

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**BERNAH MATHIAS FAHNING**

**Efeitos da ativação do receptor de angiotensina II nas células  
endoteliais e células do músculo liso vascular de aortas de ratos  
hipertensos renais**

Ribeirão Preto

2021

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**BERNAH MATHIAS FAHNING**

**Efeitos da ativação do receptor de angiotensina II nas células  
endoteliais e células do músculo liso vascular de aortas de ratos  
hipertensos renais**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão  
Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em  
Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e  
Sintéticos

**Orientadora: Profa. Dra. Lusiane Maria Bendhack**

Ribeirão Preto

2021

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

Fahning, Bernah Mathias

Efeitos da ativação do receptor de angiotensina II nas células endoteliais e células do músculo liso vascular de aortas de ratos hipertensos renais. Ribeirão Preto, 2021.  
65 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Bendhack, Lusiane Maria.

1. Hipertensão. 2. Angiotensina. 3. Aorta.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Bernah Mathias Fahning

Efeitos da ativação do receptor de angiotensina II nas células endoteliais e células do músculo liso vascular de aortas de ratos hipertensos renais.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico este trabalho à Gabriela e à Xica, minhas companheiras!*

## Agradecimentos

Neste momento de encerramento de ciclo, é sempre bom lembrar e agradecer quem esteve ao nosso lado, incentivando, apoiando, sendo suporte e torcendo por mim.

Primeiramente agradeço a Deus pelo privilégio de poder estudar em uma universidade referência em pesquisa científica. Por mais que tudo não saia como nós planejamos, é no planejamento dEle que devemos confiar.

Agradeço à minha mãe, por ter sempre me incentivado a ir pelo caminho dos estudos. Esta vitória também é sua!

À minha irmã e amiga Bárbara, por ser sempre a minha torcida, estar sempre ao meu lado, mesmo à distância. Por ter me transformado em tio/padrinho de duas preciosidades às quais eu tento ser referência de caráter e confiança.

Estendo o agradecimento à minha família Mathias Fahning, minhas avós Delourdes (*in memorian*) e Jozilda, meu avô Albino e Norival, meu Pai, madrasta, irmãs, minhas tias, tios, primos, primas e agregados. Família é a base da vida e tenho certeza que tenho uma base sólida!

À Gabriela Bragagnollo, minha esposa, parceira, melhor amiga, confidente, amor da vida, a melhor companhia que eu podia ter. Um presente de Deus. Só nós sabemos o que passamos para chegarmos até aqui e, com certeza, juntos conquistamos e vamos conquistar muito mais! Amo você! Aproveito para agradecer pela sogra e cunhada maravilhosas que ganhei, além da Rodrigada inteira que me recebeu de braços abertos.

Aos velhos amigos que mesmo a 1200 km ainda se fazem presentes. Aos novos amigos que aqui fiz, e me ajudaram a segurar a barra de morar longe da família e da cidade natal, e me fizeram mais pertencente à nova cidade.

À Profa. Dra. Lusiane M. Bendhack, o meu muitíssimo obrigado por ter aberto as portas do laboratório para mim e ter aceitado o desafio de me orientar no doutorado. Sou muito honrado por ter tido a senhora como orientadora, ter aprendido não só sobre ciência, mas também sobre valores de vida.

Agradeço também a todos os colegas e técnicos que passaram pelo laboratório neste tempo em que estive, especialmente à Simone e Tiago pela amizade, pela ajuda nos experimentos, pelas discussões sobre os experimentos e pelos papos sobre tudo mais.

Agradeço aos funcionários, técnicos, professores e alunos do PPGCF, FCFRP e USP-RP, pela disponibilidade, auxílio e ensinamentos compartilhados.

Possivelmente algum nome ficou de fora aqui, mas não por isso não mereça o agradecimento que faço sempre que estamos em contato, seja virtual ou fisicamente.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”  
(Benjamin Disraeli)

## RESUMO

FAHNING, B.M. **Efeitos da ativação do receptor de angiotensina II nas células endoteliais e células do músculo liso vascular de aortas de ratos hipertensos renais.** 2021. 65f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

O modelo de hipertensão renovascular 2-Rins-1-Clipe (2R-1C) é caracterizado pela ativação sustentada do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, cujo principal mediador é a angiotensina II (Ang II), que promove contração das células do músculo liso vascular (CMLV) ao ativar o receptor AT<sub>1</sub>. Este receptor é expresso em células endoteliais (CEs) e CMLV, que aumenta o influxo de cálcio, ativa a enzima NADPH-oxidase (NOX), aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e reduz a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO). A hipótese desse estudo foi de que em aorta de 2R-1C, a Ang II ativa receptores AT<sub>1</sub>, nas CEs e do CMLV, promovendo disfunção endotelial e aumentando a produção de substâncias contráteis. O objetivo deste estudo foi o de avaliar os efeitos da ativação dos receptores AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> e Mas pela Ang II nas CEs e células do CMLV. Avaliar os seus efeitos sobre as enzimas NO-sintase endotelial (eNOS), ciclooxigenase (COX) e produção de ROS. Os resultados são comparados entre os efeitos obtidos em aortas de 2R-1C e ratos controles normotensos (2R). Foram realizadas curvas concentração-resposta para Ang II em aortas com endotélio (E+) e em aortas sem endotélio (E-), na ausência ou em presença dos antagonistas dos receptores: Losartan (AT<sub>1</sub>), PD123319 (AT<sub>2</sub>), A779 (Mas) e dos inibidores enzimáticos L-NAME (eNOS), indometacina (COX), apocinina (NOX). Foram comparados os valores de eficácia (Emáx) e potência (pD<sub>2</sub>). Avaliamos a expressão proteica dos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, Caveolina-1 (Cav-1) e expressão gênica da eNOS. Verificamos que o losartan aboliu a resposta contrátil estimulada pela Ang II em 2R-1C (Emáx: de 0,15 ± 0,03 g para -0,01 ± 0,01 g; pD<sub>2</sub> de: 8,43 ± 0,16; n= 4 para 6,61 ± 1,33; n=7; p<0,0001) e em aortas de 2R (Emáx: de 0,30 ± 0,12 g para -0,002 ± 0,004 g; pD<sub>2</sub>: de 8,55 ± 0,09; n=6 para 8,21 ± 0,37; n=5; p= 0,0471). Não houve alteração na contração à Ang II após a incubação com o antagonista PD123319 em aorta tanto de ratos 2R-1C (Emáx: 0,19 ± 0,04 g; pD<sub>2</sub>: 8,10 ± 0,28; n= 9 e controle Emáx 0,22 ± 0,04 g; pD<sub>2</sub>: 8,46 ± 0,11; n= 10) e em 2R (Emáx: 0,27 ± 0,05 g; pD<sub>2</sub>: 8,19 ± 0,06; n= 4 e controle Emáx: 0,29 ± 0,02 g; pD<sub>2</sub>: 8,28 ± 0,07; n= 4) e também com o antagonista A779, em 2R-1C (Emáx: 0,23 ± 0,04 g; pD<sub>2</sub>: 8,64 ± 0,21; n= 6; controle Emáx: 0,18 ± 0,05 g; pD<sub>2</sub>: 8,70 ± 0,19; n= 6) e em 2R (Emáx: 0,25 ± 0,06; pD<sub>2</sub>: 8,22 ± 0,13; n= 6; controle: 0,26 ± 0,15 g; pD<sub>2</sub>: 8,40 ± 0,13; n= 5). Após remoção do endotélio, houve aumento no Emáx na contração da aorta de ratos 2R-1C (E-: 0,74 ± 0,12 g; n= 11; p= 0,005; E+: 0,23 ± 0,08 g; n= 7) sem alteração no PD<sub>2</sub> (E- pD<sub>2</sub>: 8,49 ± 0,13; n= 11; E+ pD<sub>2</sub>: 8,37 ± 0,14; n= 7). Em aortas de 2R, a remoção do endotélio reduziu a potência da AngII (E- pD<sub>2</sub>: 9,00 ± 0,07; n= 9; p= 0,0006 vs E+ 8,47 ± 0,10; n= 10) e eficácia (E-: 1,64 ± 0,14 g; n= 9; p< 0,0001 vs E+: 0,38 ± 0,12 g; n= 10). A inibição da eNOS com L-NAME não alterou a resposta contrátil estimulada com Ang II em aortas de ratos 2R-1C (Emáx: 0,46 ± 0,14 g; pD<sub>2</sub>: 8,50 ± 0,15; n=10; vs controle: 0,23 ± 0,08 g; pD<sub>2</sub>: 8,37 ± 0,14; n=7), porém aumentou os valores de Emáx (1,01 ± 0,15 g; n= 11; p= 0,0052 vs controle 0,381 ± 0,12 g; n= 10), sem alterar o pD<sub>2</sub> (8,48 ± 0,07; n= 11 vs controle 8,47 ± 0,10; n=10). A indometacina não alterou a eficácia e potência em aortas de 2R-1C e 2R. A inibição da NOX com apocinina também não alterou a resposta contrátil para Ang II em 2R-1C e 2R. A expressão basal do receptor AT<sub>1</sub> foi maior em 2R-1C (0,898 ± 0,07; n= 6) quando comparada com 2R (0,478 ± 0,01; n= 6). Por outro lado, a expressão basal do receptor AT<sub>2</sub> não



foi diferente entre os grupos (2R-1C:  $0,318 \pm 0,04$ ; n= 6; 2R:  $0,265 \pm 0,04$ ; n= 6). A expressão basal de Cav-1 foi menor em aortas isoladas de 2R-1C ( $0,636 \pm 0,020$ ; n= 6; p= 0,0001) do que de 2R ( $0,991 \pm 0,055$ ). A expressão gênica da eNOS também foi menor em aortas isoladas de 2R-1C ( $0,503 \pm 0,08$ ; n= 5; p= 0,0003) do que de 2R ( $1,00 \pm 0,04$ ; n= 6). Com os resultados obtidos, concluímos que a Ang II ativa receptores AT<sub>1</sub> expressos nas CEs e CMLVs de aorta de ratos 2R-1C e 2R e promove contração. A resposta contrátil estimulada pela AngII não envolve a participação dos receptores AT<sub>2</sub>, Mas, e dos produtos da eNOS, COX e NADPH-oxidase. Apesar do efeito anti-contrátil do endotélio, a contração vascular independente do endotélio de ratos hipertensos está prejudicada.

**Palavras-Chave:** hipertensão renal 2R-1C, Angiotensina II, resposta contrátil, espécies reativas de oxigênio, receptor AT<sub>1</sub>, NO-sintase endotelial

## ABSTRACT

Fahning, B.M. **Effects of angiotensin II receptor activation on endothelial cells and vascular smooth muscle cells in renal hypertensive rat aortas. 2021.** Thesis (Doctorate). 65p. Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

The 2-kidney-1-clip (2K-1C) renovascular hypertension model is characterized by the sustained activation of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAS), whose main mediator is angiotensin II (Ang II), which promotes the vascular smooth muscle cells (VSMC) contraction when activating the AT<sub>1</sub> receptor. This receptor is expressed in the endothelial cells (EC) and VSMC, which increases the calcium influx, activates the enzyme NADPH-oxidase (Nox), increases the production of reactive oxygen species (ROS) and reduces the bioavailability of nitric oxide (NO). The hypothesis of this study was that in 2K-1C aorta, Ang II activates AT<sub>1</sub> receptors, in the EC and in the VSMC, promoting endothelial dysfunction and increasing contractile substances production. This study aimed to evaluate the effects of the activation of AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> and Mas receptors by Ang II on EC and SMC cells. And it was also evaluated its effects on the enzymes endothelial NO- synthase (eNOS), cyclooxygenase (COX) and ROS production. The results were compared between the effects obtained in aortas of 2K-1C and normotensive control rats (2K). Concentration-response curves for Ang II were performed in aortas with endothelium (E+) and in denuded aortas (E-), in the absence or in the presence of the following receptor antagonists: Losartan (AT<sub>1</sub>), PD123319 (AT<sub>2</sub>), A779 (Mas) and the enzyme inhibitors L-NAME (eNOS), indomethacin (COX), apocynin (Nox). The efficacy (E<sub>max</sub>) and potency (pD<sub>2</sub>) were compared between the two rat aorta groups. We measured the protein expression of the AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors, Caveolin-1 (Cav-1) and eNOS gene expression. We found that losartan abolished the contractile response stimulated by Ang II in 2K-1C (E<sub>max</sub> from: 0.15 ± 0.03 g to -0.01 ± 0.01 g; pD<sub>2</sub> from: 8.43 ± 0.16; n = 4 to 6.61 ± 1.33; n = 7; p <0.0001) and in 2K aortas (E<sub>max</sub> from 0.30 ± 0.12 g to -0.002 ± 0.004 g; pD<sub>2</sub>: from 8.55 ± 0.09; n = 6 to 8.21 ± 0.37; n = 5; p = 0.0471). There was no change in contraction of Ang II after incubation with the antagonist PD123319 in aorta from both 2R-1C rats (E<sub>max</sub>: 0.19 ± 0.04 g; pD<sub>2</sub>: 8.10 ± 0.28; n = 9 and control E<sub>max</sub> 0.22 ± 0.04 g; pD<sub>2</sub>: 8.46 ± 0.11; n = 10) and in 2K (E<sub>max</sub>: 0.27 ± 0.05 g; pD<sub>2</sub>: 8.19 ± 0.06; n = 4 and E<sub>max</sub> control: 0.29 ± 0.02 g; pD<sub>2</sub>: 8.28 ± 0.07; n = 4) and also with the antagonist A779, in 2K-1C (E<sub>max</sub>: 0.23 ± 0.04 g; pD<sub>2</sub>: 8.64 ± 0.21; n = 6; E<sub>max</sub> control: 0.18 ± 0.05 g; pD<sub>2</sub>: 8.70 ± 0.19; n = 6) and in 2K (E<sub>max</sub>: 0.25 ± 0.06; pD<sub>2</sub>: 8.22 ± 0.13; n = 6; control: 0.26 ± 0.15 g; pD<sub>2</sub>: 8.40 ± 0.13; n = 5). In denuded aortas, there was an increase in the E<sub>max</sub> in the contraction to Ang II in 2K-1C rats (E-: 0.74 ± 0.12 g; n = 11; p = 0.005; E+: 0.23 ± 0.08 g; n = 7) without change in the pD<sub>2</sub> (E-: 8.49 ± 0.13; n = 11; E+: 8.37 ± 0.14; n = 7). In denuded 2K aortas, the response to Ang II was reduced in the potency (E- pD<sub>2</sub>: 9.00 ± 0.07; n = 9; p = 0.0006 vs E+ 8.47 ± 0.10; n = 10) and efficacy (E-: 1.64 ± 0.14 g; n = 9; p <0.0001 vs E +: 0.38 ± 0.12 g; n = 10). The non-selective eNOS inhibition with L-NAME did not alter the contractile response stimulated with Ang II in aortas of 2K-1C rats (E<sub>max</sub>: 0.46 ± 0.14 g; pD<sub>2</sub>: 8.50 ± 0.15; n = 10; vs control: 0.23 ± 0.08 g; pD<sub>2</sub>: 8.37 ± 0.14; n = 7), but the E<sub>max</sub> values increased (1.01 ± 0.15 g; n = 11; p = 0.0052

vs control  $0.381 \pm 0.12$  g;  $n = 10$ ), without changing  $pD_2$  ( $8.48 \pm 0.07$ ;  $n = 11$  vs control  $8.47 \pm 0.10$ ;  $n = 10$ ). Indomethacin did not alter the efficacy and potency in aortas of 2K-1C and 2K. In addition, Nox inhibition with apocynin did not alter the contractile response to Ang II in 2K-1C and 2K. Basal  $AT_1$  receptor expression was higher in 2K-1C ( $0.898 \pm 0.07$ ;  $n = 6$ ) as compared to 2K ( $0.478 \pm 0.01$ ;  $n = 6$ ). On the other hand, the basal expression of the  $AT_2$  receptor was not different between the groups (2K-1C:  $0.318 \pm 0.04$ ;  $n = 6$ ; 2K:  $0.265 \pm 0.04$ ;  $n = 6$ ). Basal Cav-1 expression was lower in aortas isolated from 2K-1C ( $0.636 \pm 0.020$ ;  $n = 6$ ;  $p = 0.0001$ ) than that from 2K ( $0.991 \pm 0.055$ ). The gene expression of eNOS was lower in 2K-1C aortas ( $0.503 \pm 0.08$ ;  $n = 5$ ;  $p = 0.0003$ ) than from 2K aortas ( $1.00 \pm 0.04$ ;  $n = 6$ ). Taking together our results indicate that the activation of  $AT_1$  receptors by Ang II in the aortic EC and VSMC of 2K-1C and 2K promoted contraction that does not involve the contribution of activation of the receptors  $AT_2$  and Mas, the products of eNOS, COX and NADPH-oxidase. Although the endothelium receptors activation by Ang II induces an anti-contractile effect in 2K-1C rat aortas, the contractile response is impaired in 2K-1C.

