

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

BRUNO RODRIGUES SILVA

**A resposta contrátil induzida pela fenilefrina é modulada pelo peróxido de
hidrogênio em aorta de ratos hipertensos renais**

Ribeirão Preto

2013

BRUNO RODRIGUES SILVA

A resposta contrátil induzida pela fenilefrina é modulada pelo peróxido de hidrogênio em aorta de ratos hipertensos renais

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Lusiane M. Bendhack

Ribeirão Preto

2013

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.

Catlogação na Publicação
Serviço de Documentação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Silva, Bruno Rodrigues

A resposta contrátil induzida pela fenilefrina é modulada pelo peróxido de hidrogênio em aorta de ratos hipertensos renais. Ribeirão Preto, 2013.

224f. : 56fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Área de Concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Profa. Dra. Lusiane M. Bendhack.

1. Óxido Nítrico.
2. Peróxido de Hidrogênio.
3. Contração vascular.
4. Agonista α 1-adrenérgico.
5. NO-Sintase.
6. Ciclooxygenase.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Bruno Rodrigues Silva

Título: A resposta contrátil induzida pela fenilefrina é modulada pelo peróxido de hidrogênio em aorta de ratos hipertensos renais

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

Área de Concentração: Farmacologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.(a) Dr(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*“A descoberta consiste em ver o que todo mundo viu
e pensar o que ninguém pensou.”*

A. Szent-Gyorgyi

Aos meus pais, Mário e Jane, meus eternos guerreiros.

Aos meus irmãos, Guilherme e Rodrigo, orgulhos da minha vida.

À vocês todo meu carinho e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus por toda força, proteção e por me permitir concretizar esta etapa da minha vida.

Aos meus pais, Mário Donizetti da Silva, Aparecida Rodrigues Silva (in memória) e Jane Regina Fernandes Silva, por toda amor, carinho, dedicação, compreensão e apoio incondicionais e ilimitáveis ao longo de toda minha vida.

Aos meus irmãos, Guilherme e Rodrigo, pelo apoio, carinho, confiança, respeito e lealdade.

Aos meus familiares, pelo carinho e incentivo.

À minha namorada, Maíta Santos, por todo carinho, apoio e amor dedicado ao longo desses anos.

À Prof^a. Dra. Patrícia Ibler Bernardo Ceron, pela amizade, carinho, confiança e apoio acadêmico. Minha eterna gratidão.

À Prof^a. Dra. Lusiane Maria Bendhack, pela amizade, pela confiança depositada em mim, pelas oportunidades oferecidas ao longo da pós-graduação, por todo incentivo à superação de desafios, por todos os ensinamentos e boas discussões acadêmicas, pelo exemplo profissional e humano. Meu eterno carinho e gratidão.

Ao Professor Dr. Roberto Santana da Silva, do Depto. de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela supervisão, disposição e atenção dirigida à execução deste trabalho.

À técnica do Depto. de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Juliana Cristina Biazotto Moraes, por toda atenção e apoio técnico.

Aos Professores membros da banca examinadora Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia, Dra. Luciana Venturini Rossoni, Dr. Carlos Renato Tirapelli e Dr. André Sampaio

Pupo pela disposição, atenção, críticas e sugestões que contribuíram para aprimorar esse trabalho.

Aos meus amigos, Rodrigo César Rosa e Rodrigo Antônio Carvalho Andraus, pelo apoio, atenção e excelente convívio.

Aos colegas de trabalho, Alice Valença Araújo, Amanda Carvalho Pereira, Carolina Baraldi Lemes Araújo, Claire Nain Gomes Lunardi, Daniela Bonaventura, Fernanda Aparecida Andrade, Gerson Jhonatan Rodrigues, José Wilson Correa, Laena Pernomian, Mário dos Anjos Neto Filho, Matheus Lavorenti Rocha, Michele Paulo, Tamy Midori Banin, Vânia Braghini de Rezende Dias, Tiago Dal-Cin de Paula, Ana Carolina Campos Cotrim Bocalon, Luciana Mattoso Píres de Campos Araújo, Fabíola Cristina Zuchi, Pricila Feitoza, Luiz Antônio Zanin Júnior, pela amizade, boas discussões acadêmicas e apoio profissional.

Aos demais amigos dos Laboratórios de Farmacologia, em especial à Larissa Pernomian, pela amizade comprometida, apoio e discussões acadêmicas, fundamentais ao meu crescimento pessoal e acadêmico.

Às técnicas Marcella Daruge Grando, Juliana Aparecida Vercesi, Mayara Santos Gomes, Miriam Cristina C. de Mello e Flávia Fiacadori Salata, por todo apoio técnico.

Às Professoras da Disciplina de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Dra. Glória Emília Petto de Souza, Dra. Ana Maria de Oliveira, Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca, Dra. Sandra Yasuyo Fukada Alves, pela agradável convivência.

Às funcionárias da Disciplina de Farmacologia de Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Marlene Rodrigues da Silva e Aparecida Rosa da Silva, pela amizade, carinho e apoio profissional.

