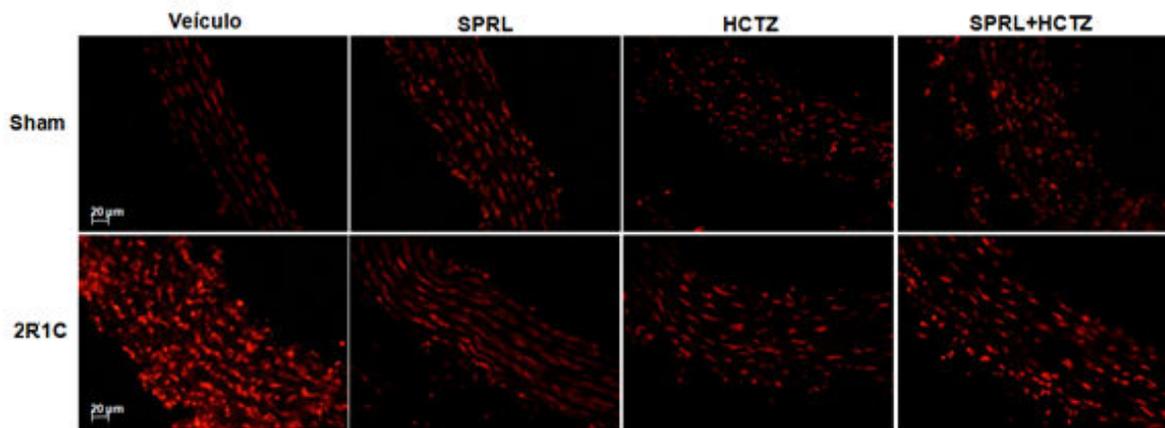
Figura 8 – Efeito dos tratamentos sobre a proliferação de células musculares lisas. Fotografias representativas de aortas (x400) coradas com H&E (A). Representação gráfica do número de células musculares lisas na camada média de aortas referentes aos 8 grupos experimentais (B). Valores expressos como média ± EPM (n=5/grupo) * $P < 0,05$ para 2R-1C+veículo *versus* os quatro grupos controle. # $P < 0,05$ para 2R-1C+tratamentos *versus* 2R-1C+veículo.

4 - Efeitos dos tratamentos sobre as concentrações vasculares de EROs e nos níveis de peroxidação lipídica plasmáticos:

Na figura 9 observa-se que há um aumento nos níveis de EROs na camada média da aorta dos animais hipertensos em relação aos controles, observado pela intensidade de fluorescência vermelha produzida na reação do DHE com O_2^- ($p < 0,05$; Figura 9A e 9B). Esse aumento é atenuado pelo tratamento com SPRL, HCTZ ou com a associação das duas drogas ($p < 0,05$). Como os níveis de EROs estão diminuídos nas aortas dos animais tratados, optou-se por investigar a atividade da maior enzima produtora de superóxido na aorta, a NADPH oxidase. Observou-se que os animais hipertensos não tratados possuem um aumento na atividade dessa enzima em comparação aos animais controle ($p < 0,05$; Figura 10A). O tratamento dos animais hipertensos com SPRL ou HCTZ inibiu esse aumento de atividade da enzima ($p < 0,05$). Infelizmente não foi possível estudar a atividade dessa enzima no grupo hipertenso tratado com a associação das drogas devido a problemas técnicos. Os resultados da atividade da NADPH oxidase na aorta são compatíveis com os resultados da oxidação do DHE citado anteriormente.

Quando se analisou os níveis de peroxidação lipídica plasmáticos, o grupo de animais hipertensos não tratados apresentou um aumento nos níveis de MDA plasmáticos em comparação aos animais controle ($p < 0,05$; Figura 10B). O tratamento dos ratos 2R-1C com SPRL, ou SPRL+HCTZ ou com a combinação das drogas foi associado com diminuição nos níveis de MDA plasmáticos comparados com os encontrados no grupo 2R-1C+veículo ($p < 0,05$). Os níveis de MDA plasmáticos dos animais hipertensos tratados com HCTZ somente não foram diminuídos em comparação com os hipertensos não tratados ($P > 0,05$).

A



B

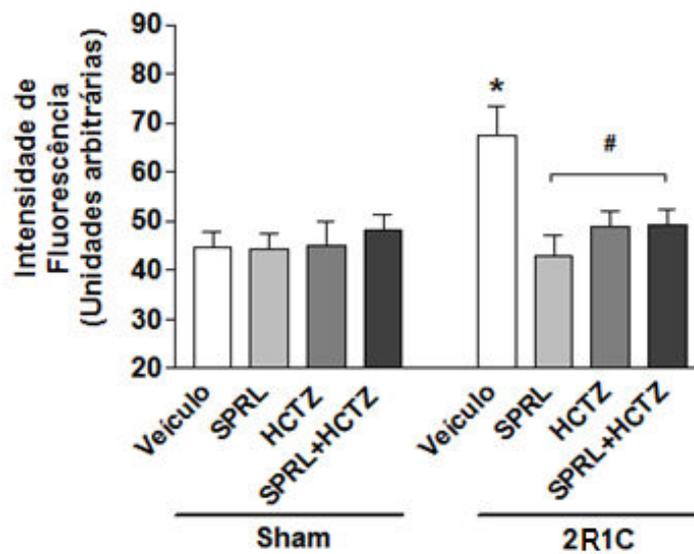
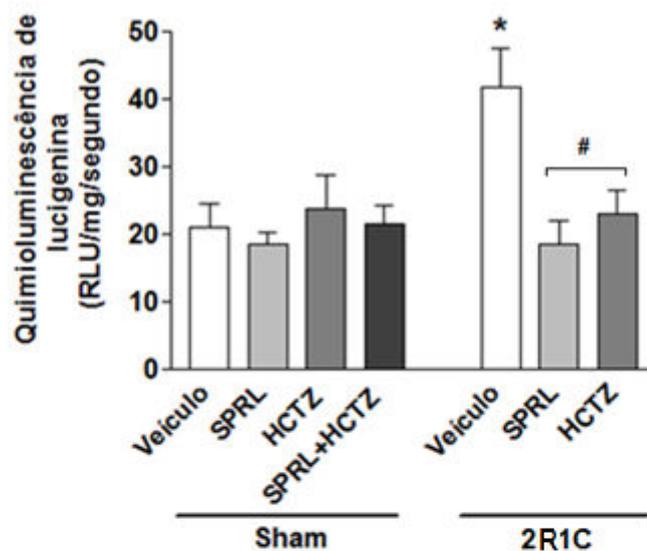


Figura 9 - Efeito dos tratamentos sobre a produção vascular de EROs. Fotografias representativas de aortas (x400) Incubadas com DHE (A). Representação gráfica da intensidade de fluorescência vermelha dos produtos da reação do DHE com O_2^- (B). Valores expressos como média \pm EPM (n=4/grupo) *P<0,05 para 2R-1C+veículo versus os quatro grupos controle. #P<0,05 para 2R-1C+tratamentos versus 2R-1C+veículo.

