UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

JEIMISON DUARTE SANTOS

**Efeitos da ativação do receptor TP sobre a função vascular em
ratos hipertensos renais**

Ribeirão Preto

2017

JEIMISON DUARTE SANTOS

**Efeitos da ativação do receptor TP sobre a função vascular em
ratos hipertensos renais**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack

Ribeirão Preto

2017

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de
Ribeirão Preto/USP

Santos, Jeimison Duarte.

Efeitos da ativação do receptor TP sobre a função vascular em ratos hipertensos renais/ Jeimison Duarte Santos; Orientador: Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack. – Ribeirão Preto, 2017.

118 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Área de Concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2017.

1. receptor TP 2. NO 3. ERO 4. COX 5. função vascular 6. hipertensão

Folha da aprovação

Autor: Jeimison Duarte Santos

Título: Efeitos da ativação do receptor TP sobre a função vascular em ratos hipertensos renais

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Profa. Dra. Cristina Antoniali Silva

Instituição: UNESP Assinatura: _____

Profa. Dra. Daniella Bonaventura

Instituição: UFMG Assinatura: _____

Profa. Dra. Michele Mazzaron de Castro

Instituição: FMRP-USP Assinatura: _____

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus por toda orientação, cuidado e (inúmeras) bênçãos concedidas.

Aos meus pais, Katia Maria Duarte Santos e Isaias Barros Santos, por toda educação, orientação, carinho, apoio, e amor. Obrigado por serem minhas maiores inspirações para seguir em frente. A vocês, todo o meu amor.

A todos os meus demais familiares pela torcida, carinho e apoio.

A meu companheiro, Bruno Serpellone, por todos os ensinamentos, carinho, sorrisos, apoio e compreensão, além do compartilhar dos dias em Ribeirão Preto. “Morta!”

À Profa. Dra. Alice Valença Araújo por, desde o início, apoiar e incentivar a minha trajetória de pós-graduação em Ribeirão Preto.

À Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack, por ter me aceitado como orientando, confiado no meu trabalho e ser minha orientadora além do “acadêmico”. Obrigado, professora, por me ensinar, alertar quando necessário, e fortalecer meus princípios éticos, profissionais e fraternos.

Aos meus amigos de laboratório: Fabíola Zuchi, Michele Paulo, Tamy Banin e Tiago Dal-Cin, por todos os ensinamentos, sorrisos compartilhados, apoio em momentos difíceis, sugestões e amizade. Em especial, agradeço ao Bruno Silva por todo o apoio, ensinamentos, contribuições para a realização desse trabalho, e experiências pessoais compartilhadas, que me ajudaram bastante a superar momentos difíceis nessa trajetória.

Agradeço especialmente às amigas Marcella Grando e Juliana Vercesi por todo apoio técnico, além dos sorrisos e “puxões de orelha”. Esse trabalho não seria possível sem a ajuda de vocês.

Às Profas. membros da minha banca examinadora Dra. Cristina Antoniali Silva, Dra. Daniella Bonaventura e Dra. Michele Mazzaron de Castro pela disponibilidade, atenção, contribuições e críticas que contribuíram para o enriquecimento desse trabalho.

A todos os meus (muitos) amigos que tive a sorte de ganhar em Ribeirão Preto, cujos nomes não posso citar para não correr o risco de esquecer algum e ser injusto. Numa fase de adaptação, desenvolver esse trabalho longe da minha terra natal ficou muito mais leve e feliz com os sorrisos compartilhados, desabafos e apoio de todos vocês. Além dos “rolês”, claro.

Aos meus amigos que permaneceram no Recife: Twane Xavier, Arthur Cabral, Mariana Cavalcanti e Rodrigo Benson, por toda a torcida e carinho que sou capaz de sentir mesmo a quilômetros de distância.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, Sônia Stefanelli, José Ramon e Fátima Petean, pelo apoio prestado.

Aos Docentes do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, em especial aos Profs(as). Drs(as): Michele de Castro, Fernando Morgan e Rita Tostes, por todos os ensinamentos compartilhados e contribuições fundamentais para minha formação.

Aos funcionários e Docentes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, pela agradável convivência durante minha trajetória.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP por todo o apoio e cuidado com os animais prestados durante a elaboração desse trabalho.

À CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro prestado para a realização dessa pesquisa.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

A todos: muito obrigado.

SANTOS, J.D. **Efeitos da ativação do receptor TP sobre a função vascular em ratos hipertensos renais.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A ativação do receptor para tromboxano-prostanóide (TP) está relacionada com o processo de desenvolvimento e manutenção da hipertensão arterial. O objetivo do presente trabalho foi investigar se a ativação do receptor TP promove a produção de fatores contráteis derivados do endotélio (EDCFs) e espécies reativas de oxigênio (ERO), contribuindo para a disfunção vascular observada na hipertensão renovascular. Aortas de ratos normotensos (2R) ou hipertensos (2R-1C) foram utilizadas para avaliar a expressão proteica da enzima cicloxigenase (COX-1, COX-2), expressão gênica do receptor TP, expressão proteica da enzima NO-Sintase endotelial fosforilada (fosfo-eNOS) e produção de TXA₂ ativada pelo U46619. Células endoteliais (CE) e do músculo liso vascular (CMLV) foram utilizadas para avaliar a produção de NO e ERO pelo estímulo com o U46619. Em aortas com (E+) ou sem endotélio (E-) de ratos 2R e 2R-1C foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para o U46619 na ausência ou presença de Tiron, Catalase (Cat) e em aortas E+, na presença de L-NAME, Ibuprofeno (Ibu) ou L-NAME + Ibu. Em aortas E+ contraídas com U46619, foram realizadas curvas concentração-efeito para acetilcolina (ACh), na ausência ou presença de Tiron, Cat ou Ibu. Os resultados mostram que a expressão gênica para o receptor TP foi menor e a expressão proteica da COX-1 e COX-2 foi maior em aortas de ratos 2R-1C do que em 2R. Em aorta de ratos 2R e 2R-1C, o U46619 não promoveu a geração de TXA₂ e não alterou a expressão proteica da fosfo-eNOS. O estímulo com U46619 promoveu o aumento de NO em CE e ERO em CE e CMLV. Em aortas E- a potência (pD₂) do U46619 em induzir contração foi maior em 2R e 2R-1C em relação às preparações E+. Em aortas E- de ratos 2R, a contração ao U46619 foi menor com Cat ou Ibu do que no controle. Em preparações E+, Ibu ou Ibu+Tiron (mas não Ibu+L-NAME) reduziram a potência do U46619 em relação ao controle. Em aortas E+ de ratos 2R-1C, a contração ao U46619 foi maior com Tiron e menor em presença de Tiron+Ibu em relação ao controle. Tiron+L-NAME ou Ibu não modificou a resposta contrátil ao U46619. Em aortas E-, Tiron ou Cat não modificaram a contração ao U46619. Quando contraídas com U46619 (10 nmol/L), o relaxamento à ACh foi menor em aorta de ratos 2R-1C em relação a 2R. Em aortas E+ de ratos 2R e 2R-1C, o relaxamento à ACh foi menor quando contraídas com U46619 (100 nmol/L) do que com U46619 (10 nmol/L). Tiron, Cat ou Ibu não modificaram o relaxamento à ACh em aorta de ratos 2R-1C comparadas a 2R. Em aorta de ratos 2R, o peróxido de hidrogênio regula a atividade das enzimas COX e eNOS. Por outro lado, em aorta de ratos 2R-1C, a regulação da atividade da COX pelas ERO depende do endotélio e modula negativamente a síntese de EDCFs. *Palavras-chave:* receptor TP, NO, ERO, COX, função vascular, hipertensão.

Palavras-chave: receptor TP, NO, ERO, COX, função vascular, hipertensão

SANTOS, J. D. **Effects of TP receptors activation on renal hypertensive rat aortas**. Dissertation (Master degree) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

TP receptor activation is involved on the development and maintenance of hypertension. This study aimed to investigate if TP receptor activation induces endothelium-derived contractile factors (EDCFs) and reactive oxygen species (ROS) production, and if it contributes to the vascular dysfunction in renal hypertensive rats. Normotensive (2K) and renal hypertensive (2K-1C) rat aortas were used to evaluate COX-1 and -2 expression, genic expression of TP receptor, p-eNOS expression and TXA₂ production induced by TP agonist, U46619. Endothelial cells (EC) and vascular smooth muscle cells (VSMC) were stimulated with U46619 to evaluate NO and ROS production. U46619- stimulated concentration-effect curves were performed in intact (E+) and denuded-endothelium (E-) aortas of 2K and 2K-1C rats, in the absence (Control) or presence of Tiron or Catalase (Cat). In E+ aortas, we used L-NAME, Ibuprofen or the combination of both. Concentration-effect curves were performed for acetylcholine (ACh) in E+ aortas, contracted by U46619, in the absence or presence of Tiron, Catalase or Ibuprofen. In 2K-1C, the genic expression of TP receptor was lower and expression of COX-1 and -2 was higher than in 2K. The agonist did not have effect on TXA₂ production or p-eNOS expression in both rat groups of aortas. U46619 induced production of NO in EC and ROS in EC and VSMC. The endothelium removal increased the potency of U46619 in 2K and 2K-1C aortas. In E- aortas of 2K, contraction induced by U46619 was impaired by Catalase. In E+ aortas, the potency was lower in the presence of Ibu ou Ibu+Tiron, but not Cat or Ibu+L-NAME. In E+ aortas of 2K-1C, the contraction to U46619 was potentiated by Tiron but it was inhibited by Tiron+Ibu. Tiron and L-NAME or Ibuprofen had no effect on U46619-induced contraction. In E- aortas of 2K-1C, Tiron or Catalase had no effect on the contraction induced by U46619. ACh-induced relaxation was impaired in 2K and 2K-1C aortas contracted with 100 nmol/L U46619. Relaxation induced by ACh was lower in 2K-1C aortas contracted with 10 nmol/L U46619. Tiron, Catalase or Ibuprofen had no effect on the relaxation to ACh in 2K-1C rats aorta. Our results suggest that in 2K rat aortas, H₂O₂ regulates COX and eNOS activity. On the other hand, in 2K-1C rats aorta, ROS modulates COX activity and EDCFs production, which mechanisms are endothelium- dependent.

Key-words: TP receptor, NO, ROS, COX, vascular function, hypertension.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Medida do tromboxano B ₂ (metabólito estável do tromboxano A ₂) do plasma de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C)	43
Figura 2. Expressão gênica do receptor TP em aorta de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C)	44
Figura 3. Resposta contrátil induzida pelo agonista TP (U46619) em aortas com endotélio e sem endotélio, isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C).....	45
Figura 4. Resposta contrátil induzida pelo agonista TP (U46619) em aortas isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C), com endotélio e sem endotélio	47
Figura 5. Intensidade de fluorescência da sonda DAF-2DA, sensível aos níveis de NO, em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs), sem estímulo (controle) ou estimuladas com U46619 (10 nmol/L ou 10 µmol/L), A23187 (10 µmol/L) ou RuBPY 10µmol/L).....	49
Figura 6. Expressão proteica da NO-Sintase endotelial (eNOS) total e eNOS fosforilada nos resíduos de Ser ¹¹⁷⁷ ou Thr ⁴⁹⁵ aorta com endotélio de ratos normotensos (2R) com ou sem (controle) estímulo com o agonista TP, U46619 (10 nmol/L)	50
Figura 7. Expressão proteica da NO-Sintase endotelial (eNOS) total e eNOS fosforilada nos resíduos de Ser ¹¹⁷⁷ ou Thr ⁴⁹⁵ aorta com endotélio de ratos hipertensos renais (2R-1C) com ou sem (controle) estímulo com o agonista TP, U46619 (10 nmol/L).....	51
Figura 8. Resposta contrátil induzida pelo agonista TP (U46619) em aortas isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C), na ausência (controle) ou presença de L-NAME (100 µmol/L).....	53
Figura 9. Intensidade de fluorescência da sonda DHE, sensível a ERO, em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) ou células do músculo liso vascular, isoladas de ratos sem estímulo (controle), ou estimuladas com U46619 (10 nmol/L ou 10 µmol/L), na ausência ou presença do antagonista TP, SQ29548 (10 µmol/L)	56
Figura 10. Intensidade de fluorescência da sonda DHE, sensível aos níveis de ERO, em células endoteliais de veias umbilicais humanas (HUVECs) ou células do músculo liso vascular, isoladas de ratos sem estímulo (controle), ou estimuladas com U46619 (10 nmol/L), na ausência ou presença de Tiron (100 µmol/L), PEG-Catalase (3.000 U/mL) ou Ibuprofeno (10 µmol/L)	57

Figura 11. Resposta contrátil induzida pelo agonista TP (U46619) em aortas com endotélio e sem endotélio, isoladas de ratos normotensos (2R), na presença ou ausência de Tiron (100 µmol/L) ou Catalase (300 U/mL).....	59
Figura 12. Resposta contrátil induzida pelo agonista TP (U46619) em aortas com endotélio e sem endotélio, isoladas de ratos hipertensos renais (2R-1C), na presença ou ausência de Tiron (100 µmol/L) ou Catalase (300 U/mL)	60
Figura 13. Expressão proteica da COX-1 e COX-2, normalizada pela expressão de β-actina, em aortas com endotélio ou sem endotélio, isoladas de ratos normotensos (2R) ou hipertensos renais (2R-1C).....	62
Figura 14. Resposta contrátil induzida pelo agonista TP (U46619) em aortas com endotélio ou sem endotélio, isoladas de ratos normotensos (2R), na ausência (Controle) ou presença de Ibuprofeno (10 µmol/L) ou Furegrelato (10 µmol/L)	64
Figura 15. Resposta contrátil induzida pelo agonista TP (U46619) em aortas com endotélio ou sem endotélio, isoladas de ratos hipertensos renais (2R-1C), na ausência (Controle) ou presença de Ibuprofeno (10 µmol/L)	66
Figura 16. Medida da produção de TXB ₂ (metabólito estável do tromboxano A ₂) em homogenato de aortas, com ou sem endotélio, de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C), previamente estimuladas ou não (controle) com U46619 (10 µmol/L) em banho para órgãos isolados.....	67
Figura 17. Resposta contrátil induzida pelo agonista TP (U46619) em aortas com endotélio isoladas de ratos normotensos (2R), na ausência (Controle) ou presença de Ibuprofeno (10 µmol/L), combinação Ibuprofeno e L-NAME (100 µmol/L) ou combinação Ibuprofeno e Tiron (100 µmol/L).....	69
Figura 18. Resposta contrátil induzida pelo agonista TP (U46619) em aortas com endotélio isoladas de ratos hipertensos renais (2R-1C), na ausência (Controle) ou presença da combinação de Tiron (100 µmol/L) e L-NAME (100 µmol/L) ou Tiron e Ibuprofeno (10 µmol/L).....	71
Figura 19. Resposta relaxante induzida pela acetilcolina (ACh) em aortas com endotélio isoladas de ratos normotensos (2R) ou hipertensos renais (2R-1C), pré-contraídas com o agonista TP, U46619 em duas concentrações: 100 nmol/L ou 10 nmol/L.....	72
Figura 20. Resposta relaxante induzida pela acetilcolina (ACh) em aortas com endotélio isoladas de ratos normotensos (2R), pré-contraídas com o agonista TP, U46619 (10 nmol/L), na ausência (controle) ou presença de Tiron (100 µmol/L), Catalase (300 U/mL) ou Ibuprofeno (10 µmol/L)	74
Figura 21. Resposta relaxante induzida pela acetilcolina (ACh) em aortas com endotélio isoladas de ratos hipertensos renais (2R-1C), pré-contraídas com o agonista TP, U46619 (10 nmol/L), na ausência (controle) ou presença de Tiron (100 µmol/L), Catalase (300 U/mL) ou Ibuprofeno (10 µmol/L).....	75

Figura 22. Efeitos da ativação do receptor TP induzidos pelo agonista U46619, em aortas isoladas de ratos normotensos (2R)..... 105

Figura 23. Efeitos da ativação do receptor TP pelo agonista U46619, em aortas isoladas de ratos hipertensos renais (2R-1C) 106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Coeficiente de <i>Hill</i> calculado pelas curvas concentração-efeito para o U46619 em aorta isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C), com endotélio ou sem endotélio	46
Tabela 2. Efeito máximo (Emax) e pD ₂ calculados pelas curvas concentração-efeito para o U46619 em aorta isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C), com endotélio ou sem endotélio	48
Tabela 3. Coeficiente de <i>Hill</i> calculado pelas curvas concentração-efeito para o U46619 em aorta com endotélio isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C), pré-incubadas ou não (controle) com o inibidor não seletivo da NO-Sintase, L-NAME (100 µmol/L)	54
Tabela 4. Efeito máximo (Emax) e pD ₂ calculados pelas curvas concentração-efeito para o U46619 em aorta isoladas de ratos normotensos (2R), com endotélio ou sem endotélio, pré-incubadas ou não (controle) com o inibidor não seletivo da COX, Ibuprofeno (10 µmol/L) ou inibidor da tromboxano sintase, Furegrelato (10 µmol/L).....	65
Tabela 5. Efeito máximo (Emax) e pD ₂ calculados pelas curvas concentração-efeito para o U46619 em aorta isoladas de ratos normotensos (2R), com endotélio, pré-incubadas ou não (controle) com o inibidor não seletivo da COX, Ibuprofeno (10 µmol/L), combinação Ibuprofeno e inibidor não seletivo da NO-Sintase, L-NAME (100 µmol/L), ou combinação Ibuprofeno e sequestrador de O ₂ ⁻ , Tiron (100 µmol/L).....	70
Tabela 6. Efeito máximo (Emax) e pD ₂ calculados pelas curvas concentração-efeito para acetilcolina em aortas com endotélio isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C), pré-contraídas com o agonista TP, U46619 em diferentes concentrações: 100 ou 10 nmol/L.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Ca ²⁺] _c	concentração citosólica de cálcio
[NO] _c	concentração citosólica de NO
2R	rato normotenso
2R-1C	rato hipertenso
A23187	ionóforo de cálcio
AA	ácido araquidônico
ACh	acetilcolina
Ang II	angiotensina II
BH ₄	tetrahidrobiopterina
CMLVs	células do músculo liso vascular
COX	cicloxigenase
COX-1	isoforma 1 da COX
COX-2	isoforma 2 da COX
DAF-2/DA	sonda fluorescente 4,5-diaminofluoresceína
DHE	sonda fluorescente dihidroetidina
DOCA	acetato de desoxicorticosterona
E-	aorta sem endotélio
E+	aorta com endotélio
EC ₁₀₀	concentração de uma droga que produz 100% do efeito máximo
EC ₅₀	concentração de uma droga que produz 50% do efeito máximo
EDCFs	fatores contráteis derivados do endotélio
EDRFs	fatores relaxantes derivados do endotélio

Emax	efeito máximo
eNOS	NO-Sintase endotelial
EPM	erro padrão da média
fosfo-eNOS	NO-sintase fosforilada
FURE	furegrelato, inibidor da tromboxano sintase
GCs	guanilil ciclase solúvel
GMPc	guanosina monofosfatada cíclica
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HUVECs	células endoteliais de veia umbilical humana
IBU	ibuprofeno, inibidor não seletivo da COX
KCl	cloreto de potássio
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina metil Ester, inibidor não seletivo da NO-Sintase
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO	óxido nítrico
NOS	NO-sintase
Nox	nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato oxidase
O ₂ ⁻	ânion superóxido
ONOO ⁻	peroxinitrito
pD ₂	co-logaritmo da concentração de uma droga que produz 50% do efeito máximo
PEG	polietilenoglicol
PGD ₂	prostaglandina D ₂
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PGF _{2α}	prostaglandina F ₂
PGG ₂	prostaglandina G ₂

PGH ₂	prostaglandina H ₂
PGI ₂	prostaciclina
PKC	proteína quinase C
PKG	proteína quinase G
PLA ₂	fosfolipase A ₂
PLC	fosfolipase C
PMA	forbol-Éster
ROCK	Rho quinase
RuBPY	complexo doador de NO cis-[Ru(bpy) ₂ (py)(NO ₂)](PF ₆)
Ser	resíduo do aminoácido serina
SQ29548	antagonista do receptor TP
Thr	resíduo do aminoácido treonina
TP	receptor tromboxano-prostanóide
TXA ₂	tromboxano A ₂
U46619	agonista do receptor TP, análogo do TXA ₂

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Animais experimentais	27
3.2 Indução da hipertensão renovascular pelo modelo experimental 2R-1C	27
3.3 Montagem das preparações de aorta.....	28
3.4 Estudos de reatividade vascular.....	29
3.5 Avaliação da expressão gênica do receptor TP por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)	32
3.6 Expressão proteica da eNOS total e eNOS fosforidada em aorta de ratos 2R e 2R-1C.....	33
3.7 Expressão proteica das isoformas COX-1 e COX-2.....	34
3.8 Medida de TXA ₂ sérico.....	35
3.9 Produção de TXA ₂ e PGI ₂ ativada pelo agonista de receptores TP	35
3.10 Estudos por citometria de fluxo	36
3.10.1 Extração e cultivo das células do músculo liso vascular	36
3.10.2 Cultivo das células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs)	38
3.10.3 Preparo das células para os estudos de citometria de fluxo	39
3.11 Protocolos específicos.....	39
3.11.1 Efeitos do agonista TP sobre a produção de ERO.....	39
3.11.2 Efeitos do agonista TP sobre a produção de NO	40
3.11 Análise estatística	41
4 RESULTADOS.....	43
5 DISCUSSÃO	76
6 SUMÁRIO DOS RESULTADOS	103
7 CONCLUSÃO	107
8 REFERÊNCIAS.....	108

1 INTRODUÇÃO

As células endoteliais exercem papel fundamental na regulação do tônus vascular. Até o início dos anos 1980, acreditava-se que o endotélio funcionava apenas como barreira de difusão seletiva a determinadas moléculas entre a luz do vaso sanguíneo e o espaço intersticial. Atualmente, diversas outras funções lhe são atribuídas tais como modulação da resposta inflamatória, agregação plaquetária, coagulação sanguínea e controle do tônus vascular. Sobre o tônus vascular, várias substâncias com atividade biológica são sintetizadas e liberadas do endotélio e atuam sobre as células do músculo liso vascular, alterando seu estado contrátil. Estas substâncias são conhecidas como fatores relaxantes (EDRFs, do inglês *endothelium-derived relaxing factors*) ou contráteis derivados do endotélio (EDCFs, do inglês *endothelium-derived contractile factors*) (WONG; VANHOUTTE, 2010).

