

**DIOGO MARÇAL MACHADO DE OLIVEIRA**

**Efeitos de diferentes diidropiridinas sobre alterações  
vasculares em modelo de Hipertensão Renovascular (2R-1C)**

**Tese 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 – SP**

**2010**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

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

## FICHA CATALOGRÁFICA

Marçal, Diogo Oliveira

Efeitos de diferentes Diidropiridinas sobre alterações vasculares em modelo de Hipertensão Renovascular (2R-1C). Ribeirão Preto, 2010.

73p. II. 30cm.

Tese (Mestrado-Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Bloqueadores de canais de cálcio, 2. Hipertensão, 3. Metaloproteinases, 4. Estresse Oxidativo, 5. 2R-1C.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Diogo Marçal Machado de Oliveira

**Efeitos de diferentes Diidropiridinas sobre alterações vasculares em modelo de Hipertensão Renovascular (2R-1C).**

**Tese 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. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Instituição: FMRP – USP

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

Prof. Dr. André Schimidt

Instituição: FMRP – USP

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Maria Cláudia Irigoyen

Instituição: USP – INCOR

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

*Dedico este trabalho à minha família e ao grupo de Hipertensão  
com quem trabalhei durante estes dois anos...que estiveram  
ao meu lado em todos os momentos...!!*

**“Desde o nascer até o por-do-sol, seja louvado o nome do senhor!!”**

**Salmos 113.3**

## **AGRADECIMENTOS**

Toda a honra e toda glória seja dada, primeiramente, à Deus, o autor e consumidor da minha fé, e que esteve sempre conduzindo os meus passos durante toda a caminhada. Obrigado, Senhor, por tudo!!!!

À meus pais que sempre estiveram ao meu lado na busca desse sonho e que mesmo longe sempre estiveram intercedendo por mim com orações e palavras de incentivo e carinho. Serei eternamente grato por toda a dedicação, incentivo, amor e principalmente por confiarem em mim.

Agradeço à meu irmão e amigo, David. Obrigado pela amizade, companhia e amor. Agradeço à Deus por termos passado juntos na prova de mestrado pois assim fizemos companhia um para o outro e nossa amizade se fortaleceu ainda mais. Obrigado mano!!!

À minha namorada Eneida por estar sempre ao meu lado me oferecendo sua amizade, compreensão, amor e principalmente tendo paciência comigo. Sua presença nesses dois anos foram fundamentais. Muito obrigado por tudo. Você é um presente de Deus na minha vida!!!

Aos meus avós que mesmo longe, em Belém do Pará, sempre torceram e oraram por mim. Obrigado pelo carinho, pelo amor e pela preocupação.

Ao meu professor de graduação, professor Edson Negreiros, que me incentivou a vir para Ribeirão Preto fazer mestrado em Farmacologia. Muito obrigado.

Ao meu orientador, prof. Dr. José Eduardo, por todo incentivo e ensinamentos. Obrigado pela orientação, paciência e por acreditar em mim.

Para mim um dos melhores professores e pesquisadores da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Agradeço também à profa. Dra. Raquel Gerlach pela colaboração e por abrir as portas de seu laboratório para que este trabalho fosse realizado. Muito obrigado.

Agradeço aos professores Dr. André Schimith e Dra. Maria Cláudia Irigoyen a disponibilidade em fazer parte desta banca e a atenção concedida.

À meu grande amigo, Alisson, que esteve sempre à meu lado e ao lado do meu irmão David. Obrigado pelas orientações, pelos conselhos e principalmente pela amizade e por poder contar sempre com você. “Cara”, valeu todo o esforço!!!!

Aos amigos do grupo RADIARE: Francisco, Paulo, Lucas, pela amizade!!!

Valeu demais, pessoal!!!!

Aos amigos do grupo de Hipertensão: Élen, Carla e Dani. Obrigado pela amizade de vocês, por caminharem junto comigo durante este estudo. Este troféu também é de vocês!!!

Ao Stêfany, pelo exemplo de dedicação e perseverança. Muitas vezes me fortaleci vendo sua perseverança em não desistir das coisas. Valeu demais!!!

Aos amigos da república K- Zona: Ulisses, Renes, Bruno, Valdecir, Júnior, Lucas( Gambá sorrateiro), o “inesquecível” Roberto e João Paulo, companheiro de torcida à favor do São Paulo e contra o Corinthians. Valeu pessoal!!

Aos amigos do laboratório que tornaram minha caminhada muito mais agradável: Ana Carol, Ana Laura, Carlos, Carol Demaque, Evandro, Flávia, Ingrid, Jefferson, Joice, Jonas, Juliana, Júnior, Karina, Lorena, Marcelo Montenegro, Marcelo Luizon, Michele, Ozélia, Patrícia, Pâmela, Riccardo, Tatiane, Valéria Gomes, Vanessa Belo, Vanessa Fontana, Vânia.

Ao Márcio pela ajuda no início do meu projeto. Muito obrigado pela atenção e ajuda.

Ao Serginho, Massaro e Fábio, do biotério da FORP, obrigado pela atenção, prestabilidade e camaradagem. Obrigado por sempre cuidar bem dos animais com dedicação, seriedade e responsabilidade. Sem vocês o estudo não teria sucesso. Obrigado!!

Aos professores do departamento de Farmacologia da FMRP pelos ensinamentos e contribuição acadêmica.

Aos demais pós-graduandos e funcionários do departamento de Farmacologia, agradeço o apoio e o prazeroso convívio. Agradeço em especial ao Ramon e às queridas secretárias, Soninha e Fátima, a atenção, a paciência e prestabilidade.

Agradeço a CAPES o apoio financeiro que possibilitou a execução deste trabalho.

## RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é considerada um grande problema de saúde pública no mundo, e está amplamente relacionada a significativas alterações morfológicas e funcionais no aparelho cardiovascular.

O remodelamento vascular acelerado presente na hipertensão está associado a ativação de um grupo de endopeptidases zinco-dependentes denominadas metaloproteinases, que apresentam um papel importante na disfunção vascular de várias doenças cardiovasculares. Aumentos na atividade destas enzimas podem levar à degradação excessiva das proteínas da matriz extracelular (MEC), além de acentuar a migração de células musculares lisas e monócitos.

Um dos modelos mais semelhantes ao quadro de hipertensão renovascular em humanos é o modelo de hipertensão renovascular unilateral (2R-1C), que é produzido pelo clampeamento de uma das artérias renais e manutenção do rim contra lateral intacto. O modelo experimental 2R-1C foi proposto para este estudo por apresentar concentrações elevadas de EROs associadas a um aumento da renina plasmática e angiotensina II. Estas ações associadas a um aumento da pressão intra-luminal, podem ser muito importantes para ativação das MMPs, o que pode contribuir para as alterações vasculares observadas neste modelo de hipertensão.

Nifedipina, Nimodipina e Amlodipina são bloqueadores de canal de cálcio (CCB) da classe das diidropiridinas usada no tratamento da hipertensão. Além de reduzir a pressão arterial, há evidências de que estas diidropiridinas tenham ações pleiotrópicas que possam significativamente contribuir para os benefícios que ela produz na terapia da hipertensão. É possível que a Nifedipina, a Nimodipina e a Amlodipina e outros CCBs com efeitos antioxidantes reduzam a atividade/expressão/níveis das MMPs na hipertensão. Baseado nestas informações, os objetivos do nosso trabalho foram primeiramente, verificar possíveis aumentos de estresse oxidativo e de MMP-2 nos vasos de ratos no modelo de hipertensão renovascular. Objetivamos ainda estudar os efeitos do tratamento com estas diidropiridinas sobre as alterações mencionadas anteriormente.

Os resultados mostraram que o tratamento com as diidropiridinas reduziu a pressão arterial sistólica nos ratos hipertensos, preveniu aumentos na espessura da camada média da aorta e apresentou uma redução significativa nos níveis plasmáticos de malondialdeído e na atividade de MMP-2.

Estes resultados sugerem que 1) as MMPs podem contribuir para as alterações vasculares observadas neste modelo experimental e 2) aumentos nas concentrações de EROs podem estar diretamente relacionados com esta atividade aumentada da MMP-2 e que 3) o tratamento com diidropiridinas pode reverter a disfunção e o remodelamento vascular durante a hipertensão 2R-1C pela diminuição na atividade/níveis de MMP-2.

**Palavras chave:** Bloqueadores de Canal de Cálcio, Hipertensão, Diidropiridinas, Metaloproteinases e Estresse Oxidativo

## ABSTRACT

Hypertension is a major health problem associated with structural and functional modifications of the vasculature. The vascular remodeling accelerated present in the hypertension is associated with a group of endopeptidases zinc-dependents recognized as metalloproteinases play an important role in vascular dysfunction and tissue remodeling in many cardiovascular conditions. Increased MMPs activation promotes excessive degradation of extracellular matrix components, vascular smooth muscle cell migration and proliferation, and monocyte invasion, thus contributing to hypertensive structural alterations. One of the models most similar to the renovascular hypertension in humans, it is the model of unilateral renovascular hypertension (2K-1C), that is produced by the clamping of one renal arteries, and maintenance of intact contralateral kidney.

Two-kidney, one clip (2K-1C) hypertension is an animal model of renovascular hypertension associated with increased plasma renin activity and systemic/tissue angiotensin II levels, and thereby enhanced oxidative stress. These alterations, combined with the increased transmural pressure, are potent stimuli for the induction of MMPs expression and degrading activities, and may drive the vascular remodeling found in this model.

Nifedipine, Nimodipine and Amlodipine are calcium channel blockers (CCBs) of the dihydropyridines used for the treatment of hypertension. Beyond reducing the arterial pressure, there are evidences that these dihydropyridines have pleiotropic actions can significantly contribute for the benefits that they produce in the therapy of hypertension. It is possible that Nifedipine, Nimodipine, Amlodipine and others CCBs with antioxidants effects reduce the activity/expression/levels of the MMP-2 in hypertension. Based on this information, the aim of our work was first, to verify possible increases of oxidative stress and MMP-2 in the vessels of rats in the model of renovascular hypertension. We still objectived to study the effects of the treatment with these dihydropyridines on the alterations previously mentioned.

The results of this study showed that the treatment with dihydropyridines reduced the systolic arterial pressure in hypertensive rats, prevented the increases in media thickness, and was associated with lower media/lumen and cross sectional areas and presented a significant reduction in the malondialdehyde levels and in the activity of MMP-2. These results suggest that 1) MMPs play a role in 2K-1C hypertension and its structural and functional vascular

changes and 2) ROS enhance the activity of MMPs, especially MMP-2, and 3) the treatment with dihydropyridines can attenuate the vascular dysfunction and remodeling during 2K-1C hypertension by decreasing MMP-2 up regulation.

**Keywords:** Calcium Channel Blockers, Hypertension, Dihydropyridinas, Metalloproteinases and Oxidative stress.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**2R-1C-** Dois rins um clipe

**Ae-** Área externa

**Ai-** Área interna

**AM-** Adrenomedulina

**ANOVA-** Análise de Variância

**Angio II-** Angiotensina II

**APS-** Persulfato de Amônio

**AT<sub>1</sub>-** Receptores da angiotensina do subtipo II

**BH<sub>4</sub>-** Tetrahydrobiopterina

**Big-ET-1-** Big endotelina-1

**BSA-** Albumina Sérica Bovina

**CaCl<sub>2</sub>-** Cloreto de cálcio

**CGRP-** Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

**CSA-** Área de secção transversal

**CCB-** Bloqueadores de canais de cálcio

**Cols.-** Colaboradores

**DHPs-** Diidropiridinas

**DHE-** Dihidroetídeo

**Dq gelatin-** Substrato fluorescente para ensaios de atividade gelatinolítica

**ED-** Diâmetro externo

**eNOS-** Sintase endotelial do óxido nítrico

**EPM-** Erro padrão da média

**EOH-** 2-hidroxietídeo

**ET-1-** Endotelina -1

**g-** gramas

**GPX-** Glutathione Peroxidase

**GMPc-** Guanosina monofosfato cíclica

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-** Peróxido de Hidrogênio

**HAS-** Hipertensão Arterial Sistêmica

**HE-** Hematoxilina e Eosina

**ID-** Diâmetro interno  
**KDa-** Kilodalton  
**Kg-** Kilograma  
**L-** Litro  
**L-NAME-** N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina  
**MDA-** Malondialdeído  
**M-** molar  
**ml-** mililitro- 10<sup>-3</sup> do litro  
**mm-** milímetro  
**mg-** miligrama  
**mmol-** milimol  
**mmHg-** milímetros de mercúrio  
**MEC-** Matriz extra celular  
**Media-** média  
**M/L-** Razão Média/Lúmem  
**MMPs-** Metaloproteinases  
**MT-MMPs-** Metaloproteinases de membrana  
**N-** número  
**NADPH-** Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
**NEM-** N-etilmaleimida  
**nmol-** nanomol  
**NO-** Óxido Nítrico  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** - Ânion Superóxido  
**OCT-** Composto para congelar tecidos  
**OH<sup>·</sup>** - Radical Hidroxil  
**OONO<sup>-</sup>** - Peroxinitrito  
**PA-** Pressão Arterial  
**PAC-** Pressão Arterial de Cauda  
**PAS-** Pressão Arterial Sistólica  
**PBS-** Tampão Salina Fosfato  
**PFA-** Paraformaldeído  
**pH-** Potencial Hidrogeniônico  
**PMSF-** Fenilmetanosulfonilfluoreto  
**R-** raio

**R-COO-** Radical peroxil de ácido graxo

**RPM-** rotações por minuto

**SDS-** Dodecil sulfato de sódio

**SOD-** Superóxido dismutase

**Std-** Padrão interno

**TBA-** Ácido tiobarbitúrico

**TBARS-** Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

**TIMP-** inibidor endógeno de MMP

**Tris-HCl-** Tris ácido clorídrico

**TBS-** Tampão Tris salina

**TEMED-** Tetrametiletilenodiamina

**$\mu\text{L}$ -** microlitro

**$\mu\text{m}$ -** micrômetro

**$\mu\text{mol}$ -** micromol

## LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

### Figuras:

<b>Figura 1:</b> Corte da parede vascular e as alterações que ocorrem na hipertensão .....	18
<b>Figura 2:</b> Estrutura das MMPs .....	20
<b>Figura 3:</b> Alvos da MMP-2 no coração .....	21
<b>Figura 4:</b> Ações exercidas pela MMP-2 sobre o tônus vascular .....	25
<b>Figura 5:</b> Ativação das MMPs.....	26
<b>Figura 6:</b> Gel de zimografia representativo dos grupos experimentais.....	49
<b>Figura 7:</b> Efeito das diidropiridinas sobre a atividade gelatinolítica <i>in situ</i> .....	51

### Gráficos:

<b>Gráfico 1:</b> Efeito das diidropiridinas sobre a pressão arterial e peso corporal.....	45
<b>Gráfico 2:</b> Efeito das diidropiridinas sobre alterações estruturais da aorta associadas à hipertensão.....	47
<b>Gráfico 3:</b> Efeito das diidropiridinas sobre a proliferação de células musculares lisas .....	48
<b>Gráfico 4:</b> Representação gráfica da pró-MMP-2 e da MMP-2 ativa .....	50
<b>Gráfico 5:</b> Efeito das diidropiridinas sobre a atividade gelatinolítica <i>in situ</i> .....	51
<b>Gráfico 6:</b> Efeito das diidropiridinas sobre a expressão da MMP-2 .....	52
<b>Gráfico 7:</b> Efeito das diidropiridinas sobre as concentrações vasculares e plasmáticas de EROs.....	54

# SUMÁRIO

<b>1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1 - Hipertensão Arterial como um problema de saúde pública .....	16
1.2 - Modelo animal de Hipertensão Arterial .....	17
1.3 - Disfunção vascular na Hipertensão Arterial.....	17
1.4 - Metaloproteinasas da Matriz Extracelular (MMPs) e o processo de remodelamento vascular.....	19
1.5 - Relevância do estresse oxidativo como um importante fator que modula a atividade das Metaloproteinasas.....	25
1.6 - Nifedipina, Nimodipina e Anlodipina: bloqueadores de canais de cálcio usados no tratamento da Hipertensão .....	30
 <b>HIPÓTESE.....</b>	<b>33</b>
 <b>2 - OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
 <b>3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
3.1 - Materiais.....	36
3.1.1 - Soluções e Tampões utilizados nos protocolos experimentais.....	36
3.1.2 - Drogas utilizadas nos protocolos experimentais .....	37
3.1.3 - Equipamentos utilizados nos protocolos experimentais .....	37
3.2 - Métodos.....	38
3.2.1 - Avaliação do peso corporal e pressão arterial de cauda (PAC) .....	38
3.2.2 - Análise da estrutura vascular da aorta.....	38
3.2.3 - Zimografia para MMP-2 na aorta.....	39

3.2.4 - Dosagem de Proteína pelo Método de Bradford: .....	40
3.2.5 - Zimografia <i>in situ</i> .....	40
3.2.6 - Determinação de TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico) .....	41
3.2.7 - Determinação Vascular de EROs .....	42
<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>43</b>
<b>4 - RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<b>5 - DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>6 - CONCLUSÕES .....</b>	<b>61</b>
<b>7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>73</b>

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - Hipertensão Arterial como um problema de saúde pública

A hipertensão é uma doença cardiovascular comum, afetando cerca de 50 milhões de pessoas nos EUA, e um número proporcional a esse no Brasil (V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – SBC/SBH/SBN, 2006).

A hipertensão arterial sistêmica acomete cerca de 1 bilhão de pessoas, sendo responsável por aproximadamente 7,1 milhões de mortes por ano e é considerada um grande problema de saúde pública no mundo (Chobanian et al., 2003a).

A pressão arterial elevada provoca alterações nos vasos sanguíneos e hipertrofia do ventrículo esquerdo, bem como anormalidades no músculo liso vascular e endotélio associadas ao comprometimento das funções dessas estruturas (Verdecchia e cols., 1998). Entre estas disfunções, podemos considerar o aumento da vasoconstrição e redução da vasodilatação, tanto dependente quanto independente do endotélio. A perda de equilíbrio entre o relaxamento e a contração é frequentemente citada como uma das causas do aumento do tônus vascular na hipertensão (Cohuet e Struijker-Boudier, 2006).

A hipertensão arterial pode ser causa ou também o resultado de complicações cardiovasculares, como infarto e acidente vascular encefálico (AVE), bem como de outras complicações, tais como insuficiência renal, diabetes, entre outros (Izzo e Black, 1998).