A



B

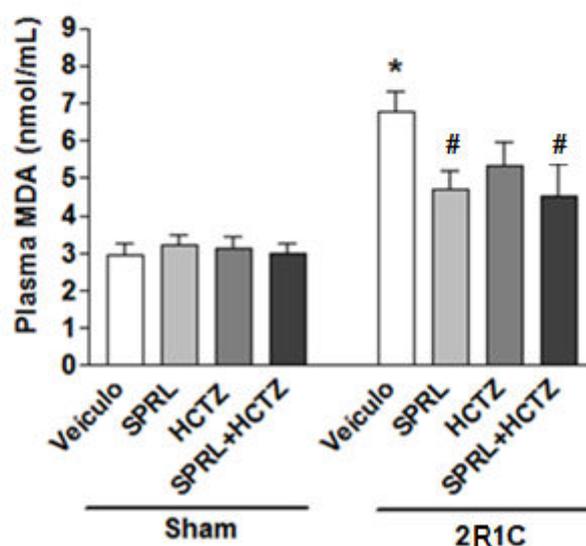


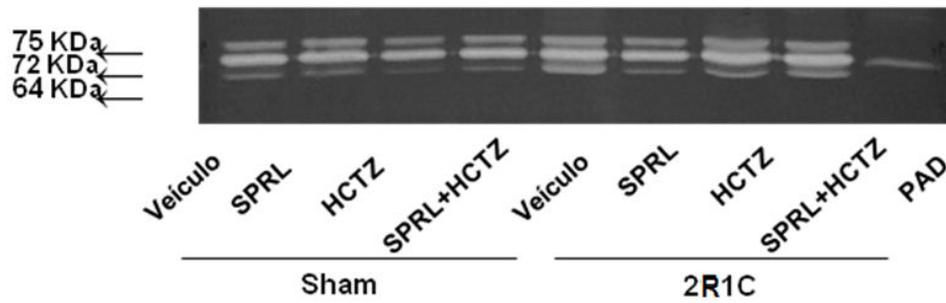
Figura 10 – Efeito dos tratamentos sobre a produção vascular de EROs e níveis de peroxidação lipídica plasmáticos. A atividade da enzima NADPHoxidase vascular (A) (n=5/grupo). Concentrações plasmáticas de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico em amostras de plasma, expressas na forma de malonildialdeído (MDA) (B) (n=10/grupo). Valores expressos como média± EPM. * $P < 0,05$ para 2R-1C+veículo versus os quatro grupos controle. # $P < 0,05$ para 2R-1C+tratamentos versus 2R-1C+veículo.

5 - Efeitos dos tratamentos sobre os níveis e atividade de MMP-2

Um zimograma representativo dos extratos das aortas é apresentado na figura 11A, que mostra o peso molecular das três bandas de MMP-2. As aortas dos ratos 2R-1C mostram níveis aumentados das três formas de MMP-2 (75 kDa, 72 kDa, and 64 kDa) comparada com os quatro grupos controle ($P<0,05$; Figura 11B). O tratamento com SPRL (mas não com HCTZ ou a combinação) atenuou o aumento na MMP-2 (72 kDa) induzido pela hipertensão 2R-1C, e o tratamento com SPRL, HCTZ, ou com a combinação das duas o aumento na MMP-2 (64 kDa) induzido pela hipertensão 2R-1C e dos níveis totais de MMP-2 ($P<0,05$; Figura 11B).

Para verificar se há um aumento na atividade gelatinolítica dessas enzimas realizou-se o ensaio de zimografia *in situ*, que é quantificado pelo aumento da intensidade de fluorescência verde na camada média e endotélio das aortas dos animais. O grupo hipertenso não tratado apresentou maior intensidade de fluorescência verde comparado aos grupos controle ($P<0.05$; Figuras 12A e 12B). O tratamento dos animais hipertensos com SPRL, HCTZ ou com a associação das mesmas resultou em menor atividade gelatinolítica. Para confirmar que a atividade encontrada deve-se a MMP-2, realizou-se a imunomarcção das amostras de aorta com anticorpo anti-MMP-2, e as imagens foram sobrepostas. Além disso, realizou-se a quantificação dos níveis dessa enzima pela intensidade de fluorescência vermelha emitida no ensaio. Os animais 2R-1C+veículo apresentaram maiores níveis de MMP-2 em comparação aos animais controle ($P<0.05$; Figura 12C), e os animais hipertensos tratados com SPRL, HCTZ ou com a associação dessas das drogas apresentaram níveis reduzidos de MMP-2 em comparação aos animais

A



B

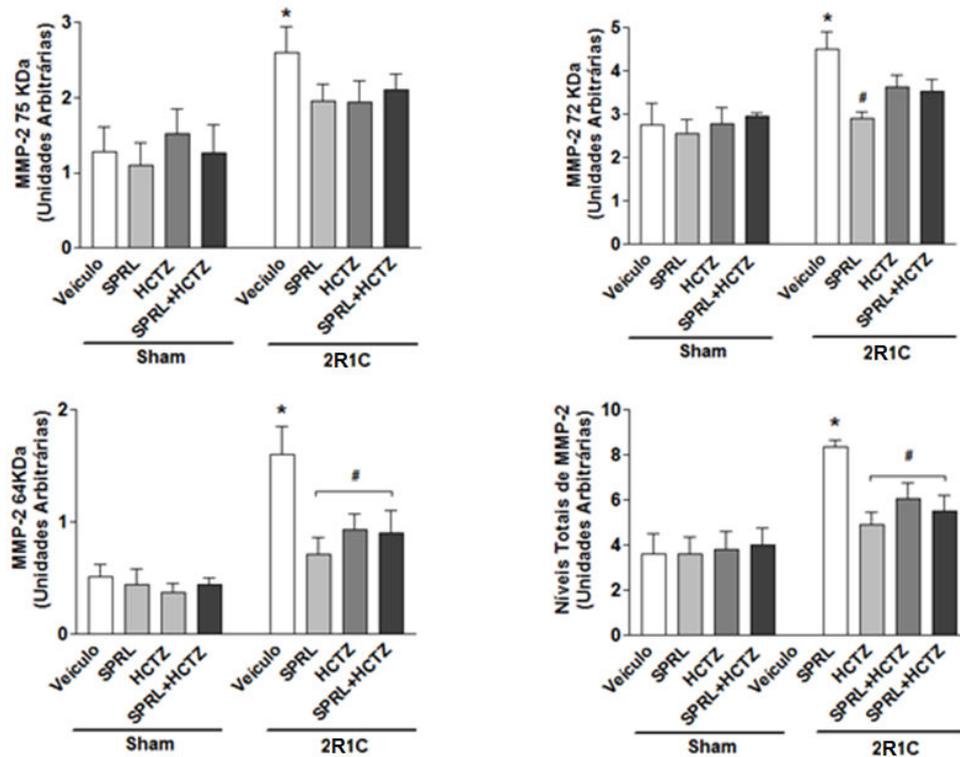


Figura 11 – Efeito dos tratamentos sobre os níveis de MMP-2 na aorta dos oito grupos experimentais. Gel representativo de zimografia SDS-PAGE de extrato de aorta (A). O peso molecular das bandas de MMP-2 (75 kDa, 72 kDa and 64 kDa MMP-2) foram identificados após eletroforese em gel a 12% SDS-PAGE. PAD: padrão interno. Representação gráfica dos valores para cada peso molecular da MMP-2 nos extratos de aorta (B). Valores expressos como média \pm EPM. (n=8/grupo) * P <0,05 para 2R-1C+veículo *versus* os quatro grupos controle. # P <0,05 para 2R-1C+tratamentos *versus* 2R-1C+veículo.

não tratados ($p < 0,05$). Para confirmar esses dados, a atividade das MMPs foi medida em extrato de aorta através de um ensaio de atividade gelatinolítica. A atividade das MMPs foi significativamente aumentada no grupo 2R-1C+veículo quando comparada aos demais grupos ($P < 0,05$; Fig. 12).