O tromboxano A_2 (TXA_2) faz parte do grupo de moléculas vasoativas descritas como EDCFs. Ele está envolvido com respostas alérgicas, modulação da imunidade adquirida, aterogênese, angiogênese e agregação plaquetária (NAKAHATA, 2008). O TXA_2 é derivado da via da enzima cicloxigenase (COX), caracterizada por uma série de reações bioquímicas que possuem como principal precursor o ácido araquidônico (AA). O AA é produzido pela fosfolipase A_2 (PLA_2) na membrana plasmática, enzima expressa em praticamente todos os tipos celulares (DENNIS, 1994). O AA é metabolizado pela COX ao endoperoxídeo prostaglandina G_2 (PGG_2) e hidroxiperoxídeo prostaglandina H_2 (PGH_2). A ação de sintases específicas converte o PGH_2 em diversos prostanóides: prostaglandina E_2 (PGE_2), prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), prostaglandina D_2 (PGD_2), prostaciclina (PGI_2) e TXA_2 (VANE et al., 1998). Em especial, o TXA_2 é proveniente do PGH_2 , por ação da tromboxano sintase,

enzima que pertence à superfamília do citocromo P₄₅₀ (ELLINSWORTH et al., 2014). O TXA₂ e a PGI₂ são as prostaglandinas mais relacionadas a efeitos cardiovasculares (BERGSTRÖM et al., 1968; BHAGWAT et al., 1985; SMYTH et al., 2008).

A principal causa da ativação da PLA₂ é o aumento da concentração citosólica de cálcio ([Ca²⁺]_c), embora algumas isoformas da enzima atuem de forma independente do aumento da [Ca²⁺]_c (FÉLÉTOU et al., 2011). Uma vez produzido, o AA é o substrato para a enzima COX, que se apresenta sob as isoformas: COX-1 e COX-2. Apesar de existir um alto grau de homologia entre as duas isoformas, elas possuem diferentes formas de ativação e regulação e podem atuar de maneira independente. A COX-1 é constitutivamente expressa na maioria dos tecidos, enquanto que a COX-2 é induzida por processos inflamatórios (SEIBERT et al., 1994). Em ratos, a COX-2 também é expressa de forma constitutiva em alguns tecidos e órgãos, dentre eles a aorta (CASTILLO-HERNÁNDEZ et al., 2010; HUSAIN et al., 2011; TANG; VANHOUTTE, 2007), cuja expressão proteica é regulada pelo estresse de cisalhamento (TOPPER et al., 1996).

O TXA₂ exerce seus efeitos biológicos pela ativação do receptor tromboxano-prostanóide (TP), que pode também ser ativado pela PGH₂, altas concentrações de outras prostaglandinas (inclusive a PGI₂) e isoprostanos, que são produtos lipídicos derivados de fosfolipídeos de membrana, por meio de reação não enzimática devido à ação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (FÉLÉTOU et al., 2010).

Em humanos (mas não em roedores), são expressas duas variantes do receptor TP (TP_α e TP_β) que diferem apenas por sua porção C-terminal e modulam de forma diferente a biossíntese de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc): enquanto o TP_α aumenta seus níveis, o TP_β diminui, embora ambas as isoformas do

receptor sejam capazes de ativar a fosfolipase C (PLC) (HIRATA et al., 1996). O receptor TP está localizado em vários tecidos e tipos celulares como miocárdio, tecido renal, células endoteliais e músculo liso vascular e está acoplado a diversas isoformas da proteína G, entretanto comunica-se majoritariamente com as proteínas G_q e G_{13} (NAKAHATA, 2008).

O óxido nítrico (NO) figura como um dos mais importantes EDRFs. O NO é uma molécula sem carga que é capaz de difundir-se através dos diversos compartimentos celulares (PALMER et al., 1987). A biossíntese do NO é resultado da oxidação da L-arginina a L-citrulina, catalisada pela enzima NO-sintase (NOS). São descritas três isoformas da NOS (nNOS ou NOS 1; iNOS ou NOS 2 e eNOS ou NOS 3) e uma das formas de ativação das isoformas constitutivas é o aumento transitório da $[Ca^{2+}]_c$, com consequente formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina, necessário para a ativação da NOS (SALTER et al., 1991). A eNOS é uma oxidase dependente de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADPH) e requer tetrahydrobiopterina (BH_4), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina adenina mononucleotídeo (FMN) como cofatores (SALTER et al., 1991). Além do aumento da $[Ca^{2+}]_c$, dois aminoácidos, dentre outros, têm importante papel na regulação fosforilativa da atividade da eNOS: um resíduo de serina (Ser^{1177} em humanos e ratos), no domínio redutase da enzima e um resíduo de treonina (Thr^{495} em humanos e ratos), no domínio de ligação com a calmodulina (FLEMING et al., 2003). Quando o resíduo de Ser^{1177} é fosforilado, há o aumento do fluxo de elétrons do domínio redutase ao domínio oxigenase da enzima e consequente aumento da produção de NO. Por outro lado, a desfosforilação da Thr^{495} está associada ao aumento na $[Ca^{2+}]_c$, ativando a enzima (FLEMING et al., 2001). A fosforilação do resíduo de Thr^{495} pela PKC reduz a atividade da NOS e produção de NO (FLEMING

et al., 2003). O NO produzido pelas células endoteliais se difunde do endotélio para o músculo liso, ativando a guanilil-ciclase solúvel (GCs) pela sua interação com o grupo heme, produzindo guanosina monofosfatada cíclica (GMPc), que por sua vez ativa a proteína quinase dependente do GMPc (PKG). A PKG ativa uma série de eventos intracelulares que culminam na diminuição da sensibilidade da maquinaria celular contrátil dependente da $[Ca^{2+}]_c$, além da própria redução da $[Ca^{2+}]_c$, promovendo o relaxamento muscular (RAPOPORT; MURAD, 1983). Apesar de seu efeito relaxante ser bem descrito, o NO também atua sobre a resposta induzida por agentes vasoconstritores, uma vez que exerce efeito anticontrátil sobre a contração estimulada com fenilefrina (SILVA et al., 2013, 2014). Desta forma, o NO está envolvido na modulação do tônus vascular não apenas no que diz respeito ao processo de dilatação, mas também de contração vascular.

Não são apenas os efeitos dos EDCFs e EDRFs que estão envolvidos na contração ou relaxamento dos vasos sanguíneos. Outros fatores também contribuem para a manutenção do tônus vascular, dentre os quais se destaca o estresse oxidativo. Este é caracterizado pelo desequilíbrio na homeostase com predomínio de ERO circulantes (PARAVICINI; TOUYZ, 2006) como o ânion superóxido (O_2^-), espécie com elevada reatividade e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). No que diz respeito ao controle do tônus vascular, um aporte exacerbado de O_2^- tem papel importante na fisiopatologia da disfunção endotelial. O O_2^- reage rapidamente com o NO (espécie radicalar) e resulta na formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), potente agente oxidante (ISCHIROPOULOS et al., 1995) reduzindo a biodisponibilidade do NO e impedindo seu efeito vasodilatador. A ativação de receptores nas células do músculo liso vascular por agonistas como a angiotensina II (Ang II) e endotelina-1, aumentam a produção de O_2^- e H_2O_2 (LASSÈGUE et al,

2012). Vários sistemas enzimáticos oxidantes estão envolvidos na manutenção do estresse oxidativo. Entretanto, nas células vasculares a maior fonte de ERO é atribuída ao aumento da atividade do complexo enzimático nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato oxidase (NADPH oxidase [Nox]), que converte o O_2 em O_2^- pela oxidação de uma molécula de NADP ou NADPH (GRIENDLING et al., 1994, 2000).

O aumento do estresse oxidativo é responsável por diversos danos celulares, o que está relacionado com o desenvolvimento de vários estados patológicos. Além disso, diversas vias celulares são moduladas pelo ambiente redox intracelular, dentre elas a via das prostaglandinas. Isto ocorre porque as ERO estão associadas com alterações na expressão proteica e atividade de importantes componentes dessa via. De forma dependente de tempo e concentração, o H_2O_2 aumenta a expressão proteica e atividade de diferentes isoformas da PLA_2 e consequente liberação de AA (KORBECKI et al., 2013). Além disso, o H_2O_2 também promove aumento da expressão proteica da COX-2. O estresse oxidativo causa aumento da peroxidação lipídica, cujos produtos também induzem aumento da expressão proteica da COX-2, bem como a biossíntese de prostanóides contráteis (HERNANZ et al., 2014; KORBECKI et al., 2013).

Componentes da via das prostaglandinas também atuam de forma autócrina, modulando os níveis de ERO no ambiente celular. O TXA_2 é estudado como um dos agentes que colaboram para a indução/manutenção do estresse oxidativo, uma vez que induz o aumento da expressão proteica da Nox e promove a geração de ERO (MUZAFFAR et al., 2004). Por outro lado, as ERO também estão envolvidas com a estabilidade e expressão proteica de receptores TP (VALENTIN et al., 2004; WILSON et al., 2009). Assim, parece existir um sistema de retroalimentação positiva

entre tais vias, o que poderia favorecer o quadro de disfunção endotelial, importante característica de grande parte das doenças cardiovasculares. Existe uma clara comunicação entre a via das prostaglandinas e estresse oxidativo, porém essa interação ocorre de maneira complexa e dependente de diversos fatores e poucos estudos abordam seus efeitos vasculares. Estas observações suscitam questionamentos a respeito de como essas vias de sinalização intracelular estão envolvidas na fisiopatologia de algumas doenças, dentre elas a hipertensão arterial.

Tendo em vista os efeitos dos EDCFs, EDRFs e ERO, várias vias de sinalização celular estão envolvidas no controle do estado contrátil final do vaso sanguíneo, alterando o tônus vascular, que está relacionado com a pressão arterial. A hipertensão arterial é caracterizada pelo aumento crônico da pressão arterial e é o principal fator de risco para outras comorbidades cardiovasculares tais como aterosclerose, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, que são responsáveis por cerca de um terço dos óbitos da população mundial (WHO, 2013). O estresse oxidativo está relacionado com a fisiopatologia da hipertensão arterial (MONTEZANO et al., 2015). Além disso, pacientes hipertensos possuem maior expressão proteica e sensibilidade do receptor TP (LIEL et al., 1993) e em modelo animal de hipertensão renovascular, a inibição da enzima tromboxano sintase e o antagonismo do receptor TP são capazes de reduzir a pressão arterial de animais hipertensos (HIMMELSTEIN; KLOTMAN, 1989). O efeito hipertensivo induzido pela Ang II é menor em camundongos *knockouts* para o receptor TP (FRANCOIS et al., 2004). Dessa forma, a ativação do receptor TP apresenta-se como um dos mecanismos envolvidos não apenas com a instalação, mas também com a manutenção da hipertensão arterial. Além do seu efeito sistêmico, a ativação do receptor TP também está envolvida com os mecanismos da resposta contrátil

induzida por diversos agentes vasoativos. Em aorta de animais hipertensos, a resposta contrátil induzida pelo agonista TP (U46619), $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_2 , PGH_2 , PGI_2 , 8-isoprostano (FÉLÉTOU et al., 2011), fenilefrina (MARTÍNEZ-REVELLES et al., 2013) e ionóforo de Ca^{2+} (FEITOZA, 2015), é abolida pelo uso do antagonista TP.

O modelo de hipertensão renovascular 2 Rins-1Clipe (2R-1C) é amplamente estudado em nosso grupo de pesquisa. Descrito por GOLDBLATT (1934), este modelo de hipertensão se caracteriza pela redução da taxa de filtração glomerular renal com consequente ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Nesse modelo, a produção aumentada de Ang II, importante vasoconstritor, eleva a resistência vascular periférica. Além disso, ocorre aumento da atividade do sistema nervoso simpático, além dos níveis de aldosterona e do hormônio antidiurético (ADH), o que contribui para a reabsorção de sódio e retenção de água (MARTINEZ-MALDONADO, 1991). Tais efeitos culminam no aumento da pressão arterial (MARTINEZ-MALDONADO, 1991). Além disso, a Ang II também é um agente ativador e modulador da Nox, promovendo o aumento do estresse oxidativo (GRIENDLING et al., 2000).

Em modelos de hipertensão arterial, a contração induzida pela liberação de EDCFs segue uma sequência de eventos. Ocorre aumento atípico da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ nas células endoteliais e também um provável aumento na mobilização do AA, induzido pela ativação da PLA_2 . Pela ação da COX, ocorre o aumento da produção de ERO e EDCFs, dentre eles o TXA_2 (GLUAIS et al., 2006; TANG et al., 2007; YANG et al., 2002a). Esses últimos difundem-se das células endoteliais até as células do músculo liso vascular e dessa forma podem ativar diretamente o receptor TP (AUCH-SCHWELK et al., 1990; LÜSCHER; VANHOUTTE, 1986; YANG et al., 2003). As ERO produzidas via ativação de receptores TP, ativam a COX presente no músculo

liso vascular, produzindo prostanóides, além de ERO. Esses produtos podem estar envolvidos em um *feed-back* positivo entre as células endoteliais e as células do músculo liso vascular, pela ativação da COX endotelial (AUCH-SCHWELK et al., 1989; HARLAN; CALLAHAN, 1984). Essa relação é descrita com base em experimentos realizados em modelo de hipertensão genética (SHR) ou em cultura de células. Entretanto, pouco ainda se sabe sobre a intercomunicação entre as vias das ERO e COX em modelos de hipertensão renovascular. São necessários avanços nos estudos nesse sentido, uma vez que modelos de hipertensão diferentes apresentam peculiaridades no que diz respeito à função vascular em resposta a agentes distintos (HOLLOWAY; BOHR, 1973).

Em estudos prévios do nosso laboratório, verificamos que no modelo de hipertensão renovascular existe maior produção de ERO de maneira sistêmica e também em aorta de ratos hipertensos (SILVA et al., 2013). Também é descrito aumento nos níveis séricos de isoprostanos, agonistas do receptor TP, no modelo de hipertensão DOCA-Sal (AMARAL et al., 2015) e também 2R-1C (MONTENEGRO et al., 2011). Com base nos resultados da literatura e de resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, a hipótese do presente trabalho é de que em aorta de ratos hipertensos renais (2R-1C), a ativação do receptor TP está envolvida com a produção de EDCFs, em especial o TXA₂, e de ERO. Estes mecanismos estão envolvidos com a disfunção vascular, característica do quadro hipertensivo, contribuindo para a manutenção da hipertensão arterial.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar se o U46619 (agonista seletivo para receptores TP) provoca aumento nos níveis de ERO e geração de prostanóides e como tais mecanismos estão envolvidos com a resposta vasomotora desencadeada pela ativação do receptor TP em aorta de ratos 2R-1C.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os níveis de TXA₂ sérico em ratos 2R e 2R-1C
- Verificar se o estímulo TP promove o aumento dos níveis de ERO em células endoteliais e do músculo liso vascular

Em aorta de ratos 2R e 2R-1C, avaliar:

- A expressão gênica do receptor TP
- O papel do endotélio na contração induzida pelo U46619
- O papel do NO na contração induzida pelo U46619
- O envolvimento de ERO na resposta vasoconstritora ao U46619 e o papel das células endoteliais nesse processo
- Se o estímulo do receptor TP promove a geração de TXA₂
- O envolvimento de prostanóides na resposta vasoconstritora ao U46619 e o papel das células endoteliais nesse processo
- Se existe modulação recíproca entre as ERO e a via dos prostanóides e como essa interação modula a contração induzida pelo U46619

- O papel das ERO produzidas pela ativação TP no relaxamento dependente do endotélio, induzido pela acetilcolina
- O papel dos prostanóides no relaxamento dependente do endotélio, induzido pela acetilcolina, em aortas estimuladas com o agonista TP

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Foram utilizados ratos Wistar (180-200 g) obtidos do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, em temperatura de 22°C, em ciclo claro/escuro de 12h, com ração e água à vontade. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (FMRP-USP, Processo N^o 27/2015-1).

3.2 Indução da hipertensão renovascular pelo modelo experimental 2R-1C

A hipertensão renovascular 2 Rins-1 Clipe (2R-1C), foi induzida pela implantação de clipe de prata (0,2 mm) na artéria renal esquerda, causando obstrução parcial da mesma, o que diminui o fluxo sanguíneo renal, com consequente ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Os animais foram previamente anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg, via intraperitoneal) para realização de laparotomia mediana e exposição do pedículo da artéria renal esquerda, onde foi implantado o clipe. Outro grupo de ratos, *sham*-operados ou dois rins (2R), foi submetido ao mesmo estresse cirúrgico, porém sem a implantação do clipe de prata, caracterizando o controle normotenso. Após as cirurgias, os animais de ambos grupos experimentais foram tratados com dose única de antibiótico oxitetraciclina (200 mg/kg), por via intramuscular. Após seis semanas, medimos a pressão caudal por pletismografia de cauda. Os ratos foram considerados

hipertensos (2R-1C) quando a pressão arterial sistólica foi maior ou igual a 160 mmHg.

Para realização dos protocolos experimentais, os ratos foram anestesiados com isoflurano por via inalatória e em seguida, foram eutanasiados por decapitação.

3.3 Montagem das preparações de aorta

Utilizamos anéis de aorta torácica isolada dos ratos hipertensos renais 2R-1C e normotensos 2R como modelo experimental para registro da tensão isométrica. A aorta foi isolada, dissecada de tecidos conjuntivos adjacentes e então cortada em anéis de 4 mm de comprimento. A monocamada de endotélio vascular foi removida mecanicamente ou não, dependendo do protocolo realizado.

Os anéis de aorta foram montados em banho para órgãos isolados, entre dois ganchos de metal inseridos no lúmen da artéria para produzir tensão. Um dos ganchos foi conectado a um suporte fixo ajustável e o outro a um transdutor de registro de força. O sistema foi montado em câmara para órgão isolado contendo 10 ml de solução fisiológica de Krebs modificado com a seguinte composição (em mmol/L): NaCl 130,0; KCl 4,7; KH_2PO_4 1,2; CaCl_2 1,6; MgSO_4 1,2; NaHCO_3 14,9; glicose 5,5, em pH 7,4, sob aeração constante com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2), a 37°C. As preparações permaneceram em repouso por 60 minutos, sob tensão basal constante de 1,5 g para estabilização e durante esse período foram lavadas a cada 15 minutos com solução de Krebs. As artérias foram estimuladas com fenilefrina (30 $\mu\text{mol/L}$) e quando a tensão isométrica registrada por meio de transdutor conectado ao sistema de registro foi reproduzida e estável, os anéis de aorta foram considerados viáveis para realização dos protocolos experimentais. A

efetividade da remoção ou permanência do endotélio foi demonstrada pela ausência ou presença, respectivamente, de relaxamento à acetilcolina ($1 \mu\text{mol/L}$) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina ($30 \mu\text{mol/L}$). Após os testes de viabilidade do tecido e presença do endotélio, as preparações foram lavadas e quando a tensão registrada voltou aos níveis basais, foram submetidas aos protocolos descritos a seguir.

3.4 Estudos de reatividade vascular

Os seguintes protocolos experimentais foram realizados em aortas de ratos 2R e 2R-1C.

Protocolo 1: Avaliação do papel do endotélio na resposta vasoconstritora induzida pela ativação do receptor TP

Objetivo: verificar se as células endoteliais modulam a contração de aortas induzida pela ativação do receptor TP.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para o agonista seletivo para receptores TP (U46619), nas concentrações de $0,01 \text{ nmol/L}$ a $3 \mu\text{mol/L}$, em anéis de aorta com (E+) ou sem endotélio (E-).