A hipertensão arterial envolve tanto componentes ambientais como hereditários, sendo classificada como uma doença poligênica e multifatorial, relacionada a significativas alterações morfológicas e funcionais no aparelho cardiovascular. Vários fatores como o estresse oxidativo (Escobales and Crespo, 2005; Lassegue and Griendling, 2004) e o aumento da atividade de algumas enzimas, como as metaloproteinases (Galis and Khatri, 2002; Raffetto and Khalil, 2008), podem estar relacionados a alterações cardiovasculares observadas na hipertensão.

Para entender os mecanismos envolvidos nestas disfunções, muitos estudos utilizam modelos de hipertensão (Doggrell & Brown, 1998; Hiyoshi e cols., 2005) desenvolvidos em ratos, que exibem características em comum com a hipertensão em humanos.

## 1.2 - Modelo animal de Hipertensão Arterial

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

## 1.3 - Disfunção vascular na Hipertensão Arterial

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

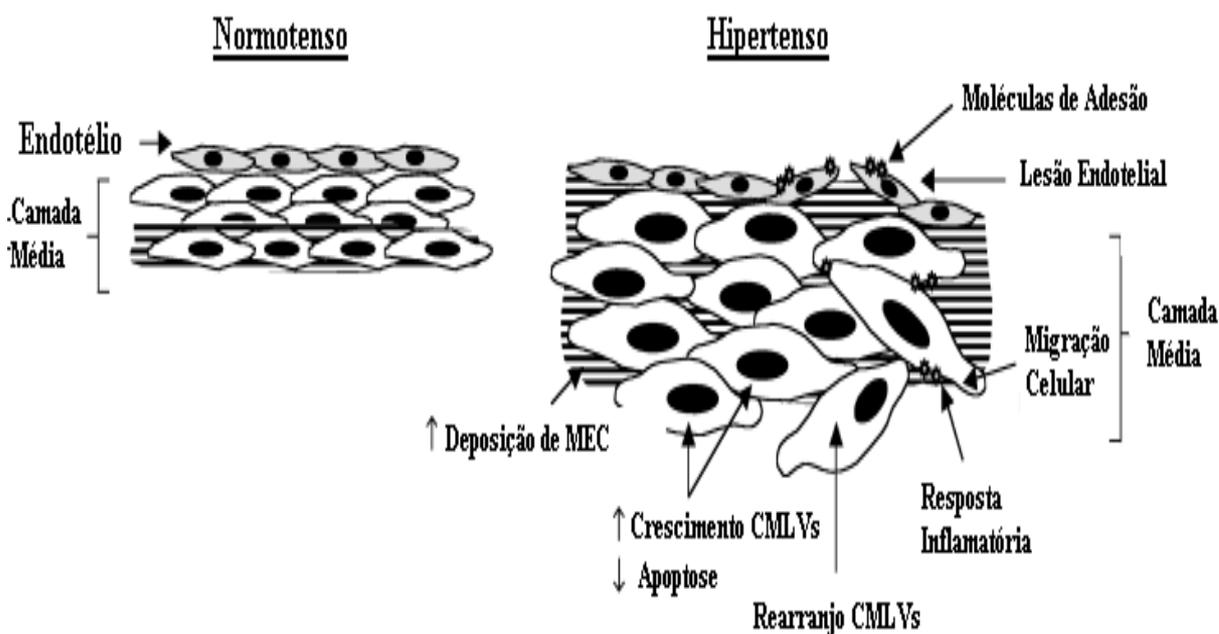
A disfunção endotelial pode ser definida como uma redução na vasodilatação dependente do endotélio, causada por uma redução na biodisponibilidade de NO na parede do vaso (Cai e Harrison, 2000).

O termo **disfunção endotelial** tem sido usado para se referir a muitas condições patológicas, incluindo propriedades anticoagulantes e anti-inflamatórias do endotélio alteradas, modulação do crescimento vascular prejudicado e desregulação do remodelamento vascular. Entretanto, em muitas literaturas este termo tem sido usado para se referir a

deterioração do vasorelaxamento dependente do endotélio causada pela diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) na parede do vaso (Cai e Harrison, 2000).

Na hipertensão, as artérias sofrem alterações funcionais, estruturais e mecânicas, resultando em redução da luz vascular e aumento da resistência periférica. As alterações incluem comprometimento do relaxamento e refletem alterações do acoplamento excitação-contracção, alteração das propriedades elétricas das células da musculatura lisa vascular (CMLVs) e/ou disfunção endotelial (Touyz RM, Tabet F and Schiffrin EL., 2003).

As principais alterações estruturais incluem o remodelamento devido ao aumento do crescimento celular, a migração celular, deposição de matriz extracelular (MEC) e a inflamação. As células da musculatura lisa vascular (CMLVs) são elementos centrais nesses eventos e tem um papel fundamental nos processos dinâmicos subjacentes às alterações vasculares na hipertensão (**Figura 1**) (Touyz RM, Tabet F and Schiffrin EL., 2003).



**Figura 1** : Diagrama que representa um corte da parede vascular e as alterações que ocorrem na hipertensão. No nível celular, há um aumento do crescimento das células da musculatura lisa vascular (CMLVs), migração celular, rearranjo das CMLVs, deposição de matriz extracelular (MEC) e inflamação. Esses processos contribuem para o remodelamento vascular na hipertensão. (Adaptado de Touyz et al.,2003).

Além dessas alterações, a lesão vascular na hipertensão envolve uma série de eventos moleculares e celulares coordenados, característico de uma reação inflamatória. De fato, evidências cada vez mais numerosas indicam que a doença vascular associada à hipertensão seja um processo inflamatório e que a inflamação crônica leve possa desempenhar um papel

significativo na fisiopatologia da hipertensão arterial e em suas complicações (Touyz RM., 2005).

O conceito de a hipertensão ser uma doença inflamatória tem revolucionado a biopatologia vascular, já que os conhecimentos desses processos podem levar a novas possibilidades terapêuticas (Touyz RM., 2005).

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

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

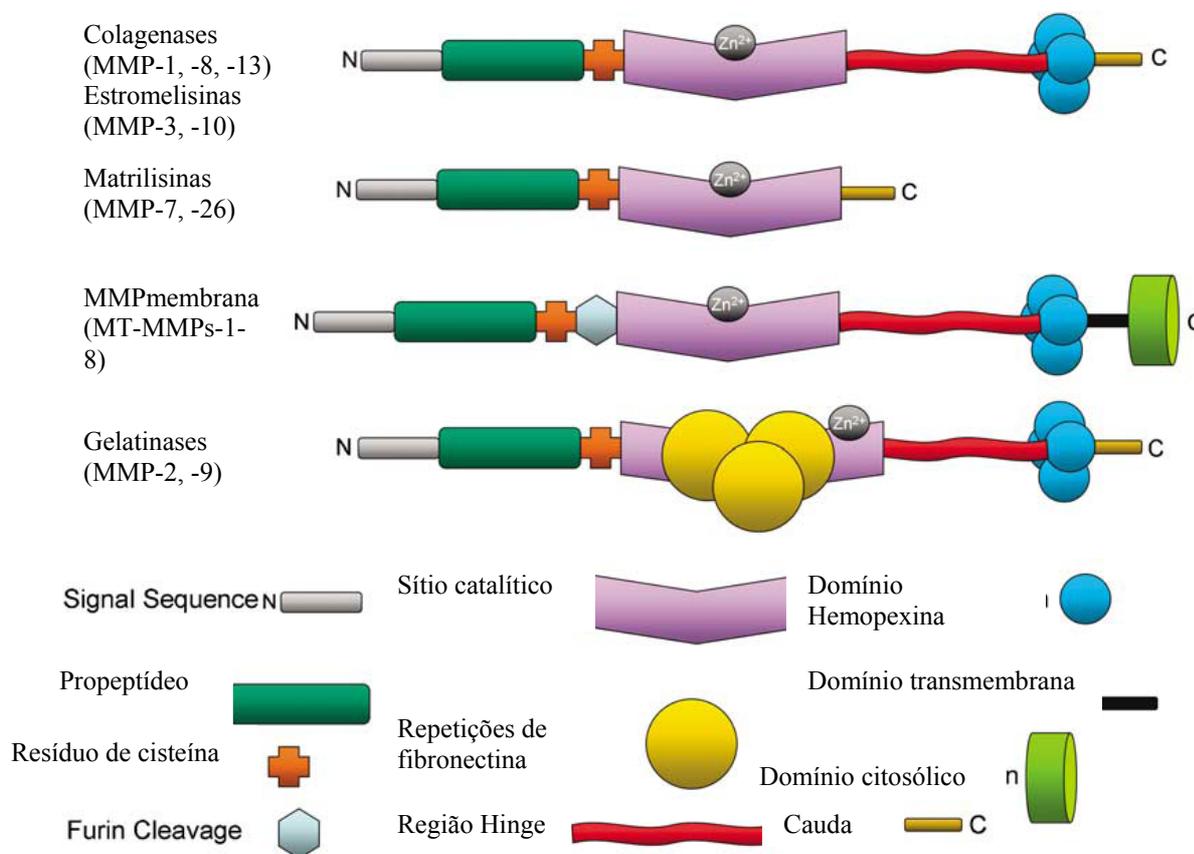
É observado, também, que esse declínio da biodisponibilidade de NO deve ser causado por uma expressão diminuída de NO sintase pelas células endoteliais (eNOS), uma falta de substrato ou cofatores para eNOS, alterações na sinalização celular fazendo com que a eNOS não seja ativada apropriadamente, e, finalmente, uma degradação acelerada de NO pelas Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (Cai e Harrison, 2000).

#### **1.4 - Metaloproteinases da Matriz Extracelular (MMPs) e o processo de remodelamento vascular**

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

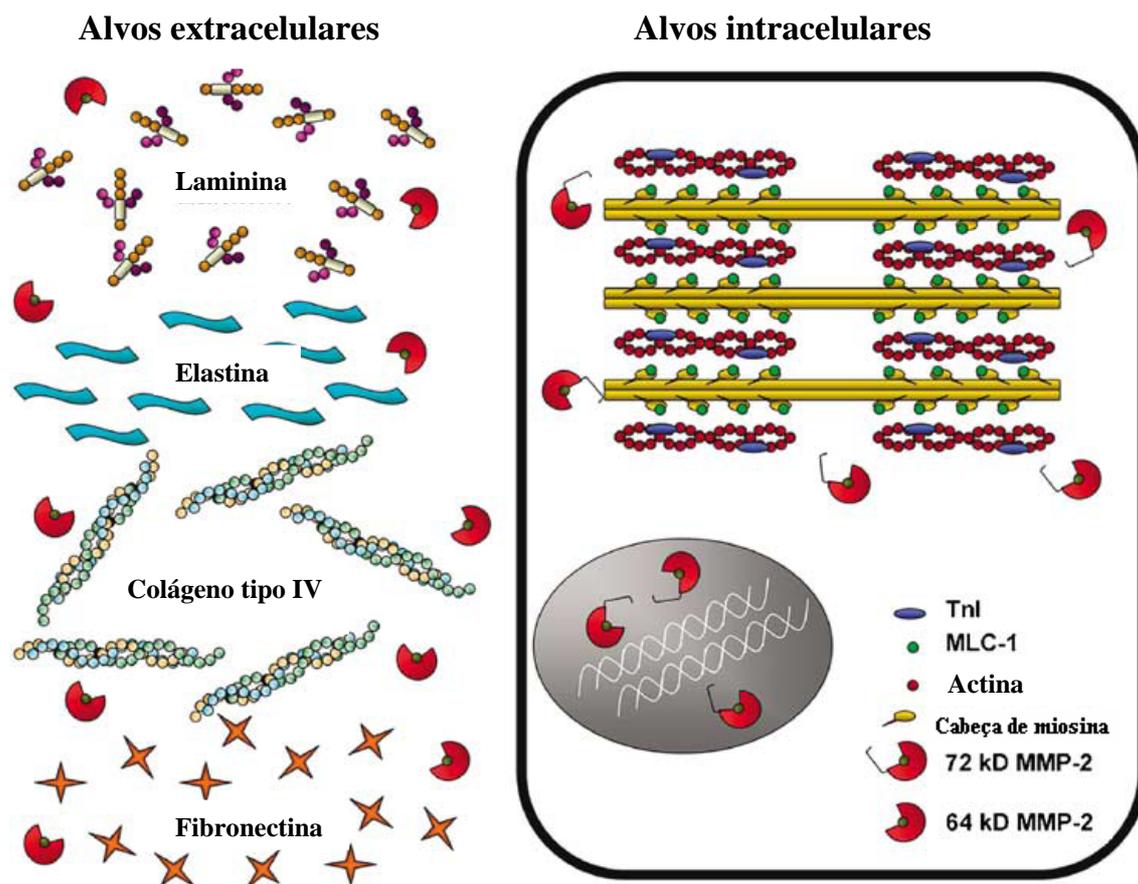
Dentre essas MMPs, as mais relacionadas a alterações estruturais e funcionais associadas a algumas doenças cardiovasculares são as gelatinases A e B, MMP-2 e MMP-9, respectivamente (Galis e Khatri, 2002; Raffetto e Khalil, 2008). Elas apresentam domínios estruturais semelhantes, e diferem-se principalmente em relação a tipos celulares, regulação de transcrição (Brinckerhoff e cols., 2002) e especificidade de substrato.

Estas endopeptidases são sintetizadas e secretadas em uma pró-forma latente (Zimogênios ou pró-MMPs) necessitando serem clivadas em seus domínios pró-peptídicos por outras proteases, como plasmina (fibrinolizina) ou MT-MMPs para serem ativadas (Nagase e Woessner, 1999). As MMPs, basicamente, são compostas de um sítio catalítico, contendo zinco e cálcio, e de um pró-peptídeo, ligado a este por uma ligação sulfidríla, o que as mantém em sua forma inativa. Grande parte delas possuem também uma região conhecida como “**hemopexin-like**”, responsável pelo reconhecimento e adesão aos componentes da matriz extracelular (Bode e Maskos, 2003; Brinckerhoff e Matrisian, 2002; Nagase e Woessner, 1999) (**Figura 2**: AK Chow et al., 2007).



**Figura 2:** Estrutura da MMP. As MMPs são, tipicamente, classificadas de acordo com os substratos que elas degradam e possuem, em geral, muitas características estruturais em comum (AK Chow et al., 2007). Adaptado de AK Chow et al., 2007.

As MMPs degradam várias proteínas da matriz extracelular, como observado na **figura 3** (AK Chow et al., 2007), quebrando-as em suas ligações peptídicas específicas, promovendo remodelamento vascular (Galis e cols., 2002), que consiste em um processo fisiológico adaptativo que ocorre nos vasos sanguíneos em resposta às alterações crônicas na hemodinâmica (Ward e cols., 2000).



**Figura 3:** Alvos da MMP-2 no coração. Alvos extracelulares da MMP-2 podem incluir proteínas de matriz como a laminina, elastina, colágeno tipo IV e fibronectina. Isso leva a interrupção da adesão e comunicação célula-célula, resultando em infarto e processo de remodelamento. Dentro do cardiomiócito (direita), a MMP-2, que é ativada como resultado do estresse oxidativo, pode rapidamente clivar proteínas sarcoméricas como a TnI e MLC-1 para causar disfunção contrátil aguda (AK Chow et al., 2007).

Adaptado de AK Chow et al., 2007.

As MMPs podem ser reguladas por vários fatores incluindo, citocinas, hormônios, fatores de crescimento, estresse de cisalhamento e também estresse oxidativo. Esta regulação pode ser feita em três níveis: (1) indução da expressão gênica; (2) ativação de suas pró-formas latentes; e (3) inibição por TIMPs, que são inibidores teciduais específicos das MMPs (Bode e

Maskos, 2003; Visse e Nagase, 2003) e são, também, proteínas pequenas (23 kDa) que inibem a atividade das MMPs ligando-se a elas numa razão estequiométrica 1:1 (Brew et al., 2000).

Estes inibidores endógenos das MMPs podem ser classificados em quatro tipos diferentes: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4. O TIMP-1 apresenta maior seletividade para MMP-9, enquanto o TIMP-2 apresenta maior seletividade para MMP-2 e essa seletividade varia de acordo com as localizações teciduais e, principalmente, especificidade a substratos (Bode e Maskos, 2003; Nagase et al., 2006; Visse e Nagase, 2003)

Tais inibidores específicos das MMPs (TIMP-1 a TIMP-4) recebem grande importância em condições patológicas, uma vez que nestas circunstâncias os níveis de TIMP afetam diretamente a atividade das MMPs (Visse e Nagase, 2003), pois, de forma geral, as metaloproteinases podem promover degradação de várias proteínas da matriz extracelular participando do processo de remodelamento vascular (Page-McCaw et al., 2007). Por isso várias doenças cardiovasculares, principalmente a hipertensão, podem ter desenvolvimento e/ou progressão caso haja um desequilíbrio na regulação destas MMPs, o que pode resultar em um aumento significativo de suas atividades (Galis e Khatri, 2002; Raffetto e Khalil, 2008).

### **Importância das Metaloproteinases em condições fisiopatológicas**

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

Dentre as MMPs, especial atenção tem sido dada a MMP-2, uma vez que o aumento da atividade e expressão da MMP-2 leva possivelmente a disfunção vascular, como tem sido

mostrado em modelos experimentais de hipertensão (Bouvet e cols., 2005; Watts e cols., 2007; Castro e cols., 2008; Raffetto e Khalil, 2008).

### **Possível participação das Metaloproteinases nas alterações cardiovasculares da Hipertensão Arterial: Importância da MMP-2**

A MMP-2 possui domínios “**fibronectin-like**” responsáveis por clivarem colágeno tipo I, IV, V, VII, X, gelatina (colágeno desnaturado) e elastina (Yasumitsu e cols., 1992). Alterações na regulação da expressão e atividade destas MMPs podem estar envolvidas no processo de remodelamento vascular que acontece na fisiopatologia de várias doenças cardiovasculares (Zhang e cols., 1999).

O remodelamento vascular é caracterizado como sendo uma resposta adaptativa ao aumento da pressão arterial, que tem como objetivo normalizar a tensão exercida na parede das artérias (Mayet e Hughes, 2003). O remodelamento vascular pode ser classificado em hipertrófico e eutrófico, segundo a teoria de Laplace ( $T = P \times R$ ; T: tensão, P: pressão e R: raio), e ambos podem contribuir para a manutenção da hipertensão arterial e/ou para o desenvolvimento de outras doenças cardiovasculares associadas (Dajnowiec e Langille, 2007; Humphrey, 2008; Intengan e Schiffrin, 2001; Mulvany, 2002).