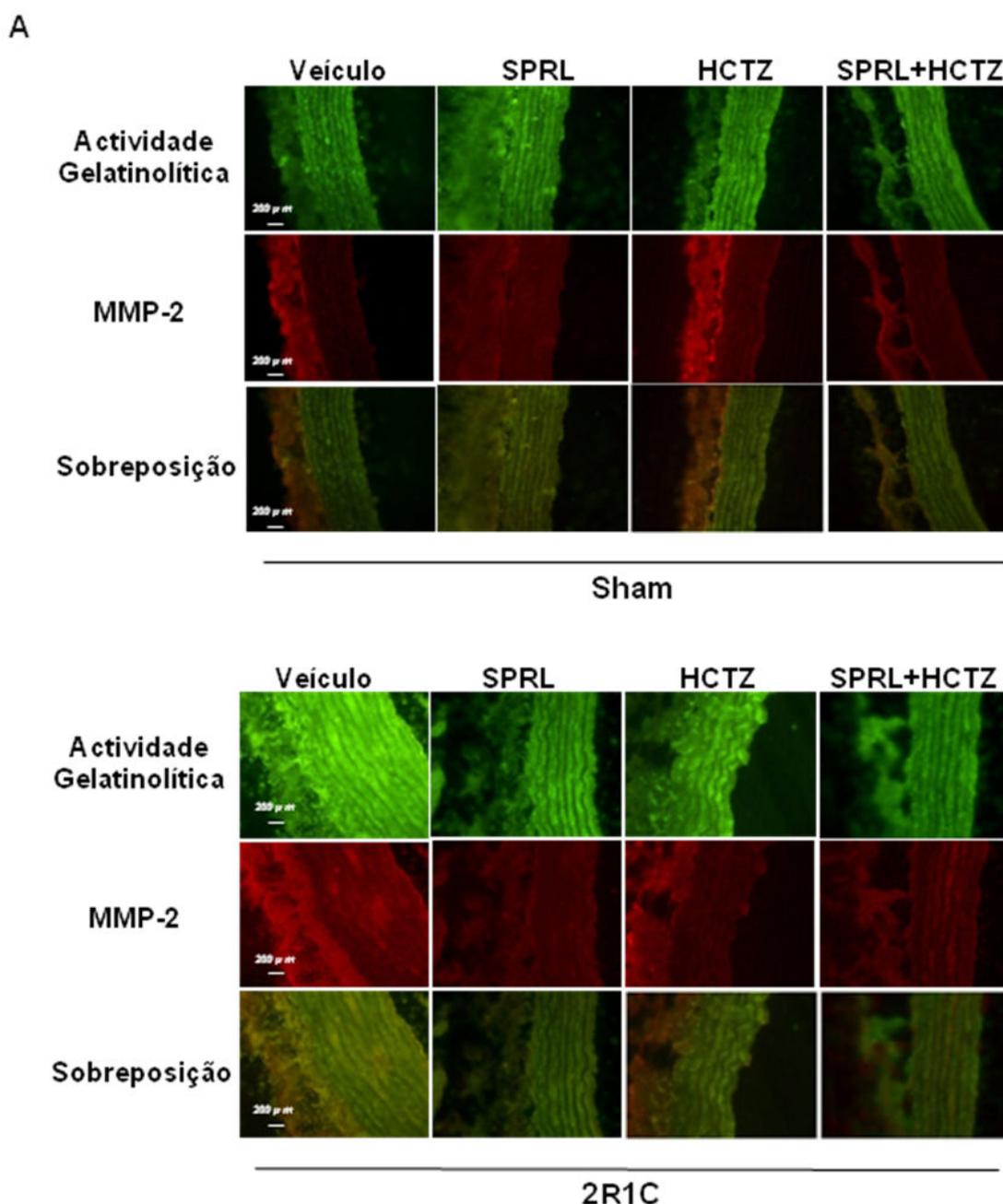


Figura 12- (A) Efeito dos tratamentos na atividade gelatinolítica, atividade gelatinolítica *in situ* e nos níveis de MMP-2 nas aortas. Fotografias representativas de aortas (x400) incubadas com DQ gelatin, anticorpo anti-MMP-2 e sobreposição das imagens.

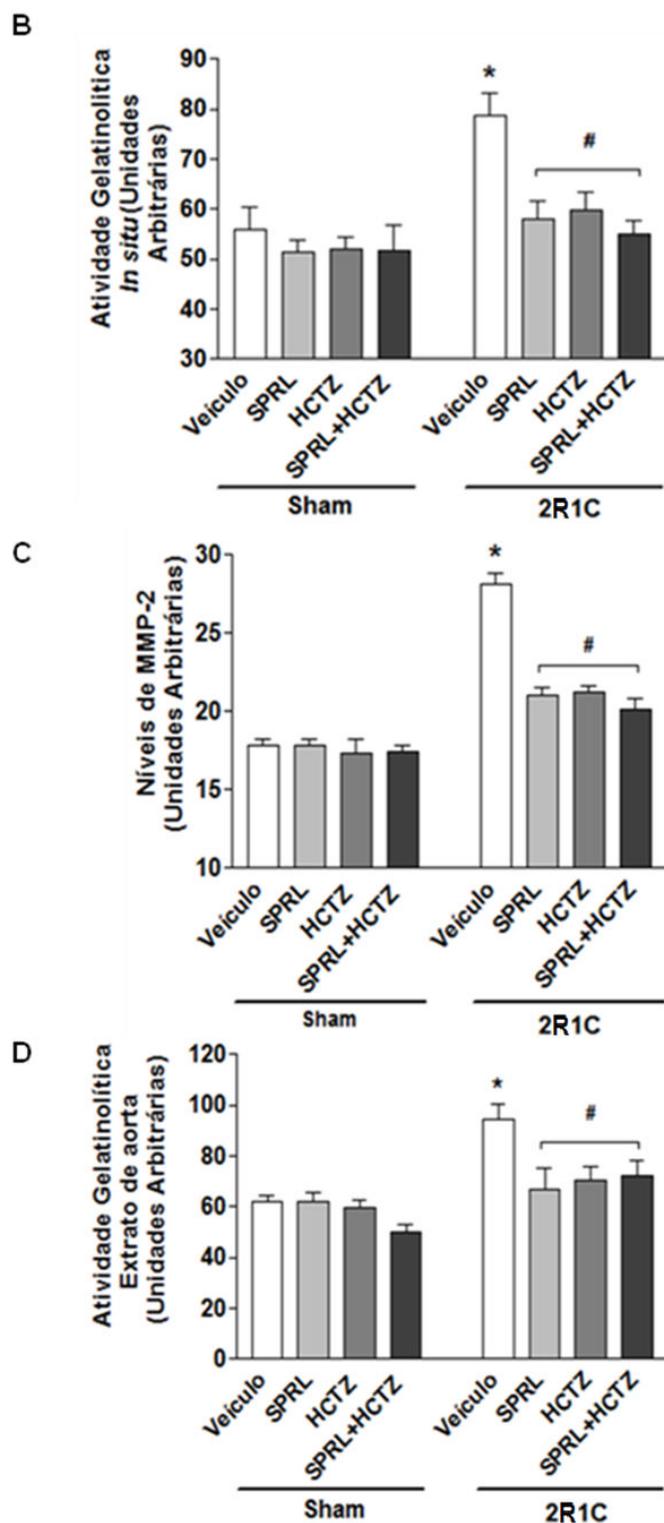


Figura 12- (B) Representação gráfica da atividade gelatinolítica *in situ*, em que a intensidade de fluorescência verde reflete a atividade enzimática via degradação da gelatina (fluoróforo) (n=4/grupo). (C) dos níveis de MMP-2, avaliada como intensidade de fluorescência vermelha (n=4/grupo). (D) Atividade gelatinolítica total em extrato de aorta dos oito grupos experimentais. Valores expressos como média \pm EPM. * $P < 0,05$ para 2R-1C+veículo *versus* os quatro grupos controle. # $P < 0,05$ para 2R-1C+tratamentos *versus* 2R-1C+veículo.

Os níveis de MMP-2 também foram avaliados pelo método de imunohistoquímica. Observa-se na figura 13 que houve um aumento significativo da expressão da MMP-2 no grupo 2R-1C+veículo, quando comparado aos grupos controles ($p < 0,05$; Figura 13A e 13B). Os tratamentos com SPRL, HCTZ ou com ambas as drogas diminuíram a expressão da enzima nas aortas dos ratos hipertensos ($p < 0,05$). Os tratamentos não alteraram os níveis de MMP-2 nos animais controles ($p > 0,05$).