Protocolo 2: Avaliação do envolvimento da enzima óxido nítrico sintase (NOS) na vasoconstrição induzida pela ativação do receptor TP

Objetivo: verificar se a atividade da NOS está envolvida na contração de aortas ativadas com o agonista de receptores TP.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para o agonista seletivo para receptores TP (U46619), nas concentrações de 0,01 nmol/L a 3 µmol/L, em aortas com endotélio, incubadas previamente por 30 minutos com o inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), N^G-nitro-L-arginina metil Ester (L-NAME, 100 µmol/L).

Protocolo 3: Avaliação do envolvimento das ERO na vasoconstrição induzida pelo agonista U46619

Objetivo: verificar se o efeito contrátil desencadeado pela ativação do receptor TP com o agonista U46619, é modulado por ERO e qual o papel do endotélio nesse processo.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para o agonista seletivo para receptores TP (U46619), nas concentrações de 0,01 nmol/L a 3 µmol/L, em aortas com ou sem endotélio, incubadas previamente por 30 minutos com Tiron (sequestrador de O₂⁻, 100 µmol/L) ou Catalase (enzima que degrada H₂O₂ em O₂ e água, 300 U/mL).

Protocolo 4: Avaliação do envolvimento da enzima COX na vasoconstrição induzida pela ativação do receptor TP

Objetivo: verificar se a atividade da COX está envolvida na contração desencadeada pela ativação do receptor TP e qual o papel do endotélio nesse processo.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para o agonista seletivo para receptores TP (U46619), nas concentrações de 0,01 nmol/L a 3 µmol/L,

em aortas com ou sem endotélio, incubadas previamente por 30 minutos com o inibidor não seletivo da COX, Ibuprofeno (10 $\mu\text{mol/L}$).

De acordo com os resultados obtidos para cada grupo experimental, protocolos específicos foram realizados para o grupos 2R ou 2R-1C:

Protocolo 5: Avaliação do envolvimento da tromboxano sintase na contração induzida pelo agonista TP em aorta de ratos 2R.

Objetivo: verificar se a atividade da enzima tromboxano sintase está envolvida na contração desencadeada pela ativação do receptor TP em aortas de ratos normotensos, e qual seria o papel do endotélio nesse processo.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativa para o agonista seletivo para receptores TP (U46619), nas concentrações de 0,01 nmol/L a 3 $\mu\text{mol/L}$, em aortas de ratos normotensos 2R, com ou sem endotélio, incubadas por 30 minutos com inibidor da enzima tromboxano sintase, Furegrelato (10 $\mu\text{mol/L}$).

Protocolo 6: Avaliação do *cross-talk* entre o NO, ERO e via das prostaglandinas na vasoconstrição induzida pelo agonista TP em aorta de ratos 2R.

Objetivo: verificar a possível modulação recíproca entre as ERO e a via das prostaglandinas sobre a contração induzida por U46619 em aorta de ratos normotensos.

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para o agonista seletivo para receptores TP (U46619), nas concentrações de 0,01 nmol/L a 3 $\mu\text{mol/L}$, em aortas de ratos 2R com endotélio, incubadas por 30 minutos com a combinação de Ibuprofeno (10 $\mu\text{mol/L}$) e L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$) ou Ibuprofeno (10 $\mu\text{mol/L}$) e Tiron (100 $\mu\text{mol/L}$).

Protocolo 7: Avaliação do *cross-talk* entre o NO, ERO e via das prostaglandinas na vasoconstrição induzida pelo agonista TP em aorta de ratos 2R-1C.

Objetivo: verificar a possível modulação recíproca entre as ERO e a via das prostaglandinas sobre a contração ao U46619 em aorta de ratos hipertensos renais.

Foram realizadas curvas concentração-efeito para o agonista TP (U46619, nas concentrações de 0,01 nmol/L a 3 μ mol/L) em aortas de ratos 2R-1C, com endotélio, incubadas por 30 minutos com a combinação de Tiron (100 μ mol/L) e L-NAME (100 μ mol/L) ou Tiron (100 μ mol/L) e Ibuprofeno (10 μ mol/L).

3.5 Avaliação da expressão gênica do receptor TP por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

Após eutanásia dos animais, os anéis de aorta foram isolados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. As amostras permaneceram armazenadas a -80 °C até o momento das análises. O RNA total de aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C foi extraído do tecido utilizando o kit *SV total RNA isolation system* (Promega), seguindo as instruções do fabricante. A concentração e pureza do RNA resultantes foram determinadas pela leitura espectrofotométrica em 260 e 280 nmol/L. O RNA total foi transcrito em cDNA utilizando o kit *high capacity cDNA reverse trasncription* (Applied Biosystems). A qRT-PCR foi realizada com ensaios de expressão gênica Taqman (Applied Biosystems) para TP (Rn00690601_m1) e GAPDH (Rn01775763_g1). A reação foi processada no equipamento *StepOnePlus* (Applied Biosystems) utilizando-se o kit *Taqman fast advanced master mix*. A análise dos resultados foi feita pelo método de $\Delta\Delta C_t$ e a expressão de cada gene foi representada pela medida relativa ao grupo de aortas de ratos 2R.

3.6 Expressão proteica da eNOS total e eNOS fosforidada em aorta de ratos 2R e 2R-1C

Após a eutanásia dos animais, as aortas dos ratos 2R e 2R-1C foram isoladas e montadas em banho para órgãos isolados. Assim como nos estudos de reatividade vascular, as preparações foram mantidas por 60 minutos para estabilização, sob tensão de 1,5 g. Após esse período, as aortas foram estimuladas com fenilefrina (30 $\mu\text{mol/L}$) e sob contração mantida, a presença do endotélio foi verificada pelo relaxamento à acetilcolina (1 $\mu\text{mol/L}$). Após sucessivas lavagens e volta da tensão aos níveis basais, um grupo de aortas foi estimulado com o agonista TP, U46619 (10 nmol/L). Quando as contrações atingiram o efeito máximo (indicado pelo platô de tensão observado no registro de tensão isométrica), as preparações foram retiradas da câmara para órgão isolado e congelados em nitrogênio líquido. Outro grupo de aorta foi congelado, sem estímulo do receptor TP, porém submetidos aos mesmos testes de viabilidade e presença do endotélio, caracterizando o grupo controle. As amostras permaneceram sob refrigeração a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises.

Para avaliação da fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ ou Thr⁴⁹⁵ da eNOS, cada amostra foi homogeneizada em Tampão RIPA Modificado (Tris-HCl 65,2 mmol/L, NaCl 154 mmol/L, NP-40 1%; Deoxicolato de sódio 0,25%; EDTA 0,8 mmol/L; PMSF 1 mmol/L, Ortovanadato de Sódio 10 mmol/L, Fluoreto de Sódio 100 mmol/L, Pirofosfato de Sódio 10 mmol/L e inibidor de protease) para evitar proteólise, mantendo dessa forma a fosforilação das proteínas. Os homogenatos foram centrifugados a 10.621 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos para remover os resíduos teciduais. A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo Método de Bradford (1976). Vinte microgramas de proteínas foram separados por eletroforese em placa

de poliacrilamida com sulfato dodecil de sódio (8% SDS-PAGE) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 5% por 60 minutos em temperatura ambiente. A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpo primários de coelho anti-eNOS (1: 2500, *BD*, 610296) por 12 horas a 4°C. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-camundongo (1:2000, *cell signaling*, 7076S). As bandas das proteínas foram visualizadas por quimioluminescência (*ECL plus*, *GE Healthcare*) e mensuradas por densitometria. A expressão proteica da eNOS total foi normalizada pela β -actina de cada amostra.

Para análise da expressão proteica da eNOS fosforilada nos resíduos de Ser¹¹⁷⁷ ou Thr⁴⁹⁵, as amostras foram incubadas com anticorpo primário de coelho contra Ser¹¹⁷⁷ (1:1.000, *Millipore*, 07-428) ou de camundongo contra Thr⁴⁹⁵ (1:1000, *BD*, 612707) fosforiladas na eNOS (1:1.000, *Millipore*) por 12 horas a 4 °C. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário HRP-conjugado anti-coelho (1:1000, *Santa Cruz*, sc-2357) ou anti-camundongo (1:1000, *Cell Signalling*, 7076S) por 60 minutos em temperatura ambiente. As bandas das proteínas foram visualizadas por quimioluminescência (*ECL plus*, *GE Healthcare*) e mensuradas por densitometria. A expressão proteica da eNOS fosforilada (fosfo-eNOS) foi normalizada pela β -actina de cada amostra.

3.7 Expressão proteica das isoformas COX-1 e COX-2

Para avaliarmos a expressão proteica das isoformas da COX, as amostras de aortas foram imediatamente isoladas de ratos 2R e 2R-1C após eutanásia e congeladas em nitrogênio líquido. A amostras foram preparadas para análise da

expressão proteica conforme descrito para eNOS. Foram utilizados anticorpos primários de coelho anti-COX-1 (1:1.000, *Abcam*, ab109025) e de camundongo anti-COX-2 (1:500, *BD*, 610203) e a seguir, anticorpos secundários anti-coelho (1:1000, *Santa Cruz*, sc-2357) ou anti-camundongo (1:1000, *Cell Signalling*, 7076S), por 60 minutos a 4°C. As bandas das proteínas foram visualizadas por quimioluminescência (*ECL plus*, *GEHealthcare*) e mensuradas por densitometria. A expressão proteica das isoformas COX-1 e COX-2 foi normalizada pela β -actina de cada amostra.

3.8 Medida de TXA₂ sérico

Sob anestesia, o sangue dos animais foi coletado da artéria abdominal em tubos contendo o anticoagulante, citrato de sódio. As amostras de sangue foram centrifugadas a 869 g, por 5 minutos, a 25 °C. A fração plasmática foi retirada e congelada em nitrogênio líquido. As amostras de plasma foram armazenadas a -80°C até o momento das análises. O TXB₂ (metabólito estável do TXA₂) foi mensurado conforme instruções do fabricante do *Kit* de Elisa Imuno-Ensaio da *Cayman Chemical* (*Ann Arbor, MI, U.S.A.*). Os resultados foram expressos em pg/mL de cada amostra.

3.9 Produção de TXA₂ e PGI₂ ativada pelo agonista de receptores TP

Aortas de ratos 2R e 2R-1C, com ou sem endotélio, foram colocadas em banho para órgãos isolados e submetidas aos testes de viabilidade do endotélio com acetilcolina. As preparações foram estimuladas ou não (grupo controle) com U46619 (10 μ mol/L). Após estabilização da contração induzida pelo agonista TP, as

amostras foram rapidamente retiradas do banho para órgãos isolados e congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até o momento das análises. As amostras de aortas foram maceradas e purificadas para medida dos prostanóides: Tromboxano B₂ (metabólito estável do Tromboxano A₂) e 6-Keto-prostaglandina F_{1α} (metabólito estável da Prostaciclina) conforme instruções do fabricante do *Kit* de Elisa Imuno-Ensaio da *Cayman Chemical* (Ann Arbor, MI- U.S.A.). O resultado foi expresso pela média (em pg/mL) ± EPM das amostras analisadas, corrigida pela proteína total de cada amostra.

3.10 Estudos por citometria de fluxo

3.10.1 Extração e cultivo das células do músculo liso vascular

As células do músculo liso vascular (CMLV) da aorta de pelo menos 5 ratos (180 g) foram removidas pela técnica de explante. Para isso, os animais foram anestesiados com isoflurano e eutanasiados por decapitação. Realizamos a assepsia da região torácica com álcool 70% e álcool iodado. A aorta torácica de cada rato foi removida e acondicionada em tubo cônico contendo 5 ml do meio HAM F12 (*Vitrocell*) gelado. As amostras foram levadas para o fluxo laminar, onde o tecido adiposo foi removido com auxílio de pinça cirúrgica. Os vasos foram abertos longitudinalmente. Removemos a camada de células endoteliais, por raspagem com auxílio de uma haste plástica (“rodinho”) estéril. Os vasos foram cortados em segmentos de 5 mm e colocados em placa de seis poços, com a face luminal voltada para o fundo do poço. Após o tecido aderir no fundo da placa, pipetamos 10 µL de meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (*Vitrocell*)

suplementado com 45% de soro bovino fetal e 1% de penicilina/estreptomicina (*GIBCO*, 15140-122). As placas foram colocadas em incubadora a 5% de CO₂, a 37 °C. Após 48 horas, adicionamos 500 µL de meio DMEN 45% FBS e 1% penicilina/estreptomicina. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias até o décimo dia. Após 10 dias do início da cultura, verificamos a presença de células aderidas no fundo do poço de cultura na região ao redor dos explantes. Os explantes foram retirados e as células lavadas com PBS e removidas da placa de cultura com solução de tripsina/EDTA (*Vitrocell*). As células foram centrifugadas por 5 minutos a 300 *g* e o sedimento celular foi ressuspense em meio de cultura e passado para garrafas de cultura de 75 cm² com 10 mL de meio de cultura (P1). Após verificarmos confluência das células (fase em que as células ocupam de 70 a 90% da garrafa), parte destas células foi submetida ao protocolo de identificação e confirmação de que são realmente CMLV (descrito abaixo) e a outra parte foi repicada em garrafa de 75 cm² (P2) contendo 10 mL de meio de crescimento (DMEN 10% FBS e 1% de penicilina/estreptomicina) e assim sucessivamente até a quinta passagem (P5), em que foram realizados os experimentos de citometria de fluxo.

Para identificação as células em cultura foram submetidas à centrifugação por 5 min a 300 *g* e o sedimento celular foi ressuspense em meio de cultura. O número de células foi contado em câmara de *Neubauer* e as mesmas distribuídas em tubo de citometria em uma densidade de 10⁶ células por tubo. Adicionamos 100 µL de uma solução fixadora (formol 2%) por 10 min em temperatura ambiente e 100 µL de uma solução permeabilizante (Tween 20%) por 15 min em temperatura ambiente. Esses tubos foram lavados por três vezes com 2 mL de PBS e centrifugados por 5 min a 300 *g*. O sobrenadante foi descartado e adicionamos 10 µg/mL do anticorpo *Anti-alpha smooth muscle Actin antibody* (FITC), (10 µg/mL, *abcam*, ab8211), por 40

min, no gelo e na ausência de luz. Lavamos tres vezes com PBS e realizamos a leitura da marcação celular por citometria de fluxo (*FACs Calibur*, *BD programa FACs DIVA*). A α -actina de músculo liso é um microfilamento que compõe todas as células musculares lisas de mamíferos. Possui importante função contrátil e é considerada um marcador do fenótipo miofibroblástico. Nossas culturas apresentaram marcação de no mínimo 90%. Portanto, obtivemos sucesso na extração e cultivo dessas células.

3.10.2 Cultivo das células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs)

Utilizamos células endoteliais de veia de cordão umbilical humano (HUVECs) da *American Type Culture Collection* (EA. Hy926, ATCC® CLR-2922™). O cultivo das células foi iniciado após descongelamento rápido de uma alíquota contendo 5×10^5 células armazenada em nitrogênio líquido, em banho maria a 37°C. Após o descongelamento, as células foram transferidas para um tubo com meio de crescimento DMEM) com fenol *red* (*Vitrocell*), suplementado com HEPES (25 mmol/L, *J.T.Baker*), bicarbonato de sódio (45 mmol/L, *Synth*), penicilina/estreptomicina (1%, GIBCO), fungizona (0,1%, *GIBCO*) e soro bovino fetal - SBF (10%, GIBCO). Esse tubo foi submetido à centrifugação a 174 g, durante 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o sedimento celular foi lavado duas vezes com PBS (solução salina em tampão fosfato) estéril para retirar todo o dimetilsulfóxido (DMSO), utilizado na etapa de congelamento. A seguir, o material foi centrifugado nas mesmas condições acima citadas e ressuspenso em 1 mL de meio de crescimento. Essa suspensão de células foi distribuída em garrafas plásticas de cultura (75 cm²) contendo meio de crescimento, que foram colocadas em incubadora

de CO₂ (5%), a 37°C. O meio de cultivo foi trocado de dois em dois dias, até as culturas atingirem confluência de 90 a 100%.

3.10.3 Preparo das células para os estudos de citometria de fluxo

Após atingirem confluência, as células foram lavadas com PBS e removidas dos frascos de cultura com solução tripsina/EDTA (*Vitrocell*), deixando a solução agir por 5 min na incubadora, a 37°C. Neutralizou-se a ação da tripsina pela adição de 5 mL de meio de crescimento em cada garrafa. A solução foi aspirada e colocada em tubo cônico. As células foram centrifugadas por 5 min a 174 g e o sedimento celular foi ressuspenso em PBS suplementado com SBF a 10%. O número de células foi contado em câmara de Neubauer e as células foram distribuídas em tubo de citometria de fluxo na densidade de $0,5 \times 10^6$ células por tubo.

3.11 Protocolos específicos

3.11.1 Efeitos do agonista TP sobre a produção de ERO

Nos tubos contendo cada população específica de células do músculo liso vascular ou células endoteliais (HUVECs), foram incubados com 10 µmol/L de Dihidroetidina (DHE – excitada com laser azul em 488 nm, com emissão em 585/42, utilizando detector C). A sonda DHE permeia as membranas celulares, onde é oxidada a 2-hidroxietídio (2-OHET⁺) por O₂⁻, ou a etídio (Et⁺) por outras ERO, que por sua vez, são intercaladas ao DNA celular sob a forma de brometo de etídio, responsável pela emissão de fluorescência vermelha (De Iuliis et al., 2006). A leitura

dessa amostra foi realizada para obtenção dos valores basais de fluorescência emitidos pelo DHE no interior das células endoteliais.

Um tubo com a suspensão de células foi então incubado por 30 min somente com a sonda fluorescente, caracterizando o grupo controle. Outros tubos contendo as células foram estimulados com o agonista TP (U46619 nas concentrações de 0,1 nmol/L ou 10 µmol/L), correspondentes à EC₅₀ e EC₁₀₀, respectivamente, por 30 min. Os experimentos foram realizados na ausência (controle) ou presença de SQ29548 (antagonista TP, 10 µmol/L), Tiron (100 µmol/L), PEG-Catalase (3.000 U/mL), ou Ibuprofeno (10 µmol/L), para avaliarmos se parte das ERO produzidas pela ativação do receptor TP é produto da atividade da COX. O antagonista, agentes antioxidantes ou inibidor da COX foram adicionados 10 min após a sonda. Em seguida, foram realizadas aquisições de 10.000 eventos para cada protocolo realizado. Para essas análises, utilizamos como controle positivo o forbol-éster (PMA, 10 µmol/L), importante agente pró-oxidante (GRIENDLING et al., 2000). A mediana da intensidade de fluorescência foi medida em todas as amostras usando o *software* DIVA.

3.11.2 Efeitos do agonista TP sobre a produção de NO

Os tubos contendo as HUVECs foram incubados com 0,5 µmol/L da sonda fluorescente 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2/DA, excitada com laser azul em 488 nm, com emissão em 530/30, utilizando detector D). Após ter sua porção diacetato clivada por esterases da membrana plasmática, a sonda reage com o produto de oxidação do NO, o trióxido de dinitrogênio (N₂O₃), produzindo o composto fluorescente estável DAF-2T (NAKATSUBO et al., 1998). A leitura dessa amostra foi

realizada para obtenção dos valores basais de fluorescência emitidos pelo DAF-2/DA.

Um tubo com a suspensão de células foi então incubado por 30 min, somente com a sonda fluorescente, caracterizando o grupo controle. Outros tubos contendo as células foram estimulados com o agonista TP (U46619: 0,1 nmol/L ou 10 μ mol/L), correspondentes à EC₅₀ e EC₁₀₀, respectivamente, por 30 min. Em seguida, foram realizadas aquisições de 10.000 eventos para cada protocolo realizado. Para essas análises, utilizamos o ionóforo de cálcio (A23187, 1 μ mol/L) e o doador de NO (RuBPY, 10 μ mol/L) como controles positivos. O doador de NO foi utilizado como controle positivo para a sonda fluorescente. A mediana da intensidade de fluorescência foi medida em todas as amostras usando o *software* DIVA.

3.11 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média dos valores obtidos $\pm$ o erro padrão da média (EPM) em preparações de aorta obtidas de diferentes animais. Em estudos de reatividade vascular, a EC₅₀ (concentração que produz 50% da resposta máxima), o efeito máximo (Emax) e o número de *Hill* foram calculados pelo método de regressão não-linear dos mínimos quadrados (MEDDINGS et al., 1989) pelo Programa *GraphPad Prism* (*graphPad software*, versão 5,01, 2007). Para a análise da potência do agonista, foi utilizado o valor de pD₂ (-log EC₅₀). O estudo foi realizado em preparações independentes, utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do pós-teste de Newman Keuls (para comparações múltiplas) ou Dunnet (quando comparações foram feitas apenas com o controle); ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni (para dois fatores envolvidos) ou teste

t de Student (para comparações entre dois grupos e também para análises dois a dois em análises de ANOVA de duas vias, quando houve interação entre os fatores). No caso do fator “interação” contribuir com a diferença observada na ANOVA de duas vias, foi utilizada ANOVA de uma via seguida do teste de Newman Keuls para evidenciar a diferença entre os grupos. Valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

Investigamos o possível aumento dos níveis séricos do TXA_2 nos ratos hipertensos renais (2R-1C). Como observado na Figura 1, não houve diferença nos níveis plasmáticos basais do tromboxano B_2 (metabólito estável do TXA_2) entre os ratos normotensos (2R) e 2R-1C.