Alguns trabalhos clínicos e experimentais mostraram um aumento da concentração e atividade da MMP-2 tanto em plasma como em vasos sanguíneos. Tais estudos sugerem que o estiramento e tensão mecânica que acontece nos vasos sanguíneos durante um processo de hipertensão aumentam a expressão e a atividade da MMP-2 nas células da musculatura vascular lisa (Asanuma e cols., 2003; Meng e cols., 1999).

A MMP-2 quando ativada, em casos de hipertensão arterial, por exemplo, pode promover um espessamento da camada média dos vasos sanguíneos com conseqüente redução no lúmen, e alterações na matriz extracelular, o que leva a um aumento da resistência periférica, característico da hipertensão (Jenkins e cols., 1998; Baumbach e cols., 1989). Estas alterações nos vasos sanguíneos estão relacionadas com disfunção endotelial, evidenciada por uma diminuição no relaxamento dependente do endotélio, como tem sido mostrado em modelos experimentais de hipertensão.

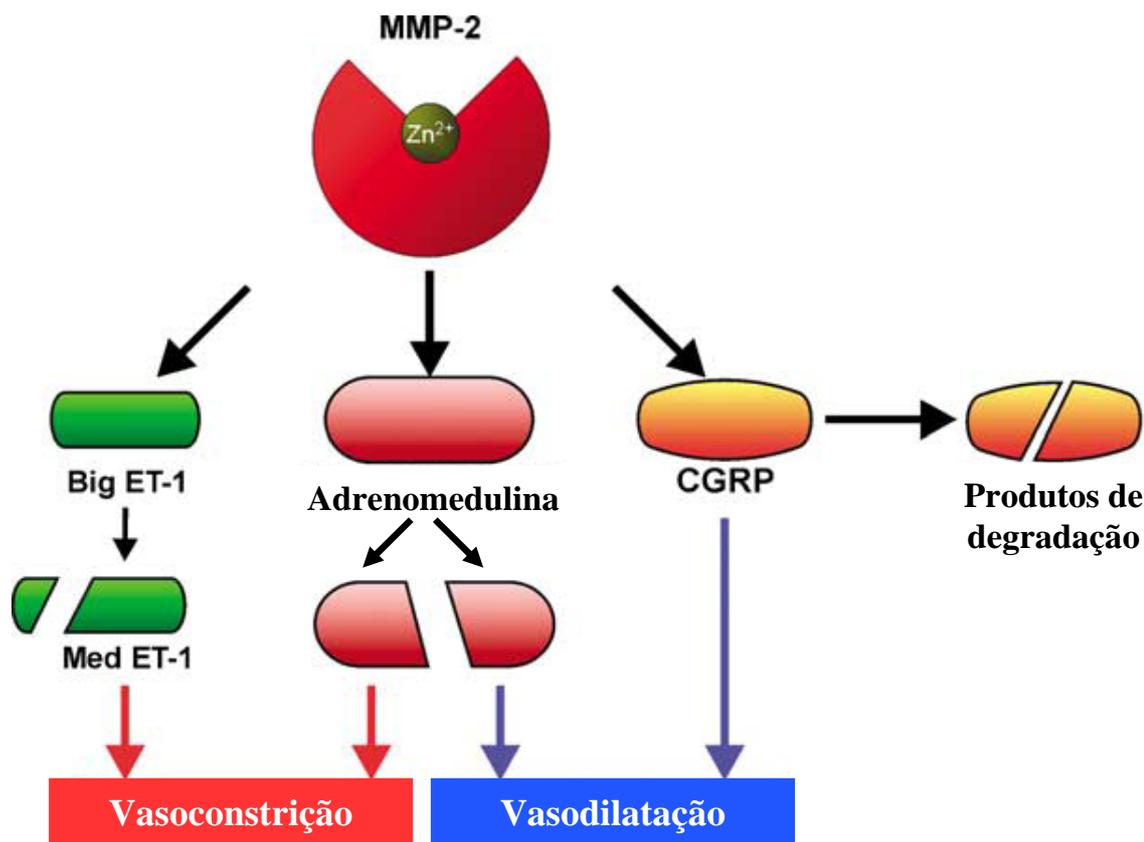
Além disso, Yasmim e colaboradores (2005) mostraram um aumento das concentrações plasmáticas de MMP-2 em pacientes com hipertensão sistólica isolada quando comparados com pacientes normais. Em outro estudo, Bouvet e colaboradores (2005) mostraram que ao induzir um processo de hipertensão por administração crônica de L-NAME

em ratos, ocorreu um aumento da atividade e da quantidade de MMP-2 em aortas, e um aumento da atividade da MMP-2 em artérias mesentéricas destes animais. Um aumento na expressão e atividade da MMP-2 também foi observado em situações de aterosclerose, ruptura de placas ateroscleróticas, restenose coronariana ( não cardíaca) (Galis e cols., 1994; Jenkins e cols., 1998; Newby e cols., 1994) e aneurismas da aorta (Crowther e cols., 2000). Hojo e colaboradores (2001) mostraram também que níveis plasmáticos da MMP-2 aumentaram gradualmente depois de infarto agudo do miocárdio, e em pacientes com angina pectoris estável e instável (Kai e cols., 1998).

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

Estudos mostraram que a MMP-9 juntamente com a MMP-2 são importantes para o processo de remodelamento adaptativo associado à hipertensão arterial. Elas podem contribuir para o aumento do diâmetro e da complacência arterial observados nessa fase inicial do remodelamento, por degradarem grande parte dos componentes da matriz extracelular (Flamant et al., 2007). Mas esse processo pode progredir para um remodelamento crônico e mal-adaptativo ( Bouvet et al., 2005; Watts et al., 2007) caso haja uma degradação constante das proteínas da matriz extracelular (MEC). Com isso as MMPs podem promover uma intensa migração e proliferação de células musculares lisas, além de hipertrofia celular e re-síntese protéica (Intengan e Schiffrin, 2000; Newby, 2006).

A MMP-2 também pode regular o tônus vascular por clivar alguns peptídeos vasoativos (Fernandez-Patron et al., 1999; Fernandez-Patron et al., 2000; Martinez et al., 2004). Ela pode clivar a big endotelina-1 (Big ET-1), o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e a adrenomedulina (AM), em potentes metabólitos vasoconstritores, o que pode contribuir para o aumento da resistência vascular periférica observado na hipertensão, que é mostrado na **figura 4**.



**Figura 4:** Ações exercidas pela MMP-2 sobre o tônus vascular. Elas podem clivar a big ET-1 em metabólitos com ações vasoconstritoras ainda mais intensas (ET<sub>1-32</sub> ou Méd ET-1). Além disso, podem clivar o CGRP, potente vasodilatador arterial, em produtos de degradação sem ação vasodilatadora. E por fim, podem clivar a AM, peptídeo vasodilatador, em produtos de degradação com ações vasoconstritoras (AK Chow et al., 2007). Adaptado de AK Chow et al., 2007.

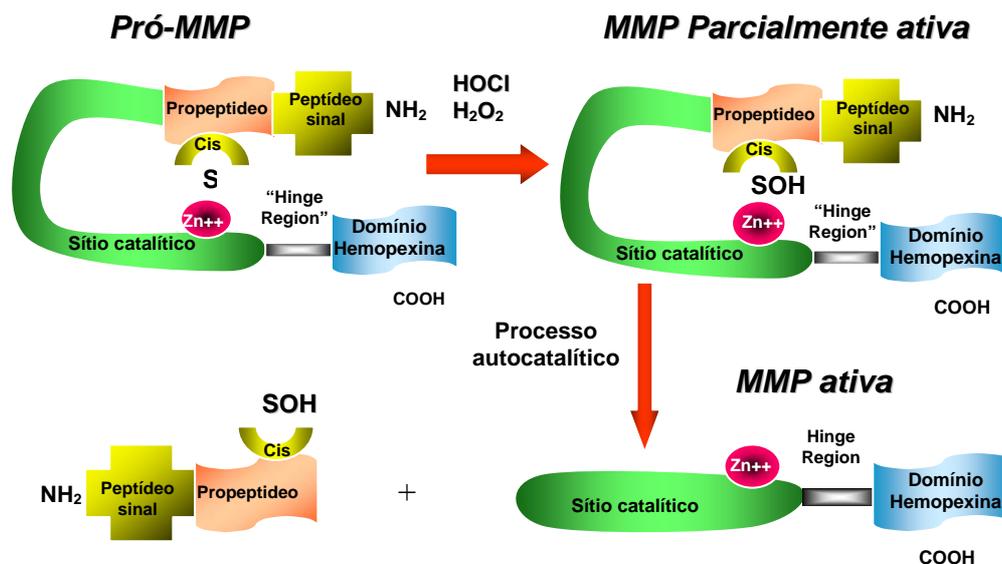
### 1.5 - Relevância do estresse oxidativo como um importante fator que modula a atividade das Metaloproteinases

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

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

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

As EROs são muito importantes na ativação de algumas MMPs, especialmente da MMP-2 (Castier et al., 2005; Luchtefeld et al., 2005; Rajagopalan et al., 1996). Elas podem reagir com o resíduo de cisteína, presente no pró-peptídeo desta enzima, promovendo uma ruptura do grupamento tiol com o zinco, o que resulta na sua ativação (Van Wart and Birkedal-Hansen, 1990), como observado na **figura 5**.



**Figura 5:** Ativação das Metaloproteinases. As MMPs são secretadas como zimógenos inativos que precisam ser processados para tornarem-se ativos. O sítio catalítico contém o zinco que é ligado a cisteína do pró-peptídeo. Esta conformação é requerida para que a enzima continue inativa. Sob condições de estresse oxidativo, alguns oxidantes tais como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) podem atacar e então modificar o resíduo tiol. Tais modificações quebram a ligação com o zinco, e a enzima no seu estado parcialmente ativo, torna-se susceptível a um processo autocatalítico, liberando o domínio pró-peptídeo e expondo o sítio catalítico, o que ativa a enzima. (Figura modificada de Nelson e Mendelez, 2004)

Sob condições patológicas, EROs são produzidas em quantidades excessivas. Este desvio no equilíbrio entre substâncias oxidantes e antioxidantes, chamado estresse oxidativo pode ter importantes efeitos na função celular e tecidual, levando à disfunção endotelial, aumento da contratilidade, crescimento do músculo liso vascular, apoptose, migração de monócitos, peroxidação lipídica, inflamação e aumentada deposição da matriz extracelular (Uemura e cols., 2001; Kadoglou e cols., 2005), contribuindo portanto, para o desenvolvimento de diversos estados patológicos tais como hipertensão, aterosclerose, diabetes e sepse (Cai e Harrison, 2000; Schulz e cols., 2008).

Estas EROs, produzidas principalmente nas mitocôndrias, foram consideradas produtos celulares prejudiciais, com potente dano lipídico, protéico e de DNA (Freeman e Crapo, 1982). Entretanto, sabe-se que em concentrações fisiológicas, estas espécies reativas são essenciais em alguns processos de sinalização e regulação intracelular, participando de mecanismos de transcrição gênica e síntese protéica (Griendling et al., 2000), e essa noção baseia-se nos seguintes achados: (I) agonistas vasoativos e fatores de crescimento, como a Ang II, são capazes de gerar EROs em células vasculares, (II) antioxidantes e inibidores de sistemas geradores de EROs suprimem vias de sinalização mediadas pelos agonistas e (III) a adição exógena de oxidantes ativa as mesmas cascatas de sinalização mediadas pelos agonistas (Touyz RM, Tabet F and Schiffrin EL., 2003). Nestas condições a produção de radicais livres de oxigênio e peróxidos é balanceada por um eficiente sistema de antioxidantes, que são moléculas capazes de remover EROs, prevenindo, danos ao tecido.

Antioxidantes enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPX) e a catalase tem um importante papel na conversão de EROs em oxigênio e água. Vários outros antioxidantes não-enzimáticos são também importantes na remoção dos radicais livres (vitamina C, vitamina E e glutathione) (Cai e Harrison, 2000), balanceando desta forma a quantidade de EROs.

Existem três tipos conhecidos de SOD, dependendo de sua localização celular: a SOD I ou citosólica, representada por Cu/Zn-SOD, a SOD II ou mitocondrial (Mn-SOD) e a SOD III ou extracelular (ecSOD). Todas são responsáveis pela remoção do  $O_2^-$  (ânion superóxido) dos vasos e pela diminuição da formação do  $OONO^-$  (peroxinitrito).

As potenciais fontes enzimáticas produtoras de espécies reativas de oxigênio incluem a respiração mitocondrial, o ácido aracônico via enzimas lipoxigenases e cicloxigenases, o citocromo P450, a xantina oxidase, a NADPH oxidase, a NO sintase, as peroxidases e proteínas heme (Cai e Harrison, 2000). Mas três dessas fontes tem sido mais estudadas no que se refere ao sistema cardiovascular: xantina oxidase, NADPH oxidase e NO sintase (Cai e Harrison, 2000).

A xantina oxidase é uma enzima importante nas vias de degradação de purinas. A enzima gera como produto final, o ácido úrico (excretado pela urina), e um subproduto, o ânion superóxido (S.K. Wattanapitayakul, J. A. Bauer/Pharmacology & Therapeutics 89 (2001)).

Praticamente todos os tipos de células vasculares produzem  $O_2^-$  (superóxido) e  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio). Qualquer proteína ou enzima capaz de transferir elétrons pode

provocar a formação de EROs. E a maior fonte de intermediários de oxigênio na parede vascular é a NADPH oxidase vascular (Touyz RM, Tabet F and Schiffrin EL., 2003).

A NADPH oxidase é considerada a principal fonte de  $O_2^-$  (superóxido) na hipertensão, e também em outras doenças cardiovasculares, e sua atividade pode ser regulada por citocinas, hormônios e forças mecânicas que estão envolvidas na patogenia de doenças vasculares (Cai e Harrison, 2000). Esta enzima apresenta múltiplas subunidades essenciais para suas ações, como por exemplo, p47<sup>phox</sup> e p22<sup>phox</sup> (Lassegue e RE, 2003; Touys e Schiffrin, 2004b). A NADPH oxidase vascular é constitutivamente ativa e fisiologicamente produz ânion superóxido ( $O_2^-$ ) de maneira lenta e progressiva (Touyz e Schiffrin, 2004a) e o aumento das concentrações de EROs pode estar relacionado, principalmente, ao aumento da atividade da NADPH oxidase vascular (Cai et al., 2003; Keane, 2005; Zalba et al., 2001) e o sistema mais bem caracterizado nas células vasculares é a geração de superóxido ( $O_2^-$ ) mediada pela NADPH oxidase e estimulada pela Angio II, que parece estar intensificada na hipertensão (Touyz RM, Tabet F and Schiffrin EL., 2003).

Novos achados muito interessantes no campo da sinalização vascular pela Ang II demonstraram que a ativação dos receptores AT<sub>1</sub> estimula a NADPH oxidase vascular e a geração de  $O_2^-$  em vários tipos de células vasculares, incluindo as células da musculatura lisa vascular (CMLVs), as células endoteliais e os fibroblastos (Touyz RM, Tabet F and Schiffrin EL., 2003). De fato, um dos primeiros estudos *in vivo* a examinar a relação entre EROS e a hipertensão demonstrou que a hipertensão induzida pela Ang II está associada ao aumento do estresse oxidativo e dos muitos fatores implicados no crescimento e remodelamento dos vasos na hipertensão, a Ang II parece ser um dos mais importantes (Touyz RM, Tabet F and Schiffrin EL., 2003).

A enzima óxido nítrico endotelial (eNOS), que é responsável pela produção de NO, durante a hipertensão pode também contribuir para a produção de  $O_2^-$  vascular. Isso ocorre em condições de baixas concentrações de L-arginina ou do cofator tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>), onde nessa situação a enzima recebe o nome de eNOS desacoplada (Landmesser et al., 2003; Touyz e Schiffrin, 2004a), porque a enzima necessita tanto de L-arginina, como substrato para formação de NO, quanto do cofator tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) (Cai e Harrison, 2000).

Laursen e cols. (2001) sugeriram que o desacoplamento da eNOS *in vivo* pode ocorrer pela oxidação da tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>), através da ação do peroxinitrito ( $OONO^-$ ), que é produto da reação do NO e  $O_2^-$ .

Três mecanismos, pelo menos, explicam o aumento do estresse oxidativo gerado pelo desacoplamento da eNOS no endotélio: 1) a produção enzimática de NO pode estar

diminuída, permitindo que radicais que normalmente reagem com NO ataquem outros alvos celulares 2) a enzima começa a produzir  $O_2^-$ , contribuindo para o estresse oxidativo 3) é possível que a eNOS possa se tornar parcialmente desacoplada, produzindo simultaneamente tanto  $O_2^-$  quanto NO e sob essas circunstâncias, a eNOS pode se tornar uma geradora de peroxinitrito, aumentando o estresse oxidativo.

Evidências sugerem que o estresse oxidativo altera muitas funções do endotélio, incluindo modulação do tônus vaso motor. A inativação do óxido nítrico (NO) pelo ânion superóxido e outras espécies reativas do oxigênio (EROs) parece ocorrer em condições como hipertensão, hipercolesterolemia, diabetes e outras. A falta de NO associado com esses tradicionais fatores de risco deve, em parte, explicar porque eles predispõe a aterosclerose (Cai e Harrison, 2000).

Aumento na biodisponibilidade de EROS vasculares leva ao crescimento celular, deposição de colágeno e alterações na atividade das metaloproteinases de matriz, importantes fatores no remodelamento arterial na hipertensão. Essas observações são compatíveis com estudos *in vivo* que demonstram que o  $O_2^-$  e o  $H_2O_2$  estimulam a hipertrofia e a proliferação de CMLVs (Touyz RM, Tabet F and Schiffrin EL.,2003).

O aumento do  $O_2^-$  vascular na hipertensão também compromete o relaxamento dependente do endotélio e aumenta a atividade contrátil. Esses efeitos podem ser mediados diretamente pela elevação da concentração de  $Ca^{2+}$  no citosol ou indiretamente pela redução das concentrações do vasodilatador óxido nítrico (NO) (Touyz RM, Tabet F and Schiffrin EL.,2003).

Como já foi dito anteriormente, dentre muitos sistemas enzimáticos que são capazes de produzir EROS, xantina oxidase, NADH/NADPH oxidase e a eNOS desacoplada tem sido extensivamente estudados nas células vasculares. E quando se tornar claro o papel dessas enzimas como fontes de EROS, talvez será possível usar mais terapias específicas para prevenir a produção de EROS e corrigir a disfunção endotelial (Cai e Harrison, 2000).