Não foram observadas alterações na expressão do TIMP-2 entre os oito grupos experimentais ($p > 0,05$; Figura 14A e 14B). Entretanto a razão MMP-2/TIMP-2 foi maior para os animais hipertensos não tratados quando comparada aos animais controles ($p < 0,05$; Figura 14C). Os tratamentos com SPRL, HCTZ ou com ambas as drogas diminuíram essa razão ($p < 0,05$), sem alterá-la nos animais controles ($p > 0,05$).

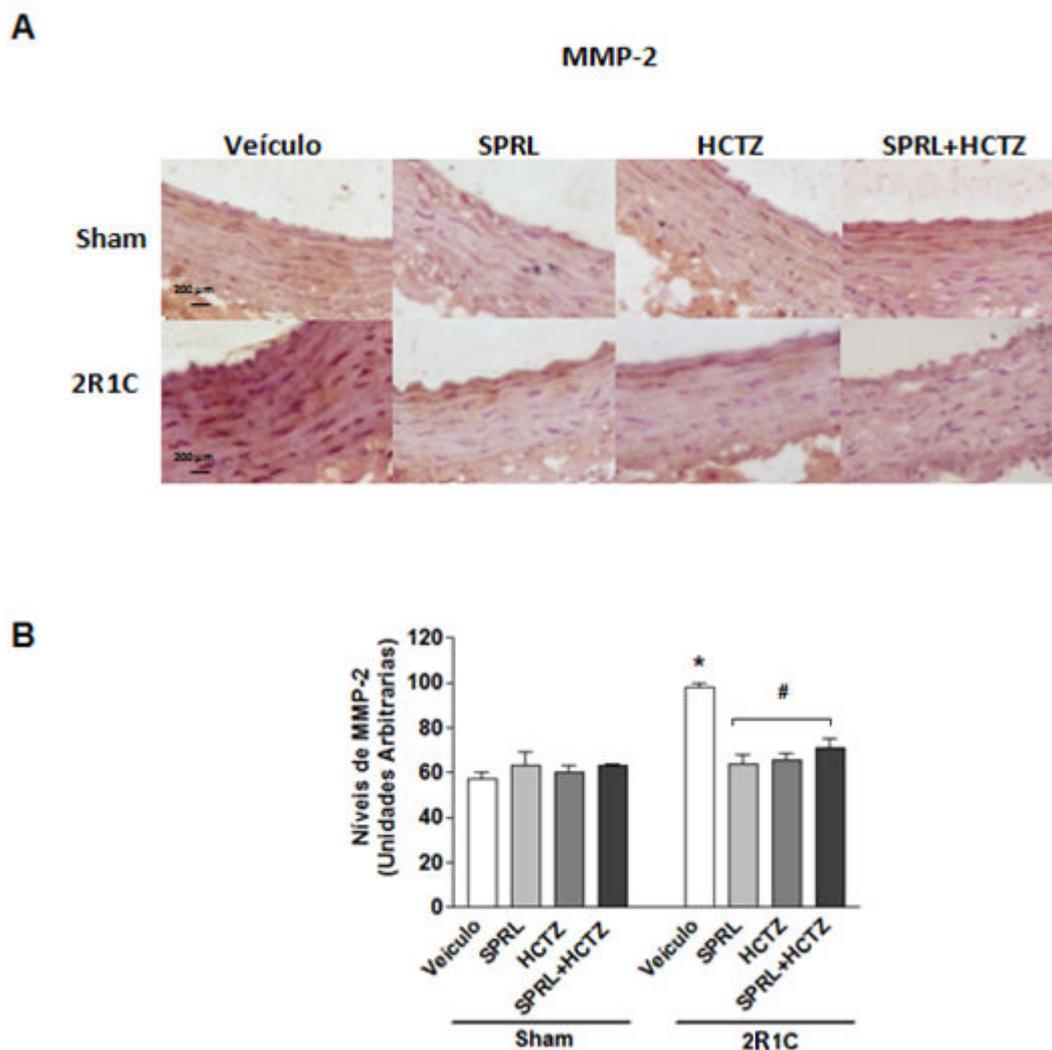


Figura 13- Efeito dos tratamentos na expressão da MMP-2 em aortas. Fotografias representativas (x400) da expressão de MMP-2 em marrom na camada média e endotélio das aortas dos oito grupos experimentais (A). Representação gráfica da atividade da expressão de MMP-2(B), quantificado analisando a intensidade de marrom. Valores expressos como média± EPM. (n=4/grupo) * $P < 0,05$ para 2R-1C+veículo versus os quatro grupos controle. # $P < 0,05$ para 2R-1C+tratamentos versus 2R-1C+veículo.

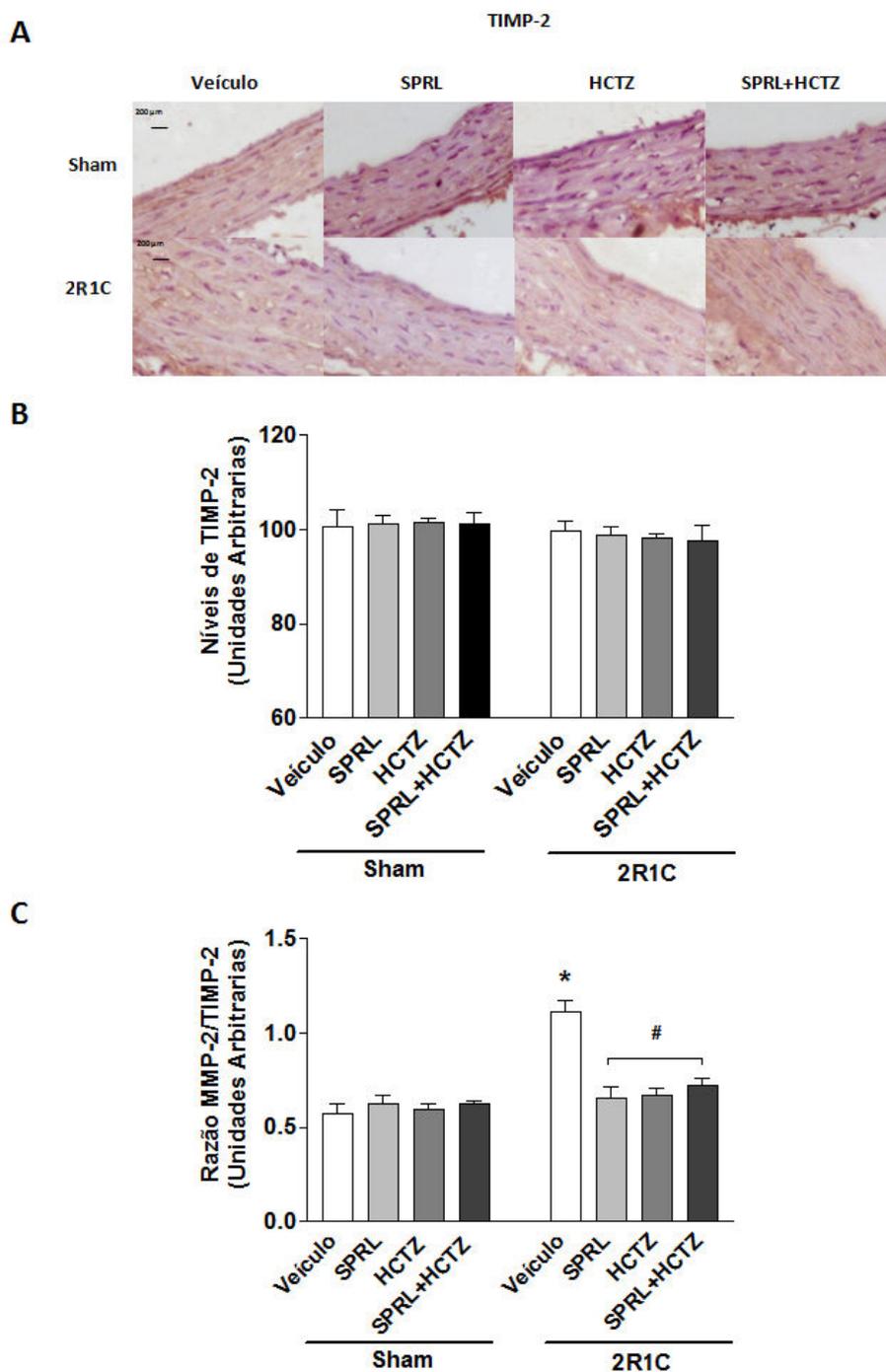


Figura 14- Efeito dos tratamentos na expressão do TIMP-2 em aortas. Fotografias representativas (x400) da expressão de TIMP-2 em marrom na camada média e endotélio das aortas dos oito grupos experimentais (A). Representação gráfica da atividade da expressão de TIMP-2 (B) e razão MMP-2/TIMP-2 (C), quantificados analisando a intensidade de marrom. Valores expressos como média \pm EPM. (n=4/grupo) * $P < 0,05$ para 2R-1C+veículo *versus* os quatro grupos controle. # $P < 0,05$ para 2R-1C+tratamentos *versus* 2R-1C+veículo.