**Keywords:** renovascular hypertension 2K-1C, Angiotensin II, contractile response, reactive oxygen species,  $AT_1$  receptor, endothelial NO-synthase

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Medidas da pressão arterial sistólica (PAS) em ratos controle 2R e hipertensos 2R-1C.....	31
<b>Figura 2.</b> Efeito do antagonista de receptores AT <sub>1</sub> (Losartan) sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II.....	32
<b>Figura 3.</b> Efeito do antagonista de receptores AT <sub>2</sub> (PD123319) sobre a contração estimulada com Ang II.....	33
<b>Figura 4.</b> Expressão basal dos receptores AT <sub>1</sub> e AT <sub>2</sub> em homogenatos de aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C.....	34
<b>Figura 5.</b> Resposta contrátil estimulada com Ang II em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C.....	34
<b>Figura 6.</b> Efeito da remoção do endotélio sobre a contração estimulada com Ang II em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C.....	35
<b>Figura 7.</b> Efeito do inibidor da eNOS (L-NAME) sobre a contração estimulada com Ang II.....	36
<b>Figura 8.</b> Expressão proteica basal de Cav-1 em homogenatos de aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C.....	37
<b>Figura 9.</b> Expressão gênica da eNOS (NOS3) em homogenatos de aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C.....	37
<b>Figura 10.</b> Efeito da inibição da COX com indometacina sobre a contração estimulada com Ang II em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C.....	38
<b>Figura 11.</b> Efeito da inibição da enzima NADPH oxidase sobre a contração estimulada com Ang II em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C.....	39
<b>Figura 12.</b> Medidas da pressão arterial sistólica (PAS) em ratos Wistar-Hannover....	39
<b>Figura 13.</b> Níveis plasmáticos de Angiotensina II.....	40
<b>Figura 14.</b> Resposta contrátil estimulada com Ang II em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2K e 2K-1C.....	41
<b>Figura 15.</b> Efeito da remoção do endotélio sobre a contração estimulada com Ang II em aortas isoladas de ratos 2K e 2K-1C.....	42
<b>Figura 16.</b> Efeito do inibidor da eNOS (L-NAME) sobre a contração estimulada com Ang II e aortas de ratos Wistar-Hannover.....	42
<b>Figura 17.</b> Efeito da inibição da enzima NADPH oxidase sobre a contração estimulada com Ang II em aortas isoladas de ratos 2K e 2K-1C.....	43

<b>Figura 18.</b> Efeito do antagonista PD123319 sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II.....	44
<b>Figura 19.</b> Efeito do antagonista do receptor Mas (A779) sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II.....	45
<b>Figura 20.</b> Expressão basal dos receptores phospho-IP <sub>3</sub> em homogenatos de aortas isoladas de ratos 2K e 2K-1C.....	46
<b>Figura 21.</b> Expressão basal dos receptores de IP <sub>3</sub> em homogenatos de aortas isoladas de ratos 2K e 2K-1C.....	46
<b>Figura 22.</b> Expressão basal da cadeia leve de miosina (MLC) em homogenatos de aortas isoladas de ratos 2K e 2K-1C.....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Pressão arterial sistólica (mmHg) de ratos 2R e 2R-1C nas semanas seguintes à cirurgia para indução da hipertensão renovascular.....	32
<b>Tabela 2.</b> Pressão arterial sistólica (mmHg) de ratos 2K e 2K-1C nas semanas seguintes à cirurgia para indução da hipertensão renovascular.....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- \*OH** Radical hidroxil
- 2K** Rato Wistar-Hannover normotenso
- 2K-1C** Rato Wistar-Hannover hipertenso
- 2R** Rato Wistar normotenso
- 2R-1C** Rato Wistar hipertenso
- A779** Antagonista de receptor Mas
- AMPc** 3´5´-adenosina-monofosfato-cíclico
- Ang II** Angiotensina II
- AT<sub>1</sub>** Subtipo 1 para o receptor de Angiotensina II
- AT<sub>2</sub>** Subtipo 2 para o receptor de Angiotensina II
- BH<sub>4</sub>** Tetrahidrobiopterina
- Ca<sup>2+</sup>** Íon cálcio
- Cav-1** Caveolina-1
- CE** Célula endotelial
- CMLV** Célula de músculo liso vascular
- COX-1** Isoforma 1 da enzima ciclooxigenase
- COX-2** Isoforma 2 da enzima ciclooxigenase
- DP** Receptor de prostaglandina D<sub>2</sub>
- E-** Aorta sem endotélio
- E+** Aorta com endotélio
- ECA1** Subtipo 1 da enzima conversora de angiotensina
- EDCF** Fatores contráteis derivados do endotélio
- EDRF** Fatores relaxantes derivados do endotélio
- Emáx** Efeito máximo
- eNOS** Enzima óxido nítrico sintase endotelial
- EP** Receptor de prostaglandina E<sub>2</sub>
- EPM** Erro padrão da média
- FAD** Flavina Adenosina Dinucleotídio
- FAM** Flavina Adenosina Mononucleotídeo
- FP** Receptor de PGF<sub>2α</sub>
- GCs** Guanilil-ciclase solúvel
- GMPc** Guanosina monofosfato cíclico

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** Peroxido de hidrogênio  
**IP** Receptor de prostaciclina  
**IP<sub>3</sub>** Receptor de inositol trifosfato  
**L-NAME** Inibidor da enzima eNOS  
**LPS** Lipopolissacarídeo bacteriano  
**MCL** Cadeia leve de miosina  
**NADPH** Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
**NO** Óxido nítrico  
**NOS3** Subtipo 3 da enzima óxido nítrico sintase  
**NOX** NADPH oxidase  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** Ânion superóxido  
**ONOO-** Peroxinitrito  
**PA** Pressão arterial  
**PAS** Pressão arterial sistólica  
**PD123319** Antagonista de receptor AT<sub>2</sub>  
**pD<sub>2</sub>** Potência  
**PG** Prostaglandina  
**PGH<sub>2</sub>** Precursor prostanóide comum  
**PGI<sub>2</sub>** Prostaciclina  
**PGX** Prostaglandina X  
**Phospho-IP<sub>3</sub>** Receptor de IP<sub>3</sub> fosforilado  
**PKG** Proteína quinase G  
**PLA<sub>2</sub>** Enzima fosfolipase A<sub>2</sub>  
**qPCR** Reação em cadeia da polimerase em tempo real  
**ROS** Espécie reativa de oxigênio  
**SHR** Rato espontaneamente hipertenso  
**SOD** Enzima superóxido dismutase  
**SRAA** Sistema renina angiotensina aldosterona  
**TP** Receptor tromboxano-prostanóides  
**TX** Tromboxanos  
**TXA<sub>2</sub>** Tromboxano A<sub>2</sub>



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	25
OBJETIVO GERAL .....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>3. MATERIAIS</b> .....	26
Grupos experimentais .....	26
<b>4. MÉTODOS</b> .....	26
Cirurgia para indução da hipertensão renovascular 2-Rins-1-Clipe (2R-1C) .....	26
Reatividade vascular .....	26
Delineamento Experimental .....	27
<i>WESTERN BLOT</i> .....	28
Análise da expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) .....	29
Medidas dos níveis plasmáticos de Ang II .....	30
<b>5. RESULTADOS</b> .....	31
Efeito da indução da hipertensão renovascular em ratos Wistar .....	31
Efeito do antagonista dos receptores AT <sub>1</sub> sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II .....	32
Efeito do antagonista dos receptores AT <sub>2</sub> sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II .....	33
Expressão proteica basal dos receptores AT <sub>1</sub> e AT <sub>2</sub> .....	33
Resposta contrátil estimulada com Ang II em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C .....	34
Efeito da remoção do endotélio sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II .....	35
Efeito da inibição da eNOS sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II .....	35
Expressão proteica basal da proteína Caveolina-1 e expressão gênica do mRNA para eNOS .....	36
Efeito da inibição da enzima COX sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II .....	38
Efeito da inibição da enzima NADPH oxidase (Nox) sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II .....	38
Efeito da indução da hipertensão renovascular em ratos Wistar Hannover .....	39
Medidas dos níveis de angiotensina II plasmática .....	40
Resposta contrátil estimulada com Ang II em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2K-1C e 2K .....	41
Efeito da remoção do endotélio sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II .....	41
Efeito da inibição da eNOS sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II .....	42

Efeito da inibição da enzima NADPH oxidase sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II .....	43
Efeito do antagonista dos receptores AT <sub>2</sub> (PD123319) sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II.....	43
Efeito do antagonista do receptor Mas (A779) sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II .....	44
Expressão proteica basal dos receptores de IP <sub>3</sub> , phospho-IP <sub>3</sub> e MLC.....	45
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>56</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os primeiros estudos experimentais envolvendo hipertensão renovascular datam de 1934, quando Goldblatt e colaboradores desenvolveram um modelo para estudo dos efeitos da obstrução da artéria renal. Este modelo ficou conhecido como 2-Rins-1Clipe (2R-1C) e foi aperfeiçoado ao longo do tempo em outros modelos (1,2). Este modelo de hipertensão é produzido pelo clameamento parcial de uma das artérias renais e pela manutenção do rim contralateral intacto. Deste modo, ocorre redução da perfusão sanguínea no rim clameado e conseqüentemente aumento na produção de renina plasmática, enzima que cliva o angiotensinogênio produzindo angiotensina I, substrato para a enzima conversora de angiotensina (ECA1) produzindo angiotensina II (Ang II), o principal peptídeo do Sistema-Renina-Angiotensina- Aldosterona (SRAA) (3).

Os subtipos de receptores para Ang II ( $AT_1$  e  $AT_2$ ), foram identificados e pertencem à superfamília dos receptores acoplados à proteína G. Muitos dos efeitos fisiológicos da Ang II são mediados pelo receptor  $AT_1$  (4). Este peptídeo possui múltiplas ações sistêmicas e locais em diversos tecidos, incluindo vasos sanguíneos, rins, glândula suprarrenal, coração e sistema nervoso central e está envolvido em diversas funções fisiológicas como regular a vasoconstrição, débito cardíaco, crescimento celular e integridade da parede vascular (5,6).

Sob circunstâncias patológicas, o SRAA desempenha papel importante em várias doenças cardiovasculares. Basicamente, a Ang II é conhecida por regular a pressão sanguínea e tem papel chave no desenvolvimento e manutenção da hipertensão arterial. Estas alterações incluem ativação da NADPH oxidase e conseqüente aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e redução na biodisponibilidade do NO quando o receptor  $AT_1$  é ativado pelo agonista Ang II. A eficácia clínica dos bloqueadores do SRAA como anti-hipertensivos, juntamente com outros benefícios para órgãos alvo, evidenciam a importância clínica da pesquisa em fisiologia e farmacologia do SRAA (5,7). No modelo de hipertensão 2R-1C, há constante ativação do SRAA e conseqüente ativação destas vias de sinalização que levam à disfunção endotelial.

Até a década de 1980, o endotélio foi considerado como uma barreira entre o sangue e o músculo liso vascular (8). Esta definição foi alterada após a descoberta da prostaglandina X (PGX) por Bunting e colaboradores (9) que mostraram que o

endotélio é capaz de sintetizar e liberar substâncias vasoativas. A PGX foi identificada como PGI<sub>2</sub> (prostaciclina), substância sintetizada e liberada pelas células endoteliais. Porém, o endotélio assumiu um papel maior após a descoberta do seu envolvimento no relaxamento vascular pelo fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) por Furchgott e Zawadski (10) que foi identificado como óxido nítrico (NO), iniciando a era da “pesquisa endotelial”. Foi descoberto que a PGI<sub>2</sub> e o NO não eram as únicas substâncias vasoativas liberadas pelo endotélio. Após a identificação destas substâncias vasoativas, outros efeitos de fatores endoteliais foram definidos, como regulação do tônus vascular, modulação da inflamação, promoção e inibição do crescimento vascular, modulação da agregação plaquetária e coagulação (8). Atualmente, se sabe que as células endoteliais são ativas metabolicamente e a integridade da camada endotelial tem papel essencial em muitos aspectos da função vascular (11). O endotélio produz várias substâncias denominadas de fatores de relaxamento derivados do endotélio (EDRFs) e fatores contráteis derivados do endotélio (EDCFs) (12).

Dentre os EDRFs, o NO é o mais importante mediador dos processos celulares envolvidos na vasodilatação. Sua produção ocorre nas células endoteliais por ação da enzima NO sintase (eNOS). Esta enzima converte o aminoácido L-arginina e oxigênio molecular em L-citrulina e NO, usando como cofatores tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>), Flavina Adenosina Dinucleotídeo (FAD), Flavina Adenosina Mononucleotídeo (FAM) e Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato NADPH. Como o NO é uma molécula não carregada, consegue se difundir facilmente através da membrana celular e compartimentos celulares. Assim, ao se difundir das células endoteliais para o músculo liso vascular (MLV), se liga ao grupo heme da enzima guanilil-ciclase solúvel (GCs) ativando-a e levando à produção de guanosina monofosfato cíclico (GMPc), que atua como segundo mensageiro. O principal alvo do GMPc é a família das proteíno-quinases dependentes do GMPc, a proteína quinase-G (PKG). A Ativação da PKG e consequente fosforilação de várias proteínas, acarreta na redução da concentração citoplasmática de Ca<sup>2+</sup> nas células do músculo liso vascular (MLV) culminando no relaxamento vascular (13–15). A eNOS (NOS3) presente na aorta de ratos, apresenta os sítios de fosforilação nos resíduos de Serina<sup>1177</sup> e Treonina<sup>495</sup>. Quando a Ser<sup>1177</sup> é fosforilada, induz o fluxo de elétrons através do domínio redutase levando ao aumento da produção de NO. Por outro lado, a fosforilação do resíduo

Thr<sup>495</sup> tem efeito inibitório sobre a eNOS resultando no desacoplamento dos monômeros que constituem a enzima (16).

O endotélio é capaz de controlar funções importantes nos vasos como a regulação do tônus vascular, homeostasia local, processos inflamatórios, manutenção da circulação sanguínea, fluidez, coagulação e respostas inflamatória e imune. Quando há desequilíbrio entre a produção e biodisponibilidade dos EDRFs e EDCFs associados ao aumento da produção de ROS e diminuída capacidade antioxidante pelo estresse oxidativo, caracteriza-se o quadro de disfunção endotelial. Além disso, fatores de regulação da eNOS como Arginina e BH<sub>4</sub>, podem ser afetados por ROS, resultando em eNOS disfuncional. Embora a disfunção endotelial ocorra em diferentes doenças, o estresse oxidativo pode ser identificado como um procedimento comum a elas. As ROS atuam na fisiologia e patofisiologia vascular. NO, ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), radical hidroxil (\*OH), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) são produzidas nos vasos sob condições normais e de estresse, como no processo inflamatório. As ROS podem ser geradas a partir de diferentes enzimas: NADPH oxidase (Nox), xantina oxidase, ciclooxigenase (COX), NO-Sintase, citocromo P<sub>450</sub>, e enzimas da cadeia respiratória mitocondrial. As espécies reativas geradas são espontaneamente ou enzimaticamente (pela enzima superóxido dismutase (SOD) reduzidas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que na presença da enzima catalase ou glutathiona peroxidase são dismutadas em água e oxigênio. Entretanto, no quadro de disfunção endotelial, a neutralização das ROS está prejudicada. Este processo caracterizado pelo menor relaxamento vascular dependente do endotélio associado à baixa disponibilidade de NO causada pelo aumento na produção de ROS (12,15,17,18) é observado em diversas situações como na hipertensão. A ativação da produção de ROS no endotélio e células do MLV resulta na sinalização redox que ativa fatores de transcrição inflamatórios. As ROS são potentes moduladores da contração/dilatação vascular e diminuem a biodisponibilidade do NO levando à peroxidação lipídica, ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios, aumento da produção de fatores de crescimento vascular e indução de fibrose. Além disso, a peroxidação lipídica resultante da produção de ROS gera elementos contráteis derivados da COX-2 endotelial que ativam receptores tromboxano-prostanóides (TP) aumentando a contratilidade das células do MLV (11).

A produção e liberação alteradas de fatores endoteliais não ocorrem somente pela redução de EDRFs, mas também pelo aumento de EDCFs. Dentre os EDCFs,

destacam-se os prostanóides contráteis, que consistem em prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs), compostos produzidos a partir do ácido araquidônico. O ácido araquidônico é liberado em resposta a estímulos fisiológicos e/ou patológicos sob ação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) e são convertidos aos vários prostanóides por ação da COX e respectivas prostanóide (PG sintase) ou tromboxano sintases (TX sintase) (19).

A COX se apresenta sob as isoformas COX-1 e COX-2. A COX-1 é a isoforma constitutiva em muitos tecidos e produz prostanóides envolvidos em diversos processos fisiológicos. A COX-2 é a isoforma normalmente não expressa em muitos tecidos, mas induzida por citocinas pró-inflamatórias e mitógenos nos sítios de inflamação. Contudo, já foi demonstrada a expressão da COX-2 de maneira constitutiva em aorta de ratos com endotélio intacto, rins e cérebro (20,21). Um precursor prostanóide comum (PGH<sub>2</sub>) é produzido sob ação das COX e convertido ao prostanóide específico por ação da respectiva PG sintase ou TX sintase que são expressas, dependendo do tipo celular. Os prostanóides formados são liberados das células imediatamente após a síntese. A PGI<sub>2</sub> e tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) são quimicamente instáveis e degradados em produtos inativos sob condições fisiológicas com tempo de meia-vida de 30 segundos a poucos minutos. Acredita-se que os prostanóides atuem somente em regiões próximas ou localmente no seu sítio de produção (19).

Os prostanóides exercem várias ações em diversos tecidos e células e tem papel importante na regulação da pressão sanguínea (22). Suas ações mais comuns são de relaxamento e contração em vários tipos de células de músculo liso. Os receptores dos prostanóides são classificados de acordo com a ação dos ligantes no músculo liso (23). Os receptores seletivos para PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> e TX foram denominados de receptor de prostaglandina D<sub>2</sub> (DP, receptor de prostaglandina E<sub>2</sub> (EP), receptor de PGF<sub>2α</sub> (FP), receptor de prostaciclina (IP) e TP, respectivamente. Mais tarde, os receptores EP foram classificados em quatro subtipos, EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub>. Embora os prostanóides e seus análogos sejam considerados seletivos para o respectivo receptor, estes agonistas podem se ligar aos vários tipos de receptores prostanóides. Portanto, é muito difícil avaliar a contribuição de cada prostanóide nos mecanismos patofisiológicos, sendo mais correto avaliar o papel de cada receptor no desenvolvimento das doenças (19). Os receptores EP<sub>1</sub>, FP e TP são acoplados à

proteína Gq e promovem contração muscular e também à proteína G<sub>12/13</sub> que ativa a via Rho-quinase envolvida no processo de contração do MLV (19).

Os receptores ativados pelos prostanóides estão envolvidos no desenvolvimento e manutenção da hipertensão. Na hipertensão induzida pela infusão de Ang II, o TXA<sub>2</sub> participa dos mecanismos de controle da pressão arterial (PA) mediados por Ang II. Na hipertensão induzida pela administração do inibidor da NOS (L-NAME), o aumento da PA envolve a interação entre TXA<sub>2</sub> e NOS (24,25). Ao contrário do TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> é potente vasodilatador produzido principalmente por células endoteliais, sugerindo que a PGI<sub>2</sub> participe da regulação da PA (19). Entretanto, de acordo com Vanhoutte (2011), a PGI<sub>2</sub> apresenta importante papel como EDCF em aorta de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) pela ativação de receptores TP (24).