Um estudo realizado por Grote e colaboradores (2003) mostra que em situações de estiramento mecânico, que acontece na hipertensão arterial, ocorre um aumento da expressão e atividade da MMP-2 devido um aumento acentuado de EROS nos vasos, derivados da NADPH oxidase vascular, verificando o envolvimento de EROS no remodelamento vascular via ativação de MMPs.

Contudo, estudos recentes tem demonstrado que o estresse oxidativo é o principal fator que modula a expressão e atividade das MMPs, e que as espécies reativas de oxigênio

estejam envolvidas no remodelamento vascular da hipertensão via ativação de MMP (Cai e Harrison, 2000; Grote e cols., 2003).

## **1.6 - Nifedipina, Nimodipina e Anlodipina: bloqueadores de canais de cálcio usados no tratamento da Hipertensão**

Os bloqueadores de canais de cálcio são classificados em 5 classes de compostos: fenilalquilaminas, benzotiazepinas, diidropiridinas, difenilpiperazinas e diarilaminopropilaminas (Cominacini e cols., 2003).

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

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

Provavelmente elas induzam a um efeito farmacológico específico pela ligação a canais de cálcio tipo L, resultando numa redução do influxo de cálcio, com efeito relaxante direto na musculatura lisa, reduzindo a resistência vascular periférica total (Weber, 2002).

Nifedipina, Nimodipina e Amlodipina são antagonistas dos canais de cálcio tipo L, pertencente ao grupo das 1,4- diidropiridinas de primeira, segunda e terceira geração, respectivamente (Jalilus, 1993; Toyo-Oka e Nayrer, 1996; Van Zwieten e Mancia, 1996).

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

O mecanismo cinina-dependente refere-se ao fato de que a produção de NO pode estar facilitada por vários estímulos, como acetilcolina, bradicinina, purinas e norepinefrina que atuam estimulando a NO sintase. Com isso, os receptores para uma destas substâncias já estariam estimulados quando do estresse isquêmico, ou mesmo a diidropiridina, poderia

aumentar os níveis de uma destas substâncias, a fim de se ligar no receptor. O mecanismo pelo qual este bloqueador de cálcio aumentaria a concentração de um destes mediadores ainda não está muito claro, mas há evidências de que este bloqueador estaria envolvido com a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), o que leva, provavelmente, ao aumento dos níveis de bradicinina, por condições de estresse (Xu e cols., 2000).

Além de serem uma boa opção terapêutica no tratamento da hipertensão (Ganz e cols., 2005; Prandin e cols., 2007; Varon, 2008) vários outros estudos demonstraram que estas diidropiridinas possuem efeitos pleiotrópicos que podem contribuir para seus efeitos benéficos. Por exemplo, em diversos estudos, a Nifedipina tem mostrado que é capaz de inibir a inflamação vascular e subseqüentemente melhorar a função endotelial em diversas doenças cardiovasculares, de forma a prevenir o desenvolvimento e prevenção da aterosclerose (Matsumori e cols., 2000; Yamagishi e cols., 2004; 2006; 2008).

Outros estudos sugerem que a Nifedipina estimule a liberação de NO de outras células, além de células endoteliais. Levando em consideração que a Nifedipina aumenta os níveis de NO no coração isquêmico mais do que no coração não isquêmico, a Nifedipina pode ter um menor efeito na produção de NO do que a Amlodipina em corações não isquêmicos (Berkels e cols., 2001 ; Mason, 2003).

Katakaze e colaboradores (2000), comprovaram o efeito da Nifedipina sobre a eNOS, onde, utilizando o L-NAME, um inibidor inespecífico da NO sintase, observou-se uma atenuação em grande parte da vasodilatação promovida pela Nifedipina em corações isquêmicos.

Os bloqueadores de canais de cálcio (CCBs) foram desenvolvidos como vasodilatadores e seu uso no tratamento de doenças cardiovasculares fica amplamente baseado nesse mecanismo de ação. Mais recentemente, como já foi dito, com a evolução dos bloqueadores de canais de cálcio de segunda e terceira geração, efeitos pleiotrópicos tem sido observados, e no mínimo alguns dos benefícios dos CCBs é atribuído a esses mecanismos (Mason et al, 2003).

Esses efeitos tem contribuído grandemente para elucidar mecanismos de doenças e racionalizar o uso dos CCBs. Entretanto, esse conhecimento deve esclarecer o porque de drogas terem utilidade em alguns estados de doenças, como na aterosclerose, mas não em outras, como na falência cardíaca (Mason et al, 2003).

Embora numerosas drogas usadas no tratamento de doenças vasculares, incluindo estatinas e inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), tem efeitos pleiotrópicos bem descritos e universalmente aceitos para contribuir a esse benefício, pequena atenção tem

sido dada aos efeitos potencialmente similares dos bloqueadores dos canais de cálcio (CCBs) (Mason et al, 2003).

A Nimodipina é um vasodilatador periférico potente e estudos em animais indicam que a Nimodipina possui melhor efeito sobre as artérias cerebrais do que sobre outros tipos de artérias. Essa maior especificidade pode ser devida à sua maior lipofilicidade e distribuição cerebral quando comparada à Nifedipina (Martindale, 2002; P. R. Vade-Mecum; Korolkovas, Andrejus; França, Francisco Faustino de Albuquerque Carneiro, 2000; 2001). Outros estudos mostraram a ação da Nimodipina em doenças cerebrovasculares e prevenção e tratamento de complicações médicas e neurológicas ( Rinkel GJ et al, 2009) ( Tomassoni D et al, 2008).

Já com relação a Amlodipina, diversos estudos tem mostrado que a droga é capaz de produzir efeitos antioxidantes em pacientes com hipertensão essencial (Mahajam e cols., 2007). Já em estudos em cultura de células, a Amlodipina diminuiu a atividade da NADPH oxidase, uma das fontes de EROs (Yoshii e cols., 2006). Em outro estudo, feito por Chou e colaboradores em 1999, a Amlodipina mostrou também ser eficaz como agente antiagregante plaquetário.

Estudos feitos em animais, humanos e cultura de células mostram que a Amlodipina aumentou a produção de NO de células endoteliais da coronária em cães, tanto em tecidos sãos quanto doentes (Xu e cols., 2000; Mason 2003; Tabrizchi, 2003).

Outros estudos evidenciam que a Amlodipina tem ações farmacológicas distintas do bloqueio dos canais de cálcio tipo L, nos alertando a investigar as ações pleiotrópicas da Amlodipina e dos CCBs em geral (Mason et al, 2003).

Da mesma forma que para a Nifedipina, vários estudos tem mostrado que outras diidropiridinas, como a Isradipina, exerceu efeitos antioxidantes (Sobal e cols., 2001), além de ter mostrado também seu efeito antiaterogênico, como a redução da expressão de mediadores inflamatórios, bem como a redução da proliferação celular (Marche e cols., 2000).

Em adição, enquanto os efeitos dos CCBs na atividade/expressão da MMP ainda precisam ser esclarecidos (Mason e cols., 2003), recentes achados sugerem que algumas diidropiridinas reduzem a atividade/expressão das MMPs (Roth e cols., 1996; Ikeda e cols., 2000; Yue e cols., 2004; Martinez e cols., 2006).

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

## **HIPÓTESE**

A hipótese deste estudo é que as diidropiridinas de interesse nesse estudo (Nifedipina, Nimodipina e Amlodipina) possam ter efeitos antioxidantes que estejam associados a uma redução na atividade de MMP-2 nos vasos de animais neste modelo experimental de hipertensão (2R-1C). Imaginamos que estes efeitos estejam associados à atenuação da hipertensão arterial e das alterações vasculares presentes neste modelo experimental.

## **2 - OBJETIVOS**

- 2.1- Estudar os efeitos do tratamento com diidropiridinas de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> geração (Nifedipina, Nimodipina e Amlodipina) sobre as alterações funcionais, estruturais e bioquímicas, relacionadas às MMPs, no modelo de hipertensão renovascular 2R-1C.

### 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

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

Ratos Wistar, machos, normais pesando em média 180g, obtidos do Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto, serão mantidos em ambiente controlado a uma temperatura de 22-25 °C em um ciclo de 12:12-horas claro/escuro, com disponibilidade de água e comida à vontade.

O número de animais por grupo foi igual a 10. Este número foi estimado com bases em estudos prévios, dos quais se extraiu a variabilidade esperada (variância) e se estimou estatisticamente o **N** por grupo em 10 animais, pois este número permite que se detecte uma diferença maior ou igual a 20% nos parâmetros a serem investigados ( $\alpha = 0,05$ ;  $\beta = 0,20$ ).

#### Indução da Hipertensão

A hipertensão renal 2R-1C foi induzida pelo clampeamento da artéria renal esquerda com um grampo de prata (abertura interna 0,2 milímetros). Os ratos Sham foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico (sob anestesia geral com Ketamina 10 mg/kg e Xilazina 10 mg/kg i.p), à exceção do grampo na artéria renal. O estudo foi dividido em quatro protocolos, e três semanas após a indução da hipertensão, os animais foram atribuídos aleatoriamente a um dos oito grupos experimentais como segue:

Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolo 4
Tratamento com água	Tratamento com Nifedipina	Tratamento com Nimodipina	Tratamento com Amlodipina
Sham	Sham	Sham	Sham
2R1C+ água	Nifedipina	Nimodipina	Amlodipina
	2R-1C	2R-1C	2R-1C
	2R-1C + Nife	2R-1C + Nimo	2R-1C + Amlo

Cada droga foi adicionada diariamente à água de beber, sendo que a dosagem da Nifedipina é de 10 mg/kg/dia, Nimodipina 15 mg/kg/dia e Amlodipina 10 mg/kg/dia. Os animais foram tratados por seis semanas, começando a partir da 3ª semana da indução da hipertensão ( ou operação de Sham). As doses diárias de cada droga foram escolhidas de acordo com estudos preliminares (Tomassoni e cols., 2003).

Ao final do período de estudo, as amostras de sangue (4 ml) foram coletadas em tubo falcon (15 ml) heparinizados. Os plasmas para análise foram obtidos por centrifugação (3000 RPM x 10 min) das amostras de sangue e armazenadas em tubos eppendorf, devidamente identificados a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até o momento da análise. As aortas foram retiradas e então dissecadas para posterior análise.

### **3.1 - Materiais**

#### **3.1.1 - Soluções e Tampões utilizados nos protocolos experimentais**

- EDTA 0.5 M pH 8,0
- Parafina
- Paraformaldeído 4 %
- Hematoxilina e Eosina
- Agarose
- Gelatina 40 mg/ml
- 1,10 - Fenantrolina
- NEM
- PMSF
- Albumina sérica bovina (BSA)
- Reagente de Bradford
- Dodecilsulfato de sódio (SDS) 12%, co-polimerizado com gelatina
- Tampão usado no gel de separação: Tris-HCL/SDS, pH 8,8
- Tampão usado no gel de largada: Tris-HCL, pH 6,8
- Tampão de amostra não-redutor: SDS 2%, Tris-HCL 125 nmol/L, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,001% pH 6,8
- Solução de Triton X-100 a 2%

- Solução de Agarose
- Persulfato de Amônio (APS) 10%
- TEMED (Tetrametil etilenodiamina)
- Solução de Acrilamida 30% e Bisacrilamida 0,8%
- Solução de Coloração: Comassie Brilliant Blue G-250 0,05%
- Solução fixadora e de descoloração: Metanol 30% e Ácido acético 10%
- Solução Tampão de Tris-CaCl<sub>2</sub> (Tris 50mmol/L, CaCl<sub>2</sub> 10 mmol/L, ZnCl<sub>2</sub> 1 $\mu$ mol/L)
- Solução de DQ Gelatin 5  $\mu$ g/mL (Molecular Probes, Oregon, USA)
- DHE (Dihidroetídio)
- Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 0,067%
- 1,1,3,3 – Tetrametoxipropano 1  $\mu$ mol/L
- Ácido Sulfúrico 0,04 mol/L
- Ácido Fosfotungstíco 10%
- N-Butanol
- PBS (Tampão Salina Fosfato)

### **3.1.2 - Drogas utilizadas nos protocolos experimentais**

- Nifedipina (Galena Química Farmacêutica Ltda)
- Nimodipina (Galena Química Farmacêutica Ltda)
- Amlodipina (Galena Química Farmacêutica Ltda)
- Ketamina
- Xilazina

### **3.1.3 - Equipamentos utilizados nos protocolos experimentais**

- Balança de Precisão (Shimadzu AY220)
- pHmetro (Incibrás)
- Centrífuga refrigerada (CELM – 3 plus)
- Banho Maria (Nova Ética)
- Estufa (Odonto Bras)

- Transdutor de pressão acoplado a um manguito (MLT125R pulse transducer/pressure cuff; Castle Hill, Austrália)
- Micrótopo (Leica RM2025) e Criostato (CM1900; Leica, Germany)
- Fonte de eletroforese (Electrophoresis Power Supply – EPS 301)
- PowerLab 4/S analog-to-digital converter (AD Instruments Ltd., Castle Hill, Austrália)
- Chart V4.04, PowerLab ADInstruments (2000) Program
- ImageJ Program (NIH – National Institutes of Health)
- KC Junior e SoftMax Pro (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)
- Sistema de fotodocumentação (KODAK EDAS 2000)
- Microscópio de fluorescência acoplado a uma câmera fotográfica

## **3.2 - Métodos**

### **3.2.1 - Avaliação do peso corporal e pressão arterial de cauda (PAC)**

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

São considerados animais hipertensos, os que apresentaram aumento mínimo de pressão arterial sistólica de cauda de pelo menos 30 mmHg.

### **3.2.2 - Análise da estrutura vascular da aorta**

Depois de 6 semanas do tratamento com as diidropiridinas ou veículo, os animais foram mortos por decaptação. A aorta torácica foi então isolada, limpada de tecido conectivo e imediatamente fixada em tampão fosfato com paraformaldeído 4%, pH 7.4, e encaixada em blocos de parafina. Fatias de 4 µm foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). Regiões coradas foram examinadas com microscopia confocal e a imagem foi capturada como descrita

anteriormente (Dão e cols., 2001). Área de secção transversal foi calculada pela subtração da área do lúmen interno da área externa, que foi medida nas secções do tecido (50x).

O diâmetro externo (ED) e o diâmetro interno (ID) foram calculados pela raiz quadrada de  $4A_e/\pi$  e de  $4A_i/\pi$ , respectivamente. Espessura da camada média (M) foi calculada como  $(ED-ID)/2$ . Finalmente a razão de M para o diâmetro do lúmen (M/L) foi também calculada. O número de células musculares lisas vasculares (VSMC) da parede da aorta foi obtido pelo método tri-dimensional em duas sessões consecutivas, como descrito anteriormente. Este método é independente da orientação do núcleo, forma e tamanho (Dao e cols., 2001).

### 3.2.3 - Zimografia para MMP-2 na aorta

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

As amostras de aorta foram congeladas e homogeneizadas em tampão contendo 20 nmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 1 nmol/L 1,10-fenantrolina e 1 nmol/L PSMF, 1 nmol/L NEM e 10 nmol/L  $CaCl_2$ . Em resumo, os extratos de tecidos normalizados para concentração de proteínas (Stoschek, 1990) foram submetidos à eletroforese num gel a 12% co-polimerizado com gelatina (1%) como substrato num sistema SDS-PAGE. Depois da eletroforese o gel foi incubado por 1 hora a temperatura ambiente com uma solução de Triton X-100 a 2%, em seguida lavada 2 vezes com água e incubado a 37 °C por 16 horas em tampão Tris-HCl, pH 7.4, contendo 10 nmol/L  $CaCl_2$ . Os géis foram então fixados numa solução contendo 30% de metanol e 10% de ácido acético. Em seguida, os géis foram corados com 0,05% Coomassie Blue G-250, e então descorados com 30% de metanol e 10% de ácido acético. As atividades gelatinolíticas foram determinadas como bandas descoradas contra um fundo azul corado com Coomassie Blue, avaliando-se a densitometria através de um sistema de documentação (Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System – EDAS 290; Kodak, Rochester, NY) (Souza-Costa e cols., 2005; 2007).

Análise intergel foi possível depois da normalização da atividade gelatinolítica com um padrão interno (meio de cultura condicionado por fibroblastos). As formas latente e ativa da MMP-2 foram identificados através dos seus pesos moleculares, 72 e 64 KDa respectivamente (Souza-Tarla

e cols., 2005; 2007), que foram inibidas com fenantrolina e não por outros inibidores de proteases, além de serem identificadas também por imunoprecipitação com anticorpos específicos. Drogas e reagentes foram comprados da Sigma-Aldrich. (St. Louis, MO).

### **3.2.4 - Dosagem de Proteína pelo Método de Bradford:**

Previamente à zimografia, é necessário determinar a quantidade de proteína presente em cada amostra de aorta. Isto porque as variações protéicas entre um tecido e outro podem interferir nos resultados finais da zimografia. Para isto, foi utilizado o método de Bradford, que consiste em um método colorimétrico e quantitativo.

Inicialmente, as amostras de aorta foram trituradas, homogeneizadas em tampão de extração de preteínas (CaCl<sub>2</sub> 10 mM, Tris 20 mM pH 7.4, Fenantrolina 1 mM, PMSF 1 mM, NEM 1 mM) e incubados por 16 horas na geladeira. Para cada 0,08g de tecido foram acrescentados 150 $\mu$ L deste tampão. Após este período, os extratos foram centrifugados por 15 minutos, e os sobrenadantes retirados para determinação protéica.

Para a construção da curva padrão foi utilizado o BSA nas seguintes concentrações, em mg/mL: 0,085; 0,175; 0,35; 0,7 e 1,4. Todas elas foram preparadas em água destilada a partir de uma solução inicial de 8 mg/mL.

O reagente de Bradford foi utilizado para determinar as concentrações de proteínas de cada amostra analisada. Ao se ligar às proteínas do tecido, ele adquire uma coloração azul que pode ser quantificada por um espectrofotômetro de luz visível (595 nm). A intensidade da cor varia de acordo com a quantidade de proteína no tecido. Para cada 5 $\mu$ L da amostra e da curva padrão foi acrescentado 250 $\mu$ L deste reagente. Pelos valores obtidos após a leitura, em  $\mu$ g/ $\mu$ L, foi possível normalizar a quantidade de proteínas que será aplicada, posteriormente, nos géis de zimografia.

Neste estudo, foi aplicado 30 $\mu$ g de proteína por “lane”.