Fig. 1. Medida do tromboxano B_2 (metabólito estável do tromboxano A_2) do plasma de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C). Os resultados estão expressos em pg/mg de proteínas de cada amostra. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM, $n=4$.

Verificamos que houve menor expressão gênica do receptor TP em aortas de ratos 2R-1C do que em aortas de ratos 2R (Figura 2). A análise foi feita pela medida do mRNA codificante para o receptor TP.

Fig. 2. Expressão gênica do receptor TP em aorta de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C). Os resultados estão expressos em nível de expressão em relação ao grupo 2R. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM, $n=4$. *vs 2R, $p<0,05$.

Investigamos as possíveis diferenças entre a contração de aortas de ratos hipertensos e normotensos, induzida pela ativação do receptor TP pelo agonista seletivo para esse receptor (U46619) em preparações com ou sem endotélio. Não houve diferença dos valores de E_{max} e pD_2 para a contração induzida pelo U46619 entre 2R e 2R-1C (Figura 3). Entretanto, verificamos que existe diferença no perfil das curvas concentração-efeito para o U46619 entre os grupos 2R e 2R-1C, pela análise do coeficiente de *Hill* (Tabela 1).

Fig. 3. Resposta contrátil induzida pelo agonista TP (U46619) em aortas com endotélio (A) e sem endotélio (B) isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C). Os resultados estão expressos em gramas de tensão como média $\pm$ EPM.

Tabela 1. Coeficiente de *Hill* calculado pelas curvas concentração-efeito para o U46619 em aorta isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C), com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-).

	2R	2R-1C
E+	2.64 ± 0.49 (n=5)	1.07 ± 0.12* (n=6)
E-	2.54 ± 0.54 (n=6)	0.58 ± 0.06 [#] (n=5)

Os valores estão expressos como média ± EPM. * Comparação entre 2R-1C e 2R E+. [#] Comparação entre 2R-1C e 2R E-, $p < 0,05$.

O agonista TP (U46619) induziu contração de forma dependente da concentração em aortas E+ e E- de ratos 2R e 2R-1C. Como mostra a Figura 4 e a Tabela 2, a remoção do endotélio não modificou o E_{max} induzido pelo U46619 em aortas de ratos 2R e 2R-1C. Entretanto, como mostram os valores de pD_2 (Tabela 2), a remoção do endotélio aumentou a potência do U46619 em aortas de ratos 2R e também de ratos 2R-1C.

Fig. 4. Resposta contrátil induzida pelo agonista TP (U46619) em aortas isoladas de ratos normotensos (2R) (A) e hipertensos renais (2R-1C) (B), com endotélio (E+) e sem endotélio (E-). Os resultados estão expressos em gramas de tensão como média $\pm$ EPM.

Tabela 2. Efeito máximo (Emax) e pD_2 calculados pelas curvas concentração-efeito para o U46619 em aorta isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C), com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-).

	2R		2R-1C	
	E+ (n=5)	E- (n=6)	E+ (n=6)	E- (n=5)
Emax (g)	3,1 ± 0,2	3,4 ± 0,5	2,6 ± 0,2	3,0 ± 0,3
pD_2	8,06 ± 0,10	8,61 ± 0,12 [*]	8,13 ± 0,08	8,69 ± 0,12 [#]

Os valores estão expressos como média ± EPM. * Comparação entre 2R E- e 2R E+. # Comparação entre 2R-1C E- e 2R-1C E+, $p < 0,05$.

A remoção do endotélio promoveu aumento da potência do U46619 em induzir contração em aortas de ratos 2R e 2R-1C (Tabela 2), sugerindo que fatores endoteliais exercem um efeito anticontrátil nessas preparações. Visto que o NO é o principal EDRF em aorta, investigamos se o NO poderia ter um efeito anticontrátil sobre a contração induzida pela ativação do receptor TP. Primeiramente, investigamos se o estímulo do receptor TP estimula a produção de NO. Verificamos que a ativação do receptor TP foi capaz de aumentar a concentração citosólica de NO ([NO]c) em células endoteliais. Como mostram os resultados na Figura 5, o estímulo das células endoteliais (HUVECs) com o U46619 por 30 min aumentou a intensidade de fluorescência para a sonda DAF, indicando aumento da [NO]c. Este aumento foi ativado pelo agonista U46619, nas concentrações 10 nmol/L e 10 μ mol/L (concentrações correspondentes às EC₅₀ e EC₁₀₀, respectivamente), entretanto não foi dependente da concentração. O estímulo das HUVECs com o ionóforo de cálcio (A23187, 10 μ mol/L) ou com o doador de NO (RuBPY, 10 μ mol/L) também promoveram aumento da [NO]c em relação ao Controle (sem estímulo).

Fig. 5. Intensidade de fluorescência da sonda DAF-2DA, sensível aos níveis de NO, em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs), sem estímulo (Controle), ou estimuladas com U46619 (10 nmol/L ou 10 μ mol/L), A23187 (10 μ mol/L) ou RuBPY (10 μ mol/L). A23187 e RuBPY foram utilizados como controles positivos. Os resultados estão expressos como média das medianas da intensidade de fluorescência (MIF) de experimentos realizados em triplicata $\pm$ EPM, n=5. *vs Controle, $p < 0,05$.

Uma vez que o estímulo do U46619 foi capaz de aumentar a [NO]_c, investigamos se a ativação do receptor TP modula a atividade da enzima eNOS, responsável pela produção do NO endotelial, por mecanismos fosforilativos nas aorta dos animais normotensos e hipertensos. Como observado nas figuras 6 e 7, o estímulo de aortas de ratos 2R ou 2R-1C não alterou a expressão proteica da eNOS fosforilada nos resíduos de Ser¹¹⁷⁷ ou Thr⁴⁹⁵, sítios regulatórios da atividade da eNOS.

Fig. 6. Expressão proteica da NO-Sintase endotelial (eNOS) total (A) e eNOS fosforilada (fosfo-eNOS) nos resíduos de Ser¹¹⁷⁷ (B) ou Thr⁴⁹⁵ (C) aorta com endotélio de ratos normotensos (2R) com ou sem (controle) estímulo com o agonista TP, U46619 (10 nmol/L). Os resultados estão normalizados pela expressão proteica da β-actina. Os resultados estão expressos como média ± EPM, n=5.

Fig. 7. Expressão proteica da NO-Sintase endotelial (eNOS) total (A) e eNOS fosforilada (fosfo-eNOS) nos resíduos de Ser¹¹⁷⁷ (B) ou Thr⁴⁹⁵ (C) aorta com endotélio de ratos hipertensos renais (2R-1C) com ou sem (controle) estímulo com o agonista TP, U46619 (10 nmol/L). Os resultados estão normalizados pela expressão proteica da β-actina. Os resultados estão expressos como média ± EPM, n=5.

Uma vez que a ativação de receptores TP foi capaz de aumentar a da [NO]_c em células endoteliais, verificamos o efeito do inibidor não seletivo da NO-sintase, L-NAME (100 μ mol/L) sobre a contração induzida pelo U46619 em aorta de ratos normotensos e hipertensos renais. Observamos que houve diferença na contração nas aortas de ratos 2R, quando pré-incubadas com inibidor da NO-sintase, verificada pela alteração do coeficiente de *Hill*, calculado para a curva concentração-efeito ao U46619 na presença do L-NAME (Tabela 3). Não houve alterações nos valores de E_{max} ou pD₂ da resposta contrátil induzida pelo agonista TP em aorta de ratos 2R e 2R-1C (Figura 8) na presença do inibidor.

Fig. 8. Resposta contrátil induzida pelo agonista TP (U46619) em aortas isoladas de ratos normotensos (2R) (A) e hipertensos renais (2R-1C) (B), na ausência (controle) ou presença de L-NAME (100 μ mol/L). Os resultados estão expressos em gramas de tensão como média $\pm$ EPM.

Tabela 3. Coeficiente de *Hill* calculado pelas curvas concentração-efeito cumulativas para o U46619 em aortas com endotélio, isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C), pré-incubadas ou não (controle) com o inibidor não seletivo da NO-Sintase, L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$).

	2R	2R-1C
Controle	2.64 $\pm$ 0.49 (n=5)	1.07 $\pm$ 0.12 (n=6)
L-NAME	1,39 $\pm$ 0.08 (n=6)*	1,44 $\pm$ 0.30 (n=6)

Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. * Comparação entre 2R (L-NAME) e 2R (controle), $p < 0,05$.

O agonista de receptores TP (U46619), nas concentrações de 10 nmol/L e 100 µmol/L, promoveu aumento das concentrações de ERO em células endoteliais (HUVECs) e do músculo liso vascular (CMLVs), de modo não dependente da concentração. Este efeito foi revertido na presença do antagonista TP, SQ29548 (10 µmol/L) (Figura 9). Entretanto, nas células do músculo liso vascular, o SQ29548 não inibiu o efeito do U46619 (10 µmol/L) sobre o aumento das concentrações de ERO. O PMA também foi capaz de aumentar o níveis de ERO em HUVECs e CMLVs. A pré-incubação das células com o sequestrador de ânion superóxido, Tiron (100 µmol/L), PEG-Catalase (3.000 U/mL) ou inibidor não seletivo da COX, Ibuprofeno (10 µmol/L), reduziu os níveis de ERO nos dois tipos celulares, indicando que parte das ERO produzidas via ativação do receptor TP é proveniente do aumento da atividade da COX (Figura 10).

Fig. 9. Intensidade de fluorescência da sonda DHE, sensível a ERO, em células endoteliais de veia umbilical humana (*HUVECs*) (A) ou células do músculo liso vascular isoladas de ratos (B) sem estímulo (controle), ou estimuladas com U46619 (10 nmol/L ou 10 μmol/L), na ausência ou presença do antagonista TP, SQ29548 (SQ, 10 μmol/L). O ativador não seletivo da proteína quinase-C, forbol éster (PMA, 10 mmol/L), foi utilizado como controle positivo. Os resultados estão expressos como média das medianas da intensidade de fluorescência (MIF) de experimentos realizados em triplicata ± EPM, n=5. *vs respectivo controle, $p < 0,05$.

Fig. 10. Intensidade de fluorescência da sonda DHE, sensível aos níveis de ERO, em células endoteliais de veias umbilicais humanas (*HUVECs*) (A) ou células do músculo liso vascular isoladas de ratos (B) sem estímulo (controle), ou estimuladas com U46619 (10 nmol/L), na ausência ou presença de Tiron (100 μ mol/L), PEG-Catalase (PEG, 3.000 U/mL) ou Ibuprofeno (IBU 10 μ mol/L). O ativador não seletivo da proteína quinase-C, forbol éster (PMA, 10 mmol/L), foi utilizado como controle positivo. Os resultados estão expressos como média das medianas da intensidade de fluorescência (MIF) de experimentos realizados em triplicata $\pm$ EPM, n=5. *vs respectivo controle, #vs respectivo U46619, $p < 0,05$.

Uma vez que a ativação do receptor TP foi capaz de aumentar as concentrações de ERO em células endoteliais e do músculo do liso vascular, verificamos os efeitos desses agentes e fatores endoteliais sobre a contração induzida pelo U46619 em aortas de ratos 2R-1C e 2R. Assim, foram realizadas curvas concentração-efeito para o U46619 em preparações E+ ou E-, isoladas de ratos 2R ou 2R-1C e pré-incubadas com Tiron (100 $\mu\text{mol/L}$) ou Catalase (300 U/mL).

Como mostra a Figura 11, a incubação das aortas E+ com Tiron ou Catalase por 30 min, não modificou os valores de E_{max} e pD_2 do U46619. Porém, em preparações E-, a Catalase reduziu o E_{max} da contração desencadeada pela ativação do receptor TP (Figura 11B). Por outro lado, o Tiron não modificou os valores de E_{max} (Controle: $3,4 \pm 0,0$ g, $n=6$; Tiron: $3,7 \pm 0,2$ g, $n=5$; Catalase: $2,7 \pm 0,1$ g, $n=6$; $p=0,001$) e de pD_2 (controle: $8,61 \pm 0,12$, $n=6$; Tiron: $8,97 \pm 0,10$, $n=5$; Catalase: $8,10 \pm 0,10$, $n=5$).

Em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R-1C, o Tiron promoveu aumento do E_{max} induzido pelo U46619 (Controle: $2,6 \pm 0,2$ g, $n=6$; Tiron: $3,5 \pm 0,2$ g, $n=6$; $p=0,01$), mas a Catalase não modificou esses valores ($2,4 \pm 0,2$ g, $n=6$) (Figura 12A). Tiron e Catalase não modificaram a resposta contrátil estimulada com o U46619, em aortas sem endotélio (Figura 12B).

Fig. 11. Resposta contrátil induzida pelo agonista TP (U46619) em aortas com endotélio (A) e sem endotélio (B) isoladas de ratos normotensos (2R), na presença ou ausência de Tiron (100 μ mol/L) ou Catalase (300 U/mL). Curvas concentração-efeito foram realizadas em aortas de ratos com concentrações crescentes e cumulativas do agonista U46619. Os resultados estão expressos em gramas de tensão como média $\pm$ EPM. *vs respectivo controle, $p < 0,05$.

Fig. 12. Resposta contrátil induzida pelo agonista TP (U46619) em aortas com endotélio (A) e sem endotélio (B) isoladas de ratos hipertensos renais (2R-1C), na presença ou ausência de Tiron (100 μ mol/L) ou Catalase (300 U/mL). Curvas concentração-efeito foram realizadas em aortas de ratos com concentrações crescentes e cumulativas do agonista U46619. Os resultados estão expressos em gramas de tensão como média $\pm$ EPM. *vs respectivo controle, $p < 0,05$.

A expressão proteica da COX-1 e COX-2 foi maior em aorta de ratos 2R-1C (COX-1: E+: $0,35 \pm 0,03$; E-: $0,40 \pm 0,02$; COX-2: E+: $0,91 \pm 0,04$; E-: $0,84 \pm 0,01$; n=6; $p<0,05$) do que em aortas de ratos 2R (COX-1 E+: $0,17 \pm 0,02$; E-: $0,21 \pm 0,04$; COX-2: E+: $0,64 \pm 0,01$; E-: $0,71 \pm 0,06$; n=6; $p<0,05$) (Figura 13). A remoção do endotélio não modificou os níveis de expressão proteica das isoformas COX-1 e COX-2.

O aumento da concentração citosólica de Ca^{2+} leva à ativação da fosfolipase A_2 (PLA_2) e consequente ativação da COX. A ativação do receptor TP está associada com o aumento do influxo de Ca^{2+} , uma vez que o receptor TP está acoplado, dentre outras proteínas G, à proteína $\text{G}_{\alpha q}$. No presente estudo, realizamos curvas concentração-efeito para o U46619 na presença do inibidor não seletivo da COX, Ibuprofeno (IBU, $10 \mu\text{mol/L}$), ou na presença do inibidor da tromboxano sintase, Furegrelato (FURE, $10 \mu\text{mol/L}$) para avaliarmos o envolvimento da via da COX na contração induzida pelo agonista TP (U46619).

Fig. 13. Expressão proteica da COX-1 (A) e COX-2 (B), normalizada pela expressão de β -actina, em aortas com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-), isoladas de ratos normotensos (2R) ou hipertensos renais (2R-1C). Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM (n=6). * Comparação entre 2R-1C E+ ou E- e 2R E+ ou E-, respectivamente; $p \leq 0,001$.

Como mostra a Tabela 4, em aortas E+, isoladas de ratos 2R, a pré-incubação com Ibuprofeno (IBU) reduziu o valor de pD_2 em relação ao grupo controle, sem alterar o Emax da contração induzida pelo agonista U46619. Por outro lado, o Furegrelato (FURE) reduziu o Emax de contração induzido pelo agonista U46619 (Figura 14A). Em preparações E-, a incubação com Ibuprofeno ou Furegrelato reduziu o Emax da contração induzida pela ativação do receptor TP (Tabela 4) (Figura 14B).

Em aortas E+ e E- isoladas de ratos 2R-1C, a pré-incubação com Ibuprofeno (10 $\mu\text{mol/L}$) não modificou a contração induzida pelo agonista U46619 (Figura 15).

Fig. 14. Resposta contrátil induzida pelo agonista TP (U46619) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B) isoladas de ratos normotensos (2R), na ausência (Controle) ou presença de Ibuprofeno (IBU, 10 μ mol/L) ou Furegrelato (FURE, 10 μ mol/L). Curvas concentração-efeito foram realizadas com concentrações crescentes e cumulativas do agonista U46619. Os resultados estão expressos em gramas de tensão como média $\pm$ EPM. *vs respectivo Controle, $p < 0,05$.

Tabela 4. Efeito máximo (Emax) e pD_2 calculados pelas curvas concentração-efeito para o U46619 em aorta isoladas de ratos normotensos (2R), com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-), pré-incubadas ou não (controle) com o inibidor não seletivo da COX, Ibuprofeno (10 $\mu\text{mol/L}$) ou inibidor da tromboxano sintase, Furegrelato (10 $\mu\text{mol/L}$).

	E+		E-	
	Emax (g)	pD_2	Emax (g)	pD_2
Controle	3,1 $\pm$ 0,2 (n=5)	8,06 $\pm$ 0,10 (n=5)	3,4 $\pm$ 0,0 (n=6)	8,61 $\pm$ 0,12 (n=6)
Ibuprofeno	2,7 $\pm$ 0,0 (n=6)	7,81 $\pm$ 0,04* (n=6)	2,8 $\pm$ 0,2# (n=5)	8,47 $\pm$ 0,03 (n=5)
Furegrelato	2,4 $\pm$ 0,1* (n=5)	8,21 $\pm$ 0,08 (n=5)	2,5 $\pm$ 0,1# (n=5)	8,54 $\pm$ 0,04 (n=5)

Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM. * Comparação entre E+ Ibuprofeno ou furegrelato e E+ controle. # Comparação entre E- Ibuprofeno ou Furegrelato e E- controle, $p < 0,05$.

Fig. 15. Resposta contrátil induzida pelo agonista TP (U46619) em aortas com endotélio (A) ou sem endotélio (B) isoladas de ratos hipertensos renais (2R-1C), na ausência (Controle) ou presença de Ibuprofeno (IBU, 10 $\mu\text{mol/L}$). Curvas concentração-efeito foram realizadas com concentrações crescentes e cumulativas do agonista U46619. Os resultados estão expressos em gramas de tensão como média $\pm$ EPM.

A resposta contrátil induzida pelo agonista TP U46619 foi modificada em aorta de ratos 2R na presença de inibidores de componentes da via da COX (Figura 14). Portanto, avaliamos se o estímulo do receptor TP promoveria a produção de TXA_2 . Como visto na Figura 16, o estímulo das preparações E+ ou E- com o U46619 não causou aumento nos níveis de tromboxano B_2 (metabólito estável do TXA_2) em aorta de ratos 2R ou 2R-1C.

Fig. 16. Medida da produção de TXB_2 (metabólito estável do tromboxano A_2) em homogenato de aortas, com (E+) ou sem endotélio (E-), de ratos normotensos (2R) (A) e hipertensos renais (2R-1C) (B), previamente estimuladas ou não (controle) com U46619 (10 $\mu\text{mol/L}$) em banho para órgãos isolados. Os resultados estão expressos em pg/mg de proteínas de cada amostra. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM, $n=4$.

Os agentes vasoativos exercem seus efeitos de modo resultante a diversas interações entre vias que ocorrem no ambiente celular. Nesse sentido, as ERO e via dos prostanóides modulam-se de forma recíproca sendo importantes no controle do tônus vascular. Para investigarmos as possíveis modulações que ocorrem entre essas vias na hipertensão renovascular, realizamos protocolos específicos nos grupos de animais 2R ou 2R-1C.

Em aortas E+ de ratos 2R, a pré-incubação com Ibuprofeno (10 $\mu\text{mol/L}$) reduziu a potência do U46619 em induzir contração, indicado pela redução do pD_2 (Tabela 4, Figura 14A). A pré-incubação simultânea de Ibuprofeno e Tiron (100 $\mu\text{mol/L}$) causou efeito semelhante. Por outro lado, a associação de Ibuprofeno com L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$) foi capaz de aumentar o valor de pD_2 em aortas E+ de ratos 2R (Tabela 5, Figura 17).

Fig. 17. Resposta contrátil induzida pelo agonista TP (U46619) em aortas com endotélio isoladas de ratos normotensos (2R), na ausência (Controle) ou presença de Ibuprofeno (IBU, 10 $\mu\text{mol/L}$), combinação Ibuprofeno e L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$) ou combinação Ibuprofeno e Tiron (100 $\mu\text{mol/L}$). Curvas concentração-efeito foram realizadas com concentrações crescentes e cumulativas do agonista U46619. Os resultados estão expressos em gramas de tensão como média $\pm$ EPM.