No sistema cardiovascular, as células endoteliais expressam COX-2 em resposta ao estresse de cisalhamento sob condições fisiológicas normais. Esta isoforma da enzima COX também está mais expressa em condições fisiopatológicas, como na hipertensão. Estudos demonstraram que a COX-2 é a maior responsável por gerar EDCFs. Os EDCFs produzidos pela COX-2 endotelial se difundem para as células do MLV, onde se ligam aos receptores TP e causam contração (21). Porém, a COX-1 está envolvida na contração dependente do endotélio em artérias de ratos e camundongos, indicando aumento na produção de PGI<sub>2</sub> que age como EDCF (26). Existe uma heterogeneidade acentuada na formação de EDCFs que depende dos estímulos, leito vascular, idade e modelo experimental estudado (27).

A sequência de eventos que ocorrem na contração dependente do endotélio, requer aumento na concentração citoplasmática de Ca<sup>2+</sup>, que leva à ativação da COX-1 endotelial e produção de EDCFs. Os EDCFs produzidos a partir da COX são prostanóides (endoperóxidos, PGI<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>) e ROS. Estes produtos derivados da COX se ligam aos receptores TP nas células do músculo liso, causando contração (27). Além disso, a produção de ROS diminui a biodisponibilidade do NO, contribuindo para o aumento da contração dependente do endotélio (15).

A enzima NO-Sintase (NOS) compartilha inúmeras similaridades com a COX. A produção de NO pode estimular a liberação de mediadores da via de sinalização da COX. O NO, PGI<sub>2</sub> ou PGE<sub>2</sub> elevam os níveis de GMPc e AMPc em células efetoras. Este efeito sinérgico pode ser um mecanismo pelo qual a NOS e COX operam para amplificar a resposta fisiológica e fisiopatológica (28). Outra possível interação está

na regulação da atividade das enzimas, pois a COX é alvo do NO, uma vez que o sítio ativo da COX contém um grupamento heme/ferro e muitos efeitos mediados pelo NO são causados pela interação do NO com o ferro e/ou enzimas que contém este grupamento (28). Muitos estudos exploram a potencial interação entre as vias de produção de PGs e NO. Os mecanismos detalhados pelo qual o NO regula a produção das PGs e vice-versa ainda é controverso, em parte porque a interação entre essas vias pode ocorrer em múltiplos níveis além da complexidade química da sinalização redox do NO (29). Os autores mostraram que o NO pode ativar a COX (28), o que foi corroborado por estudos *in vitro*, mostrando que NO exógeno ou doadores químicos de NO induzem a ativação da COX-1 (30,31). Liu e colaboradores (2004) mostraram que a ativação da COX pelo NO não se limita apenas à atividade enzimática. Estes autores mostraram que o NO pode aumentar os níveis de RNA mensageiro para COX-2. Além disso, outros autores mostraram que o NO pode interagir com várias outras vias, influenciando a cascata de sinalização da COX (32,33). Alguns estudos ainda sustentam a hipótese de que o NO poderia inativar a COX em certas condições. Minghetti e colaboradores (34) mostraram que a expressão da COX-2 induzida por LPS e a produção de PGs nas células da microglia estão aumentadas após o uso de inibidores da NOS. Em outro estudo, foi demonstrado que a interação entre NO e PGs não é unidirecional, uma vez que os anti-inflamatórios como a aspirina e indometacina, podem reduzir a atividade da NOS (35). As ROS produzidas a partir da NOS podem alterar a atividade da COX. O peroxinitrito produzido pela NOS, a partir do aumento do estresse oxidativo, ativa a COX-1 e COX-2 fazendo com que estas enzimas produzam TXA<sub>2</sub> e não PGI<sub>2</sub> (29).

Considerando que o endotélio vascular de ratos 2R-1C é disfuncional devido à ativação do SRAA neste modelo de hipertensão arterial, no presente estudo testamos a hipótese de que a Ang II ativa receptores AT<sub>1</sub> nas células endoteliais, levando ao aumento da produção de ROS (via eNOS desacoplada) e redução da biodisponibilidade de NO, que modulariam a atividade da COX endotelial.



## **2. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos da ativação dos receptores AT<sub>1</sub> pela Ang II em células endoteliais e do músculo liso vascular e verificar a modulação entre as vias da NO-Sintase, COX e participação das ROS nestas vias, no modelo de hipertensão 2R-1C que apresenta maior atividade do SRAA.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar:

- 1) Efeito contrátil da Ang II
- 2) Dependência do endotélio sobre o efeito contrátil da Ang II
- 3) Participação dos receptores AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> e Mas no efeito contrátil da Ang II
- 4) Participação da enzima eNOS na resposta contrátil à Ang II
- 5) Participação da enzima COX na resposta contrátil à Ang II
- 6) Participação da enzima NADPH oxidase na resposta contrátil à Ang II
- 7) Expressão basal dos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>
- 8) Expressão basal da proteína Cav-1
- 9) Expressão gênica do mRNA para a enzima eNOS

Comparar estes efeitos entre aortas isoladas de ratos hipertensos renais (2R-1C) e normotensos (2R).

### 3. MATERIAIS

#### Grupos experimentais

Foram utilizados ratos machos das linhagens Wistar e Wistar-Hannover, com peso entre 180-200g, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), processo N<sup>o</sup>.17.1.617.60.0

Os animais foram divididos em 4 grupos:

- 1) Grupo Wistar controle normotenso sham-operado (2R)
- 2) Grupo Wistar com hipertensão renovascular (2R-1C)
- 3) Grupo Wistar-Hannover controle normotenso sham-operado (2K)
- 4) Grupo Wistar-Hannover com hipertensão renovascular (2K-1C)

### 4. MÉTODOS

#### Cirurgia para indução da hipertensão renovascular 2-Rins-1-Clipe (2R-1C)

A hipertensão renovascular 2R-1C foi induzida por meio da colocação de um clipe de prata com abertura de 0,2 mm na artéria renal esquerda dos ratos. Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (0,25 g/Kg) e a seguir foi realizada laparotomia para exposição do pedículo da artéria renal esquerda, onde foi colocado o clipe de prata. Após as cirurgias, os animais foram tratados com dose única do antibiótico oxitetraciclina (0,2 g/kg) por via intramuscular. Outro grupo de ratos sham-operados (2R) foi submetido ao mesmo estresse cirúrgico, porém sem a implantação do clipe, caracterizando o grupo controle normotenso. Seis semanas após as cirurgias os ratos Wistar e Wistar-Hannover, foi aferida a pressão arterial sistólica (PAS) dos ratos 2R-1C e do grupo controle (SHAM operado) por pletismografia de cauda (Power Lab System 4/26, ADInstruments).

Foram considerados hipertensos (2R-1C e 2K-1C) os animais com PAS superior ou igual a 160 mmHg.

#### Reatividade vascular

Para registro da tensão isométrica foram utilizadas preparações de aorta torácica isoladas de ratos hipertensos 2R-1C e normotensos 2R. Os animais foram

anestesiados com isoflurano (500  $\mu\text{L}$ /rato por via inalatória) e sacrificados por decapitação. A seguir, a aorta foi isolada, dissecada, removida e cortada em anéis de 3 a 4 mm. Os anéis foram montados entre dois ganchos de metal inseridos no lúmen da aorta. Um dos ganchos foi conectado a um suporte fixo ajustável e o outro a um transdutor de registro de força (Letica) acoplado ao sistema de aquisição de dados. O sistema foi montado em câmara para órgãos isolados contendo solução de Krebs pH 7,4, gaseificada com mistura carbogênica a 37°C. As preparações permaneceram em repouso por 60 min, sob tensão basal de 1,5 g para estabilização. Dependendo do protocolo a ser realizado, o endotélio foi removido (E-) ou não (E+), mecanicamente. A efetividade da remoção ou manutenção do endotélio foi verificada pela ausência ou presença, respectivamente, de relaxamento à acetilcolina (ACh, 1  $\mu\text{mol/L}$ ) nas aortas pré-contráidas com a  $\text{EC}_{50}$  (100  $\text{nmol/L}$ ) de fenilefrina (PE). Foram consideradas para os experimentos, as aortas com endotélio que apresentaram relaxamento para ACh  $\geq 80\%$  em aortas de 2R e  $\geq 30\%$  para 2R-1C. Esse critério de exclusão foi padronizado anteriormente em nosso laboratório. Em seguida, curvas concentração-efeito para Ang II foram realizadas na presença ou ausência dos antagonistas dos receptores  $\text{AT}_1$  (Losartan),  $\text{AT}_2$  (PD123319), Mas (A779) e inibidores das enzimas NO-sintase (L-NAME), COX (Indometacina) e da enzima Nox (Apocinina).

### **Delineamento Experimental**

Todos os protocolos experimentais foram realizados em aortas de ratos normotensos (2R e 2K), hipertensos renais (2R-1C e 2K-1C).

### **Resposta contrátil estimulada com Ang II em aortas com endotélio íntegro**

Foram realizadas curvas controle concentração-efeito (0,1  $\text{nmol/L}$  – 100  $\mu\text{mol/L}$ ) cumulativas para Ang II em aortas com endotélio.

### **Efeito do antagonista do receptor $\text{AT}_1$ sobre a contração induzida por Ang II**

Foram realizadas curvas concentração-efeito (0,1  $\text{nmol/L}$  – 100  $\mu\text{mol/L}$ ) cumulativas para Ang II em aortas após incubação por 30 min e em presença de Losartan (1  $\mu\text{mol/L}$ )

### **Efeito do antagonista do receptor AT<sub>2</sub> sobre a contração induzida por Ang II**

Foram realizadas curvas concentração-efeito (0,1 nmol/L – 100 µmol/L) cumulativas para Ang II em aortas após incubação por 30 min e em presença de PD123319 (1 µmol/L)

### **Efeito do antagonista do receptor Mas sobre a contração induzida por Ang II**

Foram realizadas curvas concentração-efeito (0,1 nmol/L – 100 µmol/L) cumulativas para Ang II em aortas após incubação por 30 min e em presença de A779 (10 µmol/L)

### **Efeito da remoção do endotélio sobre a contração induzida por Ang II**

Foram realizadas curvas concentração-efeito (0,1 nmol/L – 100 µmol/L) cumulativas para Ang II em aortas após a remoção mecânica do endotélio vascular.

### **Efeito do inibidor não seletivo da enzima NO sintase sobre a contração induzida por Ang II**

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para Ang II em aortas após a incubação por 30 min com L-NAME (100 µmol/L).

### **Efeito do inibidor da enzima NADPH oxidase (Nox) sobre a contração induzida por Ang II**

Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para Ang II em aorta após a incubação por 30 min com Apocinina (100 µmol/L).

## ***WESTERN BLOT***

### **Expressão dos receptores AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub>, IP<sub>3</sub>, P-IP<sub>3</sub> e da proteína Cav-1 endotelial e muscular**

Os anéis de aorta de ratos 2R e 2R-1C, com endotélio vascular intacto, foram colocados no banho de órgãos isolados sob tensão de 1,5 g durante 60 min, para estabilização. A integridade do endotélio foi verificada pelo relaxamento à ACh (1 µmol/L) nos anéis pré-contraídos com a EC<sub>70</sub> (300 nmol/L) da PE. A seguir, os anéis

foram retirados e congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -70°C, até o momento da quantificação das proteínas.

As amostras foram maceradas em 120 µL de tampão RIPA suplementado com inibidores de protease e de fosfatase. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm, por 10 min a 4°C, para remoção de *debris*. A concentração proteica das amostras foi determinada pela técnica de Bradford (Bio Rad Protein assay). As alíquotas do lisado, contendo 20 µg de proteína total, foram misturadas com tampão de amostra para concentração final de 1x. Em seguida, foram fervidos por 5 min e aplicadas no gel. A separação de proteínas foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, a 4°C, por aproximadamente 2h, a 150V. O padrão de peso molecular utilizado foi o Benchark (Life Technologies). Após a corrida no gel, as proteínas foram eletrotransferidas para a membrana de nitrocelulose e foi realizado o bloqueio com leite desnatado 5% em TBS-T por 60 min. Em seguida, a solução de bloqueio foi retirada e as membranas lavadas com TBS-T por tres vezes durante 5 min. A seguir, foram incubadas com anticorpo primário diluído em TBS-T com BSA 3% (albumina de soro bovino). Foram usados anticorpos para as proteínas AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub>, receptor de IP<sub>3</sub>, receptor fosforilado de IP<sub>3</sub>, miosina de cadeia leve (MCL) e Cav-1 (diluição 1:1.000). As membranas foram incubadas por 12h, a 4° C após três lavagens de 5 min com TBS-T. Os anticorpos secundários conjugados com peroxidase anti-coelho (1:1.000) ou anti-camundongo (1:2.000) foram diluídos em BSA 1% e aplicados à membrana por 60 min em temperatura ambiente. Foram feitas mais tres lavagens de 5 min e então realizada a detecção por quimioluminescência utilizando o kit ECL-Plus (GEHealthcare). A quantificação das proteínas foi feita por densitometria, utilizando-se o *software* ImageJ.

### **Análise da expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)**

Foram utilizadas aortas de ratos 2R-1C e ratos 2R para extração do RNA com TRIzol (Life Technologies, USA) seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 10 µg do RNA total por meio do *Superscript* II (Life Technologies, USA) e armazenados em freezer a -20°C até sua utilização. O qPCR foi realizado utilizando Sybr green para quantificar a expressão de eNOS (NOS3). A sequência específica utilizada para os primers foi: eNOS: AGCATGAGGCCTTGGTATTG (*forward*) e CCCGACATTTCCATCAGC (*reverse*).

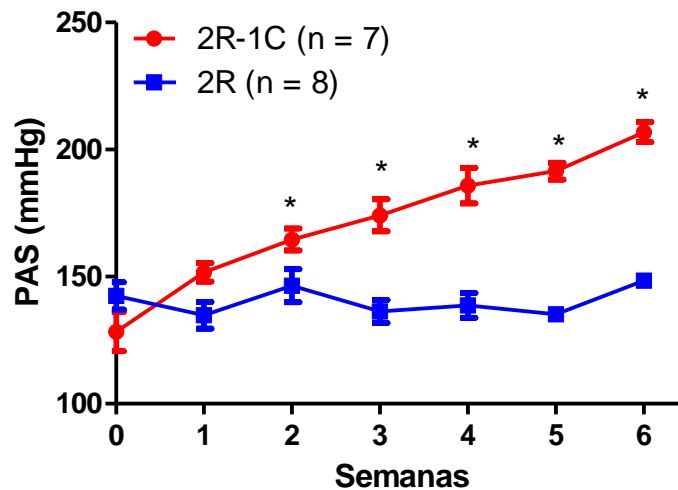
**Medidas dos níveis plasmáticos de Ang II**

Amostras de plasma de ratos 2R e 2R-1C foram utilizadas para quantificação da concentração de Ang II por meio do kit ELISA (Angiotensin II, Sigma-Aldrich, RAB0010). O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante e o limite de detecção era de 0,1 – 1.000 pg/mL.

## 5. RESULTADOS

### Efeito da indução da hipertensão renovascular em ratos Wistar

As medidas da pressão arterial sistólica (PAS) foram realizadas por pletismografia de cauda em ratos Wistar, ao longo de seis semanas após as cirurgias para indução da hipertensão renovascular (2R-1C) ou cirurgia fictícia (2R). Os valores de PAS estão expressos pela média da pressão arterial medida em mm Hg obtidas em ratos hipertensos (2R-1C) e seus respectivos controles (2R). Como mostra a Figura 1, a partir da segunda semana após as cirurgias, os animais do grupo 2R-1C apresentaram elevação gradativa e continuada da PAS até a sexta semana. Todos os valores de PAS obtidos a partir da segunda semana, foram superiores aos valores de PAS obtidos no grupo normotenso 2R.



**Figura 1: Medidas da pressão arterial sistólica (PAS) em ratos controle 2R e hipertensos 2R-1C.** Os pontos representam a média  $\pm$  EPM, das medidas realizadas ao longo de seis semanas após as cirurgias para indução da hipertensão renovascular (2R-1C) ou cirurgia fictícia (2R). \*Representa diferença entre os valores de PAS obtidos em 2R-1C em relação ao controle 2R ( $p < 0,05$ ).

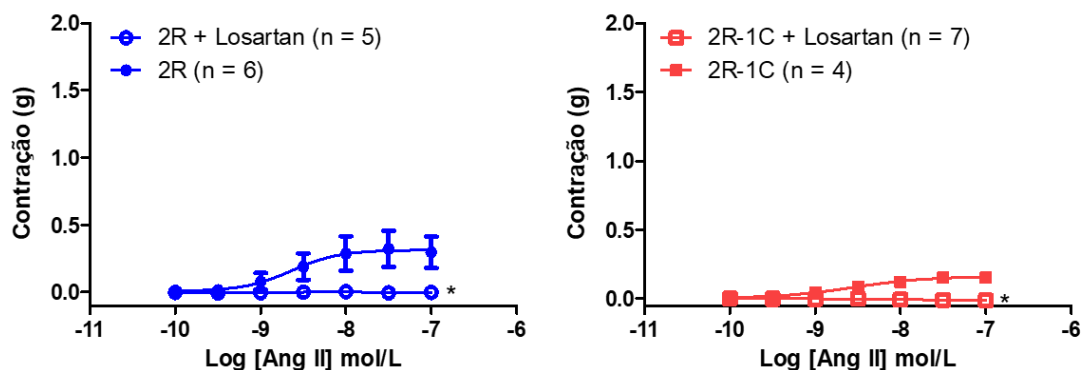
**Tabela 1.** Pressão arterial sistólica (mmHg) de ratos 2R e 2R-1C nas semanas seguintes à cirurgia para indução da hipertensão renovascular.