DISCUSSÃO

Discussão

Os principais resultados do presente estudo foram: (I) o tratamento da hipertensão 2R-1C com SPRL, HCTZ, ou a combinação das drogas produziu efeitos anti-hipertensivos e impediu as alterações vasculares estruturais e funcionais associadas a este modelo de hipertensão, (II) enquanto o tratamento com SPRL produziu menor efeito anti-hipertensivo comparado ao com HCTZ ou com a combinação das drogas, o tratamento com ambas as drogas ou a combinação produziu efeitos antioxidantes e diminuiu os níveis e atividade da MMP-2 nos ratos hipertensos. Este é o primeiro estudo a avaliar os efeitos desses medicamentos sobre MMPs no modelo 2R-1C de hipertensão renovascular.

Sabe-se que o aumento da pressão arterial induz mudanças duradouras na parede arterial vascular (Safar, London *et al.*, 1998), que podem resultar da interação de vários mecanismos (Intengan e Schiffrin, 2001). Como pode ser observado na análise morfológica realizada nesse trabalho, os animais hipertensos apresentaram um aumento do número de células na camada média das aortas, sem redução no diâmetro do lúmen. Esse tipo de remodelamento é classificado como hipertrófico, característico de artérias de condutância (Duprez, 2006), com consequente aumento na AST e na razão M/L. As MMPs, como citado anteriormente, participam do remodelamento vascular por degradar componentes da matriz extracelular, promover proliferação e migração de células musculares lisas, e hipertrofia celular (Intengan e Schiffrin, 2001; Bouvet, Gilbert *et al.*, 2005).

Nossos resultados bioquímicos (métodos de zimografia, imunohistoquímica e imunofluorescência para MMP-2) mostram um aumento na expressão vascular dessa enzima nos animais hipertensos. De forma similar aos nossos resultados, o aumento dessa enzima foi observado em animais 2R-1C (Castro, Rizzi *et al.*, 2008; Castro, Rizzi *et al.*, 2009) e em diferentes modelos de hipertensão (Bouvet, Gilbert *et al.*, 2005), e esse aumento foi associado à alterações vasculares estruturais e funcionais.

Como citado na introdução, algumas evidências sugerem que a MMP-2 está envolvida na modulação do tônus vascular por clivar alguns peptídeos vasoativos. Estudos mostraram que ela pode clivar a Big-ET-1 em um metabólito com potente ação vasoconstritora, a ET-1₍₁₋₃₂₎, o CGRP em metabólitos com menor ação vasodilatadora. Além disso cliva a adrenomedulina em metabólitos com ações vasoconstritoras (Fernandez-Patron, Radomski *et al.*, 1999; Fernandez-Patron, Stewart *et al.*, 2000; Martinez, Oh *et al.*, 2004). Por meio dessas ações essa enzima pode estar envolvida na manutenção na disfunção endotelial encontrada em modelos de hipertensão arterial.

Neste trabalho, observou-se que o tratamento dos animais hipertensos com SPRL produziu pequeno efeito anti-hipertensivo nos animais hipertensos. Essa pequena redução foi associada à normalização morfológica completa da parede vascular. Isso sugere que a aldosterona seja um importante mediador das alterações funcionais e morfológicas induzida pela hipertensão 2R-1C.

Além disso, os animais hipertensos não tratados apresentaram relaxamento vascular dependente do endotélio prejudicado em comparação

aos animais controles. O tratamento com SPRL produziu uma melhora da resposta dependente do endotélio. Nenhuma diferença entre animais hipertensos ou controles foi observada na resposta independente do endotélio, sugerindo que a disfunção endotelial possa ser o principal responsável pelas alterações encontradas na função vascular.

De forma similar aos nossos resultados, o tratamento com SPRL melhorou alterações vasculares estruturais e funcionais induzidas pela administração de angiotensina II em ratos (Viridis, Neves *et al.*, 2002). Outros estudos mostram que o tratamento crônico com antagonistas dos receptores mineralocorticóides melhorou o relaxamento dependente do endotélio e o remodelamento da aorta de ratos espontaneamente hipertensos e na insuficiência cardíaca (Thai, Do *et al.*, 2006; De Las Heras, Ruiz-Ortega *et al.*, 2007; Sartorio, Fraccarollo *et al.*, 2007).

Embora os efeitos produzidos pela SPRL possam diferir significativamente daqueles produzidos pelo antagonista mineralocorticóide seletivo eplerenone, os nossos resultados são consistentes com a idéia de que o bloqueio dos receptores mineralocorticóides atenua o remodelamento cardiovascular da hipertensão, independentemente da normalização da pressão arterial (Burla, Neves *et al.*, 2007).

Neste trabalho, os animais hipertensos que receberam tratamento com SPRL apresentaram níveis reduzidos de MMP-2, por isso sugere-se que essa redução possa ter sido uma das responsáveis pela melhora da resposta dependente do endotélio encontrada nas aortas nos ratos hipertensos tratados.

Como citado anteriormente, a MMP-2 é uma enzima constitutiva que sofre influência de vários fatores para sua ativação. Enquanto observamos nesse estudo um aumento dos níveis vasculares de MMP-2 nos animais hipertensos, os níveis de seu maior inibidor endógeno, o TIMP-2, analisados por imuno-histoquímica, não foram alterados na aorta dos diferentes grupos experimentais. Assim, aconteceu um desequilíbrio na razão MMP-2/TIMP-2 nos animais hipertensos, e como os TIMPs são importantes inibidores das MMPs, é possível que esse desequilíbrio que tenha sido um dos responsáveis pelo aumento da atividade gelatinolítica *in situ* e no extrato das aortas dos animais hipertensos. Esse aumento na atividade dos animais hipertensos foi revertido pelo tratamento com SPRL. De acordo com esses resultados, alguns trabalhos mostram que o antagonismo do receptor mineralocorticóide reduziu a quantidade de MMPs em cães com insuficiência cardíaca, e que previniu ou atenuou mecanismos pró-fibróticos, incluindo aumento da expressão de colágeno, fibronectina, da MMP-2 e da MMP-9 em miócitos cardíacos de ratos estimulados com aldosterona (Rude, Duhaney *et al.*, 2005; Rastogi, Mishra *et al.*, 2007).

Outro parâmetro avaliado nesse estudo foi o estresse oxidativo. Como citado na introdução, EROs também participam do processo de remodelamento vascular, e são um dos fatores responsáveis pela ativação das MMPs (Visse e Nagase, 2003; Kandasamy, Chow *et al.*, 2009). De acordo com isso, observamos um aumento nos níveis de EROs na camada média da aorta dos animais hipertensos, assim como o aumento da atividade da NADPH oxidase vascular nesses animais. A atividade da NADPH aumentada pode ser o principal leva a aumento do estresse oxidativo, pode diminuir a

biodisponibilidade do NO, contribuir para a disfunção endotelial e para o remodelamento vascular, características muito importante no modelo de hipertensão renovascular 2R-1C (Lerman, Chade *et al.*, 2005).