Tabela 5. Efeito máximo (Emax) e pD₂ calculados pelas curvas concentração-efeito para o U46619 em aorta isoladas de ratos normotensos (2R), com endotélio (E+), pré-incubadas ou não (controle) com o inibidor não seletivo da COX, Ibuprofeno (10 µmol/L), combinação Ibuprofeno+inibidor não seletivo da NO-Sintase, L-NAME (100 µmol/L), ou combinação Ibuprofeno+sequestrador de O₂⁻, Tiron (100 µmol/L).

	Emax (g)	pD ₂
Controle	3,1 ± 0,2 (n=5)	8,06 ± 0,10 (n=5)
Ibuprofeno	2,7 ± 0,0 (n=6)	7,81 ± 0,04* (n=6)
Ibuprofeno+L-NAME	3,1 ± 0,1 (n=6)	8,10 ± 0,03# (n=6)
Ibuprofeno+Tiron	2,6 ± 0,0 (n=6)	7,85 ± 0,04* (n=6)

Os valores estão expressos como média ± EPM. * vs pD₂ controle. # vs pD₂ Ibuprofeno, p<0,05.

Em aorta E+ de ratos 2R-1C, o Tiron promoveu aumento dos valores de Emax da contração induzida pelo U46619 (Figura 12A). A pré-incubação concomitante de Tiron (100 $\mu\text{mol/L}$) e L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$) não modificou os valores de Emax e pD_2 . Entretanto, a associação de Tiron e Ibuprofeno (10 $\mu\text{mol/L}$) reduziu o Emax da contração ao U46619 em aorta E+ de ratos 2R-1C (Controle: $2,6 \pm 0,2$, $n=6$; Tiron e Ibuprofeno: $1,8 \pm 0,1$, $n=6$; $p < 0,01$) (Figura 18).

Fig. 18. Resposta contrátil induzida pelo agonista TP (U46619) em aortas com endotélio isoladas de ratos hipertensos renais (2R-1C), na ausência (Controle) ou presença de combinação Tiron (100 $\mu\text{mol/L}$) e L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$) ou Tiron e Ibuprofeno (IBU, 10 $\mu\text{mol/L}$). As curvas concentração-efeito foram realizadas com concentrações crescentes e cumulativas do agonista U46619. Os resultados estão expressos em gramas de tensão como média $\pm$ EPM. *vs controle, $p < 0,05$.

Para investigarmos como o relaxamento vascular é modulado pela ativação do receptor TP na aorta de ratos hipertensos renais, realizamos curvas concentração-efeito cumulativas para acetilcolina em aortas pré-contraídas com agonista TP (U46619) em diferentes concentrações, em aortas de ratos 2R e 2R-1C.

Como observado na Figura 19, o relaxamento à acetilcolina foi maior em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C quando pré-contraídas com 10 nmol/L de U46619 em relação às preparações pré-contraídas com 100 nmol/L do agonista. Também verificamos que o relaxamento induzido pela acetilcolina é maior em aorta de ratos 2R quando a concentração do agonista contrátil foi de 10 nmol/L em relação às aortas pré-contraídas com 100 nmol/L de U46619. Não houve diferença da resposta relaxante à acetilcolina em aortas pré-contraídas com 100 nmol/L do agonista U46619. Não houve diferença entre os valores de pD_2 calculados, independente da concentração utilizada do agonista pré-contrátil (Tabela 6).

Fig. 19. Resposta relaxante induzida pela acetilcolina (ACh) em aortas com endotélio isoladas de ratos normotensos (2R) ou hipertensos renais (2R-1C), pré contraídas com o agonista TP, U46619 em duas concentrações: 100 nmol/L ou 10 nmol/L. As curvas concentração-efeito foram realizadas com concentrações crescentes e cumulativas de acetilcolina. Os resultados estão expressos em percentual de relaxamento como média $\pm$ EPM. *vs 2R ou 2R-1C (100 nmol/L), # vs 2R (10 nmol/L); $p < 0,05$.

Tabela 6. Efeito máximo (Emax) e pD_2 calculados pelas curvas concentração-efeito para acetilcolina em aortas com endotélio isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C), pré-contraídas com o agonista TP, U46619 em diferentes concentrações: 100 ou 10 nmol/L.

	2R (n=5)		2R-1C (n=5)	
	Emax (%)	pD_2	Emax (%)	pD_2
100 nmol/L (U46619)	39,7 ± 4,2 (n=6)	7,17 ± 0,15 (n=6)	36,0 ± 1,6 (n=6)	6,82 ± 0,14 (n=6)
10 nmol/L (U46619)	97,4 ± 0,6* (n=5)	6,92 ± 0,24 (n=5)	58,1 ± 5,4*# (n=5)	6,73 ± 0,04 (n=5)

Os valores estão expressos como média do percentual de relaxamento ± EPM.
 *Comparação entre Emax 2R ou 2R-1C (10 nmol/L) e Emax 2R ou 2R-1C (100 nmol/L), respectivamente. #Comparação entre Emax 2R-1C (10 nmol/L) e Emax 2R (10 nmol/L), $p < 0,05$.

Uma vez que verificamos diferença no relaxamento à acetilcolina quando utilizamos a concentração de 10 nmol/L de U46619 como agente pré-contrátil, realizamos protocolos específicos para investigarmos os mecanismos intracelulares envolvidos no relaxamento nessa concentração do agonista. Em aortas de ratos 2R, a pré-incubação com Catalase (300 U/mL) diminuiu o Emax de relaxamento à acetilcolina em aortas pré-contráidas com o agonista U46619 (Controle: $9,7 \pm 0,6$, $n=5$; Catalase: $75,2 \pm 4,9$, $n=5$; $p<0,05$) (Figura 20). A pré-incubação com Tiron (100 $\mu\text{mol/L}$) ou Ibuprofeno (10 $\mu\text{mol/L}$) não alterou os valores de Emax ou pD_2 para o relaxamento à acetilcolina.

Fig. 20. Resposta relaxante induzida pela acetilcolina (ACh) em aortas com endotélio isoladas de ratos normotensos (2R), pré-contráidas com o agonista TP, U46619 (10 nmol/L), na ausência (controle) ou presença de Tiron (100 $\mu\text{mol/L}$), Catalase (300 U/mL) ou Ibuprofeno (IBU, 10 $\mu\text{mol/L}$). As curvas concentração-efeito foram realizadas com concentrações crescentes e cumulativas de acetilcolina. Os resultados estão expressos em percentual de relaxamento como média $\pm$ EPM. *vs Controle, $p<0,05$.

A pré-incubação com Tiron (100 $\mu\text{mol/L}$), Catalase (300 U/mL) ou Ibuprofeno (10 $\mu\text{mol/L}$) não modificou a resposta relaxante induzida pela acetilcolina, em aortas de ratos 2R-1C (Figura 21).

Fig. 21. Resposta relaxante induzida pela acetilcolina (ACh) em aortas com endotélio isoladas de ratos hipertensos renais (2R-1C), pré-contraídas com o agonista TP, U46619 (10 nmol/L), na ausência (controle) ou presença de Tiron (100 $\mu\text{mol/L}$), Catalase (300 U/mL) ou Ibuprofeno (IBU, 10 $\mu\text{mol/L}$). As curvas concentração-efeito foram realizadas com concentrações crescentes e cumulativas de acetilcolina. Os resultados estão expressos em percentual de relaxamento como média $\pm$ EPM.

5 DISCUSSÃO

O principal achado do nosso estudo foi de que as ERO possuem um importante papel na modulação da resposta contrátil induzida pelo agonista TP (U46619) em aortas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C). As principais ERO envolvidas na modulação do tônus vascular são o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LOPERENA; HARRISON, 2017).

Em aortas de ratos 2R sem endotélio (E-), o H_2O_2 gerado pela ativação do receptor TP modula a contração induzida pelo agonista U46619. Em aortas de ratos 2R com endotélio (E+), o H_2O_2 participa do relaxamento vascular induzido pela acetilcolina. Por outro lado, em aortas de ratos 2R-1C, o O_2^- parece assumir esse papel. As ERO provenientes da ativação do receptor TP, são derivadas, pelo menos em parte, do aumento da atividade da enzima COX.

Os vasos sanguíneos são severamente afetados pelos danos provocados pela hipertensão arterial. Os principais fatores que contribuem para as alterações funcionais, estruturais e mecânicas dos vasos são a disfunção endotelial, remodelamento e calcificação vascular, inflamação e espessamento da parede arterial (CAMERON et al., 2016). Dessas, a disfunção vascular é descrita como uma das principais características que acompanham o quadro hipertensivo, e é caracterizada por alterações vasomotoras em resposta a diferentes agentes vasoativos.

Resultados anteriores do nosso laboratório, demonstraram que o relaxamento vascular dependente do endotélio estimulado com acetilcolina, está reduzido em vasos de ratos hipertensos renais 2R-1C (CALLERA et al., 2000). Da mesma forma, o relaxamento independente do endotélio ativado por doadores de NO também está

prejudicado nos vasos de ratos hipertensos renais (BONAVENTURA et al., 2005; CALLERA et al., 2000; RODRIGUES et al., 2007, 2008; SENDÃO OLIVEIRA; BENDHACK, 2004).

A disfunção endotelial é descrita como característica do quadro de hipertensão, que também é observada em outros modelos como de hipertensão genética (SHR) (CHENG; SHIBATA, 1981), DOCA-sal (NUNES et al., 2000) e modelo de hipertensão por infusão contínua de Ang II (WANG et al., 2005). Além do prejuízo no relaxamento, a disfunção vascular derivada da hipertensão arterial também causa alterações na resposta contrátil a diferentes agentes vasoconstritores. De acordo com SILVA e cols. (2014), em aortas de ratos 2R-1C, a contração induzida pela fenilefrina é menor quando comparada ao controle normotenso. Além disso, no modelo SHR, a contração induzida pela noradrenalina, serotonina ou KCl também é menor do que o controle normotenso (SPECTOR et al., 1969). Assim, fica evidente as diferenças nas respostas vasomotoras causadas pela hipertensão arterial. Entretanto, ainda não existe um consenso sobre se essas alterações são causas ou consequências da hipertensão.

Ao longo do tempo, diversos estudos foram realizados para elucidar quais os mecanismos intracelulares envolvidos com as alterações da função vascular decorrentes da hipertensão arterial, uma vez que o tônus vascular apresenta-se como um importante regulador dos níveis pressóricos. A ativação do receptor TP é descrita como um importante componente envolvido com o processo fisiopatológico da hipertensão arterial. Em pacientes hipertensos, a expressão proteica do receptor TP é maior e também ocorre maior sensibilidade desse receptor do que em indivíduos normotensos (LIEL et al., 1993). Em modelos experimentais, O tratamento *in vivo* com o inibidor da enzima tromboxano sintase ou antagonista do

receptor TP é capaz de reduzir os níveis de pressão arterial de ratos hipertensos renais 2R-1C (HIMMELSTEIN; KLOTMAN, 1989). Além disso, em camundongos *knockout* para o receptor TP ocorre menor elevação da pressão arterial do que em camundongos selvagens, em modelos de indução da hipertensão arterial por infusão de Ang II (FRANCOIS et al., 2004) ou administração de L-NAME associada à ingestão aumentada de sódio (FRANCOIS et al., 2008). Dessa forma, fica clara a relação da ativação do receptor TP não apenas com a manutenção da hipertensão arterial, como também com a etiologia da doença.

O receptor TP tem como principal ligante endógeno o TXA₂. Descrito por PALMER e cols. (1970) como “substância contrátil de aorta de coelhos”, o TXA₂ é um mediador lipídico, pertencente à família dos eicosanóides, mais especificamente do grupo dos prostanóides. Possui importante papel na modulação de diversos processos fisiológicos como hemostasia, respostas alérgicas e inflamatórias e proliferação celular (NAKAHATA, 2008). O TXA₂ é produto da via do metabolismo do ácido araquidônico (AA), ácido graxo componente de fosfolípídeos da membrana plasmática, por ação da enzima COX. O AA é liberado da membrana plasmática por uma reação enzimática catalisada pela enzima fosfolipase A₂ (PLA₂), cuja atividade é regulada principalmente pelo Ca²⁺ citoplasmático (DENNIS, 1994). Uma vez livre da membrana, o AA serve como substrato para a enzima COX, que se apresenta sob as isoformas, COX-1 e COX-2. A COX-1 é expressa em praticamente todos os tipos celulares de forma constitutiva, enquanto a COX-2 é induzida, principalmente por processos inflamatórios (SEIBERT et al., 1994). Entretanto, diversos estudos demonstram que a COX-2 também é expressa de forma constitutiva em vários tecidos, como por exemplo, nos vasos sanguíneos (TOPPER et al., 1996). A COX converte o AA ao endoperóxido PGG₂ por uma reação de cicloxigenação e,

posteriormente, o converte a PGH_2 por meio de uma reação de peroxidação (SMITH et al., 2000). A PGH_2 atua como precursor comum às demais prostaglandinas, que são geradas por ação de suas respectivas sintases ou isomerases (FÉLÉTOU et al., 2010).

Dentre os modelos experimentais de hipertensão arterial, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a estudar os mecanismos envolvidos na fisiopatologia vascular no modelo de hipertensão renovascular 2R-1C proposto por GOLDBLATT (1934) e adaptado para pequenos animais por SCHAFFEMBURG (1959). O principal objetivo do nosso trabalho foi investigar os mecanismos celulares envolvidos na função vascular desencadeadas pela ativação do receptor TP neste modelo experimental. Para isso, realizamos curvas concentração-efeito para o agonista TP, U46619, em estudos de reatividade vascular.

A construção das curvas concentração-efeito baseia-se na interação do agonista com o seu receptor farmacológico. Uma vez que o receptor TP tem como principal agonista endógeno o TXA_2 , investigamos se existe diferença entre os níveis séricos desse mediador na aorta dos ratos 2R e 2R-1C, além de avaliarmos também a expressão gênica do receptor TP. Não houve diferença nos níveis plasmáticos do TXB_2 (metabólito estável do TXA_2) entre ratos 2R e 2R-1C (Figura 1). Contudo, em aorta de ratos 2R-1C ocorre menor expressão gênica do receptor TP em relação ao controle 2R (Figura 2). Foi relatado por MONTENEGRO e cols. (2011) que em ratos 2R-1C há maior concentração circulante de isoprostanos em relação a ratos 2R. De acordo com AMARAL e cols. (2015), o mesmo ocorre em ratos hipertensos DOCA-Sal. O receptor TP tem o TXA_2 como ligante endógeno preferencial. Entretanto, endoperóxidos e altas concentrações de outras prostaglandinas também podem ativá-lo. Além disso, isoprostanos também são descritos como agonistas do receptor

TP. Assim, embora não tenhamos observado diferença nos níveis plasmáticos de TXA_2 entre ratos 2R e 2R-1C, possivelmente, um aumento nos níveis séricos de isoprostanos, agonistas do receptor TP, pode desencadear mecanismo de *feed-back* negativo, levando à menor expressão gênica do respectivo receptor farmacológico. Esse mecanismo de regulação é descrito como uma importante modulação da atividade farmacológica de diversos mediadores e vários tecidos (TSAO; VON ZASTROW, 2000).

Tendo em vista as alterações vasomotoras típicas provocadas pela hipertensão arterial, investigamos a possível diferença entre a resposta contrátil induzida pela ativação do receptor TP entre aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C pela análise das curvas concentração-efeito para o agonista U46619. Verificamos que não houve diferença nos valores de E_{max} ou potência da resposta ao U46619 (Figura 3) entre aorta de ratos 2R-1C e 2R. Entretanto, como visto na Tabela 1, observamos diferenças entre os grupos 2R e 2R-1C, no coeficiente de *Hill* calculado para as curvas concentração-efeito. O coeficiente (ou número) de *Hill*, é um dos parâmetros farmacológicos utilizados nas análises de curva concentração-efeito. Baseada na equação proposta por HILL (1910) para análises de cinéticas enzimáticas não-michaelianas, o parâmetro indica cooperatividade molecular, onde a cinética de ligação entre enzima e substrato ocorre de maneira não linear. Do ponto de vista farmacológico, a alteração do coeficiente de *Hill* acarreta em mudança na inclinação da curva concentração-efeito a determinado agonista. Este parâmetro sugere por exemplo, mudanças na sinalização celular entre a interação droga-receptor e efeito observado. Assim, esse resultado sugere que a contração ao U46619 desencadeia eventos intracelulares distintos entre os dois grupos experimentais.

Até o início dos anos 1980, acreditava-se que as células endoteliais tinham uma função de barreira física entre a luz do vaso sanguíneo e as demais células componentes dos vasos e o meio intersticial, agindo como uma barreira de difusão seletiva a determinadas substâncias entre os meios. Em 1980, FURCHGOTT e ZAWADZKI demonstraram pela primeira vez a importância do endotélio na vasodilatação, onde em preparações de aorta de coelhos sem endotélio, não ocorre relaxamento vascular induzido pela acetilcolina. Desde então, diversos estudos demonstraram a importância das células endoteliais no controle do tônus vascular. Atualmente, sabe-se que o endotélio é capaz de sintetizar diversas substâncias com atividade vasomotora, que agem como fatores de sinalização, modificando o estado contrátil vascular. Esses fatores são conhecidos como relaxantes (EDRFs) ou contráteis derivados do endotélio (EDCFs). O NO, principal EDRF, é descrito como um dos fatores derivados do endotélio mais importantes, uma vez que sua menor biodisponibilidade está relacionada com diversos processos fisiopatológicos tais como aterosclerose, diabetes e hipertensão arterial (SU, 2015).

Embora seu efeito vasodilatador seja bem descrito, o NO também exerce um importante papel na modulação do tônus contrátil vascular, atuando como um agente anticontrátil. Em sistema de perfusão-superfusão, THORIN e cols. (1994) verificaram que a incubação de artérias caudais de ratos com o inibidor não seletivo da NO-Sintase, L-NAME, é capaz de aumentar a pressão de perfusão em resposta a estímulos elétricos. O L-NAME também promove aumento da contração induzida pela urotensina em artérias pulmonares de rato, com endotélio (MACLEAN et al., 2000). A modulação do NO sobre a vasoconstrição induzida por diferentes agentes contráteis também ocorre no contexto da hipertensão arterial. A pré-incubação de aortas com L-NAME aumenta a contração induzida pela fenilefrina em aorta com

endotélio de camundongos hipertensos transgênicos (LEMOS et al., 2002) e em modelo de hipertensão renovascular 2R-1C (SILVA et al., 2014).

A ativação do receptor TP provoca aumento da $[Ca^{2+}]_c$, importante sinalizador para ativação da eNOS e consequente síntese de NO nas células endoteliais. Portanto, investigamos se a ativação do receptor TP com o agonista U46619 causa aumento da $[NO]_c$ e se esse agente modula a contração induzida pelo agonista TP. Verificamos que o U46619 é capaz de aumentar a $[NO]_c$ em células endoteliais (Figura 5) e que não houve diferença nos valores de EM e potência na contração induzida pelo U46619 em aortas, com endotélio, isoladas de ratos 2R ou 2R-1C, pré-incubadas com L-NAME (Figura 8). Uma vez que estes valores não foram diferentes, da contração ao U46619 entre aorta de ratos 2R-1C e 2R (Figura 3), nossos resultados corroboram com os observados por LIU e cols. (2015), que demonstraram que o L-NAME não modifica a resposta contrátil induzida pelo U46619 em artérias renais de SHR e ratos normotensos (WKY). Ao contrário de outros receptores farmacológicos, a ativação do receptor TP está relacionada com o bloqueio da atividade de canais para K^+ . Em estudos eletrofisiológicos, COGOLLUDO e cols. (2006) verificaram que o U46619 inibe a corrente de canais para K^+ dependentes de voltagem e a despolarização de células do músculo liso vascular de artérias pulmonares de maneira dependente de concentração, via PKC. A atividade de canais para K^+ é descrita como um dos importantes mecanismos de manutenção de potencial de repouso de células vasculares, estando dessa forma diretamente relacionada com o controle do tônus vascular (ARCHER et al., 1998; YUAN, 1995). Um dos principais mecanismos de ação intracelular do NO é a ativação direta de canais para K^+ , o que leva à hiperpolarização celular e consequente relaxamento do músculo liso (DE LIMA et al., 2014). Dessa forma, em nossos experimentos, é

possível que o NO produzido nas células endoteliais via estímulo do U46619 não modifique os valores de pD_2 ou E_{max} das curvas concentração-efeito ao agonista contrátil, uma vez que a ativação do receptor TP bloqueia o canal para K^+ , prejudicando a hiperpolarização promovida pelo NO. Tal fenômeno pode ser verificado também na Figura 19, onde na maior concentração do agonista U46619 utilizado como agente pré-contrátil (100 nmol/L), ocorre prejuízo no relaxamento induzido pela acetilcolina em aortas de 2R e 2R-1C, quando comparados ao relaxamento sendo utilizada uma concentração 10 vezes menor do agonista pré-contrátil. Entretanto, como mostra a Tabela 3, verificamos que em aortas de ratos 2R, o L-NAME foi capaz de reduzir o coeficiente de *Hill* calculado para a curva concentração-efeito ao U46619. Dessa forma, a alteração desse parâmetro observada em aortas pré-incubadas com L-NAME (Tabela 3), indica que a atividade da enzima NO-sintase (e possivelmente o próprio NO) participa da contração induzida pela ativação do receptor TP.