Semanas após cirurgia	2R	2R-1C
0	142,5 ± 5,39	128,3 ± 7,68
1	134,8 ± 5,27	151,7 ± 3,67*
2	146,4 ± 6,49	164,6 ± 4,37*
3	136,3 ± 4,44	174,1 ± 6,32*
4	138,7 ± 4,88	185,8 ± 6,97*
5	135,1 ± 2,75	191,5 ± 3,34*
6	148,4 ± 2,66	206,8 ± 3,95*

A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida ao longo de seis semanas após as cirurgias de indução da hipertensão renovascular (2R-1C) e Sham (2R). Os resultados obtidos em ratos 2R-1C foram comparados com 2R. \*Representa diferença estatística entre os grupos com  $p < 0,05$ .

### Efeito do antagonista dos receptores $AT_1$ sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II

Curvas concentração-efeito para Ang II foram realizadas em aortas com endotélio, isoladas de ratos Wistar 2R e 2R-1C, na ausência e após incubação com o antagonista do receptor  $AT_1$ , Losartan (1  $\mu\text{mol/L}$ ). Como mostra a Figura 2, o Losartan aboliu a resposta contrátil estimulada pela Ang II ( $E_{\text{máx}}$ :  $-0,01 \pm 0,01$  g;  $pD_2$ :  $6,61 \pm 1,33$ ;  $n = 7$ ;  $p < 0,0001$ ) em relação à resposta obtida com Ang II na ausência do antagonista, em aortas de ratos 2R-1C ( $E_{\text{máx}}$ :  $0,15 \pm 0,03$  g;  $pD_2$ :  $8,43 \pm 0,16$ ;  $n = 4$ ). Da mesma maneira, o Losartan aboliu a resposta contrátil estimulada com Ang II em aortas de ratos 2R. Em preparações controle obtivemos os valores: ( $E_{\text{máx}}$ :  $0,30 \pm 0,12$  g;  $pD_2$ :  $8,55 \pm 0,09$ ;  $n = 6$ ) e em preparações incubadas com Losartan, o  $E_{\text{máx}}$  foi de  $-0,002 \pm 0,004$  g e os valores de  $pD_2$ :  $8,20 \pm 0,37$ ;  $n = 5$ ;  $p = 0,0471$ .

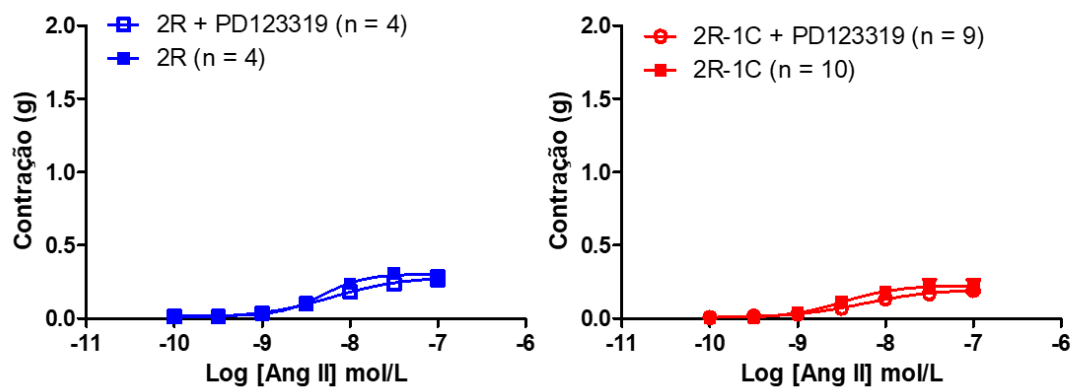


**Figura 2: Efeito do antagonista de receptores  $AT_1$  (Losartan) sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II.** Curvas concentração-efeito foram construídas na ausência (controle) e após a incubação por 30 min e na presença do Losartan (1  $\mu\text{mol/L}$ ) em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R ou 2R-1C. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n). \*representa diferença no  $E_{\text{máx}}$  ( $p < 0,05$ ) entre as respostas obtidas em preparações incubadas com Losartan e controle.



### Efeito do antagonista dos receptores AT<sub>2</sub> sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II

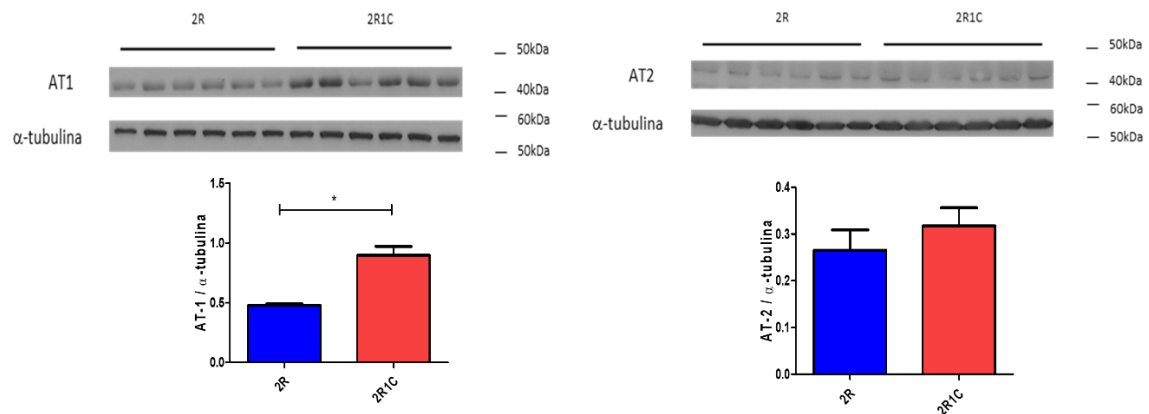
Curvas concentração-efeito para Ang II foram realizadas em aortas com endotélio, isoladas de ratos Wistar 2R e 2R-1C, na ausência ou após incubação por 30 min e na presença do antagonista do receptor AT<sub>2</sub> (PD123319, 1 µmol/L) (Figura 3). O antagonista dos receptores AT<sub>2</sub> não alterou a resposta contrátil estimulada com Ang II na aorta de ratos normotensos 2R (Emáx: 0,27 ± 0,05 g; pD<sub>2</sub>: 8,19 ± 0,06; n= 4; controle: Emáx: 0,29 ± 0,02 g; pD<sub>2</sub>: 8,28 ± 0,07; n= 4) e na aorta de ratos hipertensos 2R-1C (Emáx: 0,19 ± 0,04 g; pD<sub>2</sub>: 8,10 ± 0,28; n= 9; controle Emáx: 0,22 ± 0,04 g; pD<sub>2</sub>: 8,46 ± 0,11; n= 10)



**Figura 3: Efeito do antagonista de receptores AT<sub>2</sub> (PD123319) sobre a contração estimulada com Ang II.** Curvas concentração-efeito foram construídas na ausência e após a incubação por 30 min e na presença de PD123319 (1 µmol/L) em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R ou 2R-1C. Dados representam a média ± EPM (n=4–10).

### Expressão proteica basal dos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>

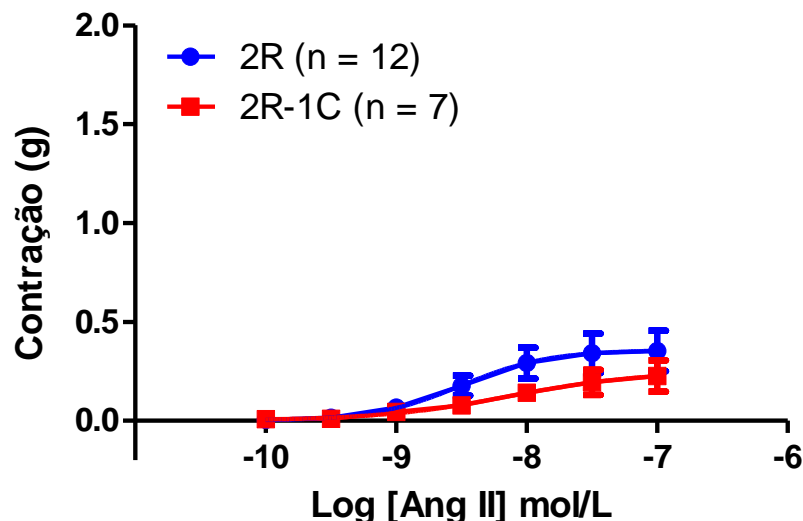
Quantificamos por Western Blot, a expressão proteica basal (sem estímulo) dos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, em homogenatos de aortas de ratos hipertensos (2R-1C) e de ratos normotensos (2R). Quando comparamos os dois grupos, verificamos que em aortas de ratos 2R-1C, a expressão basal do receptor AT<sub>1</sub> foi maior (0,898 ± 0,07; n= 6; p= 0,0002) do que em aortas dos ratos 2R (0,478 ± 0,01; n= 6) (Figura 4). Por outro lado, a expressão basal dos receptores AT<sub>2</sub>, não foi diferente entre aortas isoladas de ratos 2R-1C (0,318 ± 0,04; n= 6) e de ratos 2R (0,265 ± 0,04; n= 6) (Figura 4).



**Figura 4: Expressão basal dos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> em homogenatos de aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C.** A expressão proteica dos receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> foi quantificada por Western Blot em homogenatos de aortas de ratos 2R e 2R-1C. Os dados representam média  $\pm$  EPM, corrigidos pela concentração da proteína  $\alpha$ -tubulina (n= 6, em cada grupo). \* Representa diferença na expressão proteica do receptor AT<sub>1</sub> entre aortas de ratos 2R-1C e 2R (p=0,0002).

### Resposta contrátil estimulada com Ang II em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C

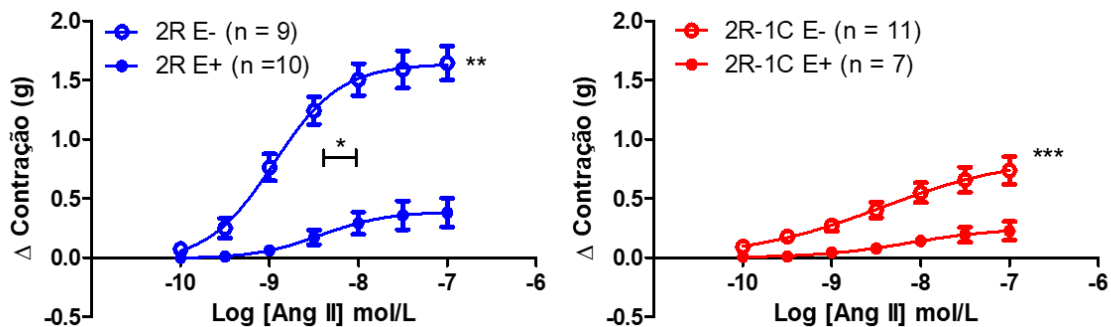
Curvas concentração-efeito para Ang II foram realizadas em aortas com endotélio, isoladas de ratos Wistar 2R e 2R-1C (Figura 5). Verificamos que não houve diferença entre a resposta contrátil estimulada com Ang II em aortas de ratos 2R-1C (Emáx:  $0,23 \pm 0,08$  g; pD<sub>2</sub>:  $8,37 \pm 0,14$ ; n=7) e 2R (Emáx:  $0,35 \pm 0,10$  g; pD<sub>2</sub>:  $8,52 \pm 0,09$ ; n=12)



**Figura 5: Resposta contrátil estimulada com Ang II em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C.** Curvas concentração-efeito para Ang II foram realizadas em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C. Dados representam média  $\pm$  EPM (n=7–12).

## Efeito da remoção do endotélio sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II

Curvas concentração-efeito para Ang II foram realizadas em aortas com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-), isoladas de ratos Wistar 2R e 2R-1C. A remoção do endotélio aumentou a resposta contrátil à Ang II em aortas de ratos 2R, de forma significativa, tanto a potência (E-:  $pD_2$ :  $9,00 \pm 0,07$ ;  $n=9$ ;  $p=0,0006$ ; E+  $pD_2$ :  $8,47 \pm 0,10$ ;  $n=10$ ) como a eficácia (E-  $Emáx$ :  $1,64 \pm 0,14$  g;  $n=9$ ;  $p<0,0001$ ; E+  $Emáx$ :  $0,38 \pm 0,12$  g;  $n=10$ ). Porém, em aortas isoladas de ratos 2R-1C, a remoção do endotélio promoveu aumento somente do  $Emáx$  (E-:  $0,74 \pm 0,12$  g;  $n=11$ ;  $p=0,0056$ ; E+:  $0,23 \pm 0,08$  g;  $n=7$ ), sem alterar a potência da Ang II em induzir contração (E-  $pD_2$ :  $8,49 \pm 0,13$ ;  $n=11$ ; E+  $pD_2$ :  $8,37 \pm 0,14$ ;  $n=7$ ) (Figura 6).

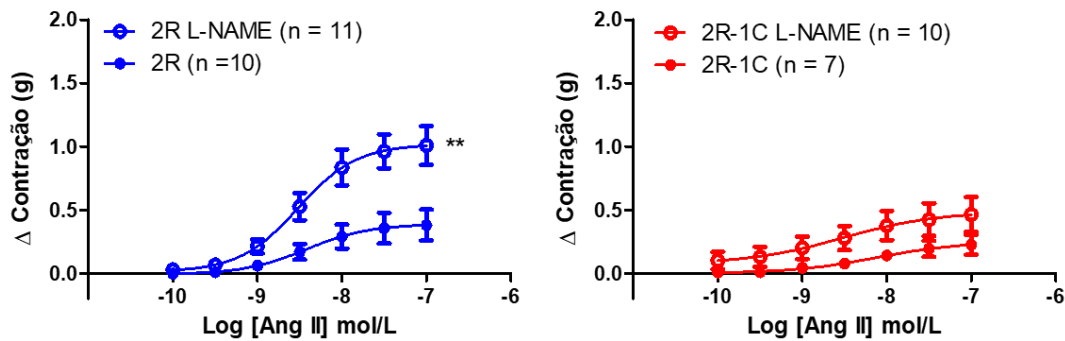


**Figura 6: Efeito da remoção do endotélio sobre a contração estimulada com Ang II em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C.** Curvas concentração-efeito para Ang II foram construídas em aortas com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-) isoladas de ratos 2R ou 2R-1C. Os Dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n=7-11$ ). \*, \*\* representam diferenças nos valores de  $pD_2$  ( $p=0,0006$ ) e  $Emáx$  ( $p<0,0001$ ), entre 2R E- e E+. \*\*\* Representa diferença no valor de  $Emáx$  entre 2R-1C (E- e E+) ( $p=0,0056$ ).

## Efeito da inibição da eNOS sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II

Curvas concentração-efeito para Ang II foram realizadas em aortas com endotélio, isoladas de ratos Wistar 2R e 2R-1C, na ausência ou após incubação e na presença do inibidor não seletivo da enzima eNOS (L-NAME,  $100 \mu\text{mol/L}$ ) (Figura 7). A inibição da eNOS não alterou a resposta contrátil estimulada com Ang II nas aortas dos ratos 2R-1C (+L-NAME /  $Emáx$ :  $0,46 \pm 0,14$  g;  $pD_2$ :  $8,50 \pm 0,15$ ;  $n=10$ ; controle  $Emáx$ :  $0,23 \pm 0,08$  g;  $pD_2$ :  $8,37 \pm 0,14$ ;  $n=7$ ). Porém, o L-NAME aumentou os valores de  $Emáx$  (+L-NAME:  $1,01 \pm 0,15$  g;  $n=11$ ;  $p=0,0052$ ; controle:  $0,38 \pm 0,12$  g;  $n=10$ ).

Por outro lado, o L-NAME não alterou a potência da Ang II nas aortas de ratos 2R (+L-NAME  $pD_2$ :  $8,48 \pm 0,07$ ;  $n = 11$ ; controle  $pD_2$ :  $8,47 \pm 0,10$ ;  $n=10$ ).

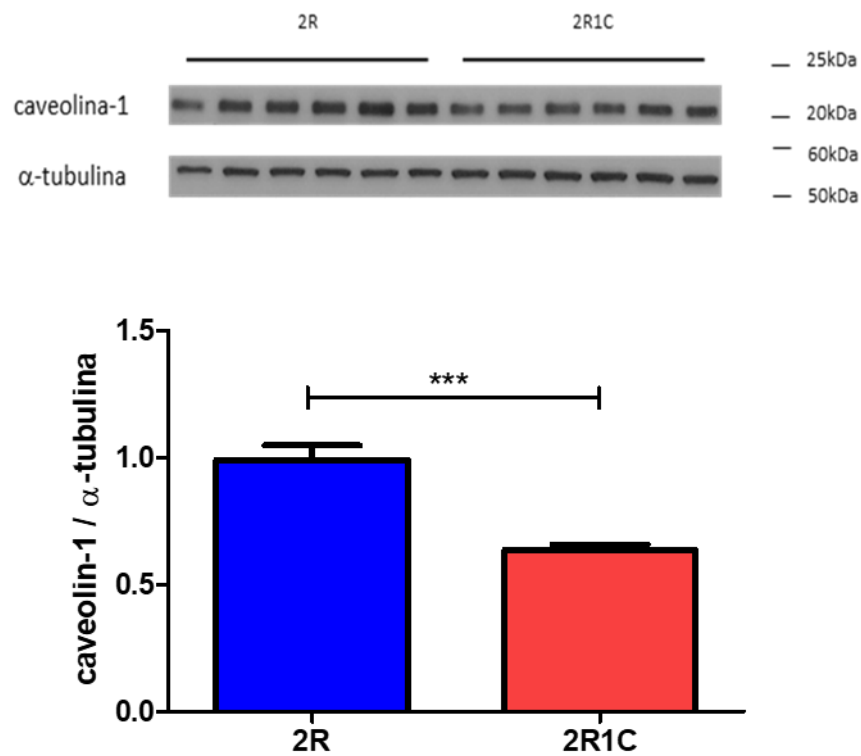


**Figura 7: Efeito do inibidor da eNOS (L-NAME) sobre a contração estimulada com Ang II.** Curvas concentração-efeito foram construídas em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R ou 2R-1C, na ausência ou após a incubação por 30 min e na presença do L-NAME (100  $\mu\text{mol/L}$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EPM ( $n=7-11$ ). \*\* Representa a diferença nos valores de  $E_{\text{máx}}$  entre as respostas obtidas na presença e na ausência de L-NAME em ratos 2R ( $p=0,0052$ ).