Neste estudo, o tratamento com SPRL produziu efeitos antioxidantes por diminuir a atividade da NADPH oxidase, e este resultado está de acordo com a menor produção do ânion superóxido *in situ* observada pelo método de DHE, e com os menores níveis plasmáticos de MDA encontrados nos ratos hipertensos tratados com esse antagonista mineralocorticoide. Essa diminuição de EROs pelo tratamento com SPRL acompanhada da redução nos níveis e atividade da MMP-2 observada na hipertensão sugere que mecanismos antioxidantes podem ter efeitos que regulam a MMP-2, e que, assim, essa enzima pode ser uma das principais responsáveis pelas mudanças vasculares estruturais e funcionais observadas na hipertensão 2R-1C, independentemente do efeito anti-hipertensivo produzido pela droga. Esses resultados confirmam resultados anteriores, em que drogas antioxidantes preveniram o aumento de MMP-2 na aorta, bem como as alterações funcionais e estruturais induzidas nesse modelo de hipertensão renovascular (Castro, Rizzi *et al.*, 2009).

Enquanto a administração de SPRL aos animais hipertensos produziu menor efeito anti-hipertensivo, a associação de HCTZ à SPRL demonstrou maior efeito na queda da pressão arterial. No entanto, essa melhora do efeito anti-hipertensivo não foi associada com efeitos mais pronunciados sobre a função ou estrutura vascular. Além disso, não encontramos nenhum efeito benéfico adicional sobre o estresse oxidativo ou sobre os níveis e atividade da MMP-2 quando ambas as drogas foram administradas a ratos hipertensos. Estes resultados sugerem que o bloqueio dos receptores mineralocorticóides

possa ter revertido completamente as alterações críticas associadas à hipertensão 2R-1C.

Também é possível que o bloqueio dos receptores mineralocorticóides pela SPRL possa ter compensado as conseqüências deletérias da HCTZ induzidas por depleção de volume, como o aumento de angiotensina II e aldosterona (Koenig, Binner *et al.*, 1991), que levam a um aumento nos níveis de EROs e de MMPs (Rude, Duhaney *et al.*, 2005; Johar, Cave *et al.*, 2006).

Curiosamente, observamos nesse trabalho que os animais hipertensos tratados com HCTZ também apresentaram uma diminuição das alterações estruturais e funcionais características da hipertensão 2R-1C. Esses resultados confirmam estudos anteriores que mostram efeitos vasculares benéficos causados pelo tratamento com HCTZ em animais SHR (Mougenot, Mediani *et al.*, 2005). Entretanto, contrastam com outro estudo feito com ratos stroke-prone SHR (SHRSP), em que a mesma dose de HCTZ não impediu espessamento da camada média arterial (Contard, Sabri *et al.*, 1993). É provável que essa contradição se deva a diferenças significativas entre os modelos animais de hipertensão utilizados.

Apesar dessas diferenças, os efeitos antioxidantes produzidos pela administração de HCTZ podem ajudar a explicar os efeitos benéficos encontrados neste estudo. O tratamento com HCTZ inibiu a atividade da enzima NADPH oxidase vascular, inibindo assim o aumento dos níveis EROs em resposta à hipertensão arterial na parede dos vasos. Além disso, o efeito antioxidante produzido pelo tratamento dos animais hipertensos com HCTZ pode ter aumentado a biodisponibilidade do NO, o que explicaria a melhora da

função endotélio-dependente observada neste estudo. O aumento da biodisponibilidade de NO foi observado em pacientes hipertensos tratados com HCTZ em um estudo anterior (Kedziora-Kornatowska, Czuczejko *et al.*, 2006). Já o fato de que o tratamento com HCTZ não foi capaz de reduzir os níveis plasmáticos de MDA pode ser explicado pela falta de especificidade da técnica de TBARS. O TBA reage com uma grande variedade de compostos, como açúcares, aminoácidos, uma variedade de aldeídos e bilirrubina, produzindo interferência nos ensaios colorimétricos e medições fluorimétricas do MDA (Knight, Pieper *et al.*, 1988; Valenzuela, 1991).

Além do efeito antioxidante encontrado nos animais hipertensos tratados com HCTZ, os testes bioquímicos mostraram que os níveis e a atividade da MMP-2 foram reduzidos nesses animais. Assim, o efeito antioxidante produzido no tratamento com a HCTZ também pode ter diminuído o aumento da atividade da MMP-2 provocados pela hipertensão, impedindo o remodelamento vascular, conforme citado anteriormente (Martinez, Castro *et al.*, 2008; Castro, Rizzi *et al.*, 2009).

CONCLUSÃO

Conclusão

O tratamento com SPRL produziu efeito anti-hipertensivo discreto, atenuou os níveis de MMP-2, e reverteu a disfunção endotelial associada à hipertensão 2R-1C. Os efeitos benéficos produzidos por essa droga parecem não ser totalmente dependentes de seu efeito anti-hipertensivo e sugerem que ela possa evitar as alterações vasculares encontradas na hipertensão 2R-1C. Esses benefícios parecem resultar da redução do estresse oxidativo, que modula negativamente o aumento da MMP-2 e as alterações vasculares observadas nesse modelo experimental. A associação de SPRL com HCTZ não apresentou benefícios adicionais ao encontrado apenas com SPRL, embora a HCTZ sozinha efeitos semelhantes à SPRL atenuando o aumento de MMP-2 bem como as alterações funcionais e estruturais do modelo experimental estudado.

REFERÊNCIAS

Referências Bibliográficas

Adam, W. R. Aldosterone and dopamine receptors in the kidney: sites for pharmacologic manipulation of renal function. Kidney Int, v.18, n.5, Nov, p.623-35. 1980.

Baumbach, G. L. e D. D. Heistad. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. Hypertension, v.13, n.6 Pt 2, p.968-72. 1989.

Bode, W. e K. Maskos. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. Biol Chem, v.384, n.6, Jun, p.863-72. 2003.

Bouvet, C., L. A. Gilbert, *et al.* Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition. Hypertension, v.45, n.3, Mar, p.432-7. 2005.

Burla, A. K., M. F. Neves, *et al.* Eplerenone offsets cardiac and aortic adverse remodeling in spontaneously hypertensive rats. Int J Cardiol, v.114, n.1, Jan 2, p.64-70. 2007.

Cai, H. e D. G. Harrison. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. Circ Res, v.87, n.10, Nov 10, p.840-4. 2000.

Calder, J. A., M. Schachter, *et al.* Direct vascular actions of hydrochlorothiazide and indapamide in isolated small vessels. Eur J Pharmacol, v.220, n.1, Sep 10, p.19-26. 1992.

_____. Ion channel involvement in the acute vascular effects of thiazide diuretics and related compounds. J Pharmacol Exp Ther, v.265, n.3, Jun, p.1175-80. 1993.

_____. Vasorelaxant actions of 5-OH-indapamide, a major metabolite of indapamide: comparison with indapamide, hydrochlorothiazide and cicletanine. Eur J Pharmacol, v.256, n.2, Apr 21, p.185-91. 1994.

Castro, M. M., E. Rizzi, *et al.* Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. Atherosclerosis, v.198, n.2, Jun, p.320-31. 2008.

_____. Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. Free Radic Biol Med, v.46, n.9, May 1, p.1298-307. 2009.

Cau, S. B., C. A. Dias-Junior, *et al.* Dose-dependent beneficial hemodynamic effects of BAY 41-2272 in a canine model of acute pulmonary thromboembolism. Eur J Pharmacol, v.581, n.1-2, Feb 26, p.132-7. 2008.

Chesler, N. C., D. N. Ku, *et al.* Transmural pressure induces matrix-degrading activity in porcine arteries ex vivo. Am J Physiol, v.277, n.5 Pt 2, Nov, p.H2002-9. 1999.

Chow, A. K., J. Cena, *et al.* Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. Br J Pharmacol, v.152, n.2, Sep, p.189-205. 2007.