Em aorta de ratos 2R e 2R-1C, a ativação do receptor TP não alterou os níveis de expressão proteica da enzima eNOS fosforilada (fosfo-eNOS) nos resíduos de Ser¹¹⁷⁷ ou Thr⁴⁹⁵ em relação às preparações sem estímulo (figuras 6 e 7). Por outro lado, de acordo com LIU e cols. (2009), o tratamento concomitante de aortas de ratos com o agonista β -adrenérgico (isoprenalina) e U46619 reduz a expressão proteica da fosfo-eNOS no resíduo de Ser¹¹⁷⁷ em relação ao tratamento com acetilcolina ou isoprenalina. De fato, esses resíduos possuem um importante papel na regulação da atividade da eNOS. A fosforilação no resíduo de Ser¹¹⁷⁷, acarreta no maior transiente de elétrons no domínio redutase da enzima, o que leva ao aumento na produção de NO cerca de duas vezes em relação aos níveis basais (McCABE et al., 2000). A fosforilação do resíduo de Thr⁴⁹⁵ interfere com a ligação da enzima com

o complexo Ca^{2+} -calmodulina em resposta a agonistas que promovem o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ e redução da atividade da eNOS (FLEMING et al., 2001).

Entretanto, não apenas a fosforilação nesses resíduos modula a atividade da eNOS. Outros resíduos de fosforilação como Ser¹¹⁴, Ser⁶³³ e outros, também são capazes de modular a atividade da enzima. A interação da eNOS com outras proteínas como a caveolina-1, dinamina e Hsp-90 podem modular a produção do NO pela NOS (FLEMING; BUSSE, 2003). Portanto, os nossos resultados não são conclusivos no que diz respeito à regulação molecular da atividade da eNOS sob ativação do receptor TP, visto que diversos outros mecanismos podem estar ativados, sendo necessários estudos complementares nesse sentido.

Muitos autores avaliam a importância da via das prostaglandinas e ativação do receptor TP em modelos de hipertensão arterial. De acordo com LÜSCHER e VANHOUTTE (1986), em aorta de ratos SHR, a acetilcolina induz contração vascular de forma dependente do endotélio cujo efeito é abolido pelo inibidor não seletivo da COX, Indometacina. Estes autores sugerem que as próprias células endoteliais são capazes de sintetizar prostanóides vasoativos que poderiam estar envolvidos com a manutenção do tônus contrátil em ratos hipertensos. Mais tarde, AUCH-SCHWELK e cols (1990) observaram que a contração dependente do endotélio em aortas de SHR é dependente da ativação do receptor TP. Desde então, diversos estudos foram desenvolvidos no sentido de investigar os mecanismos pelos quais esses eventos ocorrem e os efeitos vasculares. Diversos autores sugerem que o estresse oxidativo é ativado via receptor TP e que estas vias intracelulares estão envolvidas no controle do tônus vascular. Por exemplo, GARCÍA-REDONDO e cols. (2015) observaram que em aorta mesentérica de SHR, a contração induzida pelo H_2O_2 é mediada pela ativação do receptor TP.

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio crônico entre as atividades de sistemas anti-oxidativos e pró-oxidativos teciduais, prevalecendo esse último, o que acarreta em aumento da produção de espécie reativas de oxigênio (ERO). As ERO possuem importantes funções fisiológicas como proliferação e diferenciação celular, modulação da resposta imune inata, reparos teciduais, entre outras (LOPERENA; HARRISON, 2017). Porém, um aporte exacerbado de ERO acarreta em danos celulares, o que está relacionado com o processo fisiopatológico de diversas doenças como a hipertensão arterial. Em estudo clínico, REDÓN e cols. (2003) verificaram que existe aumento nos níveis de marcadores oxidativos em pacientes hipertensos. Dentre os modelos experimentais de hipertensão arterial, o modelo de hipertensão renovascular 2R-1C apresenta-se como um dos modelos onde é ocorre aumento do estresse oxidativo. SILVA e cols. (2013) verificaram aumento nos níveis séricos de ERO no plasma de ratos 2R-1C em relação ao controle normotenso. Esse efeito também ocorre nas aortas desses animais, sugerindo que o aumento de ERO ocorre de maneira sistêmica e também localizada (em aorta) nesse modelo experimental. O predomínio de ERO nas aortas de ratos 2R-1C está envolvido com o remodelamento vascular, observado no quadro de hipertensão (CASTRO et al., 2009). Assim, o estresse oxidativo constitui importante fator que contribui para as alterações vasculares em animais hipertensos.

Diversas fontes de ERO são descritas nas células vasculares. O aumento da atividade das NO-Sintase desacoplada, xantina oxidase e do complexo enzimático NADPH oxidase [Nox]), são os principais responsáveis pelo aumento dos níveis de ERO (PARAVICINI; TOUYZ, 2006). Dentre as ERO descritas, o O_2^- e H_2O_2 ocupam papel de destaque em diversas vias de sinalização celular que estão envolvidas com a disfunção vascular observadas na hipertensão arterial. Em células endoteliais, o

aporte excessivo de O_2^- está relacionado com a menor biodisponibilidade de NO, uma vez que pode ocorrer interação entre essas espécies radicalares e consequente geração do peroxinitrito ($ONOO^-$), prejudicando o efeito relaxante desencadeado por NO (GRYGLEWSKI et al., 1986). Ao contrário do O_2^- , o H_2O_2 é uma molécula não carregada eletricamente e possui caráter lipofílico, o que possibilita uma fácil difusão entre as membranas biológicas. Dentre outras fontes, sua produção ocorre principalmente por ação da enzima superóxido dismutase (SOD), que dismuta o O_2^- , convertendo-o em H_2O_2 , embora essa reação também possa ocorrer de forma espontânea (LOPERENA; HARRISON, 2017). O O_2^- e H_2O_2 produtos da xantina oxidase são capazes de induzir uma maior contração em aorta de SHR em relação ao mesmo efeito observado no controle normotenso (AUCH-SCHWELK et al., 1989). De acordo com YANG e cols. (2002b), em aortas com endotélio incubadas com L-NAME, a acetilcolina é capaz de induzir contração em preparações de ratos 2R-1C e que as ERO estão envolvidas nesse processo. Esses resultados demonstram a importância das ERO não apenas como agentes indutores, mas também como moduladores da resposta vasomotora observada na hipertensão arterial.

Diversos autores propõem a modulação recíproca (*cross-talk*) entre as ERO e a via das prostaglandinas, em especial, a via do TXA_2 . Em células endoteliais, o H_2O_2 induz aumento das prostaglandinas $PGF_{1\alpha}$, PGE_2 e TXA_2 . Além disso, promove o aumento da expressão proteica da COX-2, PLA_2 em sua forma ativa e também da tromboxano sintase (KARAA et al., 2006). Foi descrito também que as ERO tem importante papel na estabilização do receptor TP (VALENTIN et al., 2004). Por outro lado, a ativação do receptor TP promove aumento da expressão proteica de Nox e consequente geração de ERO (ZHANG et al., 2011). Entretanto, a relação entre essas vias vai além de suas influências sobre a expressão e liberação de

mediadores. Em artérias mesentéricas de SHR, o H_2O_2 é capaz de induzir uma contração de maior amplitude em relação ao controle normotenso, cujo efeito é mediado pela síntese de TXA_2 e ativação do receptor TP (GAO; LEE, 2001). De forma especial, as ERO são ditas como moduladoras e também produtos da atividade da COX. De acordo com WU e cols. (2011) em aortas de camundongos hipertensos *knockout* para a COX, a concentração de ERO está diminuída. Esses resultados corroboram com os achados descritos por MARTÍNEZ-REVELLES e cols. (2013), onde a inibição farmacológica da COX-2 reduz os níveis de ERO em aortas de ratos hipertensos, melhorando a disfunção vascular. Por outro lado, o H_2O_2 pode ativar diretamente a COX em estudos *in vitro* (KULMACZ et al., 1990) e esse mecanismo de ativação está envolvido com a contração e relaxamento vascular em aorta de ratos (GIL-LONGO; GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, 2005). Dessa forma, fica clara a relação entre as ERO e a via COX- TXA_2 em relação às vias de sinalização celular na hipertensão arterial.

Vários autores relatam a difusão de mediadores entre as células endoteliais e do músculo liso vascular como um dos fatores responsáveis pela manutenção das alterações vasculares decorrentes da hipertensão arterial. Nesse sentido, a modulação entre as ERO e vias das prostaglandinas ocorrem em função de suas localizações vasculares, no endotélio ou em células do músculo liso.

Em modelos de hipertensão arterial, o aumento das $[Ca^{2+}]_c$ nas células endoteliais ativa a PLA_2 com consequente produção de AA. Uma vez livre na membrana, o AA ativa a COX, resultando no aumento dos níveis de ERO e EDCFs, dentre eles o TXA_2 (GLUAIS et al., 2006; TANG et al., 2007; YANG et al., 2002a). Esses últimos difundem-se das células endoteliais e agem sobre as células do músculo liso vascular, ativando diretamente os receptores TP presentes nessas

células, como sugerido por diversos autores que verificaram que a contração dependente do endotélio é dependente da ativação de receptores TP (AUCH-SCHWELK et al., 1990; LÜSCHER; VANHOUTTE, 1986; YANG et al., 2003). A ativação desse receptor promove a geração de EDCFs pela ativação da COX (decorrente do aumento da $[Ca^{2+}]_c$) e por ativação direta da enzima pelas ERO (GIL-LONGO; GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, 2005). Esses produtos podem então difundir-se e ativarem receptores TP presentes no endotélio. Dessa forma, tais mediadores podem estar envolvidos num mecanismo de *feed-back* positivo entre os dois tipos celulares, contribuindo com o quadro de disfunção vascular (AUCH-SCHWELK et al., 1989; HARLAN; CALLAHAN, 1984). Essa relação é descrita com base em experimentos utilizando modelos animais de hipertensão genética (SHR) e estudos *in vitro* em cultura de células. Entretanto, pouco ainda se sabe sobre a modulação entre as ERO e a via das prostaglandinas e como essa relação pode causar alterações na função vascular no modelo de hipertensão 2R-1C. Modelos experimentais de hipertensão apresentam peculiaridades nas respostas vasculares induzidas por diferentes agentes vasomotores (HOLLOWAY; BOHR, 1973). Assim, a relação entre ERO e prostaglandinas e a modulação que ocorre entre essas vias pode ter diferentes efeitos sobre a função vascular no modelo 2R-1C. Nesse sentido, investigamos o papel das ERO na contração induzida pelo agonista TP, U46619, em aorta de ratos 2R-1C.

Verificamos que o agonista U46619 promove aumento dos níveis de ERO em células endoteliais e do músculo liso vascular nas concentrações de 10 nmol/L e 10 μ mol/L, correspondentes às EC_{50} e EC_{100} (respectivamente) do agonista, calculadas pela análise das curvas concentração-efeito para o agonista. Esses achados corroboram com os resultados obtidos por MUZAFFAR e cols. (2004), que

observaram que o U46619 é capaz de aumentar os níveis de ERO em células endoteliais e do músculo liso vascular isoladas de artéria pulmonar de suínos, de maneira dependente de concentração. A ativação do receptor TP também aumenta os níveis de ERO *in situ* em aorta de camundongos (ZHANG et al., 2011). A pré-incubação das células com o antagonista do receptor TP (SQ29548, 10 $\mu\text{mol/L}$) reverte este efeito, o que indica que o aumento dos níveis de ERO ocorre por ativação desse receptor. Em células do músculo liso vascular, o SQ29548 não reverteu o aumento dos níveis de ERO induzido pelo U46619 na concentração de 10 $\mu\text{mol/L}$. Esse resultado pode ser explicado por um efeito superável do agonista sobre o antagonista, além de indicar que a redução da intensidade fluorescência emitida pela sonda DHE, promovida pelo SQ29548, não deve ser atribuída a um efeito antioxidante da própria droga. Nas células endoteliais, o aumento de ERO promovido pela concentração de 10 $\mu\text{mol/L}$ de U46619 foi revertido pela pré-incubação dessas células com o antagonista TP. A redução observada apenas nesse tipo celular pode ser explicada pelo fato de que, em células endoteliais, pode existir mecanismos antioxidantes próprios, inclusive a presença do próprio NO (GRYGLEWSKI et al., 1986), o que resulta num efeito somatório ao antagonismo exercido pelo SQ29548. Recentemente, verificamos em nosso laboratório, que células endoteliais em co-cultura com células do músculo liso vascular, reduzem os níveis de ERO basal em monocultura dessas últimas células, quando cultivadas isoladamente.

O aumento de ERO provocado pelo agonista TP U46619 em células endoteliais e do músculo liso vascular foi reduzido pela pré-incubação dessas células com os agentes antioxidantes Tiron (sequestrador do O_2^- , 100 $\mu\text{mol/L}$), PEG-Catalase (enzima que degrada o H_2O_2 em O_2 e água, 3.000 U/mL), e o inibidor não

seletivo da COX, Ibuprofeno (10 $\mu\text{mol/L}$). Esses resultados sugerem que parte das ERO geradas pelo U46619 é proveniente do aumento da atividade dessa enzima. De modo interessante, nas células do músculo liso vascular, apenas a PEG-Catalase reduziu a intensidade de fluorescência emitida pela sonda DHE aos níveis do grupo controle. A principal produção de H_2O_2 ocorre pela reação de dismutação do O_2^- catalisada pela enzima SOD. Entretanto, em células vasculares, outras fontes de produção direta desse agente são descritas, tais como o metabolismo mitocondrial e aumento da atividade das enzimas xantina oxidase, eNOS desacoplada e COX (BRETÓN-ROMERO; LAMAS, 2014; CAI, 2005; SIES, 2014). Nossos achados corroboram com resultados prévios obtidos pelo nosso laboratório, que demonstraram que em aorta de ratos hipertensos 2R-1C, os aumentos dos níveis de H_2O_2 induzido pela fenilefrina é reduzido na presença do Ibuprofeno (SILVA et al., 2013). O aumento da atividade da COX gera ERO como co-produtos (WONG; VANHOUTTE, 2010) e estudos prévios indicam que a expressão proteica e atividade da COX estão envolvidas com a geração de ERO (MARTÍNEZ-REVELLES et al., 2013; WU et al., 2011), corroborando com os nossos achados. Assim, pelo menos no tipo celular estudado, o H_2O_2 parece ser a principal ERO produzida pelo estímulo TP.

O U46619 promove aumento de ERO em artérias pulmonares de suínos, sendo que esse efeito é ainda maior em artérias com endotélio (MUZAFFAR et al., 2004), evidenciando a participação dessas células como importante fonte da geração de ERO, em resposta ao estímulo do receptor TP. Uma vez que o U46619 foi capaz de aumentar os níveis de ERO nos estudos em células endoteliais e do músculo liso vascular (Figura 9) e no contexto vascular as células endoteliais possuem importante papel nesse processo, investigamos o papel desses agentes na

contração induzida pela ativação do receptor TP, no modelo de hipertensão renovascular e qual seria o papel das células endoteliais nesse processo. Para isso, realizamos curva concentração-efeito para o agonista TP, U46619, em aortas com e sem endotélio isoladas de ratos 2R ou 2R-1C, pré-incubadas com os antioxidantes Tiron (100 $\mu\text{mol/L}$) ou Catalase (300 U/mL).

Em aortas E+ isoladas de ratos 2R, a pré-incubação com Tiron ou Catalase não alterou a contração ao U46619. Entretanto, em preparações E- a Catalase reduziu o efeito máximo de contração induzido pelo U46619 (Figura 11). Vários autores demonstraram o papel do H_2O_2 como agente modulador de vias intracelulares envolvidas com o controle do tônus vascular. Por exemplo, SILVA e cols. (2013) verificaram que em aorta de ratos hipertensos 2R-1C a resposta contrátil induzida pela fenilefrina é modulada pelas concentrações de H_2O_2 nessas preparações. De fato, no leito vascular o H_2O_2 parece estar envolvido com a modulação da atividade de enzimas, dentre elas a COX e a eNOS. O H_2O_2 é capaz de induzir contração vascular pelo aumento $[\text{Ca}^{2+}]_c$, ERK1/2 e ROCK (GARCÍA-REDONDO et al., 2015; YANG et al., 1999b). Além disso, as células endoteliais parecem modular a resposta contrátil induzida pelo H_2O_2 , uma vez que ele induz vasoconstrição maior em artérias mesentéricas e aortas sem endotélio em ratos normotensos (WKY) (GAO; LEE, 2001; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 1998). Em aorta de ratos normotensos e SHR, a contração induzida pelo H_2O_2 é dependente da atividade da COX e ativação do receptor TP (GARCÍA-REDONDO et al., 2015; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 1998). Isto ocorre também em artérias coronárias (SANTIAGO et al., 2013). A modulação da atividade da COX pelo H_2O_2 , agindo como um importante modulador da função vasomotora também foi descrita por Gil-Longo e cols. (2005). Além disso, estudos *in vitro* também indicam que o H_2O_2

podem estimular a atividade da COX (KULMACZ et al., 1990). Por outro lado, O H_2O_2 está relacionado com a modulação da atividade da eNOS, produzindo, por meio desse mecanismo, relaxamento vascular, uma vez que a inibição da enzima diminui seu efeito vasodilatador (YANG et al., 1999a; ZEMBOWICZ et al., 1993). Dessa forma, nos vasos sanguíneos o H_2O_2 pode ter efeito contrátil, via ativação da enzima COX e relaxante por meio da modulação da atividade da eNOS. De acordo com os nossos achados, a remoção mecânica do endotélio provoca aumento da potência ao U46619 em aortas isoladas de ratos 2R (Figura 4A) e a remoção do H_2O_2 nessas preparações pela Catalase (Figura 10) diminui o efeito máximo de contração ao U46619 (Figura 11B). Assim, em aorta de ratos 2R, o H_2O_2 poderia estar envolvido com a ativação da COX, contribuindo com o tônus contrátil nessas preparações. Como visto, em aorta E+ de ratos 2R a Catalase não teve efeito sobre a contração induzida pelo U46619, o que pode ser explicado pelo fato de que nessas preparações, além da enzima COX também há presença da eNOS, visto que o endotélio encontra-se intacto. Como o H_2O_2 pode regular a atividade das duas enzimas, a remoção do H_2O_2 parece não alterar o balanço entre a produção de agentes contráteis e relaxantes vasculares.

Em aorta aortas E+ isoladas de ratos 2R-1C, a pré-incubação com Catalase não modificou a resposta contrátil induzida pelo U46619. Entretanto, o Tiron aumentou o efeito máximo de contração induzida pela ativação do receptor TP. Em aortas E-, os agentes antioxidantes não modificaram a contração ao U46619. Diversos estudos indicam que os efeitos das ERO sobre as respostas a diferentes estímulos, ocorre por ação indireta desses agentes nas vias de sinalização celular. Devido a sua elevada reatividade, o O_2^- é capaz de reagir rapidamente com o NO, gerando $ONOO^-$ (GRYGLEWSKI et al., 1986). Especialmente na via da COX, as

ERO possuem papel fundamental na modulação da síntese das prostaglandinas por ação sobre suas respectivas isomerases ou sintases, dentre outros mecanismos (BACHSCHMID et al., 2005).

Em estudo de cultura celular, o H_2O_2 é capaz de inibir a liberação de prostaciclina em neutrófilos (HARLAN; CALLAHAN, 1984). Além disso, o ONOO^- é capaz de inibir a atividade da prostaciclina sintase, acarretando menor produção de prostaciclina (ZOU et al., 1998; ZOU; ULLRICH, 1996). NICHOLSON e cols. (1984) verificaram que em células endoteliais, o U46619 provoca aumento da liberação de prostaciclina de maneira dependente de concentração, e HUNT e cols. (1992) corroboraram com esses achados, evidenciando a relação entre a ativação do receptor TP e o aumento da atividade da COX nesse tipo celular. Classicamente, a prostaciclina possui uma ação vasodilatadora por agir sobre receptores IP que estão acoplados principalmente à proteína G_s (FÉLÉTOU et al., 2011). Entretanto, em situações fisiopatológicas tais como a hipertensão arterial, um aumento na produção de prostaciclina associada com disfunção de receptores IP resulta num comportamento atípico desse prostanóide, que pode atuar como um fator contrátil por passar a ativar receptores TP (GLUAIS et al., 2005; VANHOUTTE, 2011). Dessa forma, os nossos resultados podem ser explicados pelo fato de que a remoção do O_2^- pelo Tiron (Figura 10), impede a formação do ONOO^- , resultante de sua reação com NO. Dessa forma, a ausência do ONOO^- permite a atividade da prostaciclina sintase e consequente geração de prostaciclina, que pode assumir um papel contrátil. A hipótese desse mecanismo é sustentada pelo fato de que em aortas E-, o Tiron não modificou a resposta contrátil ao U46619 em relação ao controle, provavelmente pela ausência do endotélio e, portanto, NO.