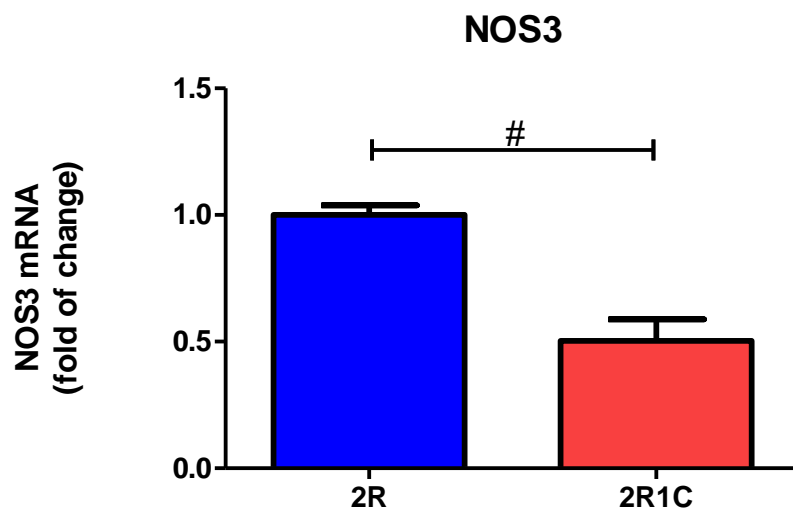
### Expressão proteica basal da proteína Caveolina-1 e expressão gênica do mRNA para eNOS.

Quando quantificamos a expressão basal (sem estímulo) da proteína Caveolina-1 (Cav-1), verificamos que a expressão proteica basal de Cav-1 foi menor em aortas isoladas de ratos 2R-1C ( $0,636 \pm 0,020$ ;  $n = 6$ ;  $p = 0,0001$ ) do que em aortas isoladas de ratos 2R ( $0,991 \pm 0,055$ ) (Figura 8).

Ao quantificarmos a expressão gênica da enzima eNOS por qPCR, verificamos que a expressão gênica da eNOS foi menor em aorta de ratos 2R-1C ( $0,503 \pm 0,08$ ;  $n = 5$ ;  $p = 0,0003$ ), quando comparada à sua expressão gênica em aortas dos ratos 2R ( $1,00 \pm 0,04$ ;  $n = 6$ ) (Figura 9).



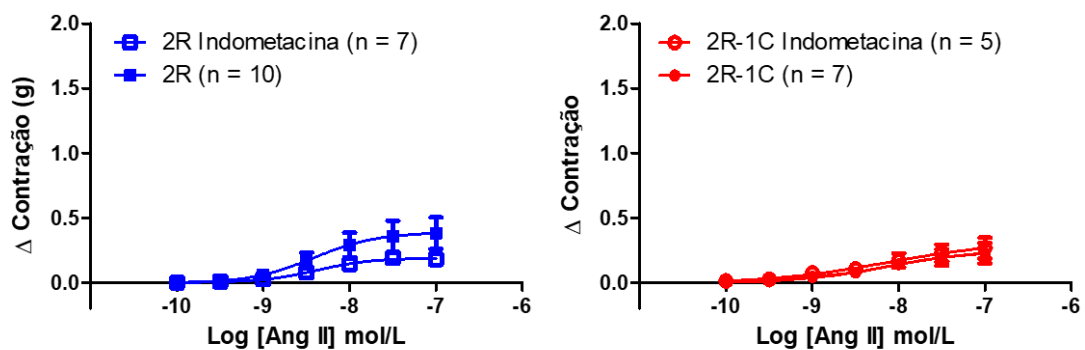
**Figura 8: Expressão proteica basal de Cav-1 em homogenatos de aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C.** Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n= 5–6). \*\*\* Representa diferença (p=0,0001) na expressão da Cav-1 entre aortas de 2R-1C e 2R.



**Figura 9: Expressão gênica da eNOS (NOS3) em homogenatos de aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C.** Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n=6). # Representa diferença (p=0,0003) na expressão gênica da eNOS entre aortas isoladas de 2R-1C e 2R.

## Efeito da inibição da enzima COX sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II

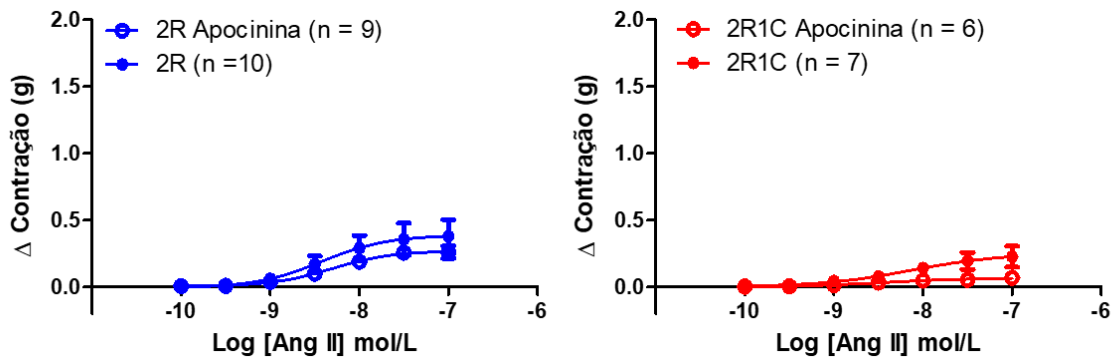
Curvas concentração-efeito para Ang II foram realizadas em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C, na ausência ou após incubação e na presença do inibidor não seletivo da COX (Indometacina, 10  $\mu\text{mol/L}$ ) (Figura 10). Verificamos que a indometacina não alterou a resposta contrátil estimulada com Ang II em aortas isoladas de ratos 2R (+Indometacina  $E_{\text{máx}}$ : 0,18  $\pm$  0,04 g;  $pD_2$ : 8,32  $\pm$  0,10; n= 7; controle  $E_{\text{máx}}$ : 0,38  $\pm$  0,12 g;  $pD_2$ : 8,47  $\pm$  0,10; n=10) e 2R-1C (+Indometacina  $E_{\text{máx}}$ : 0,27  $\pm$  0,08 g;  $pD_2$ : 7,98  $\pm$  0,21; n= 5; controle  $E_{\text{máx}}$  0,23  $\pm$  0,08 g;  $pD_2$ : 8,37  $\pm$  0,14; n= 7).



**Figura 10: Efeito da inibição da COX com indometacina sobre a contração estimulada com Ang II em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C.** Curvas concentração-efeito foram construídas em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C, na ausência e após a incubação por 30 min e na presença de Indometacina (10  $\mu\text{mol/L}$ ). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5 – 10).

## Efeito da inibição da enzima NADPH oxidase (Nox) sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II

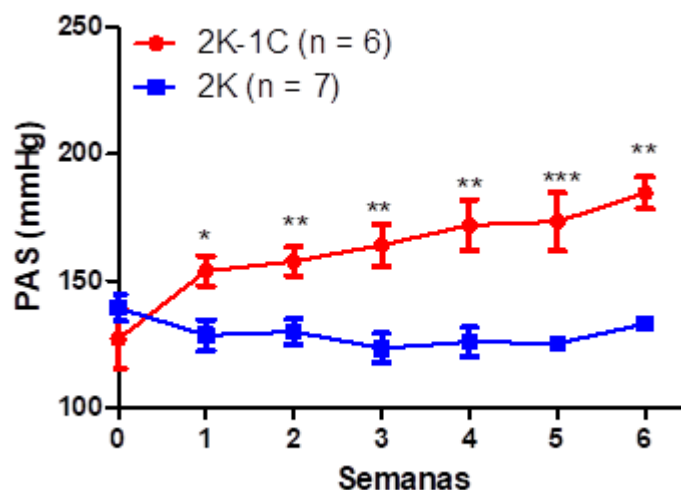
Curvas concentração-efeito para Ang II foram realizadas em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C, na ausência ou após incubação e na presença do inibidor da enzima NADPH oxidase (Apocinina, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) (Figura 11). Verificamos que a incubação com apocinina não alterou a resposta contrátil estimulada com Ang II nas aortas isoladas dos ratos 2R (+Apocinina  $E_{\text{máx}}$ : 0,26  $\pm$  0,05 g;  $pD_2$ : 8,31  $\pm$  0,06; n= 9; controle  $E_{\text{máx}}$ : 0,38  $\pm$  0,12 g;  $pD_2$ : 8,47  $\pm$  0,10; n= 10) e 2R-1C (+Apocinina  $E_{\text{máx}}$ : 0,16  $\pm$  0,03 g;  $pD_2$ : 8,18  $\pm$  0,11; n= 6; controle  $E_{\text{máx}}$ : 0,23  $\pm$  0,08 g;  $pD_2$ : 8,37  $\pm$  0,14; n= 7).



**Figura 11: Efeito da inibição da enzima NADPH oxidase sobre a contração estimulada com Ang II em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C.** Curvas Concentração-efeito foram construídas na ausência ou após incubação por 30 min e na presença do inibidor da enzima NADPH oxidase (apocinina, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R ou 2R-1C. Os dados representam média  $\pm$  EPM ( $n = 6 - 10$ ).

### Efeito da indução da hipertensão renovascular em ratos Wistar Hannover

As medidas da pressão arterial (PAS) por pletismografia de cauda em ratos Wistar Hannover foram realizadas ao longo de seis semanas após as cirurgias para indução da hipertensão renovascular (2K-1C) ou cirurgia fictícia (2K). Os valores de PAS estão expressos como média da pressão arterial medida em *mm Hg* obtidas em ratos hipertensos (2K-1C) e seus respectivos controles (2K). Como mostra a Figura 12, a partir da primeira semana após as cirurgias, os animais do grupo 2K-1C apresentaram elevação da PAS, quando comparados com o grupo normotenso 2K.



**Figura 12: Medidas da pressão arterial sistólica (PAS) em ratos Wistar Hannover.** Os pontos representam a média  $\pm$  EPM, das medidas realizadas ao longo de seis semanas após as cirurgias para indução da hipertensão renovascular (2K-1C) ou cirurgia fictícia (2K). \*Representa diferença entre os valores de PAS obtidos em relação ao controle 2R ( $p < 0,05$ ), \*\*( $p < 0,01$ ), \*\*\*( $p < 0,001$ ).

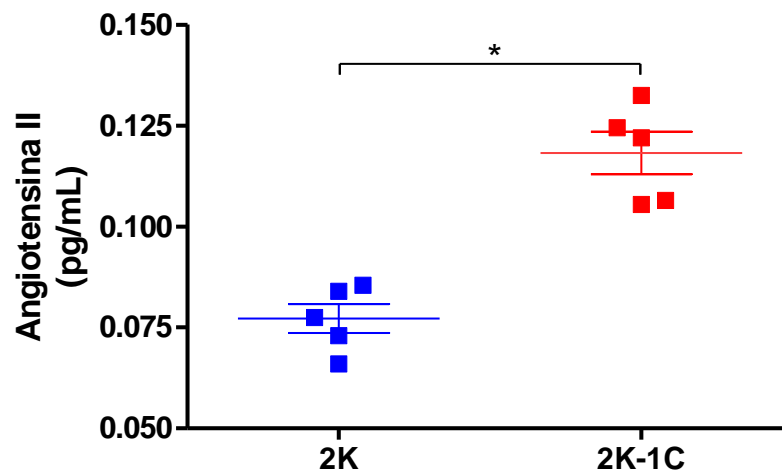
**Tabela 2.** Pressão arterial sistólica (mmHg) de ratos 2K e 2K-1C nas semanas seguintes à cirurgia para indução da hipertensão renovascular

Semanas após a cirurgia	2K	2K-1C
0	139,39 ± 5,27	127,05 ± 11,64
1	128,67 ± 6,11	153,92 ± 5,91*
2	130,07 ± 4,99	157,80 ± 5,66**
3	124,66 ± 4,90	164,17 ± 8,37**
4	126,01 ± 5,75	172,11 ± 9,99**
5	125,49 ± 2,07	173,37 ± 11,4***
6	133,15 ± 1,74	203,98 ± 14,34**

A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida ao longo de seis semanas após as cirurgias de indução da hipertensão renovascular (2K-1C) e Sham (2K). Os resultados obtidos em ratos 2K-1C foram comparados com 2K. \*Representa diferença estatística entre os grupos com  $p < 0,05$ , \*\* ( $p < 0,01$ ) e \*\*\* ( $p < 0,001$ )

### Medidas dos níveis de angiotensina II plasmática

Quando quantificamos a expressão basal (sem estímulo) dos níveis plasmáticos de angiotensina II, seis semanas após a indução da hipertensão renovascular, verificamos que os níveis plasmáticos de Ang II foram maiores em ratos Wistar-Hannover hipertensos 2K-1C ( $0,118 \pm 0,005$ ;  $n = 5$ ;  $p = 0,0002$ ) quando comparados com normotensos 2K ( $0,077 \pm 0,003$ ;  $n = 5$ ) (figura 13).

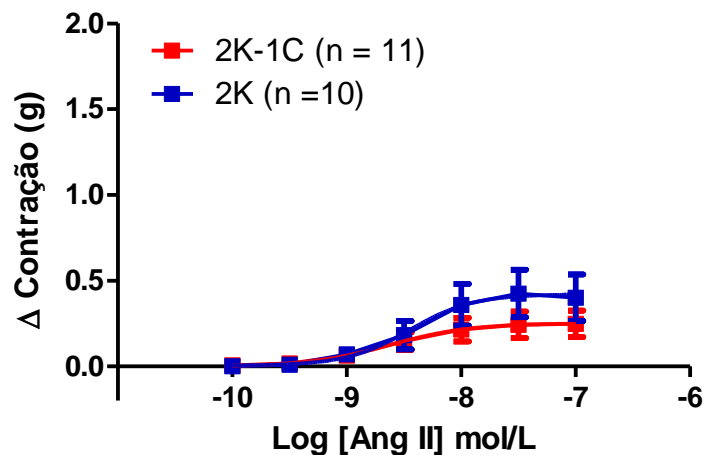


**Figura 13: Níveis plasmáticos de Angiotensina II.** Avaliação por ELISA imunoensoio para detecção dos níveis plasmáticos de Ang II em ratos Wistar-Hannover normotensos (2K) e hipertensos (2K-1C). Dados representam a média ± EPM ( $n = 5$ ). \*Representa diferença entre 2K-1C e 2K ( $p < 0,05$ )



### Resposta contrátil estimulada com Ang II em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2K-1C e 2K

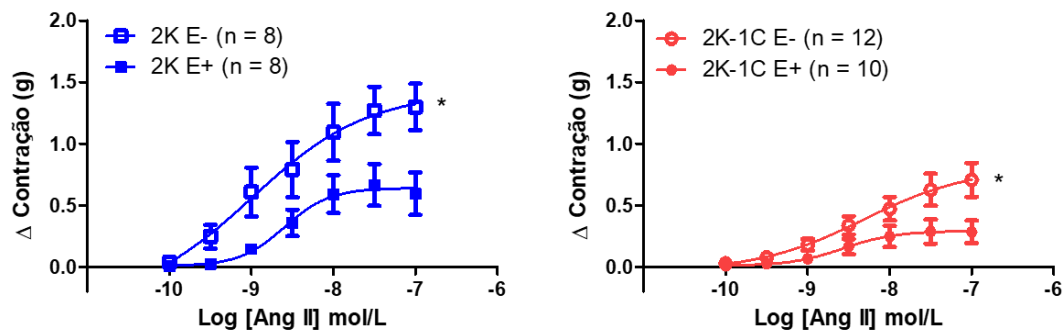
Curvas concentração-efeito para Ang II foram realizadas em aortas com endotélio, isoladas de ratos Wistar Hannover 2K e 2K-1C (Figura 14). Verificamos que não houve diferença entre a resposta contrátil estimulada com Ang II em aortas de ratos 2K-1C ( $E_{m\acute{a}x}$ :  $0,25 \pm 0,08$  g;  $pD_2$ :  $8,65 \pm 0,11$ ;  $n = 11$ ) e de ratos 2K ( $E_{m\acute{a}x}$ :  $0,40 \pm 0,13$  g;  $pD_2$ :  $8,42 \pm 0,09$ ;  $n = 10$ ).



**Figura 14: Resposta contrátil estimulada com Ang II em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2K e 2K-1C.** Curvas concentração-efeito para Ang II foram realizadas em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2K e 2K-1C. Dados representam média  $\pm$  EPM ( $n = 10 - 11$ ).

### Efeito da remoção do endotélio sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II

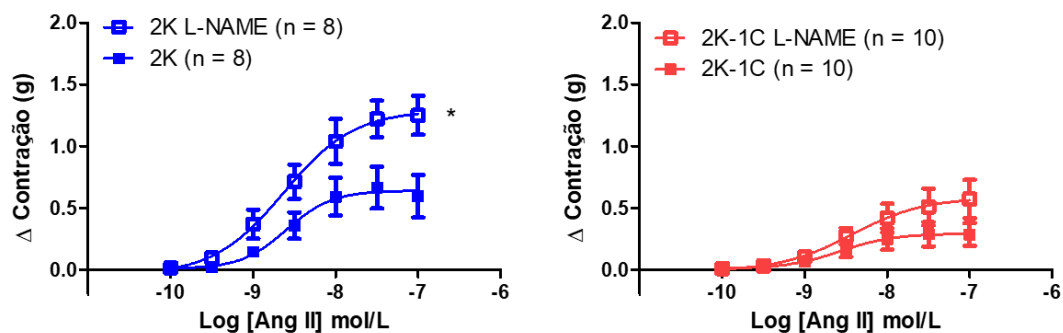
Curvas concentração-efeito para Ang II foram realizadas em aortas com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-), isoladas de ratos Wistar Hannover 2K e 2K-1C. A remoção do endotélio aumentou de forma significativa a eficácia ( $E_{m\acute{a}x}$ ) da Ang II nas aortas isoladas de ratos 2K e 2K-1C (E-  $E_{m\acute{a}x}$ :  $0,71 \pm 0,14$  g;  $n = 12$ ;  $p = 0,024$ ; E+  $E_{m\acute{a}x}$ :  $0,28 \pm 0,10$  g;  $n = 10$ ), quando comparados com os respectivos controles (E+).