Contard, F., A. Sabri, *et al.* Arterial smooth muscle cell phenotype in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Hypertension, v.22, n.5, Nov, p.665-76. 1993.

Dao, H. H., J. Lemay, *et al.* Norepinephrine-induced aortic hyperplasia and extracellular matrix deposition are endothelin-dependent. J Hypertens, v.19, n.11, Nov, p.1965-73. 2001.

De Las Heras, N., M. Ruiz-Ortega, *et al.* Interactions between aldosterone and connective tissue growth factor in vascular and renal damage in spontaneously hypertensive rats. J Hypertens, v.25, n.3, Mar, p.629-38. 2007.

Derosa, G., A. D'angelo, *et al.* Matrix metalloproteinase-2, -9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with hypertension. Endothelium, v.13, n.3, May-Jun, p.227-31. 2006.

Duprez, D. A. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in vascular remodeling and inflammation: a clinical review. J Hypertens, v.24, n.6, Jun, p.983-91. 2006.

Escobales, N. e M. J. Crespo. Oxidative-nitrosative stress in hypertension. Curr Vasc Pharmacol, v.3, n.3, Jul, p.231-46. 2005.

Faia, K. L., W. P. Davis, *et al.* Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in hamster aortic atherosclerosis: correlation with in-situ zymography. Atherosclerosis, v.160, n.2, Feb, p.325-37. 2002.

Fernandez-Patron, C., M. W. Radomski, *et al.* Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. Circ Res, v.85, n.10, Nov 12, p.906-11. 1999.

Fernandez-Patron, C., K. G. Stewart, *et al.* Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. Circ Res, v.87, n.8, Oct 13, p.670-6. 2000.

Fiebeler, A., D. N. Muller, *et al.* Aldosterone, mineralocorticoid receptors, and vascular inflammation. Curr Opin Nephrol Hypertens, v.16, n.2, Mar, p.134-42. 2007.

Flamant, M., S. Placier, *et al.* Role of matrix metalloproteinases in early hypertensive vascular remodeling. Hypertension, v.50, n.1, Jul, p.212-8. 2007.

Fukui, T., N. Ishizaka, *et al.* p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. Circ Res, v.80, n.1, Jan, p.45-51. 1997.

Funder, J. W. Aldosterone, mineralocorticoid receptors and vascular inflammation. Mol Cell Endocrinol, v.217, n.1-2, Mar 31, p.263-9. 2004.

Galis, Z. S. e J. J. Khatri. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. Circ Res, v.90, n.3, Feb 22, p.251-62. 2002.

Galis, Z. S., G. K. Sukhova, *et al.* Microscopic localization of active proteases by in situ zymography: detection of matrix metalloproteinase activity in vascular tissue. Faseb J, v.9, n.10, Jul, p.974-80. 1995.

Gerlach, R. F., C. Demacq, *et al.* Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. Clin Biochem, v.40, n.1-2, Jan, p.119-23. 2007.

Gerlach, R. F., J. A. Uzuelli, *et al.* Effect of anticoagulants on the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. Anal Biochem, v.344, n.1, Sep 1, p.147-9. 2005.

Goldblatt, H. Experimental renal hypertension; mechanism of production and maintenance. Circulation, v.17, n.4, Part 2, Apr, p.642-7. 1958.

Greene, A. S., P. J. Tonellato, *et al.* Microvascular rarefaction and tissue vascular resistance in hypertension. Am J Physiol, v.256, n.1 Pt 2, p.H126-31. 1989.

Griendling, K. K., B. Lassegue, *et al.* Angiotensin receptors and their therapeutic implications. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.36, p.281-306. 1996.

Griendling, K. K., D. Sorescu, *et al.* NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. Circ Res, v.86, n.5, Mar 17, p.494-501. 2000.

Grote, K., I. Flach, *et al.* 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, v.92, n.11, Jun 13, p.e80-6. 2003.

Hao, L., T. Nishimura, *et al.* Vascular responses to alpha1-adrenergic receptors in small rat mesenteric arteries depend on mitochondrial reactive oxygen species. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.26, n.4, Apr, p.819-25. 2006.

Harrison, D. G. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. J Clin Invest, v.100, n.9, p.2153-7. 1997.

Heitzer, T., U. Wenzel, *et al.* Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. Kidney Int, v.55, n.1, p.252-60. 1999.

Humphrey, J. D. Mechanisms of arterial remodeling in hypertension: coupled roles of wall shear and intramural stress. Hypertension, v.52, n.2, Aug, p.195-200. 2008.

Intengan, H. D. e E. L. Schiffrin. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. Hypertension, v.38, n.3 Pt 2, Sep, p.581-7. 2001.

Janiszewski, M., H. P. Souza, *et al.* Overestimation of NADH-driven vascular oxidase activity due to lucigenin artifacts. Free Radic Biol Med, v.32, n.5, Mar 1, p.446-53. 2002.

Jenkins, G. M., M. T. Crow, *et al.* Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase and preferential localization of matrix metalloproteinase-2 to the neointima of balloon-injured rat carotid arteries. Circulation, v.97, n.1, p.82-90. 1998.

Johar, S., A. C. Cave, *et al.* Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. Faseb J, v.20, n.9, Jul, p.1546-8. 2006.

Kandasamy, A. D., A. K. Chow, *et al.* Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. Cardiovasc Res, Aug 20. 2009.

Kearney, P. M., M. Whelton, *et al.* Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. Lancet, v.365, n.9455, Jan 15-21, p.217-23. 2005.

Kedziora-Kornatowska, K., J. Czuczejko, *et al.* Effects of perindopril and hydrochlorothiazide on selected indices of oxidative stress in the blood of elderly patients with essential hypertension. Clin Exp Pharmacol Physiol, v.33, n.8, Aug, p.751-6. 2006.

Knight, J. A., R. K. Pieper, *et al.* Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. Clin Chem, v.34, n.12, Dec, p.2433-8. 1988.

Koenig, W., L. Binner, *et al.* Catecholamines and the renin-angiotensin-aldosterone system during treatment with felodipine ER or hydrochlorothiazide in essential hypertension. J Cardiovasc Pharmacol, v.18, n.3, Sep, p.349-53. 1991.

Kohzuki, M., M. Kanazawa, *et al.* Cardiomegaly and vasoactive hormones in rats with chronic myocardial infarction: long-term effects of chlorothiazide. Clin Sci (Lond), v.90, n.1, Jan, p.31-6. 1996.

Lalu, M. M., J. Cena, *et al.* Matrix metalloproteinases contribute to endotoxin and interleukin-1beta induced vascular dysfunction. Br J Pharmacol, v.149, n.1, Sep, p.31-42. 2006.

Lawes, C. M., S. Vander Hoorn, *et al.* Blood pressure and the global burden of disease 2000. Part 1: estimates of blood pressure levels. J Hypertens, v.24, n.3, Mar, p.413-22. 2006.

_____. Blood pressure and the global burden of disease 2000. Part II: estimates of attributable burden. J Hypertens, v.24, n.3, Mar, p.423-30. 2008.

Lehoux, S., C. A. Lemarie, *et al.* Pressure-induced matrix metalloproteinase-9 contributes to early hypertensive remodeling. Circulation, v.109, n.8, Mar 2, p.1041-7. 2004.

Lerman, L. O., A. R. Chade, *et al.* Animal models of hypertension: an overview. J Lab Clin Med, v.146, n.3, Sep, p.160-73. 2005.

Luchtefeld, M., K. Grote, *et al.* Angiotensin II induces MMP-2 in a p47phox-dependent manner. Biochem Biophys Res Commun, v.328, n.1, Mar 4, p.183-8. 2005.

Luscher, T. F., L. Raij, *et al.* Endothelium-dependent vascular responses in normotensive and hypertensive Dahl rats. Hypertension, v.9, n.2, p.157-63. 1987.

Martinez-Maldonado, M. Pathophysiology of renovascular hypertension. Hypertension, v.17, n.5, May, p.707-19. 1991.