### **3.2.5 - Zimografia *in situ***

Diferente da zimografia convencional, este método reflete a atividade *in situ* das MMPs. Ele permite localizar e quantificar as gelatinases diretamente nos tecidos (Galis et al., 1995).

A atividade das MMPs, *in situ*, foi analisada utilizando como substrato DQ gelatin (E 12055, Molecular Probes, Oregon, USA) na concentração de 1,0  $\mu\text{g/mL}$ , preparada em tampão em Tris- $\text{CaCl}_2$  50nmol/L. Inicialmente, os tecidos foram congelados em OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA), utilizando acetona e gelo seco. Eles foram cortados, em criostato, a 4  $\mu\text{m}$  de espessura, e incubados com o substrato, em uma câmara úmida e escura, por 60 minutos. Após este período, os cortes foram lavados 5x com PBS e fixados em paraformaldeído 4% v/v, por 10 minutos. Com auxílio de um microscópio de fluorescência (Leica Imaging Systems Ltda., Cambridge, England) acoplado a uma câmera fotográfica, as imagens dos cortes foram registradas na objetiva de 40x. A atividade gelatinolítica, *in situ*, foi visualizada por uma coloração verde brilhante contra um fundo preto. Para análise e quantificação da atividade, foi utilizado o programa Image J (NIH – National Institute of Health). Fenantrolina e PMSF foram utilizados para confirmar a atividade das MMPs nos tecidos. A fenantrolina diminuiu significativamente a atividade gelatinolítica; entretanto, o mesmo não foi observado para o PMSF.

### 3.2.6 - Determinação de TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico)

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

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

### 3.2.7 - Determinação Vascular de EROs

As concentrações vasculares de EROs foram analisadas, *in situ*, na camada média das aortas, utilizando dihidroetídio (DHE) na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  (Hão et al., 2006; Viel et al., 2008). Este “probe” reage com  $\text{O}_2^-$  presente nos tecidos, resultando na formação de 2-hidroxi-etídio (EOH) e de etídio, produtos da reação que emitem uma fluorescência vermelha no local. Inicialmente, os tecidos foram congelados em OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA), utilizando acetona e gelo seco. Eles foram cortados, em criostato, a 4  $\mu\text{m}$  de espessura, e incubados com o DHE, em uma câmara úmida e escura, por 30 minutos. Após este período de incubação, os cortes foram lavados com tampão salina fosfato (PBS) e fixados em paraformaldeído 4%. Com auxílio de um microscópio de fluorescência acoplado a uma câmara fotográfica, as imagens dos cortes foram registradas na objetiva de 40x. As concentrações de EROs presentes nos tecidos foram representadas pela emissão de fluorescência vermelha, como descrito anteriormente. Esta foi quantificada utilizando o programa ImageJ (NIH - National Institutes of Health).

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P. As comparações entre os grupos foram feitas através da análise de variância de duas vias (SigmaStart for Windows, Jandel Scientific, USA), por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey. Uma probabilidade  $< 0,05$  será considerada significativa.

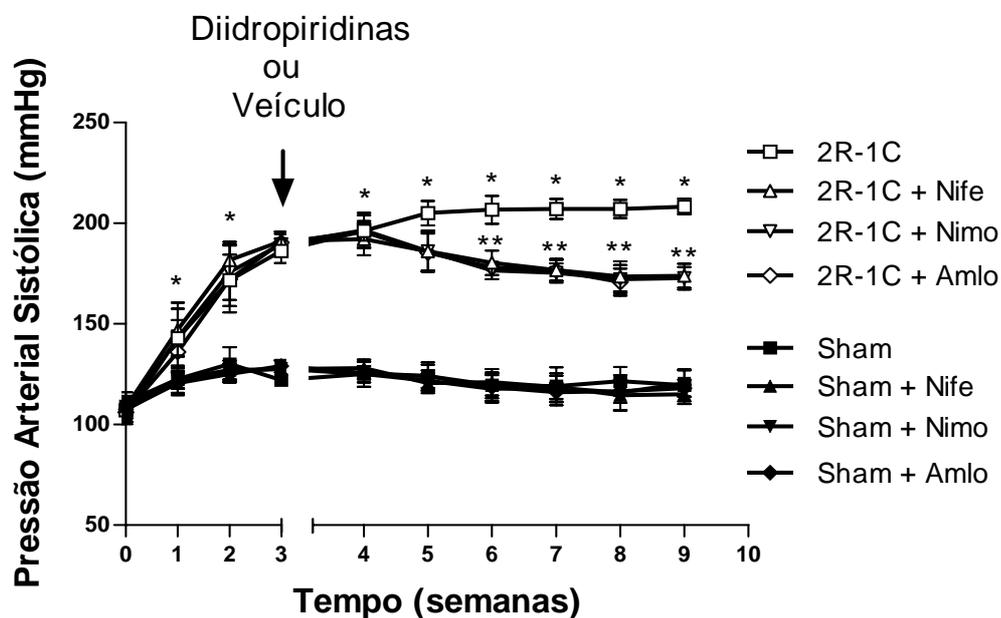
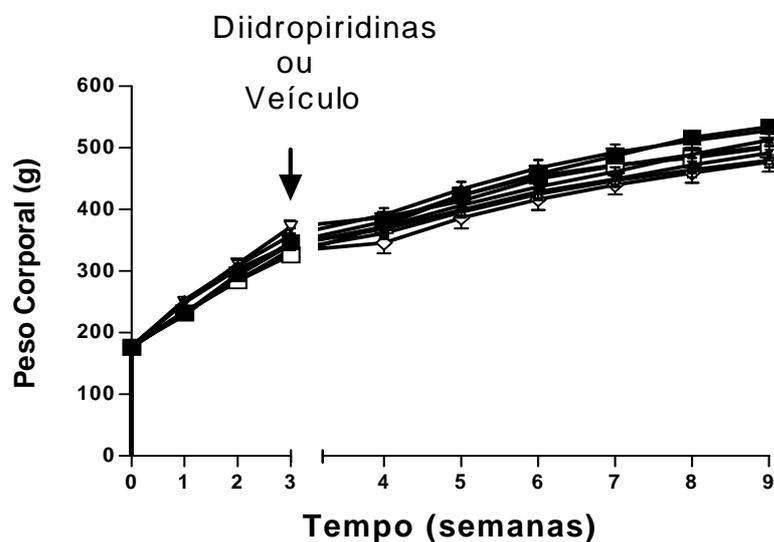
## 4 - RESULTADOS

### **Tratamento com Nifedipina, Nimodipina e Amlodipina melhora a hipertensão renal 2R-1C.**

A pressão arterial foi avaliada durante dois meses por meio de pletismografia de cauda e com o objetivo de verificar se as MMPs contribuem para o aumento de pressão arterial observado neste modelo experimental, alguns animais, controles e hipertensos, foram tratados com Nifedipina, Nimodipina e Amlodipina.

Os valores basais de pressão arterial e peso corporal foram similares entre os animais dos oito grupos experimentais (Gráfico 1A e 1B). Nenhuma alteração significativa foi observada nos grupos controles. Entretanto, a pressão arterial começou a aumentar logo na primeira semana após a cirurgia nos animais hipertensos (2R-1C) quando comparados com os controles. O aumento de pressão continuou durante todo o período de estudo nos animais hipertensos e as diidropiridinas em questão preveniram os aumentos de pressão nos animais hipertensos tratados ( $p < 0,05$ ), sem alterá-la nos animais controles ( $p > 0,05$ ).

Em relação ao peso corpóreo, não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos apesar dos animais controles terem uma maior tendência a ganhar peso em relação aos animais hipertensos.

**A****B**

**Gráfico 1:** Efeito das diidropiridinas sobre a pressão arterial e peso corporal. Evolução da pressão arterial sistólica, em mmHg (A) e do peso corporal, em gramas (B). Dados são mostrados como média  $\pm$  EPM (n = 10-13 por grupo).

\*  $p < 0,01$  para 2R-1C e 2R-1C + DHPs *versus* grupos Sham

\*\*  $p < 0,05$  para 2R-1C + DHPs *versus* 2R-1C

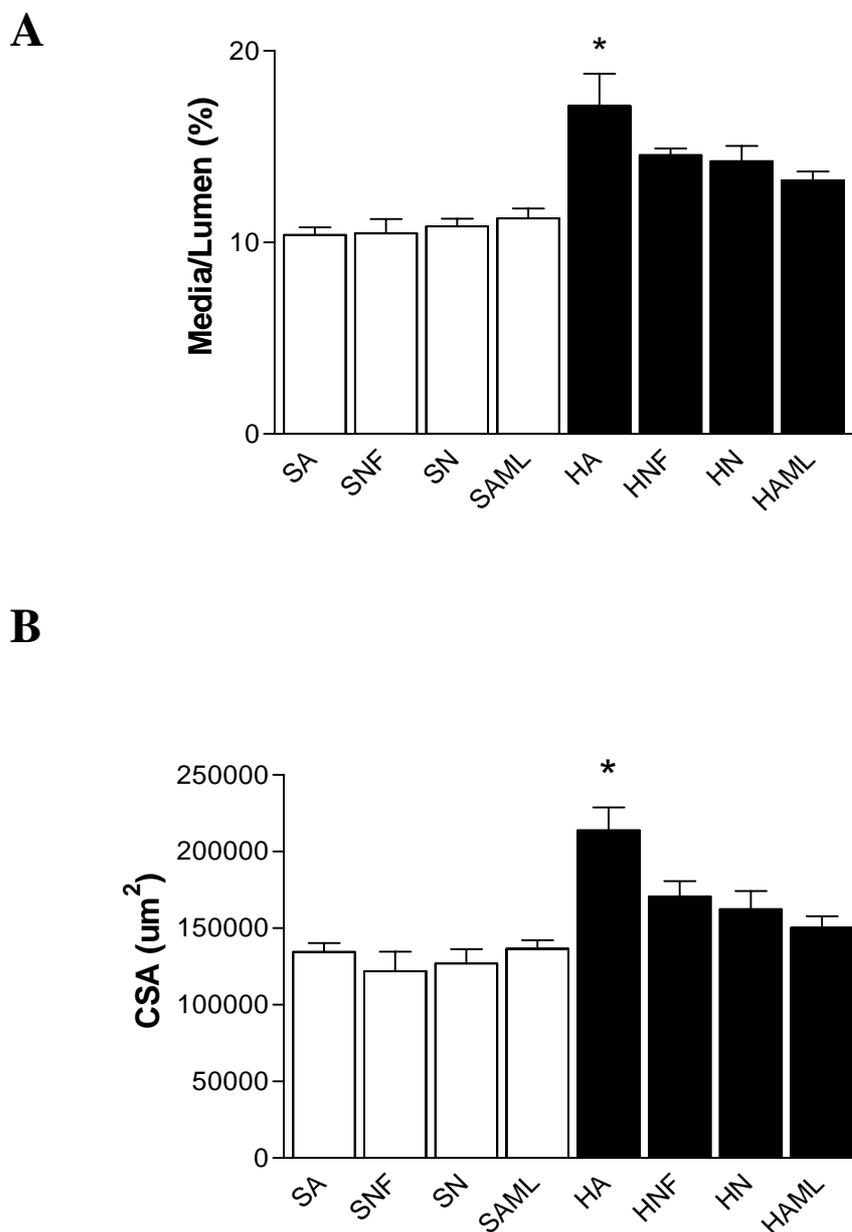
### **Efeito das diidropiridinas sobre o remodelamento vascular em ratos 2R-1C.**

A hipertrofia da parede arterial das artérias de condutância é a principal característica associada à hipertensão (Arribas e cols., 2006).

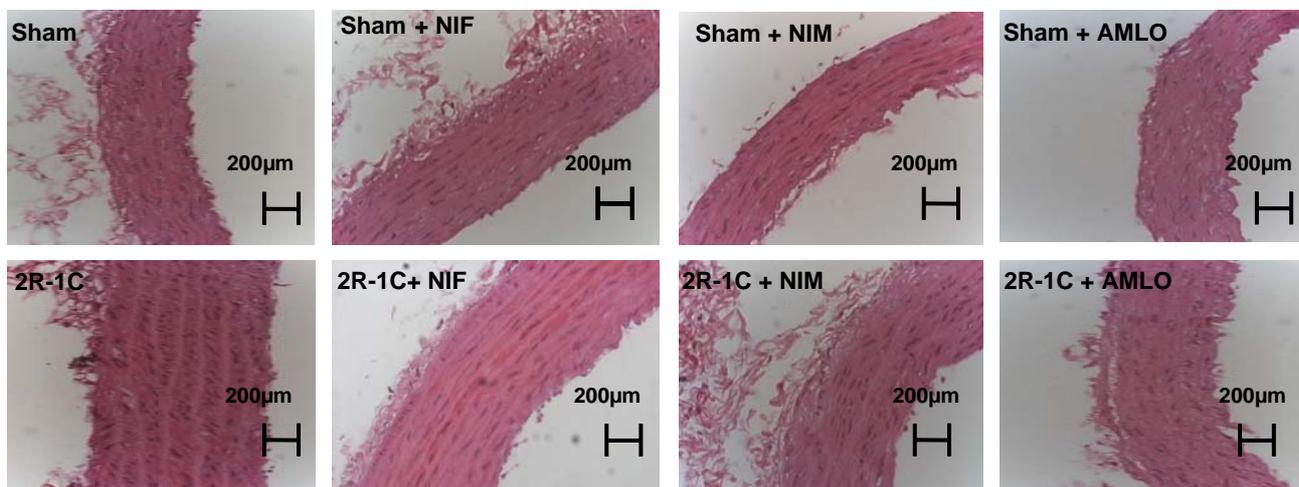
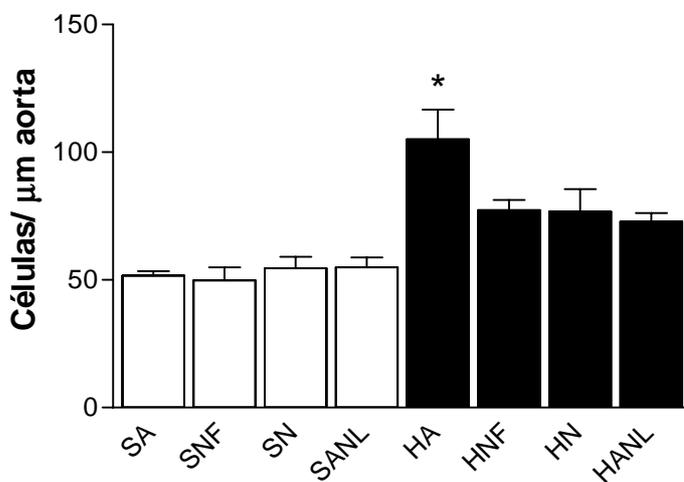
Como pode ser observado nos gráficos abaixo, houve um aumento significativo tanto da razão M/L quanto do CSA nas aortas dos ratos hipertensos (2R-1C) em relação aos controles ( $p < 0,05$ ). Estas alterações estão relacionadas a um aumento da espessura da camada média destas artérias e o tratamento com as diidropiridinas reverteu esses parâmetros estruturais observados nos animais hipertensos (Gráfico 2A e 2B), sem alterá-los nos animais controles.

Esta hipertrofia ocorreu em paralelo a um aumento da proliferação das células musculares lisas nas aortas dos animais hipertensos em relação aos controles ( $p < 0,05$ ; Gráfico 3).

O tratamento com as diidropiridinas preveniu todas estas alterações estruturais nos animais hipertensos, sem nenhuma alteração destes parâmetros nos animais controles ( $p < 0,05$ ).



**Gráfico 2:** Efeito das DHPs sobre as alterações estruturais da aorta associadas à hipertensão. (A) Representativo da razão média/lúmen (M/L). (B) Representativo da área de secção transversal do corte (CSA), em  $\mu\text{m}^2$ . Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM (n = 5-6 por grupo). \* p < 0,05 versus os controles e 2R-1C + DHPs.

**A****B**

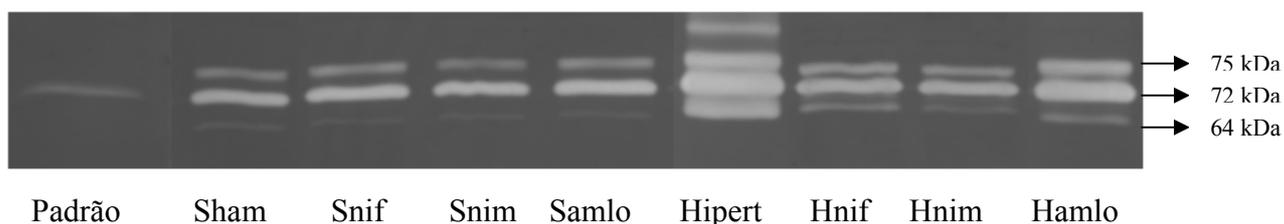
**Gráfico 3:** Efeito das DHPs sobre a proliferação de células musculares lisas. (A) Imagens ilustrativas, em 400x, da quantidade de núcleos na camada média das aortas, referentes aos oito grupos experimentais. (B) Representação gráfica do número de células musculares lisas por  $\mu\text{m}$  de aorta. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM (n = 8-10 por grupo). \*  $p < 0,05$  versus os controles e 2R-1C + DHPs.