A fisiopatologia da hipertensão arterial está relacionada com componentes do sistema imunológico, sendo considerada por diversos autores como uma doença inflamatória crônica. Em aorta de ratos hipertensos SHR ocorre aumento da expressão gênica de NFκB e TNF-α, importantes mediadores inflamatórios (SANZ-ROSA et al., 2005). Além disso, a infusão de Ang II eleva a pressão arterial de camundongos e compromete a vasodilatação induzida pela acetilcolina nas aortas desses animais. Porém, esses efeitos são reduzidos quando utilizados camundongos *knockout* para linfócitos B e T (GUZIK et al., 2007). Nesse sentido, a inflamação vascular contribui de forma importante para manutenção de quadros patológicos como a hipertensão arterial e aterosclerose (SAVOIA; SCHIFFRIN, 2006).

Visto que a síntese das prostaglandinas, dentre elas PGI₂ e TXA₂, é precedida pela formação de PGH₂, via metabolismo da COX, avaliamos possíveis diferenças na expressão proteica das isoformas da COX nas aorta de ratos 2R-1C e 2R, uma vez que a COX está intimamente relacionada a processos inflamatórios (SEIBERT et al., 1994). Como mostra a Figura 13, há maior expressão proteica das duas isoformas da COX, COX-1 e COX-2, em ratos 2R-1C. A remoção do endotélio não modificou a expressão proteica da enzima nessas preparações. Nossos resultados corroboram com o que foi observado por (MARTÍNEZ-REVELLES et al., 2013), que verificaram aumento da expressão proteica da COX-2, mas não da COX-1, em aorta de camundongos hipertensos por Ang II. LIU e COLSA (2015) demonstraram que não existe diferença na expressão proteica da COX-1 entre artérias renais de SHR e normotensos. Esses achados também foram descritos por GRAHAM e cols. (2009), em aorta de ratos SHR com 16 semanas de idade. Porém, nesse mesmo trabalho, verificaram que em ratos SHR de 30 semanas de idade, ocorre aumento da

expressão proteica da COX-1 nas aortas desses animais. Também observaram que existe aumento da expressão proteica da COX-2 em aorta de ratos SHR de maneira independente da idade. Animais com aproximadamente 10 semanas de idade foram utilizados nos nossos experimentos. Assim, esses resultados reforçam as diferenças existentes entre os diversos modelos experimentais de hipertensão arterial.

Diversos estudos relacionam a ativação do receptor TP como um importante modulador da síntese de prostanóides (HUNT et al., 1992; NICHOLSON et al., 1984), o que sugere uma relação entre a ativação do receptor TP e aumento da atividade da COX. De acordo com CHAKRABORTI e cols. (2012), o U46619 é capaz de aumentar a expressão proteica da PLA₂, importante componente da via da síntese das prostaglandinas. No leito vascular, ativação do receptor TP está relacionada com o aumento da $[Ca^{2+}]_c$, o que favorece a atividade das enzimas componentes da via dos prostanóides, gerando EDCFs, como por exemplo o TXA₂ (GLUAIS et al., 2006; TANG et al., 2007; YANG et al., 2002b). Resultados prévios do nosso laboratório verificaram que o estímulo de aortas de ratos hipertensos 2R-1C com fenilefrina é capaz de aumentar os níveis de TXA₂, e esse efeito é maior em preparações com endotélio, indicando um papel importante das células endoteliais nesse processo. Uma vez que o principal objetivo do nosso estudo foi verificar a possível relação entre as ERO e a via das prostaglandinas como moduladores da resposta vascular desencadeada pela ativação do receptor TP no contexto da hipertensão arterial, investigamos se o estímulo de aortas de ratos 2R ou 2R-1C com o U46619 causa o aumento dos níveis de TXA₂.

Verificamos que o estímulo com o U46619 em aortas isoladas de ratos 2R ou 2R-1C com ou sem endotélio não promoveu o aumento da geração de TXA₂ (Figura 16). De maneira especial, os estudos de reatividade vascular são fundamentais para

o avanço nos conhecimentos dos mecanismos intracelulares envolvidos na resposta a diferentes agonistas, possibilitando o uso de ferramentas farmacológicas para elucidar as vias de sinalização intracelulares desencadeadas por diferentes drogas. Nesse sentido, estudos moleculares apresentam-se como importantes ferramentas no complemento de informações necessárias para um entendimento mais refinado de fenômenos biológicos, porém não são secundários. Em análises de curvas concentração-efeito, observamos a resposta induzida por determinada droga, geralmente agonistas. Baseados nas informações obtidas na literatura e por resultados prévios do nosso laboratório, embora não tenhamos observado a produção do TXA₂ pelo estímulo do U46619, realizamos curvas concentração-efeito para o agonista TP em aorta com ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C, na presença do Ibuprofeno (10 µmol/L).

Como observado na Tabela 4, em aorta E+ de ratos 2R, a pré-incubação com Ibuprofeno foi capaz de reduzir os valores potência para a contração induzida pelo U46619. Em aortas E-, o Ibuprofeno foi capaz de reduzir o Emax contrátil ao U46619. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos por BOLLA e cols. (2004), que verificaram que a inibição da enzima COX com Indometacina é capaz de inibir a resposta contrátil ao U46619 em artéria mesentérica de ratos. Tais achados reforçam a hipótese de que o H₂O₂, gerado pela ativação do receptor TP, pode estar envolvido com a ativação da enzima COX, gerando mediadores contráteis, uma vez que a pré-incubação dessas preparações com o inibidor da tromboxano sintase, furegrelato (10 µmol/L), reduziu o efeito máximo de contração ao U46619 (tabela 4, figura 14 A), mesmo em preparações sem endotélio. A contração induzida por metacolina em artérias pulmonares de coelhos é mediada pelo TXA₂ e é abolida pela inibição das enzimas COX e tromboxano sintase, além do antagonista do receptor

TP (BUZZARD et al., 1993). Esses efeitos também são observados em aorta de SHR utilizando o ionóforo de cálcio A23187, como agente contrátil (GLUAIS et al., 2006). Além disso, SEGAL e cols. (1983) observaram que agentes antioxidantes não têm efeito sobre a liberação de TXB₂ (TXA₂) em células polimorfo-nucleares. Assim, nossos achados não excluem a possibilidade de que haja uma relação independente de H₂O₂ entre a ativação do receptor TP e a geração do TXA₂, via aumento da atividade da COX, mesmo sem observarmos diferença estatística na sua produção pelo estímulo com o U46619 (Figura 16), sendo necessários novos estudos para elucidação dessas interações.

Para investigarmos a possível interação entre as ERO e vias de sinalização intracelular envolvidas com a contração induzida pela ativação TP em aortas E+ isoladas de ratos 2R, realizamos protocolos específicos nessas preparações. Como mostra a Tabela 5, a associação do Ibuprofeno com o L-NAME foi capaz de aumentar o valor do pD₂ em relação à pré-incubação das aortas apenas com o Ibuprofeno. Esses achados reforçam a nossa hipótese de que o H₂O₂ possui um efeito de modulação simultânea sobre atividade das enzimas COX e eNOS, na contração ao U46619, uma vez que o L-NAME foi capaz de reverter a redução dos valores de pD₂ provocada pelo Ibuprofeno (Tabela 5, Figura 17), sugerindo que a inibição da atividade da enzima eNOS pode reestabelecer o balanço de síntese de fatores vasoativos produzidos pelas células endoteliais. A associação do Ibuprofeno e Tiron reduziu os valores de pD₂ em relação ao grupo controle (sem droga), mas não é diferente do valor de pD₂ em aortas pré-incubadas apenas com o L-NAME (Tabela 5, Figura 17). Esses resultados estão de acordo com o observado na Figura 10B e corroboram com fato de que o H₂O₂ pode ser proveniente de outras fontes além da dismutação do O₂⁻, via SOD (BRETÓN-ROMERO; LAMAS, 2014; CAI,

2005; SIES, 2014). Dessa forma, o H_2O_2 poderia exercer efeito modulador da atividade da eNOS, mesmo em aortas pré-incubadas com a associação de Ibuprofeno e o sequestrador de O_2^- , Tiron. Entretanto, também é possível que o efeito provocado por essa associação de drogas seja resultante de uma maior biodisponibilidade do NO (GRYGLEWSKI et al., 1986), permitindo que esse agente exerça um papel anticontrátil. Essa sugestão converge com a os nossos achados de que o estímulo TP estimula a produção de NO (Figura 5), e que esse participa da contração ao U46619 em aortas E+ de ratos 2R, ainda que a inibição da eNOS nessas preparações não causa mudança nos valores de efeito máximo ou pD_2 para resposta contrátil induzida pelo U46619 (Figura 8), como já discutido. Dessa forma, estudos complementares são necessários a fim de elucidar esses mecanismos.

Em aortas E+ isoladas de ratos 2R-1C, o Ibuprofeno não modificou a resposta contrátil induzida pelo agonista TP, U46619 (Figura 15). Esse resultado indica que, nessas preparações, não existe relação direta entre a ativação desse receptor com o aumento da atividade da COX, reforçando a nossa suposição de que essa modulação ocorre via ERO, principalmente o O_2^- . A pré-incubação de aortas E+ isoladas de ratos 2R-1C com Tiron aumentou a contração ao U46619 (Figura 12A), o que pode estar relacionado com um aumento da atividade da prostaciclina sintase (devido à redução dos níveis de ONOO^- , inibidor da enzima) e liberação desse mediador como agente contrátil (GLUAIS et al., 2006; VANHOUTTE, 2011).

Para testarmos a nossa hipótese, realizamos protocolos específicos nessas preparações. A associação de Tiron e o inibidor não seletivo da enzima NO-Sintase, L-NAME, não modificou o efeito contrátil induzido pelo U46619. Uma vez que o ONOO^- é derivado principalmente da reação do NO com o O_2^- , a inibição da síntese do NO (provocada pelo L-NAME) associada com o sequestro do O_2^- pelo Tiron,

poderia reestabelecer o equilíbrio de fatores vasoativos derivados do endotélio estimulados pela ativação do receptor TP. Dessa forma, a resposta contrátil induzida pelo agonista TP nessas preparações não é alterada em relação ao controle (sem droga). Por outro lado, a pré-incubação de aortas E+ isoladas de ratos 2R-1C com a associação de Tiron e o inibidor não seletivo da COX, Ibuprofeno, reduziu o Emax de contração ao U46619. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que, o aumento da atividade da enzima COX estimula a produção de fatores EDRFs, mas também de EDCFs, tais como o TXA_2 (WONG; VANHOUTTE, 2010). Assim, sob ativação do receptor TP, a inibição da COX (pelo Ibuprofeno) associada ao sequestro de O_2^- pelo Tiron pode acarretar em uma redução de EDCFs, com redução do efeito máximo de contração ao U46619 observado. Esses resultados corroboram com a nossa hipótese de que a ativação do receptor TP modula a atividade da COX, via ERO, principalmente o O_2^- , em aorta E+ de ratos 2R-1C. De forma complementar a esses achados, experimentos em aortas E- isoladas de ratos 2R-1C estão sendo realizados e serão discutidos na versão definitiva desse trabalho.

A maioria dos estudos que investigam os mecanismos desencadeados pela ativação do receptor TP sobre a atividade vasomotora concentra-se na elucidação de vias intracelulares relacionadas com a vasoconstrição. Poucos estudos descrevem os efeitos diretos da ativação do receptor TP no que diz respeito ao relaxamento vascular, principalmente no contexto da hipertensão arterial. Nesse sentido, uma vez que observamos uma série peculiaridades na sinalização celular desencadeada pela ativação do receptor TP na contração vascular em ratos 2R e 2R-1C, avaliamos o possível papel da ativação desse receptor sobre o relaxamento vascular induzido pela acetilcolina. Para isso, realizamos curvas concentração-efeito

para a acetilcolina em aortas E+ isoladas de ratos 2R ou 2R-1C, pré-contraídas com o agonista TP, U46619.

A acetilcolina promoveu maior relaxamento vascular em aortas pré-contraídas com 10 nmol/L de U46619 do que em aortas pré-contraídas com 100 nmol/L de U46619. Não houve diferença nos valores de EM ou pD_2 entre aorta de ratos 2R-1C e 2R quando pré-contraídas com 100 nmol/L de U46619. Entretanto, quando pré-contraídas com 10 nmol/L de U46619, as aortas de ratos 2R-1C apresentaram menor relaxamento à acetilcolina. Esses achados podem ser explicados pelo fato de que a ativação do receptor TP está associada com o bloqueio de canais para K^+ (COGOLLUDO et al., 2006), um dos principais mecanismos envolvidos com a vasodilatação promovida pelo NO (DE LIMA et al., 2014). Em aorta de ratos 2R, o relaxamento induzido pela acetilcolina pelo NO foi de aproximadamente 97% (Tabela 5). Nossos resultados corroboram com os achados obtidos por Plane e cols. (1996), que verificaram um relaxamento aproximadamente 97% à acetilcolina de em aortas de ratos pré-contraídas com U46619. Também nesse trabalho, os autores verificaram que esse relaxamento é dependente da atividade da eNOS. No nosso trabalho, a menor vasodilatação induzida pela acetilcolina observada em aorta de ratos 2R-1C (aproximadamente 58%, Tabela 5) pode ser explicada pela disfunção endotelial e consequente prejuízo no relaxamento dependente do endotélio, característico da hipertensão arterial. Esses resultados estão de acordo com resultados prévios do nosso laboratório, que mostram um prejuízo no relaxamento vascular dependente e independente do endotélio (BONAVENTURA et al., 2005; CALLERA et al., 2000; RODRIGUES et al., 2007, 2008; SENDÃO OLIVEIRA; BENDHACK, 2004).

Como houve diferença no relaxamento induzido pela acetilcolina em aortas de ratos 2R-1C e 2R quando a concentração do U46619 como agonista pré-contrátil, foi de 10 nmol/L, utilizamos essa concentração para a investigação das vias intracelulares envolvidas nesse processo. Avaliamos como as ERO e a atividade da COX poderiam modular o efeito vasodilatador da acetilcolina e sua relação com a hipertensão arterial. Para isso, realizamos curvas concentração-efeito para a acetilcolina em aortas de ratos 2R e 2R-1C, pré-contráidas com o agonista TP, U46610 (10 nmol/L), na presença dos agentes antioxidantes Tiron (100 μ mol/L) ou Catalase (300 U/mL), ou inibidor não seletivo da enzima COX, Ibuprofeno (10 μ mol/L).

Como observado na Figura 20, em aorta isoladas de ratos 2R a pré-incubação com Tiron ou Ibuprofeno não alterou o efeito relaxante à acetilcolina. Entretanto, a Catalase foi capaz de reduzir o efeito máximo de relaxamento. Esses resultados corroboram com a nossa hipótese de que, sob estímulo do receptor TP, o H_2O_2 é importante agente modulador da atividade da eNOS, uma vez que a sua remoção, pode acarretar numa menor produção de NO, reduzindo o efeito relaxante induzido pela acetilcolina. Como já discutido nesse trabalho, o H_2O_2 pode atuar como agente modulador da atividade da enzima eNOS (YANG et al., 1999a; ZEMBOWICZ et al., 1993), modificando o relaxamento dependente do endotélio, induzido por diferente agentes.

Em aorta de ratos 2R-1C, Catalase ou Ibuprofeno não modificou a resposta relaxante à acetilcolina (Figura 20). A pré-incubação dessas preparações com Tiron apresentou uma tendência em aumentar o relaxamento a esse agonista, entretanto não observamos diferença estatística, comparado ao grupo controle. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que o sequestro de O_2^- promovido pelo

Tiron pode aumentar a biodisponibilidade do NO (GRYGLEWSKI et al., 1986), favorecendo seu efeito relaxante. Porém o bloqueio de canais para K^+ pela ativação do receptor TP, promovido pelo uso do U46619 como agente pré-contrátil, não favorece o efeito vasodilatador via NO, o que pode explicar a ausência da diferença estatística observada. Por outro lado, esses resultados não descartam a nossa hipótese de que nessas preparações, sob estímulo do receptor TP, a redução de O_2^- pode estar associada com o aumento da síntese de prostaciclina, uma vez que o fator relacionado com a manutenção do tônus contrátil nessa situação seja de fato a prostaciclina por ação sobre receptores TP. GRAHAM e cols. (2009) verificaram que o prejuízo no relaxamento induzido pela acetilcolina observado em ratos hipertensos (SHR), é revertido pelo antagonismo do receptor TP em aortas pré-contraídas com fenilefrina. Em modelo de hipertensão DOCA-sal, o menor relaxamento à acetilcolina em aorta de ratos hipertensos também é revertido pelo uso de inibidor da COX e antagonista do receptor TP (CORDELLINI, 1999). Assim, estudos complementares serão necessários para elucidarmos os mecanismos envolvidos nesse processo.

6 SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Em conjunto, nossos resultados sugerem que existe relação entre as ERO e a atividade da COX, em resposta à ativação do receptor TP pelo agonista U46619, em aorta de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C). Em aortas com endotélio de ratos 2R-1C, a resposta contrátil induzida pelo agonista TP foi potencializada pelo Tiron.

Em aortas de ratos 2R-1C, verificamos menor expressão gênica do receptor TP e maior expressão proteica da COX, mas não houve diferença nos níveis plasmáticos de TXA₂ entre ratos 2R-1C e 2R.

Existe diferença no perfil da curva concentração-efeito de contração estimulada com o agonista (U46619) em aorta de ratos 2R-1C e 2R, indicando diferença na sinalização celular ativada pela ativação do receptor TP entre os grupos. Observamos também que a remoção do endotélio aumenta potência do U46619, em aorta de ratos 2R e 2R-1C.

Em células endoteliais, verificamos que o U46619 é capaz de promover aumento na [NO]c. Em aorta de ratos 2R, o inibidor não seletivo da NO- Sintase (L-NAME) alterou o perfil da curva concentração-efeito da contração induzida pelo U46619.

Em células endoteliais e do músculo liso vascular, a ativação do receptor TP promoveu aumento das ERO, em parte derivadas da atividade da COX. Em aortas de ratos 2R, o H₂O₂ parece estar envolvido com a modulação da atividade das enzimas COX e eNOS na contração induzida pelo U46619, uma vez que em preparações sem endotélio, a Catalase (enzima que degrada o H₂O₂ em O₂ e água) reduz a contração ao agonista, o que não foi observado em preparações com

endotélio. Além disso, na presença do endotélio, a contração ao U46619 apresenta valores menores de pD_2 na presença do inibidor da COX (Ibuprofeno), cujos efeitos foram inibidos pela associação Ibuprofeno e L-NAME.

Em aorta de ratos 2R-1C, o O_2^- parece ter efeito modulador sobre a síntese de fatores contráteis via COX na contração ao U46619, uma vez que em aortas com endotélio, o Tiron aumentou a contração ao U46619. Este efeito não ocorreu em preparações sem endotélio, na presença do Tiron ou pelo Ibuprofeno em aortas com ou sem endotélio. Porém, na presença de Tiron e Ibuprofeno, a contração ao U46619 foi menor em aorta de ratos 2R-1C com endotélio intacto. Nossos resultados sugerem que as ERO estão envolvidas com a modulação da síntese de agentes contráteis, atividade da COX, e que as células endoteliais tem papel relevante nesse processo.

Altas concentrações do U46619 como agente pré-contrátil reduz o relaxamento à acetilcolina, em relação às preparações pré-contraídas com concentrações menores do agonista. Quando pré-contraídas com 10 nmol/L de U46619, o relaxamento à acetilcolina foi menor em aortas de ratos 2R-1C em relação ao grupo 2R. A pré-incubação com Catalase reduziu o relaxamento à acetilcolina em aorta de ratos 2R, o que corrobora com a nossa hipótese de que nessas preparações, sob estímulo do receptor TP, o H_2O_2 parece modular a síntese de agentes vasoativos.

Fig. 22. Efeitos da ativação do receptor TP induzidos pelo agonista U46619, em aortas isoladas de ratos normotensos (2R). A ativação do receptor TP promove a geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas células endoteliais (CE) e do músculo liso vascular (CMLV). O H_2O_2 ativa as enzimas ciclooxigenase (COX) (CE e CMLV) e NO-Sintase endotelial (eNOS), estimulando a produção de tromboxano A₂ (TXA₂) e NO, respectivamente. O TXA₂ produzido pode ativar o receptor TP nas CMLVs, exercendo efeito contrátil sobre essas células. O NO gerado pode exercer efeito anti-contrátil sobre a contração ao U46619.

NO: óxido nítrico; AA: ácido araquidônico; PLA₂: fosfolipase A₂; PGH₂: prostaglandina H₂; TXAS: tromboxano sintase.

Fig. 23. Efeitos da ativação do receptor TP pelo agonista U46619, em aortas isoladas de ratos hipertensos renais (2R-1C). Em aorta de ratos 2R-1C a contração ao U46619 é modulada pela produção de prostanóides vasoativos nas células endoteliais (CE). A ativação do receptor TP promove a geração de ânion superóxido (O_2^-) que interage com o NO e forma peroxinitrito ($ONOO^-$), que inibe a prostaciclina sintase (PGIS) diminuindo a produção de prostaciclina (PGI_2) e pode ativar receptores TP, exercendo efeito vasoconstritor.