**Figura 15: Efeito da remoção do endotélio sobre a contração estimulada com Ang II em aortas isoladas de ratos 2K e 2K-1C.** Curvas concentração-efeito para Ang II foram construídas em aortas com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-) isoladas de ratos 2K e 2K-1C. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n = 8 – 12). \* Representa a diferença entre os valores de  $E_{m\acute{a}x}$  ( $p < 0,05$ ) entre 2K E- vs 2K E+ e 2K-1C E- vs 2K-1C E+.

### Efeito da inibição da eNOS sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II

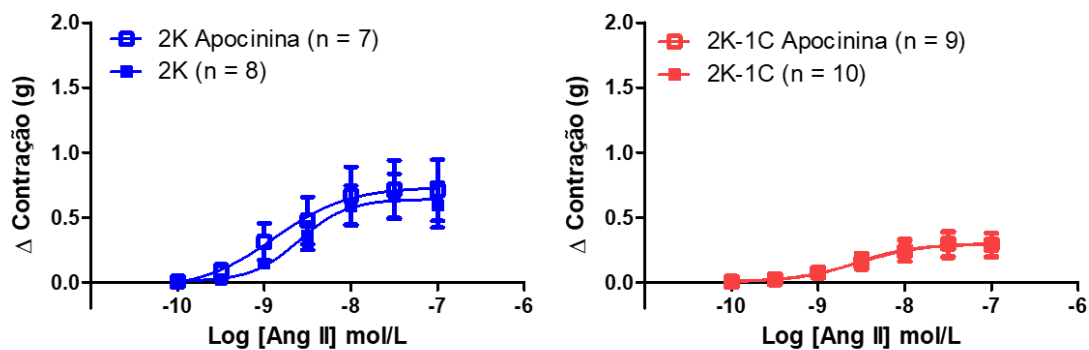
Curvas concentração-efeito para Ang II foram realizadas em aortas com endotélio, isoladas de ratos Wistar Hannover 2K e 2K-1C, na ausência ou após a incubação e na presença do inibidor não seletivo da enzima eNOS (L-NAME, 100  $\mu$ mol/L) (Figura 15). A inibição da eNOS não alterou a resposta contrátil estimulada com Ang II nas aortas dos ratos 2K-1C (+L-NAME /  $E_{m\acute{a}x}$ :  $0,57 \pm 0,15$  g;  $pD_2$ :  $8,35 \pm 0,14$ ; n= 10; controle  $E_{m\acute{a}x}$ :  $0,28 \pm 0,09$  g;  $pD_2$ :  $8,55 \pm 0,13$ ; n= 10). Porém, em aortas de ratos 2K, aumentou significativamente os valores de  $E_{m\acute{a}x}$  (+L-NAME  $E_{m\acute{a}x}$ :  $1,25 \pm 0,16$  g; n= 8;  $p = 0,014$ ; controle  $E_{m\acute{a}x}$ :  $0,59 \pm 0,17$  g; n= 8). Entretanto, o L-NAME não alterou a potência da Ang II (+L-NAME  $pD_2$ :  $8,69 \pm 0,23$  g; n= 8; controle  $pD_2$ :  $8,54 \pm 0,10$ ; n= 8).



**Figura 16: Efeito do inibidor da eNOS (L-NAME) sobre a contração estimulada com Ang II em aortas de ratos Wistar Hannover.** Curvas concentração-efeito foram construídas em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2K ou 2K-1C na ausência ou após a incubação por 30 min e na presença do L-NAME (100  $\mu$ mol/L). OS dados representam a média  $\pm$  EPM (n=7–11). \* Representa a diferença nos valores de  $E_{m\acute{a}x}$  entre as respostas obtidas na presença e na ausência de L-NAME em ratos 2K ( $p = 0,0143$ ).

### Efeito da inibição da enzima NADPH oxidase sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II

Curvas concentração-efeito para Ang II foram realizadas em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2K e 2K-1C, na ausência ou após a incubação e na presença do inibidor da enzima NADPH oxidase (Apocinina, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) (Figura 16). Verificamos que a incubação com apocinina não alterou a resposta contrátil estimulada com Ang II em aortas isoladas dos ratos 2K-1C (+Apocinina  $E_{\text{máx}}$ :  $0,29 \pm 0,09$  g;  $pD_2$ :  $8,55 \pm 0,23$ ;  $n = 9$ ; controle  $E_{\text{máx}}$ :  $0,28 \pm 0,09$  g;  $pD_2$ :  $8,55 \pm 0,13$ ;  $n=10$ ) e 2K (+Apocinina  $E_{\text{máx}}$ :  $0,59 \pm 0,17$  g;  $pD_2$ :  $8,54 \pm 0,09$ ;  $n = 7$ ; controle  $E_{\text{máx}}$ :  $0,71 \pm 0,23$  g;  $pD_2$ :  $8,78 \pm 0,20$  g;  $n = 8$ ).

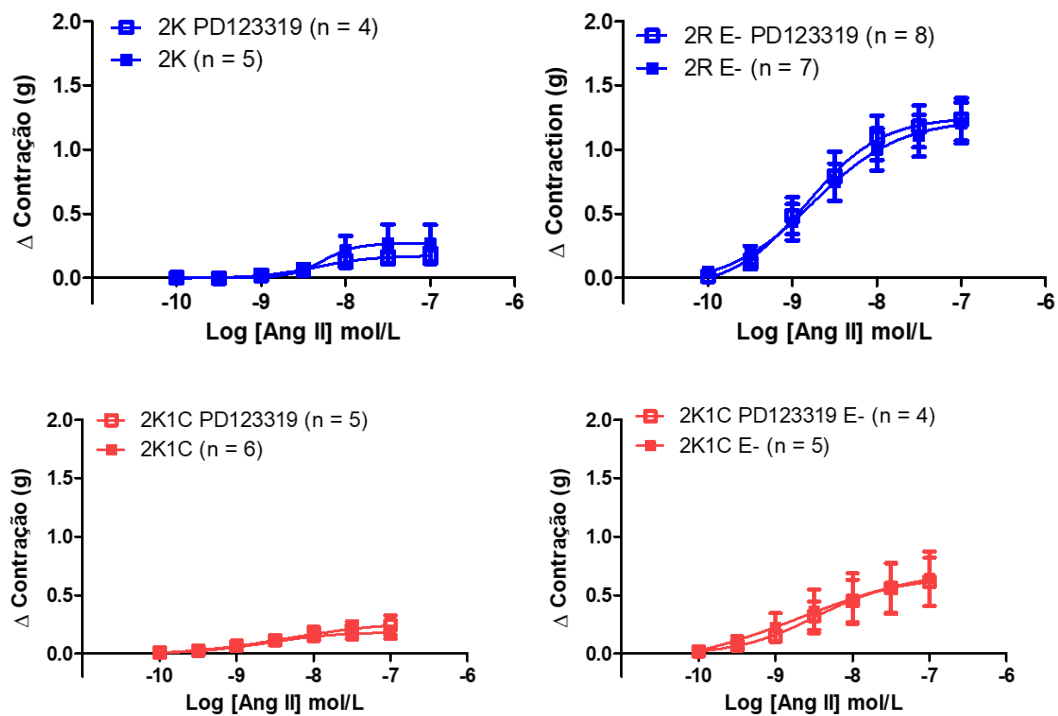


**Figura 17: Efeito da inibição da enzima NADPH oxidase sobre a contração estimulada com Ang II em aortas isoladas de ratos 2K e 2K-1C.** Curvas concentração-efeito foram construídas na ausência ou após a incubação por 30 min e na presença do inibidor da NADPH oxidase (Apocinina, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2K ou 2K-1C. Os dados representam média  $\pm$  EPM ( $n=7 - 10$ ).

### Efeito do antagonista dos receptores $AT_2$ (PD123319) sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II

Curvas concentração-efeito para Ang II foram realizadas em aortas com ou sem endotélio, isoladas de ratos Wistar Hannover 2K e 2K-1C, na ausência e após incubação com PD123319 (1  $\mu\text{mol/L}$ ). Como mostra a Figura 17, o antagonista PD123319 não alterou a resposta contrátil estimulada pela Ang II, tanto em aortas de ratos 2K-1C (+PD123319  $E_{\text{máx}}$ :  $0,24 \pm 0,09$  g;  $pD_2$ :  $8,68 \pm 0,33$ ;  $n = 5$ ; controle  $E_{\text{máx}}$ :  $0,18 \pm 0,05$  g;  $pD_2$ :  $8,70 \pm 0,19$ ;  $n = 6$ ) como de ratos 2K (+PD123319  $E_{\text{máx}}$ :  $0,17 \pm 0,0$  g;  $pD_2$ :  $8,33 \pm 0,23$ ;  $n = 4$ ; controle  $E_{\text{máx}}$ :  $0,26 \pm 0,15$  g;  $pD_2$ :  $8,40 \pm 0,13$ ;  $n = 5$ ).

O antagonista PD123319 também não alterou a resposta contrátil em aortas sem endotélio, de aortas de ratos 2K-1C (+PD123319 Emáx:  $0,61 \pm 0,21$  g;  $pD_2$ :  $8,18 \pm 0,19$ ;  $n= 4$ ; controle Emáx:  $0,64 \pm 0,23$  g;  $pD_2$ :  $8,18 \pm 0,366$ ;  $n= 5$ ) e de ratos 2K (+PD123319 Emáx:  $1,23 \pm 0,17$  g;  $pD_2$ :  $8,75 \pm 0,12$ ;  $n= 8$ ; controle Emáx:  $1,21 \pm 0,16$  g;  $pD_2$ :  $8,77 \pm 0,27$ ;  $n= 7$ ).

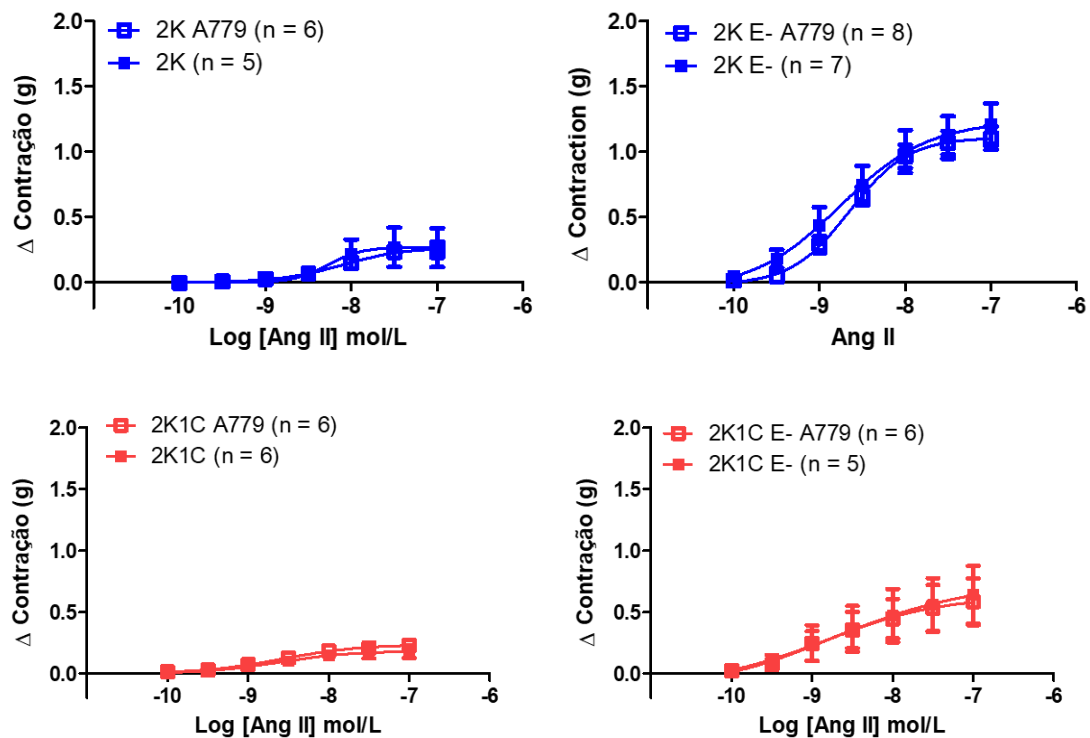


**Figura 18: Efeito do antagonista PD123319 sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II.** Curvas concentração-efeito foram construídas na ausência (controle) e após a incubação por 30 min e na presença do PD123319 ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2K ou 2K-1C com e sem endotélio. Os dados representam a média  $\pm$  EPM. ( $n=4-8$ ).

### Efeito do antagonista do receptor Mas (A779) sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II

Curvas concentração-efeito para Ang II foram realizadas em aortas com ou sem endotélio, isoladas de ratos Wistar Hannover 2K e 2K-1C, na ausência ou após incubação por 30 min e na presença do antagonista A779 ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) (Figura 18). A incubação com o A779 não alterou a resposta contrátil estimulada com Ang II nos ratos normotensos 2K (Emáx:  $0,25 \pm 0,06$ ;  $pD_2$ :  $8,22 \pm 0,13$ ;  $n=6$ ; 2K / Emáx:  $0,26 \pm$

0,15 g; pD<sub>2</sub>: 8,40 ± 0,13; n= 5) e 2K-1C (+A779 Emáx: 0,23 ± 0,04 g; pD<sub>2</sub>: 8,64 ± 0,21; n= 6; controle Emáx: 0,18 ± 0,05 g; pD<sub>2</sub>: 8,70 ± 0,19; n=6). O mesmo ocorreu em aortas sem endotélio em 2K-1C (+A779 Emáx: 0,58 ± 0,19 g; pD<sub>2</sub>: 8,74 ± 0,42; n= 6; controle Emáx: 0,64 ± 0,23 g; pD<sub>2</sub>: 8,18 ± 0,37; n= 5) e em aortas de ratos 2K (+A779 Emáx: 1,10 ± 0,09 g; pD<sub>2</sub>: 8,66 ± 0,06; n=8; controle Emáx: 1,21 ± 0,16 g; pD<sub>2</sub>: 8,77 ± 0,22; n= 7).

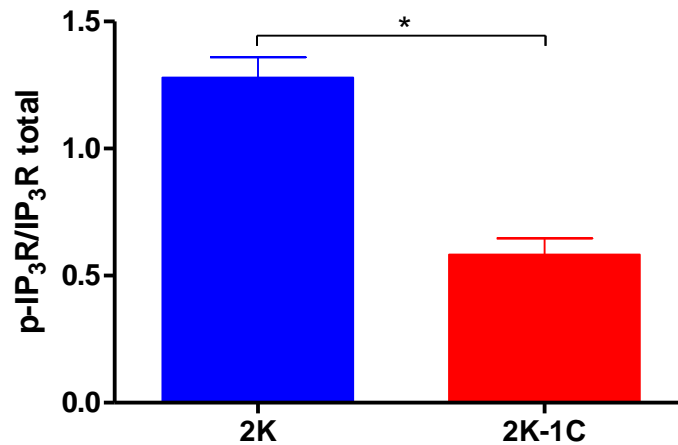


**Figura 19: Efeito do antagonista do receptor Mas (A779) sobre a resposta contrátil estimulada com Ang II.** Curvas concentração-efeito foram construídas na ausência (controle) e após a incubação por 30 min e na presença do A779 (10 μmol/L) em aortas com ou sem endotélio, isoladas de ratos 2K e 2K-1C. Os dados representam a média ± EPM. (n = 5 – 8).

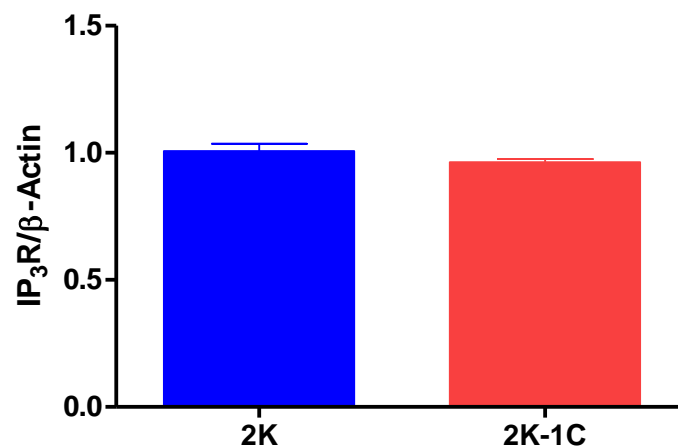
### Expressão proteica basal dos receptores de IP<sub>3</sub>, phospho-IP<sub>3</sub> e MLC

Quantificamos por Western Blot, a expressão proteica basal (sem estímulo) dos receptores de IP<sub>3</sub>, phospho-IP<sub>3</sub> e cadeia leve de miosina (MLC) em homogenatos de aortas de ratos Wistar-Hannover hipertensos (2K-1C) e de ratos normotensos (2K). Quando comparamos os dois grupos, verificamos que em aortas de ratos 2K-1C, a expressão basal da phospho-IP<sub>3</sub> foi menor (0,582 ± 0,06; n= 4; p= 0,0005) do que a expressão basal na aorta de ratos normotensos 2K (1,279 ± 0,08; n= 4). Por outro

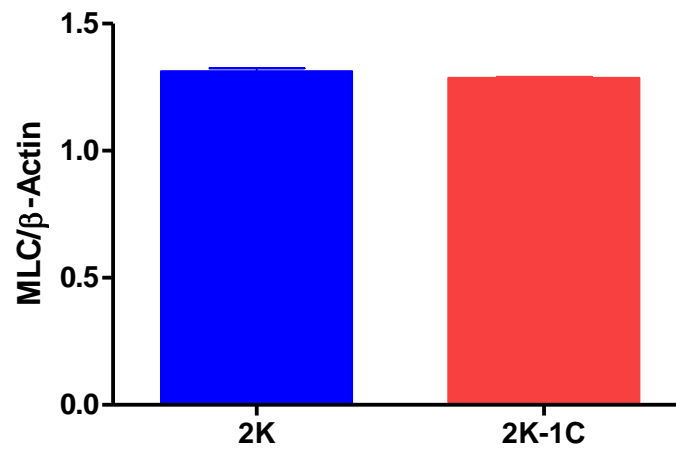
lado, a expressão basal total dos receptores IP<sub>3</sub> não foi diferente entre aortas isoladas de ratos 2K-1C ( $0,963 \pm 0,01$ ; n= 4) e aortas isoladas de ratos 2K ( $1,007 \pm 0,028$ ; n= 4). Do mesmo modo, não houve diferença na expressão basal da cadeia leve de miosina (MLC) entre ratos 2K-1C ( $1,286 \pm 0,003$ ; n= 4) e 2K ( $1,313 \pm 0,012$ ; n= 4).