### Efeito das DHPs sobre as concentrações vasculares da MMP-2 em ratos 2R-1C.

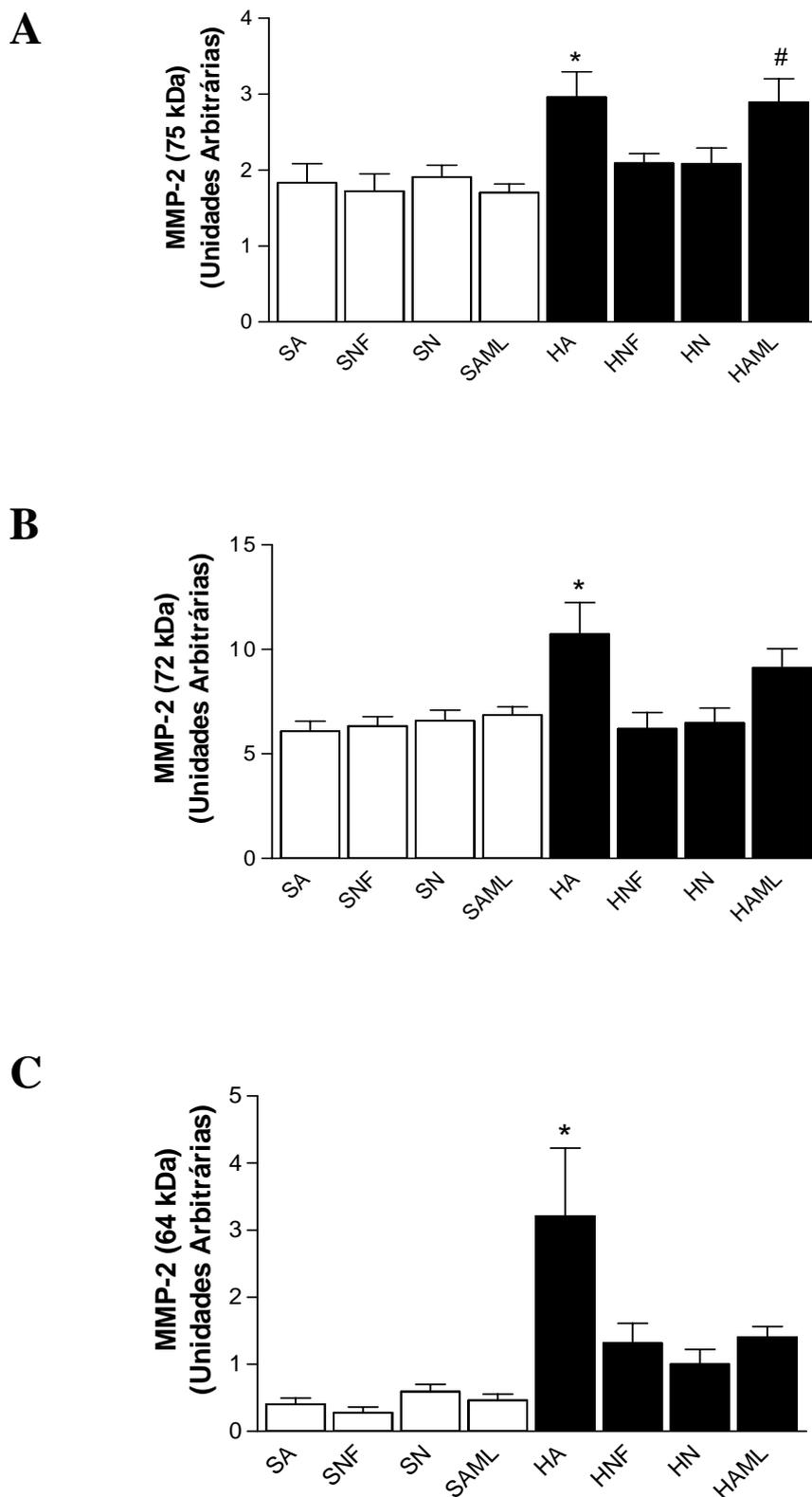
O método convencional de zimografia em gel foi utilizado para avaliar os efeitos da Nifedipina, Nimodipina e Amlodipina sobre as concentrações vasculares de MMP-2. A figura 6, abaixo, mostra um gel representativo dos extratos de aortas referentes aos grupos (8) experimentais. As bandas da pró-MMP-2 (75 e 72 KDa) e da MMP-2 ativa (64 KDa) foram representadas pelos seus respectivos pesos moleculares.

Os animais hipertensos tiveram as concentrações vasculares, tanto da pró-MMP-2 quanto da MMP-2 ativa, aumentadas significativamente em relação aos controles: sham e sham + DHPs (Gráfico 4A, B e C;  $p < 0,05$ ).

O tratamento com Nifedipina e Nimodipina alterou de forma significativa estas concentrações enzimáticas elevadas nos animais hipertensos ( $p < 0,05$ ), com exceção da Amlodipina que não alterou de forma significativa as bandas da pró-MMP-2 (75 e 72 KDa), mas alterou significativamente a banda de 64 KDa da MMP-2, que é a banda ativa da enzima e de interesse para nosso estudo. Isto pode ser decorrente de alguma limitação da técnica de zimografia.



**Figura 6:** Gel de zimografia representativo das aortas dos grupos experimentais. Pró-MMP-2 (75 e 72 KDa) e MMP-2 ativa (64 KDa). Std: padrão interno.



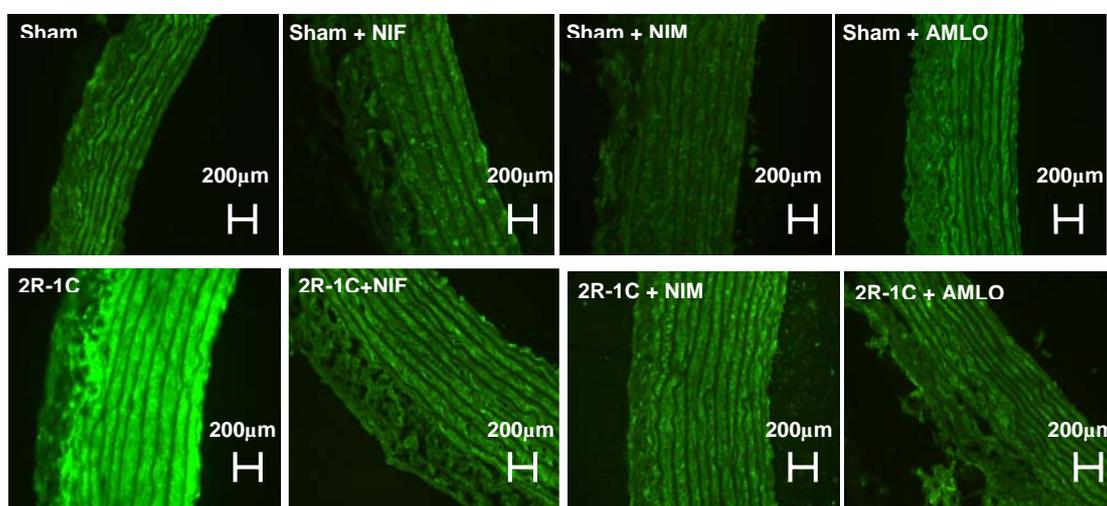
**Gráfico 4:** (A e B) Representação gráfica das concentrações vasculares da pró-MMP-2 (75 e 72 KDa) e (C) da MMP-2 ativa nos extratos de aortas. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM (n= 8-14). (A e B \* $p$ <0,05 vs controles e HNF;HN) (C - \* $p$ <0,05 vs controles e 2R-1C + DHPs). #  $p$ <0,05 vs controles.

### Efeito das DHPs sobre a atividade gelatinolítica *in situ* em ratos 2R-1C

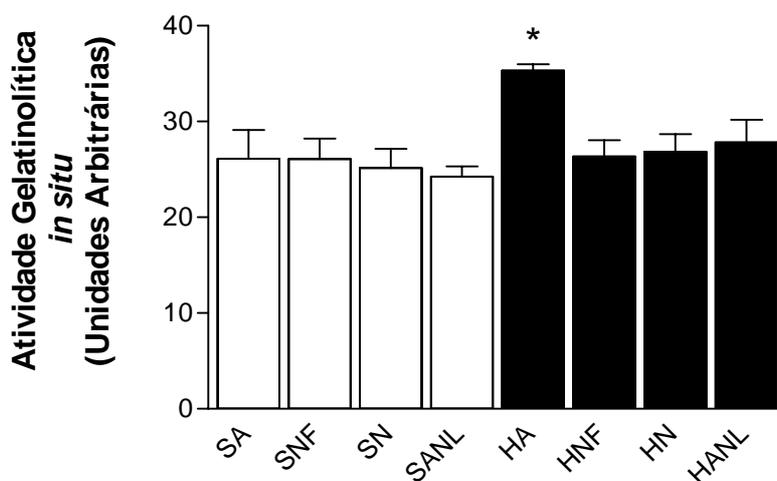
A atividade gelatinolítica foi avaliada nas aortas pelo método de zimografia *in situ*. Diferente da zimografia convencional, este método reflete a atividade das MMPs diretamente nos tecidos.

Apesar deste método não ser capaz de diferenciar as gelatinases, foi observado um aumento significativo da atividade gelatinolítica total, na camada média e endotélio, das aortas dos ratos hipertensos em relação aos controles (Figura 7 e Gráfico 5;  $p < 0,05$ ).

O tratamento com Nifedipina, Nimodipina e Amlodipina preveniu este aumento da atividade nos animais hipertensos ( $p < 0,05$ ), sem alterá-los nos animais controle ( $p > 0,05$ ).



**Figura 7:** Efeito das DHPs sobre a atividade gelatinolítica *in situ*. Imagens ilustrativas, em 400x, da atividade gelatinolítica total, na camada média e endotélio, das aortas referentes aos oito grupos experimentais. A fluorescência verde reflete esta atividade via degradação da gelatina (fluoróforo).



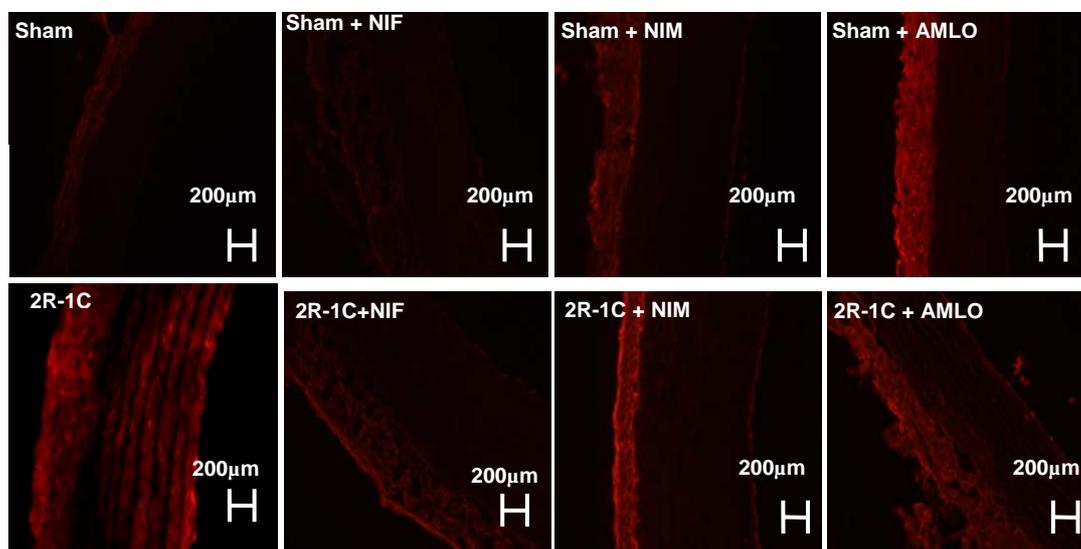
**Gráfico 5 :** Efeito das DHPs sobre a atividade gelatinolítica *in situ*. Quantificação da intensidade de fluorescência na camada média e endotélio das aortas. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM ( $n = 8-10$  por grupo). \*  $p < 0,05$  versus os controles e 2R-1C + DHPs.

### Efeito das DHPs sobre a expressão da MMP-2 nas aortas de ratos 2R-1C.

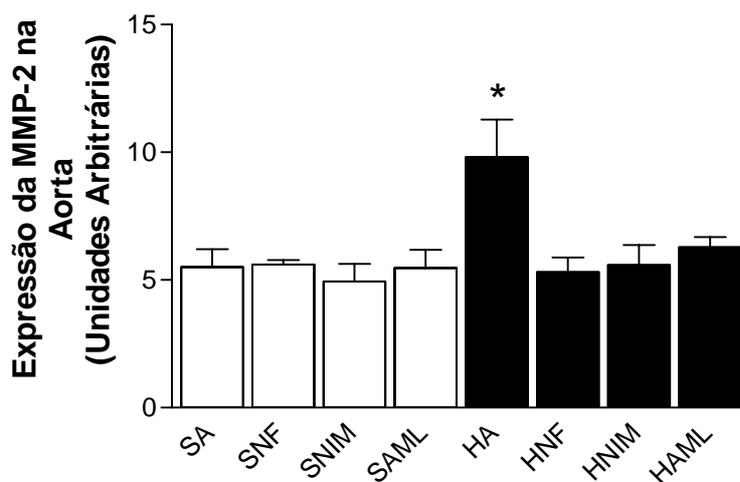
Como pode ser observado no gráfico abaixo, houve um aumento significativo da expressão da MMP-2 nas aortas dos ratos hipertensos em relação aos controles (Gráfico 6;  $p < 0,05$ ).

O tratamento com as DHPs reverteu esta expressão aumentada da MMP-2 nos animais hipertensos, similar ao que ocorreu com a quantidade de proteína ativa na zimografia em gel, sugerindo que a MMP-2 pode apresentar um importante papel nas alterações estruturais e funcionais dos vasos observados nesta doença.

A



B



**Gráfico 6:** Efeito das DHPs sobre a expressão da MMP-2. Representação gráfica dessa expressão. (A) Imagens ilustrativas, em 400x, da expressão da MMP-2, das aortas referentes aos oito grupos experimentais. A fluorescência vermelha indica a presença da MMP-2. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM ( $n = 8-10$  por grupo).

\*  $p < 0,05$  versus os controles e 2R-1C + DHPs.

## **Efeitos antioxidantes das DHPs sobre as concentrações vasculares de EROs em ratos 2R-1C.**

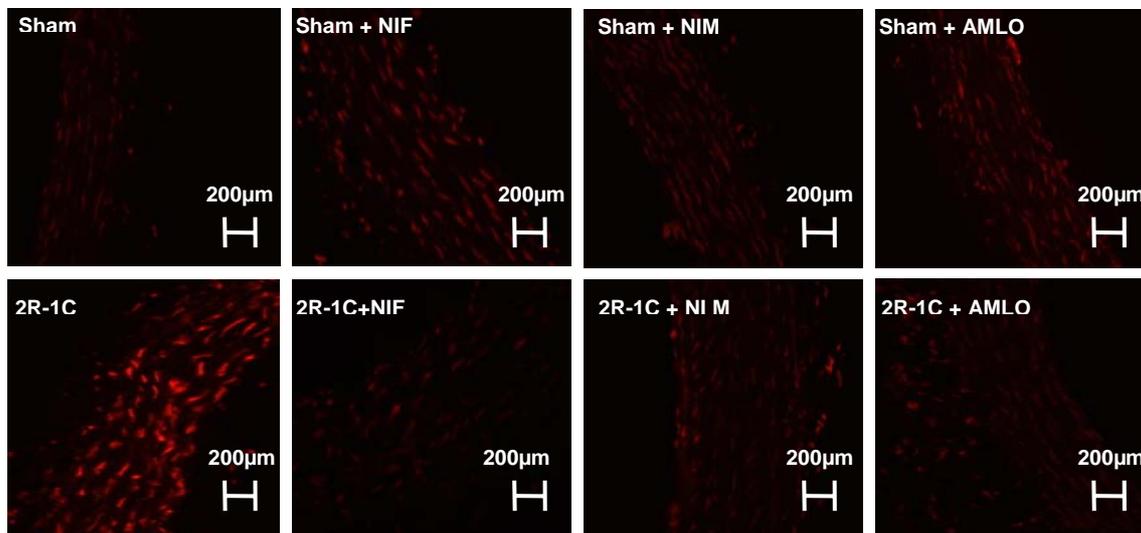
Foi observado um aumento significativo das concentrações de EROs, na média e no endotélio, das aortas dos animais hipertensos em relação aos controles (Gráfico 7A e 7B;  $p < 0,05$ ).

A atenuação da hipertensão arterial e das alterações vasculares, observadas anteriormente, podem estar relacionadas aos efeitos antioxidantes das DHPs sobre as concentrações vasculares de EROs, mas é bem provável que elas exerçam efeitos antioxidantes por doar elétrons aos radicais livres, reduzindo-os a formas não reativas. Por outro lado elas podem afetar uma das fontes enzimáticas de EROs, como a NADPH oxidase, reduzindo assim a produção intracelular destas espécies reativas de oxigênio (Cominacini et al., 2003) ou ainda por aumentar a produção de NO por mudanças na fosforilação da eNOS (H. Lenasi et al., 2003).

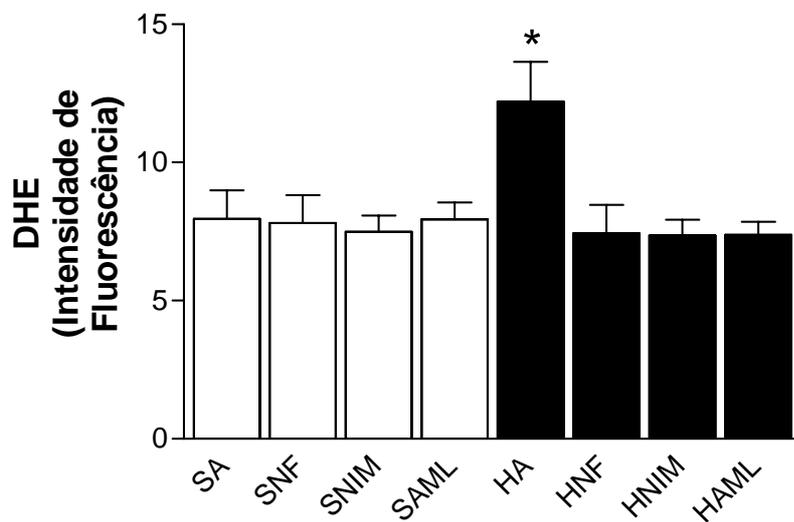
O tratamento com as DHPs reverteu estas concentrações elevadas de EROs nos animais hipertensos ( $p < 0,05$ ), sem alterá-las nos animais controles.

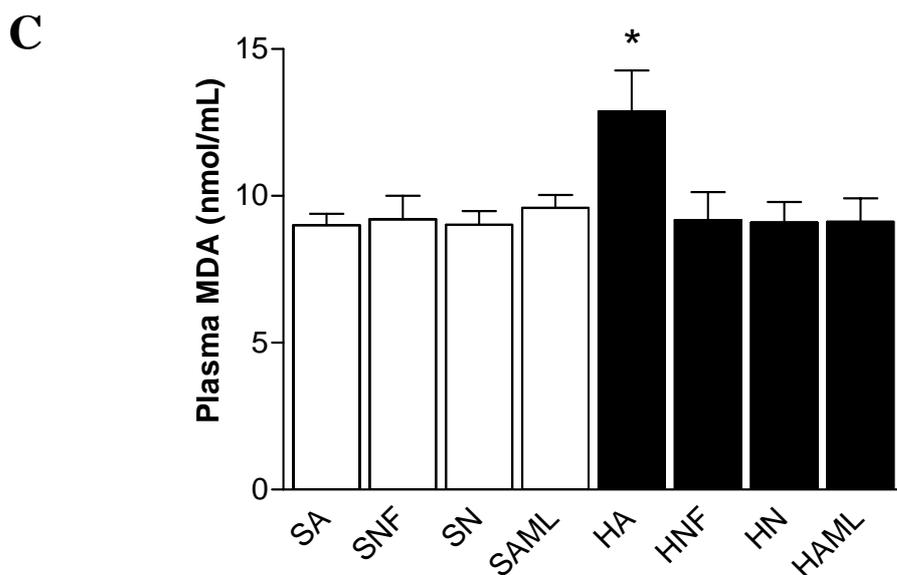
O estresse oxidativo também foi analisado no plasma pela quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico. O gráfico 7C mostra um aumento significativo das concentrações de MDA no plasma dos animais hipertensos quando comparados aos controles ( $p < 0,05$ ), e as diidropiridinas inibiram este aumento de TBARS.