CMLV: célula do músculo liso vascular; $[Ca^{2+}]_c$: concentração citosólica de cálcio, eNOS: NO-Sintase endotelial; AA: ácido araquidônico; PLA₂: fosfolipase A₂; PGH₂: prostaglandina H₂; TXAS: tromboxano sintase, TXA₂: tromboxano A₂.

7 CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados sugerem que as ERO possuem importante papel na modulação da síntese de agentes vasoativos derivados da atividade da COX na contração de aortas de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C), induzida pelo agonista do receptor TP, U46619.

Em aorta de ratos 2R, o H_2O_2 regula a atividade das enzimas COX e eNOS. Por outro lado, em aorta de ratos 2R-1C, a regulação da atividade da COX pelas ERO depende do endotélio e modula negativamente a síntese de EDCFs. Assim, a produção de ERO pela ativação do receptor TP pode representar efeito vasoprotetor na hipertensão renal.

8 REFERÊNCIAS

- AMARAL, J. H. et al. Consistent antioxidant and antihypertensive effects of oral sodium nitrite in DOCA-salt hypertension. **Redox Biology**, v. 5, p. 340–346, 2015.
- ARCHER, S. L. et al. Molecular identification of the role of voltage-gated K⁺ channels, Kv1.5 and Kv2.1, in hypoxic pulmonary vasoconstriction and control of resting membrane potential in rat pulmonary artery myocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 11, p. 2319–2330, 1998.
- AUCH-SCHWELK, W.; KATUSIC, Z. S.; VANHOUTTE, P. M. Contractions to oxygen-derived free radicals are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 13, n. 6 II, p. 859–864, 1989.
- AUCH-SCHWELK, W.; KATUSIC, Z. S.; VANHOUTTE, P. M. Thromboxane A₂ receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions. **Hypertension**, v. 15, n. 6 II, p. 699–703, 1990.
- BACHSCHMID, M.; SCHILDKNECHT, S.; ULLRICH, V. Redox regulation of vascular prostanoid synthesis by the nitric oxide-superoxide system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, n. 1, p. 536–542, 2005.
- BERGSTRÖM, S.; CARLSON, L. A.; WEEKS, J. R. The prostaglandins: a family of biologically active lipids. **Pharmacological Reviews**, v. 20, n. 1, p. 1–48, 1968.
- BHAGWAT, S. S. et al. Synthesis and structure of the platelet aggregation factor thromboxane A₂. **Nature**, v. 315, n. 6019, p. 511–513, 1985.
- BOLLA, M. et al. Cyclooxygenase involvement in thromboxane-dependent contraction in rat mesenteric resistance arteries. **Hypertension**, v. 43, n. 6, p. 1264–1269, 2004.
- BONAVENTURA, D. et al. Decreased vasodilation induced by a new nitric oxide donor in two kidney, one clip hypertensive rats is due to impaired K⁺ channel activation. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 32, n. 5–6, p. 478–481, 2005.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

- BRETÓN-ROMERO, R.; LAMAS, S. Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. **Redox Biology**, v. 2, n. 1, p. 529-534, 2014.
- BUZZARD, C. J.; PFISTER, S. L.; CAMPBELL, W. B. Endothelium-dependent contractions in rabbit pulmonary artery are mediated by thromboxane A₂. **Circulation Research**, v. 72, n. 5, p. 1023–1034, 1993.
- CAI, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. **Cardiovascular Research**, v. 68, n. 1, p. 26-36, 2005.
- CALLERA, G. E.; VARANDA, W. A.; BENDHACK, L. M. Impaired relaxation to acetylcholine in 2K-1C hypertensive rat aortas involves changes in membrane hyperpolarization instead of an abnormal contribution of endothelial factors. **General Pharmacology**, v. 34, n. 6, p. 379–389, 2000.
- CAMERON, A. C.; LANG, N. N.; TOUYZ, R. M. Drug Treatment of Hypertension: Focus on Vascular Health. **Drugs**, v. 76, n. 16, p. 1529–1550, 2016.
- CASTILLO-HERNÁNDEZ, M. C. et al. Extraendothelial and constitutive COX-2 expression is involved in the contractile effect of angiotensin II in the rat aorta. **Autonomic and Autacoid Pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 205–211, 2010.
- CASTRO, M. M. et al. Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 9, p. 1298–1307, 2009.
- CHAKRABORTI, S. et al. Role of PKC α -p³⁸MAPK-G α axis in NADPH oxidase derived O₂⁻-mediated activation of cPLA₂ under U46619 stimulation in pulmonary artery smooth muscle cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 523, n. 2, p. 169–80, 2012.
- CHENG, J. B.; SHIBATA, S. Vascular relaxation in the spontaneously hypertensive rat. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 3, n. 5, p. 1126–40, 1981.
- COGOLLUDO, A. et al. Role of Reactive Oxygen Species in K_v Channel Inhibition and Vasoconstriction Induced by TP Receptor Activation in Rat Pulmonary Arteries. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1091, n. 1, p. 41–51, 2006.
- CORDELLINI, S. Endothelial dysfunction in DOCA-salt hypertension: Possible involvement of prostaglandin endoperoxides. **General Pharmacology**, v. 32, n. 3, p. 315–320, 1999.

- DE LIMA, R. G. et al. Ruthenium complexes as NO donors for vascular relaxation induction. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 9628-9654, 2014.
- DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 18, p. 13057-13060, 1994.
- FEITOZA, P. R. Efeitos vasculares induzidos pelo ionóforo de cálcio A23187 em aorta de ratos hipertensos renais. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2015.
- FÉLÉTOU, M.; HUANG, Y.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 3, p. 894–912, 2011.
- FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M.; VERBEUREN, T. J. The thromboxane/endoperoxide receptor (TP): the common villain. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 55, n. 4, p. 317–32, 2010.
- FLEMING, I. et al. Phosphorylation of Thr⁴⁹⁵ Regulates Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity. **Circulation Research**, v. 88, n. 11, p. e68–e75, 2001.
- FLEMING, I.; BUSSE, R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 284, n. 1, p. R1–R12, 2003.
- FRANCOIS, H. et al. Role for Thromboxane Receptors in Angiotensin-II-Induced Hypertension. **Hypertension**, v. 43, n. 2 II, p. 364 - 369, 2004.
- FRANCOIS, H. et al. A role for the thromboxane receptor in L-NAME hypertension. **American Journal Physiology. Renal Physiology**, v. 295, n. 4, p. F1096-102, 2008.
- FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373–376, 1980.
- GAO, Y. J.; LEE, R. M. Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane A₂ production. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, n. 8, p. 1639–46, 2001.

- GARCÍA-REDONDO, A. B. et al. c-Src, ERK1/2 and Rho kinase mediate hydrogen peroxide-induced vascular contraction in hypertension. **Journal of Hypertension**, v. 33, n. 1, p. 77–87, 2015.
- GIL-LONGO, J.; GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, C. Characterization of four different effects elicited by H₂O₂ in rat aorta. **Vascular Pharmacology**, v. 43, n. 2, p. 128–138, 2005.
- GLUAIS, P. et al. Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin. **British Journal of Pharmacology**, v. 146, p. 834–845, 2005.
- GLUAIS, P. et al. In SHR aorta, calcium ionophore A-23187 releases prostacyclin and thromboxane A₂ as endothelium-derived contracting factors. **American Journal of Pharmacology**, v. 291, n. 5, p. H2255–H2264, 2006.
- GOLDBLATT, H. Studies on experimental hypertension: The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. **Journal of Experimental Medicine**, v. 59, n. 3, p. 347–379, 1934.
- GRAHAM, D. A.; RUSH, J. W. E. Cyclooxygenase and thromboxane/prostaglandin receptor contribute to aortic endothelium-dependent dysfunction in aging female spontaneously hypertensive rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 107, n. 4, p. 1059–1067, 2009.
- GRIENDLING, K. K. et al. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. **Circulation Research**, v. 74, n. 6, p. 1141–1148, 1994.
- GRIENDLING, K. K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circulation Research**, v. 86, n. 5, p. 494–501, 2000.
- GRYGLEWSKI, R. J.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. **Nature**, v. 320, n. 6061, p. 454–456, 1986.
- GUZIK, T. J. et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 10, p. 2449–2460, 2007.
- HARLAN, J. M.; CALLAHAN, K. S. Role of hydrogen peroxide in the neutrophil-mediated release of prostacyclin from cultured endothelial cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 74, n. 2, p. 442–448, 1984.

- HERNANZ, R. et al. New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension. **Clinical Science**, v. 126, n. 2, p. 111–121, 2014.
- HIMMELSTEIN, S. I.; KLOTMAN, P. E. The role of thromboxane in two-kidney, one-clip Goldblatt hypertension in rats. **The American Journal of Physiology**, v. 257, n. 2 Pt 2, p. F190-6, 1989.
- HILL A. V. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. **The Journal of Physiology**. 40: iv–vii, 1910.
- HIRATA, T. et al. Two thromboxane A₂ receptor isoforms in human platelets. Opposite coupling to adenylyl cyclase with different sensitivity to Arg⁶⁰ to Leu mutation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 4, p. 949–956, 1996.
- HOLLOWAY, E. T.; BOHR, D. F. Reactivity of Vascular Smooth Muscle in Hypertensive Rats. **Circulation Research**, v. 33, n. 6, p. 678–685, 1973.
- HUSAIN, K. et al. Chronic ethanol ingestion induces aortic inflammation/oxidative endothelial injury and hypertension in rats. **Human and Experimental Toxicology**, v. 30, n. 8, p. 930–939, 2011.
- HUNT, J. A. et al. Characterization of the thromboxane receptor mediating prostacyclin release from cultured endothelial cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 8, p. 1747–1752, 1992.
- ISCHIROPOULOS, H.; AL-MEHDI, A. B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. **FEBS letters**, v. 364, n. 3, p. 279–82, 1995.
- KARAA, A. et al. Differential Effects of Oxidative Stress on Hepatic Endothelial and Kupffer Cell Eicosanoid Release in Response to Endothelin-1. **Microcirculation**, v. 13, n. 6, p. 457–466, 2006.
- KORBECKI, J. et al. The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 64, n. 4, p. 409-421, 2013.
- KULMACZ, R. J. et al. Cyclooxygenase initiation assay for hydroperoxides. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 431–8, 1990.
- LASSÈGUE, B.; SAN MARTÍN, A.; GRIENDLING, K. K. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. **Circulation Research**, v. 110, p. 1364-1390, 2012.

- LEMOS, V. S. et al. Angiotensin-(1-7) is involved in the endothelium-dependent modulation of phenylephrine-induced contraction in the aorta of mRen-2 transgenic rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, n. 7, p. 1743–1748, 2002.
- LIEL, N. et al. Increased platelet thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptors in patients with pregnancy induced hypertension. **Thrombosis Research**, v. 70, n. 3, p. 205–210, 1993.
- LIU, C. Q. et al. Thromboxane prostanoid receptor activation impairs endothelial nitric oxide-dependent vasorelaxations: The role of Rho kinase. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, n. 4, p. 374–381, 2009.
- LIU, D. et al. A vasoconstrictor response to COX-1-mediated prostacyclin synthesis in young rat renal arteries that increases in pre-hypertensive conditions. **American Journal of Physiology**, v. 309, n. 5, p. H804–H811, 2015.
- LOPERENA, R.; HARRISON, D. G. Oxidative Stress and Hypertensive Diseases. **Medical Clinics of North America**, v. 101, n. 1, p. 169–193, 2017.
- LÜSCHER, T. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**, v. 8, n. 4, p. 344–348, 1986.
- MACLEAN, M. R. et al. Contractile responses to human urotensin-II in rat and human pulmonary arteries: effect of endothelial factors and chronic hypoxia in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, n. 2, p. 201–204, 2000.
- MARTINEZ-MALDONADO, M. Pathophysiology of renovascular hypertension. **Hypertension**, v. 17, n. 5, p. 707–719, 1991.
- MARTÍNEZ-REVELLES, S. et al. Reciprocal Relationship Between Reactive Oxygen Species and Cyclooxygenase-2 and Vascular Dysfunction in Hypertension. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 18, n. 1, p. 51–65, 2013.
- MCCABE, T. J. et al. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain “calcium-independent” eNOS activation by phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 9, p. 6123–6128, 2000.
- MONTENEGRO, M. F. et al. Sodium nitrite downregulates vascular NADPH oxidase and exerts antihypertensive effects in hypertension. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 1, p. 144–152, 2011.

- MUZAFFAR, S. et al. Iloprost inhibits superoxide formation and gp₉₁ phox expression induced by the thromboxane A₂ analogue U46619, 8-isoprostane F_{2α}, prostaglandin F_{2α}, cytokines and endotoxin in the pig pulmonary artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, n. 3, p. 488–496, 2004.
- NAKAHATA, N. Thromboxane A₂: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 118, n. 1, p. 18–35, 2008.
- NICHOLSON, N. S. et al. Effect of the stable endoperoxide analog u-46619 on prostacyclin production and cyclic amp levels in bovine endothelial cells. **Thrombosis Research**, v. 35, p. 183–192, 1984.
- NUNES, V. . et al. Influence of enalapril on the endothelial function of DOCA-salt hypertensive rats. **General Pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 117–125, 2000.
- PALMER, M. A.; PIPER, P. J.; VANE, J. R. The release of rabbit aorta contracting substance (RCS) from chopped lung and its antagonism by anti-inflammatory drugs. **British Journal of Pharmacology**, v. 40, n. 3, p. 581P–582P, 1970.
- PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524–526, 1987.
- PARAVICINI, T.; TOUYZ, R. Redox signaling in hypertension. **Cardiovascular Research**, v. 71, n. 2, p. 247–258, 2006.
- PLANE, F.; GARLAND, C. J. Influence of contractile agonists on the mechanism of endothelium-dependent relaxation in rat isolated mesenteric artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 119, p. 191–193, 1996.
- RAPOPORT, R. M.; MURAD, F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. **Circulation Research**, v. 52, n. 3, p. 352–7, 1983.
- REDON, J. et al. Antioxidant Activities and Oxidative Stress Byproducts in Human Hypertension. **Hypertension**, v. 41, n. 5, p. 1096–1101, 2003.
- RODRIGUES, G. J. et al. Caveolae Dysfunction Contributes to Impaired Relaxation Induced by Nitric Oxide Donor in Aorta from Renal Hypertensive Rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 323, n. 3, p. 831–837, 2007.

- RODRIGUES, G. J. et al. Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. **Nitric Oxide**, v. 18, n. 3, p. 176–183, 2008.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, M. A. et al. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. **British Journal of Pharmacology**, v. 125, n. 6, p. 1329–1335, 1998.
- SALTER, M.; KNOWLES, R.; MONCADA, S. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent nitric. **FEBS Letters**, v. 291, n. 1, p. 145–149, 1991.
- SANTIAGO, E. et al. Signaling pathways involved in the H_2O_2 -induced vasoconstriction of rat coronary arteries. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 60, p. 136–146, 2013.
- SANZ-ROSA, D. et al. Effect of AT_1 receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: role of NF- κB /I κB system. **American Journal of Physiology**, v. 288, p. H111–H115, 2005.
- SAVOIA, C.; SCHIFFRIN, E. L. Inflammation in hypertension. **Current Opinion in Internal Medicine**, v. 5, n. 3, p. 245–251, 2006.
- SCHAFFENBURG, C. A. Device to Control Constriction of Main Renal Artery for Production of Hypertension in Small Animals. **Experimental Biology and Medicine**, v. 101, n. 4, p. 676–677, 1959.
- SEGAL, M. L. et al. The role of reactive oxygen species in thromboxane B_2 generation by polymorphonuclear leukocytes. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 102, n. 5, p. 788–94, 1983.
- SEIBERT, K. et al. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 25, p. 12013–7, 1994.
- SENDÃO OLIVEIRA, A. P.; BENDHACK, L. M. Relaxation Induced by Acetylcholine Involves Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in 2-Kidney 1-Clip Hypertensive Rat Carotid Arteries. **Pharmacology**, v. 72, n. 4, p. 231–239, 2004.
- SIES, H. Role of Metabolic H_2O_2 Generation: REDOX SIGNALING AND OXIDATIVE STRESS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 13, p. 8735–8741, 2014.

- SILVA, B. R. et al. Hydrogen peroxide modulates phenylephrine-induced contractile response in renal hypertensive rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 721, n. 1–3, p. 193–200, 2013.
- SILVA, B. R. et al. Phenylephrine activates eNOS Ser¹¹⁷⁷ phosphorylation and nitric oxide signaling in renal hypertensive rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 738, p. 192–199, 2014.
- SMITH, W. L.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 145–82, 2000.
- SMYTH, E. M. et al. Prostanoids in health and disease. **The Journal of Lipid Research**, v. 50, n. Supplement, p. S423–S428, 2008.
- SPECTOR, S. et al. Vascular smooth muscle reactivity in normotensive and hypertensive rats. **Science**, v. 166, n. 3910, p. 1300–1, 1969.
- SU, J. B. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. **World Journal of Cardiology**, v. 7, n. 11, p. 719–741, 2015.
- TANG, E. H. C. et al. Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, n. 1, p. 15–23, 2007.
- TANG, E. H. C.; VANHOUTTE, P. M. Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. **Physiological Genomics**, v. 32, n. 3, p. 409–418, 2007.
- THORIN, E.; ATKINSON, J. Modulation by the endothelium of sympathetic vasoconstriction in an *in vitro* preparation of the rat tail artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 111, n. 1, p. 351–7, 1994.
- TOPPER, J. N. et al. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 19, p. 10417–22, 1996.
- TSAO, P.; VON ZASTROW, M. Downregulation of G protein-coupled receptors. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 10, n. 3, p. 365–369, 2000.

- VALENTIN, F.; FIELD, M. C.; TIPPINS, J. R. The Mechanism of Oxidative Stress Stabilization of the Thromboxane Receptor in COS-7 Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 9, p. 8316–8324, 2004.
- VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. CYCLOOXYGENASES 1 AND 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 97–120, 1998.
- VANHOUTTE, P. M. Endothelium-Dependent Contractions in Hypertension: When Prostacyclin Becomes Ugly. **Hypertension**, v. 57, n. 3, p. 526–531, 1 mar. 2011.
- WANG, D. et al. Angiotensin II infusion alters vascular function in mouse resistance vessels: Roles of O_2^- and endothelium. **Journal of Vascular Research**, v. 43, n. 1, p. 109–119, 2005.
- WHO. A Global Brief on Hypertension. **A Global Brief on Hypertension**, v. 1, n. 4815, p. 40, 18 abr. 2013.
- WILSON, S. J. et al. Activation-dependent stabilization of the human thromboxane receptor: role of reactive oxygen species. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. 6, p. 1047–1056, 2009.
- WONG, M. S.-K.; VANHOUTTE, P. M. COX-mediated endothelium-dependent contractions: from the past to recent discoveries. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 31, n. 9, p. 1095–1102, 2010.
- WU, R. et al. Cyclo-Oxygenase-2 Knockout Genotype in Mice Is Associated With Blunted Angiotensin II-Induced Oxidative Stress and Hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 24, n. 11, p. 1239–1244, 2011.
- YANG, D. et al. Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 136, n. 1, p. 104–110, 2002.
- YANG, D. et al. A Diffusible Substance(s) Mediates Endothelium-Dependent Contractions in the Aorta of SHR. **Hypertension**, v. 41, n. 1, p. 143–148, 1 jan. 2003.
- YANG, Z.-W. et al. Hydrogen peroxide-induced endothelium-dependent relaxation of rat aorta involvement of Ca^{2+} and other cellular metabolites. **General Pharmacology**, v. 33, n. 4, p. 325–36, 1999a.

- YANG, Z. WEI et al. Hydrogen peroxide induces contraction and raises $[Ca^{2+}]_i$ in canine cerebral arterial smooth muscle: Participation of cellular signaling pathways. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 360, n. 6, p. 646–653, 1999b.
- YUAN, X. J. Voltage-gated K^+ currents regulate resting membrane potential and $[Ca^{2+}]_i$ in pulmonary arterial myocytes. **Circulation Research**, v, 77, n. 2, p. 370-378, 1995.
- ZEMBOWICZ, A. et al. Involvement of nitric oxide in the endothelium-dependent relaxation induced by hydrogen peroxide in the rabbit aorta. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n. 1, p. 151–158, 1993.
- ZHANG, M. et al. Activation of NAD(P)H Oxidases by Thromboxane A_2 Receptor Uncouples Endothelial Nitric Oxide Synthase. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 1, p. 125–132, 2011.
- ZOU, M. H. et al. Interleukin 1β decreases prostacyclin synthase activity in rat mesangial cells via endogenous peroxynitrite formation. **The Biochemical Journal**, v. 336 Pt 2, p. 507–12, 1998.
- ZOU, M. H.; ULLRICH, V. Peroxynitrite formed by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide selectively inhibits bovine aortic prostacyclin synthase. **FEBS Letters**, v. 382, n. 1–2, p. 101–104, 1996.