**Figura 20: Expressão basal dos receptores phospho-IP<sub>3</sub> em homogenatos de aortas isoladas de ratos 2K e 2K-1C.** A expressão proteica dos receptores phospho-IP<sub>3</sub> foi quantificada por Western Blot em homogenatos de aortas de ratos 2K e 2K-1C. Os dados representam média  $\pm$  EPM, corrigidos pela concentração de receptores total de IP<sub>3</sub> (n= 4, em cada grupo). \*Representa diferença na expressão proteica do receptor phospho-IP<sub>3</sub> entre aortas de ratos 2K-1C e 2K (p= 0,0005)



**Figura 21: Expressão basal dos receptores de IP<sub>3</sub> em homogenatos de aortas isoladas de ratos 2K e 2K-1C.** A expressão proteica dos receptores de IP<sub>3</sub> foi quantificada por western blot em homogenatos de aortas de ratos 2K e 2K-1C. Os dados representam média  $\pm$  EPM, corrigidos pela concentração da proteína β-actina



**Figura 22: Expressão basal da cadeia leve de miosina (MLC) em homogenatos de aortas isoladas de ratos 2K e 2K-1C.** A expressão proteica da cadeia leve de miosina (MLC) foi quantificada por Western Blot em homogenatos de aortas de ratos 2K e 2K-1C. Os dados representam média  $\pm$  EPM, corrigidos pela concentração da proteína  $\beta$ -actina (n= 4)

## 6. DISCUSSÃO

O modelo animal desenvolvido por Goldblatt e colaboradores, conhecido como hipertensão renovascular (2R-1C), é caracterizado pela constrição parcial da artéria renal de um dos rins, daí sua denominação, 2-Rins-1-Clipe. Neste modelo, como não ocorre obstrução total da artéria renal, a hipertensão é resultante da estenose unilateral. Dessa forma, a reduzida pressão de perfusão renal é detectada pelas células justaglomerulares que produzem e liberam renina, enzima responsável pela clivagem do angiotensinogênio em angiotensina I, que conseqüentemente é clivada à Ang II, por ação da enzima conversora de angiotensina (ECA). A Ang II é o principal peptídeo efector do SRAA e, via efeitos vasculares diretos, aumenta agudamente a resistência periférica total aumentando assim a pressão arterial, além das ações em diversos órgãos alvos que contribuem para esta ação (2).

Em nosso estudo, demonstramos a elevação da pressão arterial sistólica (PAS) após a indução da hipertensão renovascular em ratos da linhagem Wistar. Uma semana após a cirurgia de implantação do clipe de prata, os animais 2R-1C já estavam com a PAS elevada em relação aos ratos submetidos à cirurgia fictícia (SHAM) e mantiveram esta elevação ao longo das seis semanas subseqüentes (Figura 1, tabela 1). De mesma forma, os ratos da linhagem Wistar-Hannover também submetidos à cirurgia para indução da hipertensão renal (denominados 2K-1C) apresentaram elevação e manutenção da PAS durante o período estudado (Figura 12, tabela 2). Estes resultados estão de acordo com outros estudos, como por exemplo, os relatos de Pereira e colaboradores (36). Estes autores demonstraram que quatro semanas após implantação do clipe de prata para induzir a hipertensão renovascular em ratos Wistar, o grupo de animais hipertensos já apresentava elevação da pressão arterial média. Por outro lado, Guimarães e colaboradores (37) demonstraram que duas semanas após a indução da hipertensão, ratos Wistar já apresentavam elevação na pressão arterial em relação ao controle, que se manteve ao longo de dez semanas. Da mesma maneira, Skogstrand e colaboradores (38) mostraram que em ratos da linhagem Wistar-Hannover, duas semanas após a indução da hipertensão renovascular, estes animais apresentaram elevação na PAS em relação aos ratos do grupo SHAM, situação que se manteve ao longo de 24 semanas. Tsutsumi e colaboradores, mostraram que camundongos transgênicos apresentaram pressão arterial elevada quando infundidos com Ang II e o tratamento concomitante com



TCV116, antagonista de receptores AT<sub>1</sub>, foi capaz de abolir o aumento da pressão arterial nestes animais (39).

Dois tipos de receptores para Ang II são classicamente conhecidos, os receptores de angiotensina tipo 1 (AT<sub>1</sub>) e tipo 2 (AT<sub>2</sub>). A ligação da Ang II e ativação dos receptores AT<sub>1</sub>, causa interação com proteínas G heterotriméricas, incluindo G<sub>q/11</sub>, G<sub>12/13</sub> e G<sub>i</sub>. No caso da ativação da proteína G<sub>q</sub> acoplada ao receptor AT<sub>1</sub>, ocorre a sinalização celular via formação dos segundos mensageiros inositol trifosfato e diacilglicerol. A ativação da proteína G pode levar à produção de ácido araquidônico e ROS, levando à ativação das proteínas efetoras fosfolipases C, A e D (5), responsáveis por ações diretas como vasoconstrição e inflamação.

No presente trabalho, demonstramos que a concentração plasmática de Ang II é maior em ratos hipertensos renais Wistar Hannover do que em ratos normotensos 2K. Demonstramos também que a ação da Ang II em causar contração da aorta de ratos se dá pela ligação da Ang II ao receptor AT<sub>1</sub>, uma vez que ao utilizarmos o antagonista deste receptor (Losartan), a resposta contrátil foi totalmente abolida em animais normotensos (2R) e em ratos 2R-1C (Figura 2). De maneira interessante, a resposta contrátil à Ang II não foi diferente entre aortas de ratos 2R-1C e 2R entre as 6<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas após a indução da hipertensão, tanto na linhagem Wistar quanto na linhagem Wistar-Hannover (Figuras 5 e 14). Isto ocorreu apesar da maior expressão basal do receptor AT<sub>1</sub> na aorta de ratos Wistar 2R-1C em comparação às aortas dos ratos Wistar 2R (Figura 4). Este resultado corrobora com os dados apresentados por Levy e colaboradores (40) que demonstraram não haver diferença na contração da aorta induzida por Ang II em ratos Wistar com hipertensão induzida pela infusão de Ang II por meio de *mini-pumps* em comparação com os ratos controle. Entretanto, Hiyoshi e colaboradores demonstraram que a contração para Ang II é menor em aortas de camundongos 2R-1C quando comparados ao respectivos controles Sham (3).

Uma explicação para os nossos resultados é de que o receptor AT<sub>1</sub> atue como ponto de controle para a regulação dos efeitos diretos da Ang II em tecidos alvos. Agudamente, o aumento nos níveis de Ang II leva ao aumento nos níveis de ativação do AT<sub>1</sub>, contudo a exposição crônica à Ang II ocasiona *down-regulation* destes receptores (41–43). Dessa forma, a hipótese do nosso estudo foi de que apesar de estarem mais expressos em aortas de ratos hipertensos, os receptores AT<sub>1</sub> estariam

menos ativos. Outros experimentos para avaliarmos a atividade destes receptores seriam necessários para testarmos esta hipótese.

As ações causadas pela ligação da Ang II ao receptor  $AT_1$ , são contrapostas pelas ações quando ocorre sua ligação e ativação dos receptores  $AT_2$  (7), uma vez que a ligação da Ang II neste receptor acoplado às proteínas  $Gi_{\alpha 2}$  e  $Gi_{\alpha 3}$ , proporciona pelo menos três mecanismos principais de transdução de sinal: ativação de várias proteínas fosfatases, causando desfosforilação protéica, ativação do sistema NO/GMPc e ativação da  $PLA_2$ , levando à liberação de ácido araquidônico que podem gerar efeitos como a vasodilatação (44).

De acordo com Consentino e colaboradores (45) o tratamento de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) com losartan induz relaxamento concentração-dependente para Ang II, relaxamento que foi inibido por ação do antagonista do receptor  $AT_2$ , (PD123319). Estes autores sugerem que a ligação da Ang II ao receptor  $AT_2$ , promove relaxamento via NO, uma vez que houve aumento na produção de NO na aorta de ratos SHR tratados com losartan quando comparados com os ratos SHR sem tratamento e com os ratos Wistar tratados ou não. De acordo com Tsutsumi e colaboradores (39), em camundongos transgênicos com super expressão do receptor  $AT_2$ , os efeitos deletérios da ação da Ang II na aorta foram atenuados quando estas foram estimuladas com Ang II. Ao utilizarem o antagonista PD123319 houve aumento na vasoconstrição quando comparadas a aortas de ratos que não receberam o antagonista. Porém, em nosso estudo os receptores  $AT_2$  não exercem participação na contração da aorta induzida pela Ang II, uma vez que ao utilizarmos o antagonista deste receptor (PD123319) não observamos alteração da resposta contrátil na aorta de ratos 2R e 2R-1C na linhagem Wistar (Figura 3) e nas aortas de ratos 2K e 2K-1C de ratos da linhagem Wistar-Hannover (Figura 18), inclusive sua expressão basal na aorta não se altera após a indução da hipertensão renovascular (Figura 4). O receptor do subtipo  $AT_2$ , é o principal subtipo de receptor para Ang II expresso no tecido fetal. Entretanto, em organismos adultos saudáveis, independentemente da espécie, o receptor  $AT_2$ , está expresso somente em certos tipos celulares como células endoteliais, áreas distintas do cérebro, adrenal, tecido cutâneo, estruturas renais e cardíacas, miométrio e ovários (46). Steckelings e colaboradores (46) demonstraram que embora o receptor  $AT_1$  seja dominante no organismo adulto, um aumento na expressão dos receptores  $AT_2$  pode ser observado em algumas condições patológicas como injúria vascular, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva,

insuficiência renal, isquemia cerebral e transecção do nervo ciático ou nervo óptico. Hiyoshi e colaboradores mostraram aumento na expressão do receptor  $AT_2$  em camundongos após duas e seis semanas da indução da hipertensão renovascular (3). Entretanto, este resultado não foi reproduzido em nossos estudos com ratos Wistar submetidos à hipertensão renovascular, visto que nossos resultados indicam não haver diferença na expressão do receptor  $AT_2$  entre as aortas de ratos 2R-1C e 2R (Figura 4).

Recentes estudos demonstraram a importância da Enzima Conversora de Angiotensina tipo 2 ( $ECA_2$ ) na manutenção do balanço total do SRAA. De fato, em alguns ambientes, e no sistema cardiovascular em particular, a  $ECA_2$  pode ser mais importante que a ECA na regulação de níveis locais de Ang II e Ang 1-7 e no balanço de ativação do SRAA. A Ang 1-7 exerce seus efeitos pela ligação com o receptor Mas (47) nos tecidos renal, cardíaco, vascular e sistema nervoso central (48). Além disso, Tetzner e colaboradores (49) demonstraram que a estrutura do antagonista PD123319, por se assemelhar com a estrutura da Ang 1-7 poderia estar causando antagonismo também nos receptores específicos para Ang 1-7, mascarando o efeito protetor deste eixo  $ECA_2$ /Ang 1-7/Mas (e MrgD). Para avaliarmos esta possibilidade, utilizamos o antagonista específico para o receptor Mas, A779 (50) e induzimos a contração com Ang II em aortas isoladas de ratos Wistar-Hannover 2K e 2K-1C (Figura 19). Para nossa surpresa, não houve alteração na resposta contrátil nas aortas isoladas destes ratos. Estes resultados sugerem que não há participação dos receptores Mas na contração induzida por Ang II.

As células endoteliais tiveram seu papel destacado desde a surpreendente descoberta de Furchgott na década de 1980 em que demonstrou que após a remoção da camada destas células endoteliais de aortas isoladas de coelho o relaxamento induzido *in vitro* pela acetilcolina era suprimido (10). Desde então várias substâncias vasoativas oriundas do endotélio foram descobertas e classificadas como EDRFs ou EDCFs, que exercem função sobre as células do MLV. Deste modo, a função endotelial assume importante papel na modulação do tônus da musculatura lisa vascular (51). Dentre as substâncias mais importantes classificadas como EDRFs, sobretudo em células endoteliais de vasos de grande calibre (vasos de condutância, como aorta) está o NO. Durante os anos que se seguiram, a disfunção endotelial, definida como uma alteração na relação entre os EDRFs e EDCFs foi o centro de diversos trabalhos. A disfunção endotelial apresenta-se de forma característica em

várias situações patológicas do sistema cardiovascular como doença arterial coronariana, aterosclerose e hipertensão (15,52,53) atingindo vasos de grande calibre, como a aorta (54–56). Assim, testamos a participação do endotélio na contração da aorta para Ang II em ratos 2R-1C, removendo mecanicamente o endotélio antes de induzir a contração com Ang II. De maneira esperada, o endotélio exerce importante efeito anti-contrátil à contração pela Ang II nas aortas de ratos 2R, uma vez que ao removermos o endotélio, observamos um aumento tanto na potência, quando no efeito máximo da Ang II em relação às aortas com endotélio intacto. Porém, nas aortas de ratos 2R-1C, o endotélio também exerce este efeito anti-contrátil, mas de maneira menos pronunciada do que no grupo de ratos 2R, apresentando apenas diferença no efeito máximo da Ang II em relação ao grupo 2R-1C com endotélio intato (figura 6). Estes resultados se assemelham aos encontrados quando utilizamos a linhagem de ratos Wistar-Hannover (Figura 15) em que os animais do grupo 2K apresentaram maior contração (Em<sub>ax</sub>) para Ang II após a remoção do endotélio. No grupo 2K-1C o Em<sub>ax</sub> também foi aumentado, mas de maneira menos pronunciada. Tal fenômeno pode ser explicado pelo fato de que no modelo de hipertensão 2R-1C, ocorre disfunção endotelial. Sendo assim, passamos a nos questionar se algum componente vasoativo produzido no endotélio estaria alterado, situação que poderia colaborar para este efeito.

Nosso grupo de pesquisa tem estudado o papel do NO, principalmente no relaxamento vascular em ratos 2R-1C. Em alguns trabalhos, o nosso grupo demonstrou que tanto o relaxamento vascular dependente do endotélio e participação do NO endógeno e o relaxamento independente do NO endotelial (fornecendo o NO exógeno por meio de doadores de NO), em aorta de ratos 2R-1C, é menor do que em vasos de ratos 2R (57–60). Neste contexto, testamos a hipótese da participação da enzima eNOS. Para tanto, utilizamos a inibição não seletiva desta enzima com o L-NAME. O nosso grupo demonstrou anteriormente que em ratos Wistar tratados com L-NAME por 3 semanas apresentaram hipertensão e reduziram parcialmente o relaxamento vascular da artéria caudal induzido com histamina, que possui ação dependente e independente do endotélio, sugerindo que a participação endotelial via NO foi abolida (61). O L-NAME também foi responsável por diminuir a produção de NO em células HUVECS tratadas com o doador de NO, TERPY (62).

De acordo com Toutain e colaboradores, artérias de resistência submetidas a baixo fluxo sanguíneo, característica encontrada em situações patológicas como

diabetes e hipertensão (63,64), apresentaram redução na expressão da eNOS e aumento na força de contração induzida por Ang II (65). Consoante, observamos que a expressão gênica da eNOS em homogenatos de aorta isoladas de ratos Wistar 2R-1C está diminuída em relação às aortas isoladas de ratos Wistar 2R. Deste modo, o L-NAME não alterou a resposta contrátil à Ang II em aorta de ratos Wistar 2R-1C, em comparação às aortas de 2R-1C que não foram incubadas com L-NAME (Figura 7), porém foi capaz de elevar o  $E_{máx}$  nas aortas contraídas com Ang II dos ratos Wistar 2R. Estes resultados sugerem que a participação da eNOS está prejudicada nas aortas de ratos Wistar 2R-1C contraídas com Ang II. Da mesma forma, ratos Wistar-Hannover apresentaram este mesmo comportamento quando aortas isoladas de ratos 2K e 2K-1C foram contraídas com Ang II na presença ou ausência de L-NAME (Figura 16). Rodrigues e colaboradores, mostraram que o número de cavéolas que expressam eNOS está diminuído em aortas de ratos 2R-1C (54). Cavéolas são invaginações da membrana plasmática ricas em esfingolipídios e colesterol às quais são atribuídas várias funções celulares, como transcitose de moléculas e eventos de transdução de sinais (66,67). O principal componente estrutural das cavéolas são as proteínas caveolinas presentes na estrutura das cavéolas no endotélio vascular e interagindo com diferentes proteínas (68), sendo uma das mais importantes, a eNOS (69). Lei e colaboradores, sugerem que a ligação da eNOS à Cav-1 regula negativamente a atividade da enzima eNOS, pois em camundongos *knockout* para Cav-1 há aumento da atividade da eNOS. Rodrigues e colaboradores, no entanto, sugere em seu estudo que uma diminuição no número de cavéolas endoteliais de ratos Wistar 2R-1C contribui para o menor efeito da acetilcolina sobre a concentração citosólica de  $Ca^{2+}$  e NO, explicando o menor relaxamento à acetilcolina em aortas de ratos 2R-1C (54). Nossos resultados corroboram com este estudo. Verificamos que a expressão da Cav-1 está diminuída na aorta de ratos Wistar 2R-1C em comparação com aortas de ratos Wistar 2R (Figura 8) podendo levar ao desacoplamento da eNOS com conseqüente diminuição de sua participação no processo de manutenção do tônus vascular.