**A**



**B**





**Gráfico 7:** Efeito das DHPs sobre as concentrações vasculares de EROs, associadas à hipertensão. (A) Imagens ilustrativas, em 400x, da concentração vascular de EROs na camada média das aortas. A fluorescência em vermelho representa os produtos da reação do DHE com o  $O_2^-$ . (B) Quantificação da intensidade de fluorescência presente na camada média das aortas. (C) Concentrações plasmáticas de TBARS, expressas na forma de MDA. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM (n = 5-6 por grupo para DHE; n = 8-10 por grupo para TBARS).

\*  $p < 0,05$  versus controles e 2R-1C + DHPs.

## 5 - DISCUSSÃO

Na hipertensão, as pequenas artérias sofrem alterações funcionais, estruturais e mecânicas, resultando em redução da luz vascular e aumento da resistência periférica. As alterações funcionais incluem o aumento da reatividade à vasoconstritores ou o comprometimento do relaxamento e refletem alterações do acoplamento excitação-contração, alteração das propriedades elétricas das células da musculatura lisa vascular e/ou disfunção endotelial. As principais alterações estruturais incluem o remodelamento devido ao aumento do crescimento celular, a migração de células, deposição de matriz extracelular e inflamação (Touyz RM, Fatiha Tabet, Schiffrin EL., 2003).

O modelo experimental 2R-1C foi proposto para este estudo por apresentar concentrações elevadas de EROs associadas ao aumento da renina plasmática e, principalmente, da angiotensina II (Lerman et al., 2005). Embora os mecanismos pelos quais a angiotensina II produz EROs na vasculatura estejam se tornando mais claros, os conhecimentos sobre como os intermediários reativos de oxigênio atuam como segundos mensageiros na resposta à angiotensina II e como esses processos redox sensíveis levam ao remodelamento vascular, à disfunção endotelial e à inflamação na hipertensão ainda são escassos. A melhor compreensão dos processos moleculares subjacentes poderia identificar novos alvos terapêuticos voltados para a prevenção da lesão vascular na hipertensão (Touyz RM, Fatiha Tabet, Schiffrin EL., 2003).

Apesar de evidências experimentais convincentes para a associação causal entre estresse oxidativo/inflamação e hipertensão, ainda não está claro se a hipertensão ou o estresse oxidativo é o evento primário neste processo, e continua incerta a associação exata na hipertensão essencial humana. No entanto, o que está claro é que o estresse oxidativo, a inflamação e a hipertensão se inter-relacionam e que sua associação envolve um processo de amplificação, que pode levar a uma deterioração progressiva da hipertensão e de lesões de órgãos-alvo (Touyz RM., 2005).

Estudos prévios do nosso laboratório mostrou a possível participação das metaloproteinases de matriz (MMPs), especialmente a MMP-2, nas alterações vasculares associadas ao modelo experimental de hipertensão 2R-1C (Castro et al., 2008).

Como descrito anteriormente, metaloproteinases são endopeptidases cálcio-dependentes, contendo zinco, presentes na matriz de vários tecidos, incluindo musculatura lisa vascular, endotélio e miocárdio. Elas são as principais responsáveis pela degradação de várias

proteínas da MEC, participando ativamente de processos fisiológicos de remodelamento tecidual (Page-McCaw et al., 2007).

O aumento dos níveis e ativação da MMP-2 que foi encontrado no nosso estudo é apoiado por achados similares em outros modelos experimentais de hipertensão (Bouvet e cols., 2005; Watts e cols., 2007; Castro e cols., 2008). E partindo da idéia de que as metaloproteinases (MMPs) participam ativamente da proliferação de células da musculatura lisa vascular e do remodelamento dos vasos, recentemente, estudos com vários CCBs, incluindo a Amlodipina, tem mostrado modular a atividade das MMPs. Embora o mecanismo envolvido ainda não esteja claro, os CCBs devem não agir somente na atividade/expressão das MMPs mas também na transcrição de seus inibidores teciduais (TIMPs) (R.P. Mason, P. Marche, T.H. Hintze., 2003). Portanto, o aumento da expressão/atividade da MMP-2 pode levar a uma menor vasodilatação ou aumentada vasoconstrição, contribuindo assim para uma disfunção endotelial e aumento da resistência vascular na hipertensão (Moreau e Schiffrin, 2003; Lerman e cols., 2005).

As EROs são muito importantes na ativação de algumas MMPs, especialmente da MMP-2 (Castier et al., 2005; Luchtefeld et al., 2005; Rajagopalan et al., 1996). Elas podem reagir com o resíduo de cisteína, presente no pró-peptídeo desta enzima, promovendo uma ruptura do grupamento tiol com o zinco, o que resulta na sua ativação (Van Wart and Birkedal-Hansen, 1990). Evidências indicam que as EROs tem papel patofisiológico importante no desenvolvimento da hipertensão, em grande parte, por excesso de radicais superóxidos ( $O_2^-$ ) e diminuição da biodisponibilidade de NO na vasculatura.

Elevadas concentrações de EROs tem sido consistentemente mostradas em modelos animais de hipertensão, bem como na hipertensão clínica (Griendling e Fitzgerald., 2003). Esses processos patológicos estão associados com a hipertensão porque eles contribuem para o estreitamento do lúmen arterial e conseqüentemente resistência periférica e pressão sanguínea aumentada (Ana Fortuño et al., 2005).

Atualmente se aceita amplamente que o estresse oxidativo e a inflamação sejam importantes participantes da doença vascular associada a hipertensão. A identificação de índices clinicamente úteis, o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para interferir com a inflamação e o estresse oxidativo e a validação de métodos para avaliar a terapia anti-inflamatória/oxidante aprimorarão ainda mais nossos conhecimentos sobre os processos fisiopatológicos subjacentes à hipertensão e suas complicações (Touyz RM., 2005).

Neste estudo, encontramos níveis plasmáticos de peróxidos lipídicos aumentados em ratos hipertensos, e este resultado é consistente com achados prévios que mostram um

aumento das concentrações de EROs em modelo clínico e experimental de hipertensão (Griendling et al., 2003). Esses achados são baseados, em geral, nos níveis aumentados no plasma de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e 8-epi-isoprostanos, biomarcadores de peroxidação lipídica e estresse oxidativo (Touyz RM., 2004) e que foram reduzidos com as diidropiridinas usadas no nosso estudo (Nifedipina, Nimodipina e Amlodipina).

Os bloqueadores de canais de cálcio (CCBs) foram desenvolvidos como vasodilatadores e seu uso no tratamento de doenças cardiovasculares fica amplamente baseado nesse mecanismo de ação. Mais recentemente, como já foi dito, com a evolução dos bloqueadores de canal de cálcio de segunda e terceira geração, efeitos pleiotrópicos tem sido observados, e no mínimo alguns dos benefícios dos CCBs é atribuído a esses mecanismos (Mason et al, 2003).

Os CCBs usados no estudo são da família das diidropiridinas, que são bloqueadores de canal de cálcio do tipo L e são importantes drogas no tratamento da hipertensão e doenças coronarianas. Essas diidropiridinas induzem seus efeitos farmacológicos específicos por se ligarem nos canais de cálcio tipo L, resultando em redução do influxo de cálcio e vasodilatação (Reinhard Berkels et al ., 2001).

Nosso estudo também mostra que, em paralelo à atenuação da atividade/níveis das MMPs, o tratamento com as diidropiridinas reverteu as alterações estruturais hipertróficas observadas nas aortas dos animais hipertensos. Isto foi evidenciado por menores aumentos do CSA e da razão M/L. Proporcionalmente ao aumento do CSA, houve também um aumento da proliferação celular e grande parte do espessamento da camada média observado nas aortas dos ratos 2R-1C pode ter ocorrido como conseqüência de uma hiperplasia das células musculares lisas (Castro et al ., 2008). Podemos sugerir, então, que as MMPs tem uma importante participação neste tipo de alteração já que as diidropiridinas usadas no estudo reverteu essas alterações nos animais hipertensos.

Quanto à atividade antioxidante das diidropiridinas, é bem provável que elas exerçam atividade antioxidante por doar elétrons aos radicais livres, reduzindo-os a formas não reativas. Por outro lado, as diidropiridinas podem afetar uma das fontes enzimáticas de EROs, tais como NADPH oxidase, xantina oxidase e ciclooxigenase, reduzindo assim a produção intracelular destas espécies reativas de oxigênio (Cominacini et al ., 2003). Ao reduzir a produção de EROs, as diidropiridinas podem estar reduzindo a atividade/expressão/níveis das MMPs.

Evidências experimentais indicam que os bloqueadores de canal de cálcio exercem efeito antioxidante e que protegeria as células endoteliais contra os radicais livres, que é o que prejudica a disponibilidade de NO e leva à disfunção endotelial na hipertensão (Taddei et al., 2000).

Diidropiridinas antagonistas de cálcio, como a Amlodipina melhora a função endotelial em pacientes com hipertensão essencial e diminui significativamente a aterosclerose na carótida. O mecanismo molecular responsável por esses efeitos parece não estar totalmente elucidado, mas parece estar envolvido com as propriedades antioxidantes desse composto em aumentar a produção de NO por mecanismos envolvendo a inibição de PKC e subsequente mudanças na fosforilação da eNOS na Ser<sup>1177</sup> e Thr<sup>495</sup> (H. Lenasi et al., 2003).

Berkels e colaboradores (2001) demonstrou que o tratamento com Nifedipina (concentração e tempo dependente) aumentou significativamente a liberação de NO de células endoteliais e que a disponibilidade de NO deve contribuir para os efeitos das diidropiridinas antagonistas de cálcio como efeitos antiagregatórios, antiproliferativos e antiateroscleróticos.

Segundo Taddei e colaboradores (2000) as diidropiridinas podem reverter a vasodilatação dependente do endotélio prejudicada e que na circulação do antebraço, Nifedipina e Lacidipina podem melhorar a disfunção endotelial por restaurar a disponibilidade de NO.

Martinez ML e colaboradores (2008) mostraram que a Lercanidipina, uma diidropiridina de 3<sup>a</sup> geração, reverteu o comprometimento da vasodilatação à Ach associada com a hipertensão 2R-1C, mostrando um possível efeito das diidropiridinas em melhorar a disfunção endotelial, associada a hipertensão, por restaurar a disponibilidade de NO.

De uma forma geral, a atenuação das alterações vasculares pelas diidropiridinas (Nifedipina, Nimodipina e Amlodipina) pode estar diretamente relacionada ao menor aumento da pressão arterial observado nos animais hipertensos tratados. É importante notar que as ações destas drogas sobre o sistema vascular vão além dos seus efeitos anti-hipertensivos. Isto porque, mesmo atenuando o aumento da pressão, as diidropiridinas em estudo reverteram as alterações estruturais, diminuí as concentrações elevadas de EROs (DHE), observadas nos animais hipertensos, e diminuí os níveis e a atividade da MMP-2 na aorta, visto através dos métodos de zimografia em gel e in situ, respectivamente. Isto sugere fortemente que as MMPs possam contribuir de forma significativa para o desenvolvimento e/ou progressão da hipertensão renovascular.

Em adição, enquanto os efeitos dos CCBs na atividade/expressão da MMP ainda precisam ser esclarecidos (Mason e cols., 2003), recentes achados sugerem que algumas diidropiridinas reduzem a atividade/expressão das MMPs (Roth e cols., 1996; Ikeda e cols., 2000; Yue e cols., 2004; Martinez e cols., 2006).

De acordo com os nossos resultados, as diidropiridinas reduziram tanto os níveis de estresse oxidativo, visto através da redução na produção de ânions superóxidos(DHE) e malondialdeído no plasma (TBARS), quanto os níveis de MMP no vaso, visto através da zimografia em gel e da zimografia *in situ* (medida de atividade gelatinolítica total).

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

Com esses resultados podemos implicar que os bloqueadores de canal de cálcio sejam antihipertensivos com capacidade de reduzir o remodelamento vascular. E uma limitação do nosso estudo é saber se o nosso modelo de hipertensão renovascular(2R-1C) é representável frente à hipertensão clínica, mas para isso estudos mais detalhados precisam ser feitos.

Nossos resultados ainda sugerem que os efeitos antihipertensivos e antioxidantes independem da geração das diidropiridinas e que esses antagonistas de cálcio em estudo (nifedipina, nimodipina e amlodipina) reverteram as alterações estruturais associadas à hipertensão renovascular 2R-1C envolvendo efeitos antioxidantes e menor ativação da MMP-2.

Em conclusão, nossos achados sugerem que drogas antihipertensivas com atividade antioxidante podem inibir a ativação da MMP-2 e ajudar na prevenção dessas alterações estruturais associadas à hipertensão.

## **6 - CONCLUSÕES**

- 1- Observamos que as diidropiridinas em estudo( Nifedipina, Nimodipina e Amlodipina) produziram efeitos antihipertensivo e antioxidantes, revertendo as alterações estruturais e aumento de MMP-2 na aorta dos ratos hipertensos e reduzindo os níveis de estresse oxidativo no modelo de hipertensão renovascular 2R-1C.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARTI S. MAHAJAN, RASHMI BABBAR, NISHEETH KANSAL, SATISH K. AGARWAL, PRAKASH C. RAY. Antihypertensive and Antioxidant Action of Amlodipine and Vitamin C in Patients of Essential Hypertension. *J Clin Biochem Nutr* (2007) **40**: 141-147.
- ANA FOTUÑO, GORKA SAN JOSÉ, MARIA U. MORENO, JAVIER DÍEZ AND GUILLERMO ZALBA. Oxidative stress and vascular remodeling. *Exp Physiol* **90(4)**: 457-462; 2005.
- ASANUMA K, MAGID R, JOHNSON C, NEREM RM, GALIS ZS, O'CALLAGHAN CJ, WILLIAMS B. Uniaxial strain upregulates matrix-degrading enzymes produced by human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**:H1778-1784; 2003.
- BAUMBACH GL, HEISTAD DD. Remodeling of cerebral arterioles in chronic hypertension. *Hypertension* **13(6 Pt 2)**:968-72; 1989.
- BODE W, MASKOS K. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biol Chem* **384(6)**:863-72; 2003.
- BOUVET C, GILBERT LA, GIRARDOT D, DEBLOIS D, MOREAU P. Different involvement of extracellular matrix components in small and large arteries during chronic NO synthase inhibition. *Hypertension* **45(3)**:432-7; 2005.
- BRINCKERHOFF CE, MATRISIAN LM. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:207-14; 2002.
- CAI H, HARRISON DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases – The role of oxidant stress. *Circ Res* **87**:840; 2000.
- CANAVESI M, BALDINI N, LEONARDI A, SIRONI G, BELLOSTA S, BERNINI F. In vitro inhibitory effect of lercanidipine on cholesterol accumulation and matrix metalloproteinases secretion by macrophages. *J Cardiovasc Pharmacol* **44(4)**:426-22; 2004.
- CASTIER, Y., BRANDES, R.P., LESECHE, G., TEDGUI, A., LEHOUX, S., 2005. p47phox-dependent NADPH oxidase regulates flow-induced vascular remodeling. *Circ Res* **97**: 533-540.

- CASTRO MM, RIZZI E, FIGUEIREDO-LOPES L, FERNANDES K, BENDHACK LM, PITOL DL, GERLACH RF, TANUS-SANTOS JE. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. *Atherosclerosis* **198(2)**:320-3; 2008.
- CASTRO MM, RIZZI E, RASCADO RR, NAGASSAKI S, BENDHACK LM, TANUS-SANTOS JE. Atorvastatin enhances sildenafil-induced vasodilation through nitric oxide-mediated mechanisms. *Eur J Pharmacol* **498**:189-194; 2004.
- CAU SB, DIAS-JUNIOR CA, MONTENEGRO MF, DE NUCCI G, ANTUNES E, TANUS-SANTOS JE. Dose-dependent beneficial hemodynamic effects of BAY 41-2272 in a canine model of acute pulmonary thromboembolism. *Eur J Pharmacol* **581(1-2)**:132-7; 2008.
- CERIELLO A. Controlling oxidative stress as a novel molecular approach to protecting the vascular wall in diabetes. *Curr Opin Lipidol* **17**:510-518; 2006.
- CHOU TC, LI CY, YEN MH, DING YA. Antiplatelet effect of amlodipine. *Biochem Pharmacol* **58**:1657-63; 1999.
- CHOW, A.K., CENA, J., SCHULZ, R., 2007. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol* **152** : 189-205.
- COHUET G, STRUIJKER-BOUDIER H. Mechanisms of target organ damage caused by hypertension: therapeutic potential. *Pharmacol Ther* **111**:81-98; 2006.
- CROWTHER M, GOODALL S, JONES JL, BELL PR, THOMPSON MM. Localization of matrix metalloproteinase 2 within the aneurysmal and normal aortic wall. *Br J Surg* **87(10)**:1391-400; 2000.
- DAO HH, LEMAY J, DE CHAMPLAIN J, DEBLOIS D, MOREAU P. Norepinephrine-induced aortic hyperplasia and extracellular matrix deposition are endothelin-dependent. *J Hypertens* **19**:1965-1973; 2001.
- DEATH AK, FISHER EJ, McGRATH KCY, YUE DK. High glucose alters matrix metalloproteinase expression in two key vascular cells: potential impact on atherosclerosis in diabetes. *Atherosclerosis* **168**:263-9; 2003.
- DE SOUZA AP, GERLACH RF, LINE SR. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dent Mater* **16(2)**:103-8; 2000.