Martinez, A., H. R. Oh, *et al.* Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. Biochem J, v.383, n.Pt. 3, Nov 1, p.413-8. 2004.

Martinez, M. L., M. M. Castro, *et al.* Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-2 activity and reverses vascular dysfunction in renovascular hypertensive rats. Eur J Pharmacol, v.591, n.1-3, Sep 4, p.224-30. 2008.

Martinez, M. L., L. F. Lopes, *et al.* Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-9 activity in patients with hypertension. J Cardiovasc Pharmacol, v.47, n.1, Jan, p.117-22. 2006.

Mayet, J. e A. Hughes. Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. Heart, v.89, n.9, Sep, p.1104-9. 2003.

Min, L. J., M. Mogi, *et al.* Aldosterone and angiotensin II synergistically induce mitogenic response in vascular smooth muscle cells. Circ Res, v.97, n.5, Sep 2, p.434-42. 2005.

Mougenot, N., O. Mediani, *et al.* Bisoprolol and hydrochlorothiazide effects on cardiovascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. Pharmacol Res, v.51, n.4, Apr, p.359-65. 2005.

Mulvany, M. J. The fourth Sir George Pickering memorial lecture. The structure of the resistance vasculature in essential hypertension. J Hypertens, v.5, n.2, p.129-36. 1987.

Nagase, H., R. Visse, *et al.* Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovasc Res, v.69, n.3, Feb 15, p.562-73. 2006.

Nagase, H. e J. F. Woessner, Jr. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem, v.274, n.31, Jul 30, p.21491-4. 1999.

Nakano, S., N. Kobayashi, *et al.* Cardioprotective mechanisms of spironolactone associated with the angiotensin-converting enzyme/epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinases, NAD(P)H oxidase/lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, and Rho-kinase pathways in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. Hypertens Res, v.28, n.11, Nov, p.925-36. 2005.

Nobre, F., C. A. Da Silva, *et al.* Antihypertensive agents have different ability to modulate arterial pressure and heart rate variability in 2K1C rats. Am J Hypertens, v.19, n.10, Oct, p.1079-83. 2006.

Oliveira-Sales, E. B., A. P. Dugaich, *et al.* Oxidative stress contributes to renovascular hypertension. Am J Hypertens, v.21, n.1, Jan, p.98-104. 2008.

Owens, G. K. Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells. Am J Physiol, v.257, n.6 Pt 2, p.H1755-65. 1989.

Panza, J. A., A. A. Quyyumi, *et al.* Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. N Engl J Med, v.323, n.1, p.22-7. 1990.

Park, Y. M., B. H. Lim, *et al.* Expression of NAD(P)H oxidase subunits and their contribution to cardiovascular damage in aldosterone/salt-induced hypertensive rat. J Korean Med Sci, v.23, n.6, Dec, p.1039-45. 2008.

Pickkers, P., R. S. Garcha, *et al.* Inhibition of carbonic anhydrase accounts for the direct vascular effects of hydrochlorothiazide. Hypertension, v.33, n.4, Apr, p.1043-8. 1999.

Pitt, B., W. Remme, *et al.* Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. N Engl J Med, v.348, n.14, Apr 3, p.1309-21. 2003.

Pitt, B., F. Zannad, *et al.* The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. N Engl J Med, v.341, n.10, Sep 2, p.709-17. 1999.

Pu, Q., M. F. Neves, *et al.* Endothelin antagonism on aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling. Hypertension, v.42, n.1, Jul, p.49-55. 2003.

Raffetto, J. D. e R. A. Khalil. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. Biochem Pharmacol, v.75, n.2, Jan 15, p.346-59. 2008.

Rajagopalan, S., D. Duquaine, *et al.* Mineralocorticoid receptor antagonism in experimental atherosclerosis. Circulation, v.105, n.18, May 7, p.2212-6. 2002.

Rao, G. N. e B. C. Berk. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. Circ Res, v.70, n.3, p.593-9. 1992.

Rastogi, S., S. Mishra, *et al.* Effect of long-term monotherapy with the aldosterone receptor blocker eplerenone on cytoskeletal proteins and matrix metalloproteinases in dogs with heart failure. Cardiovasc Drugs Ther, v.21, n.6, Dec, p.415-22. 2007.

Rude, M. K., T. A. Duhaney, *et al.* Aldosterone stimulates matrix metalloproteinases and reactive oxygen species in adult rat ventricular cardiomyocytes. Hypertension, v.46, n.3, Sep, p.555-61. 2005.

Rueckschloss, U., N. Duerrschmidt, *et al.* NADPH oxidase in endothelial cells: impact on atherosclerosis. Antioxid Redox Signal, v.5, n.2, Apr, p.171-80. 2003.

Safar, M. E., G. M. London, *et al.* Recent advances on large arteries in hypertension. Hypertension, v.32, n.1, Jul, p.156-61. 1998.

Sartorio, C. L., D. Fraccarollo, *et al.* Mineralocorticoid receptor blockade improves vasomotor dysfunction and vascular oxidative stress early after myocardial infarction. Hypertension, v.50, n.5, Nov, p.919-25. 2007.

Schulz, R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.47, p.211-42. 2007.

Souza-Tarla, C. D., J. A. Uzuelli, *et al.* Methodological issues affecting the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. Clin Biochem, v.38, n.5, May, p.410-4. 2005.

Spinale, F. G. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. Circ Res, v.90, n.5, Mar 22, p.520-30. 2002.

Suzuki, G., H. Morita, *et al.* Effects of long-term monotherapy with eplerenone, a novel aldosterone blocker, on progression of left ventricular dysfunction and remodeling in dogs with heart failure. Circulation, v.106, n.23, Dec 3, p.2967-72. 2002.

Suzuki, H., A. Swei, *et al.* In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography. Hypertension, v.25, n.5, May, p.1083-9. 1995.

Thai, H. M., B. Q. Do, *et al.* Aldosterone antagonism improves endothelial-dependent vasorelaxation in heart failure via upregulation of endothelial nitric oxide synthase production. J Card Fail, v.12, n.3, Apr, p.240-5. 2006.

Touyz, R. M. e E. L. Schiffrin. Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. Hypertension, v.34, n.4 Pt 2, Oct, p.976-82. 1999.

_____. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. Histochem Cell Biol, v.122, n.4, Oct, p.339-52. 2004.

Traub, Y. M., L. M. Nemes, *et al.* Stimulation of renin secretion by various methods: optional results with hydrochlorothiazide. Int Urol Nephrol, v.8, n.3, p.247-55. 1976.

Valenzuela, A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. Life Sci, v.48, n.4, p.301-9. 1991.

Van Brummelen, P., A. Man In't Veld, *et al.* Haemodynamics during long-term thiazide treatment in essential hypertension: differences between responders and non-responders. Clin Sci (Lond), v.57 Suppl 5, Dec, p.359s-362s. 1979.

Viel, E. C., K. Benkirane, *et al.* Xanthine oxidase and mitochondria contribute to vascular superoxide anion generation in DOCA-salt hypertensive rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.295, n.1, Jul, p.H281-8. 2008.

Viridis, A., M. F. Neves, *et al.* Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. Hypertension, v.40, n.4, Oct, p.504-10. 2002.

Visse, R. e H. Nagase. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res, v.92, n.8, May 2, p.827-39. 2003.

Ward, M. R., G. Pasterkamp, *et al.* Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. Circulation, v.102, n.10, Sep 5, p.1186-91. 2000.

Warnholtz, A., G. Nickenig, *et al.* Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. Circulation, v.99, n.15, Apr 20, p.2027-33. 1999.

Yasmin, C. M. Mceniery, *et al.* Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.25, n.2, Feb, p.372. 2005.

Zhu, Z., S. Zhu, *et al.* Thiazide-like diuretics attenuate agonist-induced vasoconstriction by calcium desensitization linked to Rho kinase. Hypertension, v.45, n.2, Feb, p.233-9. 2005.

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](#)