Outro mecanismo fisiopatológico presente na hipertensão renovascular, consiste nas alterações vasculares mediadas por prostanóides derivados da COX e ROS. Martinez-Revelles e colaboradores demonstraram a recíproca relação entre as ROS, produzidas sobretudo a partir do estímulo da Ang II sobre a enzima Nox e os prostanóides derivados da COX, destacando a isoforma induzível, COX-2, que está

super-expressa em diversas situações patológicas, como hipertensão (70). Em um artigo de revisão, Hernanz e colaboradores destacam que as ROS podem ser geradas também a partir de estímulos diretos na COX e/ou NADPH oxidase, em que seus produtos por ação direta diminuem a biodisponibilidade do NO (71) e indiretamente, pela ativação de receptores  $AT_1$  também atuam contribuindo para a disfunção endotelial e desenvolvimento da hipertensão (70,71). Para avaliarmos a participação dos prostanóides e ROS derivados da COX e ROS derivadas da NADPH oxidase, utilizamos os inibidores das enzimas COX e NADPH oxidase Indometacina e Apocinina, respectivamente. Para nossa surpresa, não houve alteração na contração induzida por Ang II em aortas, incubadas com indometacina ou apocinina. Provavelmente, estas enzimas não tem participação importante na contração induzida por Ang II em aortas isoladas de ratos Wistar 2R e 2R-1C. O mesmo perfil de resposta foi detectado quando da utilização de aorta isolada de ratos Wistar-Hannover, nos grupos 2R e 2R-1C.

No presente trabalho, verificamos que a expressão dos receptores fosforilados (ativados) de  $IP_3$ , é menor em aortas de ratos hipertensos (2K-1C) do que em aortas de ratos normotensos (2K). Estes resultados sugerem que ocorre menor ativação de receptores de  $IP_3$  no retículo sarcoplasmático e conseqüentemente menor liberação de cálcio armazenado nesta organela quando os receptores  $AT_1$  são ativados na membrana plasmática das MLVC, pela Ang II. Estes resultados sugerem que o estímulo contínuo com altas concentrações de Ang II poderiam promover a internalização e desensibilização de receptores  $AT_1$  em aortas de ratos hipertensos renais. E desta forma, causariam a menor fosforilação de receptores de  $IP_3$  receptor modulando negativamente a resposta contrátil à Ang II em aortas de ratos 2K-1C. Estes resultados poderiam explicar a reduzida resposta contrátil estimulada com Ang II em aortas sem endotélio, isoladas de ratos 2K-1C. Como o estímulo constante dos receptores  $AT_1$  em aortas de ratos hipertensos renais poderia inibir a fosforilação e ativação de receptores  $IP_3$  precisaria ser estudado mais detalhadamente. Por outro lado, não está alterada a expressão total de receptores de  $IP_3$  e da proteína MLC no músculo liso vascular das aortas de ratos 2K-1C.

## 7. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que uma vez estabelecida a hipertensão renovascular (2R-1C), a aorta destes ratos parece dispor de algum mecanismo que faz com que haja uma menor resposta à Ang II nas células do músculo liso vascular em comparação às aortas de ratos normotensos 2R. O endotélio das aortas dos ratos 2R-1C, seja da linhagem Wistar ou Wistar-Hannover, apresenta efeito anti-contrátil menos pronunciado do que o observado em ratos 2R, porém sem aparente participação efetiva das enzimas endoteliais eNOS, COX e Nox. Os nossos resultados demonstraram que a inibição destas enzimas não alterou a contração induzida por Ang II em aortas isoladas de 2R-1C, mas alterou a resposta induzida por Ang II nas aortas isoladas de ratos 2R. Além disso, é possível que ocorra alteração na atividade dos receptores  $AT_1$ , visto que mesmo com aumento na concentração plasmática de Ang II e da expressão de receptores  $AT_1$  na aorta de ratos hipertensos renais, a menor resposta contrátil à Ang II poderia ser devida à menor ativação e fosforilação de receptores de  $IP_3$ .

## 8. REFERÊNCIAS

1. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev.* 2007;59(3):251–87.
2. Dornas WC, Silva ME. Animal models for the study of arterial hypertension. *J Biosci* [Internet]. 2011 Sep 10 [cited 2013 Mar 5];36(4):731–7. Available from: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s12038-011-9097-y>
3. Hiyoshi H, Yayama K, Takano M, Okamoto H. Angiotensin type 2 receptor-mediated phosphorylation of eNOS in the aortas of mice with 2-kidney, 1-clip hypertension. *Hypertension* [Internet]. 2005 May [cited 2013 May 9];45(5):967–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15837834>
4. Miura S ichiro, Matsuo Y, Kiya Y, Karnik SS, Saku K. Molecular mechanisms of the antagonistic action between AT1 and AT2 receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;391(1):85–90.
5. Forrester SJ, Booz GW, Sigmund CD, Coffman TM, Kawai T, Rizzo V, et al. Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev* [Internet]. 2018;98(3):1627–738. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29873596> <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00038.2017>
6. Liu H, Mao P, Wang J, Wang T, Xie CH. Azilsartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, attenuates tert-butyl hydroperoxide-induced endothelial cell injury through inhibition of mitochondrial dysfunction and anti-inflammatory activity. *Neurochem Int* [Internet]. 2016;94:48–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2016.02.005>
7. Dandona P, Dhindsa S, Ghanim H, Chaudhuri A. Angiotensin II and inflammation:



the effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockade. *J Hum Hypertens* [Internet]. 2007;21(1):20–7. Available from: [papers3://publication/doi/10.1038/sj.jhh.1002101](http://papers3://publication/doi/10.1038/sj.jhh.1002101)

8. Schulz E, Jansen T, Wenzel P, Daiber A, Münzel T. Nitric Oxide, Tetrahydrobiopterin, Oxidative Stress, and Endothelial Dysfunction in Hypertension. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2008;10(6):1115–26. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ars.2007.1989>

9. Bunting S, Gryglewski R, Moncada S, Vane JR. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins* [Internet]. 1976 Dec;12(6):897–913. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1005741>

10. Furchgott RF, Zawadzki J V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* [Internet]. 1980 Nov 27;288(5789):373–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6253831>

11. Mennuni S, Rubattu S, Pierelli G, Tocci G, Fofi C, Volpe M. Hypertension and kidneys: unraveling complex molecular mechanisms underlying hypertensive renal damage. *J Hum Hypertens* [Internet]. 2013;28(April 2013):74–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23803592>

12. Aversa A, Vitale C, Volterrani M, Fabbri A, Spera G, Fini M, et al. Chronic administration of Sildenafil improves markers of endothelial function in men with Type 2 diabetes. *Diabet Med* [Internet]. 2008 Jan [cited 2015 Apr 24];25(1):37–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18199130>

13. Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res*. 1983;52(3):352–7.

14. Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen R a. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 1994;368(6474):850–3.
15. Silva BR, Pernomian L, Bendhack LM. Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension. *Front Physiol* [Internet]. 2012 Jan [cited 2013 Mar 14];3(December):441. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3514688&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
16. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2003 Jan 1;284(1):R1-12. Available from: <http://ajpregu.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpregu.00323.2002>
17. Bernatova I. Endothelial dysfunction in experimental models of arterial hypertension: Cause or consequence? *Biomed Res Int*. 2014;2014.
18. Michel, Vanhoutte V and PM. Endothelial dysfunction : a multifaceted disorder. *Am J Physiol Hear Circ Physiol*. 2006;291:H985–1002.
19. Yuhki KI, Kojima F, Kashiwagi H, Kawabe JI, Fujino T, Narumiya S, et al. Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases: Novel insights from knockout mouse studies. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2011;129(2):195–205. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.09.004>
20. Adeagbo ASO, Patel D, Iddrissu A, Walker J, Thirumalai S, Joshua IG, et al. NS-398, a selective cyclooxygenase-2 blocker, acutely inhibits receptor-mediated contractions of rat aorta: Role of endothelium. *Eur J Pharmacol*. 2003;458(1–2):145–154.
21. Wong SL, Leung FP, Lau CW, Au CL, Yung LM, Yao X, et al. Cyclooxygenase-2-

- derived prostaglandin F<sub>2</sub>?? mediates endothelium-dependent contractions in the aortae of hamsters with increased impact during aging. *Circ Res*. 2009;104(2):228–35.
22. Hao C-M, Breyer MD. Physiological regulation of prostaglandins in the kidney. *Annu Rev Physiol*. 2008;70(1):357–77.
23. Coleman RA, Grix SP, Head SA, Louttit JB, Mallett A, Sheldrick RLG. A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins* [Internet]. 1994 Feb [cited 2016 Jun 8];47(2):151–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8016385>
24. Francois H, Athirakul K, Mao L, Rockman HA, Coffman TM, Makhanova N, et al. Role for Thromboxane Receptors in Angiotensin-II-Induced Hypertension. *Hypertension* [Internet]. 2004;295(4):364–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18684890>
25. Francois H, Makhanova N, Ruiz P, Ellison J, Mao L, Rockman HA, et al. A role for the thromboxane receptor in L-NAME hypertension. *Am J Physiol Ren Physiol* [Internet]. 2008;295(4):F1096-102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18684890>
26. Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions in hypertension: When prostacyclin becomes ugly. *Hypertension*. 2011;57(3 PART 2):526–31.
27. Tang EHC, Vanhoutte PM. Prostanoids and reactive oxygen species: Team players in endothelium-dependent contractions. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2009;122(2):140–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.02.006>
28. Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(15):7240–4.

29. Kim SF. The role of nitric oxide in prostaglandin biology; Update. *Nitric Oxide - Biol Chem* [Internet]. 2011;25(3):255–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2011.07.002>
30. Salvemini D, Seibert K, Masferrer JL, Misko TP, Currie MG, Needleman P. Endogenous nitric oxide enhances prostaglandin production in a model of renal inflammation. *J Clin Invest* [Internet]. 1994 May;93(5):1940–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7514189>
31. Salvemini D, Masferrer JL. Interactions of nitric oxide with cyclooxygenase: in vitro, ex vivo, and in vivo studies. *Methods Enzymol* [Internet]. 1996;269(1992):12–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8791633>
32. Liu Y, Borchert GL, Phang JM. Polyoma Enhancer Activator 3, an Ets Transcription Factor, Mediates the Induction of Cyclooxygenase-2 by Nitric Oxide in Colorectal Cancer Cells. *J Biol Chem*. 2004;279(18):18694–700.
33. Park S-W, Sung M-W, Heo D-S, Inoue H, Shim S-H, Kim K-H. Nitric oxide upregulates the cyclooxygenase-2 expression through the cAMP-response element in its promoter in several cancer cell lines. *Oncogene*. 2005;24(May 2004):6689–98.
34. Minghetti L, Polazzi E, Nicolini A, Créminon C, Levi G. Interferon-gamma and nitric oxide down-regulate lipopolysaccharide-induced prostanoid production in cultured rat microglial cells by inhibiting cyclooxygenase-2 expression. *J Neurochem*. 1996;66(5):1963–70.
35. Chen KD, Chen LY, Huang HL, Lieu CH, Chang YN, Chang MD, et al. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the rapid induction of the 78-kDa glucose-regulated protein in 9L rat brain tumor cells. *J Biol Chem* [Internet]. 1998 Jan 9;273(2):749–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9422727>

36. Pereira TMC, Balarini CM, Silva I V, Cabral a M, Vasquez EC, Meyrelles SS. Endogenous angiotensin II modulates nNOS expression in renovascular hypertension. *Braz J Med Biol Res* [Internet]. 2009 Jul;42(7):685–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19578649>
37. Guimarães D a, Rizzi E, Ceron CS, Pinheiro LC, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. Atorvastatin and sildenafil lower blood pressure and improve endothelial dysfunction, but only atorvastatin increases vascular stores of nitric oxide in hypertension. *Redox Biol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Feb 2];1(1):578–85. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3863772&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
38. Skogstrand T, Leh S, Paliege A, Reed RK, Vikse BE, Bachmann S, et al. Arterial damage precedes the development of interstitial damage in the nonclipped kidney of two-kidney, one-clip hypertensive rats. *J Hypertens*. 2013;31(1):152–9.
39. Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, Kurihara H, Murasawa S, Takai S, et al. Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J Clin Invest*. 1999;104(7):925–35.
40. Levy BI, Benessiano J, Henrion D, Caputo L, Heymes C, Duriez M, et al. Chronic blockade of AT2-subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure. *J Clin Invest*. 1996;98(2):418–25.
41. Griendling KK, Delafontaine P, Rittenhouse SE, Gimbrone MA, Alexander RW. Correlation of receptor sequestration with sustained diacylglycerol accumulation in angiotensin II-stimulated cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1987;262(30):14555–62.
42. Lassegue B, Alexander RW, Nickenig G, Clark M, Murphy TJ, Griendling KK. Angiotensin II down-regulates the vascular smooth muscle AT1 receptor by

transcriptional and post-transcriptional mechanisms: Evidence for homologous and heterologous regulation. *Mol Pharmacol*. 1995;48(4):601–9.

43. Touyz RM, He G, Deng LY, Schiffrin EL. Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II- stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance arteries. *Circulation*. 1999;99(3):392–9.

44. Nouet S, Nahmias C. Signal transduction from the angiotensin II AT<sub>2</sub> receptor. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11(1):1–6.

45. Cosentino F, Savoia C, De Paolis P, Francia P, Russo A, Maffei A, et al. Angiotensin II type 2 receptors contribute to vascular responses in spontaneously hypertensive rats treated with angiotensin II type 1 receptor antagonists. *Am J Hypertens*. 2005;18(4):493–9.

46. Steckelings UM, Kaschina E, Unger T. The AT<sub>2</sub> receptor - A matter of love and hate. *Peptides*. 2005;26(8):1401–9.

47. Santos RAS, e Silva ACS, Maric C, Silva DMR, Machado RP, de Buhr I, et al. Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2003 Jul 8;100(14):8258–63. Available from: <https://www.pnas.org/content/pnas/100/14/8258.full.pdf>

48. Tikellis C, Thomas MC. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) is a key modulator of the renin angiotensin system in health and disease. *Int J Pept [Internet]*. 2012;2012:1–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22536270>

49. Tetzner A, Gebolys K, Meinert C, Klein S, Uhlich A, Trebicka J, et al. G-Protein-Coupled Receptor MrgD Is a Receptor for Angiotensin-(1-7) Involving Adenylyl Cyclase, cAMP, and Phosphokinase A. *Hypertension*. 2016;68(1):185–94.

50. Tetzner A, Naughton M, Gebolys K, Eichhorst J, Sala E, Villacañas Ó, et al. Decarboxylation of Ang-(1–7) to Ala<sup>1</sup>-Ang-(1–7) leads to significant changes in

- pharmacodynamics. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2018; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299918302966>
51. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EHC, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol*. 2009;196(2):193–222.
52. Tousoulis D, Simopoulou C, Papageorgiou N, Oikonomou E, Hatzis G, Siasos G, et al. Endothelial dysfunction in conduit arteries and in microcirculation. Novel therapeutic approaches. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2014;144(3):253–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.06.003>
53. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004;109(23 SUPPL.).
54. Rodrigues GJ, Restini CBA, Lunardi CN, Neto M dos A, Moreira JE, Bendhack LM. Decreased number of caveolae in endothelial cells impairs the relaxation induced by acetylcholine in hypertensive rat aortas. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2010;627(1–3):251–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.11.010>
55. Konishi M, Su C. Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. *Hypertension*. 1983;5(6):881–6.
56. Van de Voorde J, Vanheel B, Leusen I. Endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in aorta from control and renal hypertensive rats. *Circ Res*. 1992;70(1):1–8.
57. Callera GE, Varanda WA, Bendhack LM. Impaired relaxation to acetylcholine in 2K-1C hypertensive rat aortas involves changes in membrane hyperpolarization instead of an abnormal contribution of endothelial factors. *Gen Pharmacol Vasc Syst*. 2000;34(6):379–89.
58. Rodrigues GJ, Restini CB, Lunardi CN, Moreira JE, Lima RG, Da Silva RS, et al. Caveolae dysfunction contributes to impaired relaxation induced by nitric oxide donor

- in aorta from renal hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;323(3):831–7.
59. Bonaventura D, Oliveira FS, Da Silva RS, Bendhack LM. Decreased vasodilation induced by a new nitric oxide donor in two kidney, one clip hypertensive rats is due to impaired K<sup>+</sup> channel activation. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005;32(5–6):478–81.
60. Rodrigues GJ, Lunardi CN, Lima RG, Santos CX, Laurindo FRM, Silva RS d., et al. Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. *Nitric Oxide - Biol Chem.* 2008;18(3):176–83.
61. Grifoni SC, Bendhack LM. Relaxation induced by histamine is not endothelium dependent in tail arteries of L-NAME-treated rats. *Gen Pharmacol Vasc Syst.* 2000;34(6):435–41.
62. Potje SR, Chen Z, Oliveira SDAS, Bendhack LM, da Silva RS, Bonini MG, et al. Nitric oxide donor [Ru(terpy)(bdq)NO]<sub>3</sub><sup>+</sup> induces uncoupling and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase promoting oxidant production. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2017;112(September):587–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.004>
63. De Mey JGR, Schiffers PM, Hilgers RHP, Sanders MMW. Toward functional genomics of flow-induced outward remodeling of resistance arteries. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2005;288(3 57-3):1022–7.
64. Mulvany MJ. Small artery remodeling and significance in the development of hypertension. *News Physiol Sci.* 2002;17(3):105–9.
65. Toutain B, Cousin M, Dumont O, Guihot A, Custaud M, Loufrani L, et al. Involvement of angiotensin II in the remodeling induced by a chronic decrease in blood flow in rat mesenteric resistance arteries. *Hypertens Res* [Internet]. 2010;33(8):857–
66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20535114>
66. Yamamoto M, Okumura S, Oka N, Schwencke C, Ishikawa Y. Downregulation of



caveolin expression by cAMP signal. *Life Sci.* 1999;64(15):1349–57.

67. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 1997;387(6633):569–72.

68. Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin- scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem.* 1997;272(10):6525–33.

69. García-Cardena G, Martasek P, Masters BSS, Skidd PM, Couet J, Li S, et al. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem.* 1997;272(41):25437–40.

70. Martínez-Revelles S, Avendaño MS, García-Redondo AB, Alvarez Y, Aguado A, Pérez-Girón J V, et al. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2013 Aug 27];18(1):51–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22671943>

71. Hernanz R, Briones AM, Salaices M, Alonso MJ. New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension. *Clin Sci* [Internet]. 2014;126(2):111–121. Available from: <http://clinsci.org/lookup/doi/10.1042/CS20120651>