- DOGGRELL SA, BROWN L. Rat model of hypertension, cardiac hipertrophy abd failure. *Cardiovascular Research* **39**:89-105; 1998.
- FAXON DP, FUSTER V, LIBBY P, BECKMAN JA, HIATT WR, THOMPSON RW. Atherosclerotic vascular disease conference: Writing Group III: pathophysiology. *Circulation* **109**:2617-25; 2004.
- FREEMAM, B.A., CRAPO, J.D., 1982. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* **47**: 412-426.
- GALIS, Z., GK, S., LIBBY, P., 1995. Microscopic localization of active protease by in situ zymography: detection of matrix metalloproteinase activity in vascular tissue. *FASEB J.* **9**: 974-980.
- GALIS ZS, KHATRI JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* **90**:251-262; 2002.
- GALIS ZS, SUKHOVA GK, LARK MW, LIBBY P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* **94(6)**:2493-503; 1994.
- GAN LM, SELIN-SJOGREN L, DOROUDI R, JERN S. Temporal regulation of endothelial ET-1 and eNOS expression in intact human conduit vessels exposed to different intraluminal pressure levels at physiological shear stress. *Cardiovasc Res* **48(1)**:168-77; 2000.
- GANZ M, MOKABBERI R, SICA DA. Comparison of blood pressure control with amlodipine and controlled-release isradipine: an open-label, drug substitution study. *J Clin Hypertens* **7(4 Suppl 1)**:27-31; 2005.
- GERLACH RF, UZUELLI JA, SOUZA-TARLA CD, TANUS-SANTOS JE. Effect of anticoagulants on the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Anal Biochem* **344**:147-149; 2005.
- GERLACH RF, DEMACQ C, JUNG K, TANUS-SANTOS JE. Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. *Clin Biochem* **40**:119-123; 2007.
- GOLDBLATT H, LYNCH J, HAMZAL RF, SUMMERVILLE WW. Studies on experimental hypertension. I. the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med* **59**:347-79; 1934.

- GRIENDLING KK, FITZGERALD GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation* **108**:2034-2040; 2003.
- GROTE K, FLACH I, LUCHTEFELD M, AKIN E, HOLLAND SM, DREXLER H, SCHIEFFER B. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Circ Res* **92**:80-86; 2003.
- HAO, L., NISHIMURA, T., WO, H., FERNANDEZ-PATRON, C., 2006. Vascular responses to alpha 1-adrenergic receptors in small rat mesenteric arteries depend on mitochondrial reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**: 819-825.
- HELENA LENASI, KARIN KOHLSTEDT, BIRGIT FICHTLSCHERER, ALEXANDER MÜLSCH, RUDI BUSSE, INGRID FLEMING. Amlodipine activates the endothelial nitric oxide synthase by altering phosphorylation on Ser<sup>1177</sup> and Thr<sup>495</sup>. *Cardio Res* **50**: 844-853; 2003.
- HIYOSHI H, YAYAMA K, TAKANO M, OKAMOTO H. Angiotensin type 2 receptor-mediated phosphorylation of eNOS in the aortas of mice with 2-kidney, 1-clip hypertension. *Hypertension* **45(5)**:967-73; 2005.
- HOJO Y, IKEDA U, UENO S, ARAKAWA H, SHIMADA K. Expression of matrix metalloproteinases in patients with acute myocardial infarction. *Jpn Circ J* **65(2)**:71-5; 2001.
- IKEDA U, HOJO Y, UENO S, ARAKAWA H, SHIMADA K. Amlodipine inhibits expression of matrix metalloproteinase-1 and its inhibitor in human vascular endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* **35(6)**:887-90; 2000.
- IZZO JL, BLACK HR. Hypertension Primer – The Essentials of High Blood Pressure. *From the Council on High Blood Pressure Research. American Heart Association* **2**:1-471; 1998.
- JALIUS S. Sympathetic hyperactivity and coronary risk in hypertension. *Hypertension* **21**:886-93; 1993.
- JENKINS GM, CROW MT, BILATO C, GLUZBAND Y, RYU WS, LI Z. Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase and preferential localization of matrix metalloproteinase-2 to the neointima of balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation* **97(1)**:82-90; 1998.

- JOHNSON C, GALIS ZS. Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24(1)**:54-60; 2004.
- KADOGLU NP, DASKALOPULO SS, PERREA D, LIAPIS CD. Matrix metalloproteinases and diabetic vascular complications. *Angiol* **56**:173-189; 2005.
- KAI H, IKEDA H, YASUKAWA H, KAI M, SEKI Y, KUWAHARA F. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* **32(2)**:368-72; 1998.
- KATAOKA S, ALAM R, DASH PK, YATSUO FM. Inhibition of PDGF-Mediated Proliferation of Vascular Smooth Cells by Calcium Antagonists. *Stroke* **28**:364-9; 1997.
- LALU, M., CENA J, CHOWDHURY R, LAM A, SCHULZ, R., 2006. Matrix metalloproteinases contribute to endotoxin and interleukin-1beta induced vascular dysfunction. *Br J Pharmacol* **149**: 31-42.
- LAPENNA D, CIOFANI G, PIERDOMENICO SD, GIAMBERARDINO MA, CUCCURULLO F. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. *Free Rad Biol Med* **31**:331-5; 2001.
- LERMAN LO, CHADE AR, SICA V, NAPOLI C. Animal models of hypertension: an overview. *J Lab Clin Med* **146**: 160-173; 2005.
- LUCHTEFELD, M., GROTE, K., GROTHUSEN, C., BLEY, S., BANDLOW, N., SELLE, T., STRUBER, M., HAVERICH, A., BAVENDIEK, U., DREXLER, H., SCHIEFFER, B., 2005. Angiotensin II induces MMP-2 in a p47phox-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* **328**: 183-188.
- MAHAJAN AS, BABBAR R, KANSAL N, AGARWAL SK, RAY PC. Antihypertensive and antioxidant action of amlodipine and vitamin C in patients of essential hypertension. *Journal of Clinical Biochem and Nutrition* **40(2)**:141-7; 2007.
- MARCHE P, STEPIEN O. Calcium antagonists and vascular smooth muscle cell reactivity. *Z Kardiol* **89(2)**:140-4; 2000.
- MARTINEZ-MALDONADO M. Pathophysiology of renovascular hypertension. *Hypertension* **17(5)**:707-19; 1991.

- MARTINEZ ML, LOPES LF, COELHO EB, NOBRE F, ROCHA JB, GERLACH RF, TANUS-SANTOS JE. Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-9 activity in patients with hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. **47**:117-122; 2006.
- MASON RP. Atheroprotective Effects of Long-Acting Dihydropyridine-Type Calcium Channel Blockers: Evidence from Clinical Trials and Basic Scientific Research. *Cerebrovasc Dis* **16(3)**:11-17; 2003.
- MASON RP, MARCHE P, HINTZE TH. Novel vascular biology of third-generation L-type calcium channel antagonists: ancillary actions of amlodipine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**:2155-2163; 2003.
- MATSUMORI A, NUNOKAWA Y, SASAYAMA S. Nifedipine inhibits activation of transcription factor NF-kB. *Life Sciences* **67**:2655-61; 2000.
- MENG X, MAVROMATIS K, GALIS ZS. Mechanical stretching of human saphenous vein grafts induces expression and activation of matrix-degrading enzymes associated with vascular tissue injury and repair. *Exp Mol Pathol* **66(3)**:227-37; 1999.
- MESSERLI FZ. Calcium Antagonists in Hypertension: From Hemodynamics to Outcomes. *AJH* **15**:94S-97S; 2002.
- MOREAU P, SCHIFFRIN EL. Role of endothelins in animal models of hypertension: focus on cardiovascular protection. *Can J Physiol Pharmacol* **81**: 511-521; 2003
- NAGASE, H., R, V., MURPHY, G., 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Res*. **69**: 562-573.
- NAGASE H, WOESSNER JF, JR. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* **274(31)**:21491-4; 1999.
- NELSON KK, MELENDEZ JA. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radic Biol Med* **37**:768-784; 2004.
- NEWBY AC, SOUTHGATE KM, DAVIES M. Extracellular matrix degrading metalloproteinases in the pathogenesis of arteriosclerosis. *Basic Res Cardiol* **89(Suppl 1)**:59-70; 1994.
- PALEI ACT, ZANETI RAG, FORTUNA GM, GERLACH RF, TANUS-SANTOS JE. Hemodynamic benefits of matrix metalloproteinase-9 inhibition by doxycycline during experimental acute pulmonary embolism. *Angiology* **56(5)**: 611-7; 2005.

- PRANDIN MG, CICERO AF, VERONESI M, COSENTINO E, DORMI A, STROCCHI E, BORGHI C. Persistence on treatment and blood pressure control with different first-line antihypertensive treatments: a prospective evaluation. *Clin Exp Hypertens* **29**:553-562; 2007.
- RA HJ, PARKS WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol* **26**:587-596; 2007.
- RAFFETTO JD, KHALIL RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Bioc Pharm* **75**: 346-359; 2008.
- RAJAGOPALAN S, MENG XP, RAMASAMY S, HARRISON DG, GALIS ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest* **98**:2572-2579; 1996.
- RAY JM, STETLER-STEVENSON WG. The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* **7(11)**:2062-72; 1994.
- REINHARD BERKELS, GUIDO EGINK, TOBIAS A. MARSEN, HENNING BARTELS, RENATE ROESEN, WOLFGANG KLAUS. Nifedipine Increases Endothelial Nitric Oxide Bioavailability by Antioxidative Mechanisms. *Hypertension* (2001) **37**: 240-245.
- RHIAN M TOUYZ, FATIHA Tabet AND ERNESTO L SCHIFFRIN. Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodeling in hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **30**: 860-866 ; 2003.
- ROTH M, EICKELBERG O, KOHLER E, ERNE P, BLOCK LH. Ca<sup>2+</sup> channel blockers modulate metabolism of collagens within the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* **93(11)**:5478-82; 1996.
- SASE K, MICHEL T. Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. *Life Sci* **57(22)**:2049-55; 1995.
- SAVOIA C, SCHIFFRIN EL. Inhibition of the renin angiotensin system: implications for the the endothelium. *Curr Diab Rep* **6(4)**:274-8; 2006.
- SCHULZ E, JANSEN T, WENZEL P, DAIBER A, MÜNDEL T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal* **10(6)**:1115-26; 2008.

- SOBAL G, MENZEL EJ, SINZINGER H. Calcium antagonists as inhibitors of in vitro low density lipoprotein oxidation and glycation. *Biochem Pharmacol* **61(3)**:3737-9; 2001.
- SOUZA-COSTA DC, FIGUEIREDO-LOPES L, ALVES-FILHO JC, SEMPRINI MC, GERLACH RF, CUNHA FQ, TANUS-SANTOS JE. Protective effects of atorvastatin in rat models of acute pulmonary embolism: involvement of matrix metalloproteinase-9. *Crit Care Med* **35**:239-245; 2007.
- SOUZA-COSTA DC, ZERBINI T, PALEI AC, GERLACH RF, TANUS-SANTOS JE. L-arginine attenuates acute pulmonary embolism-induced increases in lung matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9. *Chest* **128**:3705-3710; 2005.
- SOUZA-TARLA CD, UZUELLI JA, MACHADO AA, GERLACH RF, TANUS-SANTOS JE. Methodological issues affecting the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Clin Biochem* **38**:410-414; 2005.
- SPINALE FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* **90(5)**:520-30; 2002.
- STEFANO TADDEI, MD, AGOSTINO VIRDIS, MD, LORENZO GHIADONI, MD, ISABELLA SUDANO, MD, ANTONIO SALVETTI, MD. Antihypertensive Drugs and reversing of Endothelial Dysfunction in Hypertension. *Curr Hypert Reports* (2000) **2**: 64-70.
- STOSCHECK CM. Quantitation of protein. *Methods Enzymol* **182**:50-68; 1990.
- TAYEBJEE MH, NADAR S, BLANN AD, GARETH BEEVERS D, MACFADYEN RJ, LIP GY. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hypertension and their relationship to cardiovascular risk and treatment: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT). *Am J Hypertens* **17**:764-9; 2004 (a).
- TAYEBJEE MH, NADAR SK, MACFADYEN RJ, LIP GY. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-9 levels in patients with hypertension. Relationship to tissue Doppler indices of diastolic relaxation. *Am J Hypertens* **17**:770-4; 2004 (b).
- TAYEBJEE MH, MACFADYEN RJ, LIP GY. Extracellular matrix biology: a new frontier in linking the pathology and therapy of hypertension? *J Hypertens* **21**:2211-8; 2003.
- T. GODFRAIND. Antioxidant effects and the therapeutic mode of action of calcium channel blockers in hypertension and atherosclerosis. *Phil Trans R Soc B* (2005) **360**: 2259-2272.

- TOBA H, NAKAGAWA Z, MIKI S, SHIMIZU T, YOSHIMURA A, INOUE R, ASAYAMA J, KOBARA M, NAKATA T. Calcium channel blockades exhibit anti-inflammatory and antioxidative effects by augmentation of endothelial nitric oxide synthase and the inhibition of angiotensin converting enzyme in the N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertensive rat aorta: vasoprotective effects beyond the blood pressure lowering effects of amlodipine and manidipine. *Hypertens Res* **28(8)**:689-700; 2005.
- TOMASSONI D, LANARI A, SILVESTRELLI G, TRAINI E, AMENTA F. Nimodipine and its use in cerebrovascular disease: evidence from recent preclinical and controlled clinical studies. *Clin Exp Hypertens* 2008; **30(8)**:744-66.
- TOMASSONI D, SABBATINI M, AMENTA F. Effect of different dihydropyridine-type Ca<sup>2+</sup> antagonists on left ventricle hypertrophy and coronary changes in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* **41**:544-552; 2003.
- TOUYS, RM., 2005. Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **14**: 125-131.
- TOUYS, RM., 2004b. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* **44**: 248-252.
- TOUYZ RM, SCHIFFRIN EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Hist and Cell Biology* **122(4)**:339-52; 2004.
- TOYO-OKA T, NAYRER WG. Third generation calcium entry blockers. *Blood Press* **5**:206-8; 1996.
- TRIGGLE DJ. Calcium Antagonists. History and Perspective. *Stroke* **21(IV)**:49-58; 1990.
- TRIGGLE DJ. Calcium channel antagonists: Clinical uses – Past, present and future. *Bioch Pharmacol* **74**:1-9; 2007.
- UEMURA S, MATSUSHITA H, LI W, GLASSFORD AJ, ASAGAMI T, LEE KH, HARRISON DG, TSAO PS. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress. *Circ Res* **88**:1291-1298; 2001.
- VAN WART, H.E., BIRKEDAL-HANSEN, H., 1990. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 5578-5582.
- VAN ZWIETEN PA, MANCIA G. Third generation calcium antagonists: Further developments. *Blood Press* **5**:376-7; 1996.

- VARON J. Treatment of acute severe hypertension: current and newer agents. *Drugs* **68(3)**:283-297; 2008.
- VERDECCHIA P, SCHILLACI G, BORGIONI C, CIUCCI A, GATTOBIGIO R, ZAMPI I, REBOLDI G, PORCELLATI C. Prognostic Significance of Serial Changes in Left Ventricular Mass in Essential Hypertension. *Circulation* **97**:48-54; 1998.
- VIEL, E.C., BENKIRANE, K., JAVESHGHANI, D., TOUYZ, R.M., SCHIFFRIN, E.L., 2008. Xanthine Oxidase and Mitochondria Contribute to Vascular Superoxide Anion Generation in DOCA-Salt Hypertension Rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.
- VISSE R, NAGASE H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* **92(8)**:827-39; 2003.
- WARD MR, PASTERKAMP G, YEUNG AC, BORST C. Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. *Circulation* **102(10)**:1186-91; 2000.
- WATTS SW, RONDELLI C, THAKALI K, LI X, UHAL B, PERVAIZ MH, WATSON RE, FINK GD. Morphological and biochemical characterization of remodeling in aorta and vena cava of DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**:H2438-2448; 2007.
- YAMAGISHI S, TAKEUCHI M. Nifedipine inhibits gene expression of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in endothelial cells by suppressing reactive oxygen species generation. *Drugs Exp Clin Res* **30(4)**:169-75; 2004.
- YAMAGISHI S, NAKAMURA K, TAKENAKA K, MATSUI T, INOUE H. Pleiotropic effects of nifedipine on atherosclerosis. *Curr Pharm Des* **12(12)**:1543-7; 2006.
- YAMAGISHI S, NAKAMURA K, MATSUI T. Role of oxidative stress in the development of vascular injury and its therapeutics intervention by nifedipine. *Curr Med Chem* **15(2)**:172-7; 2008.
- YASMIN, MCENIERY CM, WALLACE S, DAKHAM Z, PULSALKAR P, MAKI-PETAJA K, ASHBY MJ, COCKCROFT JR, WILKINSON IB. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**:372; 2005.
- YASUMITSU H, MIYAZAKI K, UMENISHI F, KOSHIKAWA N, UMEDA M. Comparison of extracellular matrix-degrading activities between 64-kDa and 90-kDa gelatinases purified in inhibitor-free forms from human schwannoma cells. *J Biochem* **111(1)**:74-80; 1992.

YOSHII T, IWAI M, LI Z, CHEN R, IDE A, FUKUNAGA S, OSHITA A, MOGI M, HIGAKI J, HORIUCHI M. Regression of atherosclerosis by amlodipine via anti-inflammatory and anti-oxidative stress actions. *Hypertens Res* **29(6)**:457-66; 2006.

YUE H, UZUI H, SHIMIZU H, NAKANO A, MITSUKE Y, UEDA T, LEE JD. Different effects of calcium channel blockers on matrix metalloproteinase-2 expression in cultured rat cardiac fibroblasts. *J Cardiovasc Pharmacol* **44**:223-230; 2004.

ZATZ R, BAYLIS C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension* **32(6)**:958-64; 1998.

ZHANG B, YE S, HERRMANN SM, ERIKSSON P, DE MAAT M, EVANS A. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* **99(14)**: 1778-94; 1999.

V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial - SBC/SBH/SBN 2006.

## ANEXOS



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —



## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação n° 029/2009, sobre o projeto intitulado “*Efeitos de diferentes anti-hipertensivos sobre alterações vasculares presentes no modelo Hipertensão Arterial Renovascular (2R-1C)*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor José Eduardo Tanus dos Santos** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de *08 de junho de 2009*.

(We certify that the protocol n° 029/2009, about “*Effects of different antihypertensives on the vascular alterations in the renovascular hypertension*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved in *06/08/2009* meeting.

Ribeirão Preto, 08 de junho de 2009.

**Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha**  
Presidente da Comissão de Ética em  
Experimentação Animal

# 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](#)