Aos funcionários do Departamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Sônia Maria Stefanelli, José Waldick Ramon e Fátima Helena Petea, por todo apoio prestado.

Aos meus amigos Reinaldo Fernando Batista e Antônio Flávio, funcionários do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela paciência e cuidado com os animais utilizados neste trabalho.

Aos funcionários do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo cuidado no tratamento dos animais.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Processo 2009/14219-9) e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo auxílio financeiro nesta pesquisa.

E a todas às pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

Resumo

SILVA, B.R. **A resposta contrátil induzida pela fenilefrina é modulada pelo peróxido de hidrogênio em aorta de ratos hipertensos renais.** 2013. 224f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A disfunção endotelial, comumente observada em doenças cardiovasculares como hipertensão, é caracterizada por um prejuízo na liberação de fatores vasodilatadores e/ou aumento de fatores vasoconstritores provenientes do endotélio. O desequilíbrio na produção de fatores relaxantes, como o óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI₂), e fatores contráteis, como tromboxano (TXA₂), é geralmente associada à excessiva produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Dada a importância do sistema nervoso autonômico simpático para o controle do tônus vascular, esse estudo teve o objetivo de investigar os mecanismos celulares envolvidos na disfunção endotelial na hipertensão renovascular. Avaliamos o papel do endotélio e da produção das EROs, ânion superóxido (O₂⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), para a resposta contrátil estimulada com agonista α_1 -adrenérgico fenilefrina e resposta vasodilatadora induzida pelo doador de NO AuNPs-{Ru-4PySH}_n em aorta de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C). Curvas concentração-efeito para a fenilefrina (PE) e para AuNPs-{Ru-4PySH}_n foram construídas em aortas de ratos 2R e 2R-1C com endotélio intacto (E+) e sem endotélio (E-), na ausência (Controle) ou após incubação com o sequestrador de O₂⁻ tiron (0,1 ou 1 mmol/L) ou catalase (30, 90, 150 ou 300 U/mL). Curvas concentração-efeito para PE foram construídas na presença de inibidores seletivos e não seletivos para NO-Sintase e ciclooxigenase (COX). A expressão das enzimas eNOS e COX foi avaliada por Western Blot. A produção de GMPC, TXA₂ e PGI₂ estimulada com PE foi quantificada por *Kit* imunoenzimático. A produção de NO e EROs em células endoteliais isoladas foi avaliada por citometria de fluxo utilizando as sondas fluorescentes DAF-2DA e DHE, respectivamente. A produção de H₂O₂ foi avaliada utilizando o *Kit* Amplex Red. Nossos resultados indicam que a resposta contrátil induzida pela PE sob tensão de repouso de 1,5 g foi reduzida em aorta de ratos 2R-1C E+ comparada a 2R E+. Essa menor resposta contrátil se deve à maior produção de H₂O₂ e hiperatividade da eNOS em 2R-1C E+. Embora a COX também esteja hiperativa, o efeito do NO prevalece sobre o efeito do TXA₂ em aorta de 2R-1C E+ sob 1,5 g de tensão de repouso, mas não sob 3,0 g de tensão. A produção de H₂O₂ potencializou a resposta vasodilatadora do doador de NO AuNPs-{Ru-4PySH}_n em aorta de 2R-1C E- e a hiperatividade da eNOS reduziu seu efeito em 2R-1C E+.

Palavras-Chave: Óxido Nítrico, Peróxido de Hidrogênio, contração vascular, agonista α_1 -adrenérgico, NO-Sintase, Ciclooxigenase.

Abstract

SILVA, B.R. **Phenylephrine-induced contractile response is modulated by hydrogen peroxide in renal hypertensive rat aorta.** 2013. 224f. Thesis (PhD degree) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

The endothelial dysfunction present in cardiovascular diseases, such as hypertension, is characterized by reduced endothelium-dependent vasodilator response and/or increased contractile response. The imbalance in the production of endothelium-derived relaxing factors, such as nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI₂), and contractile factors, such as thromboxane A₂ (TXA₂) can contribute to endothelial dysfunction. Endothelial dysfunction has also been associated to increased generation of reactive oxygen species (ROS). Since the sympathetic nervous system plays an important role on vascular tone control, the aim of this study was to evaluate the role of endothelium and ROS, superoxide anion (O₂⁻) and hydrogen peroxide (H₂O₂), involved in the α₁-adrenergic agonist phenylephrine-induced contractile response on endothelial dysfunction in renovascular hypertension. Furthermore, we evaluated the endothelium and ROS role on the vasodilator effect induced by the NO donor AuNPs-{Ru-4PySH}_n in normotensive (2K) and hypertensive (2K-1C) rat aortas, contracted by phenylephrine (PE). Accordingly, concentration-effect curves to PE and AuNPs-{Ru-4PySH}_n were performed in endothelium-intact (E+) and endothelium-denuded aorta (E-) from 2K and 2K-1C rat in the absence (Control) or after incubation with the O₂⁻ scavenger Tiron (0.1 and 1 mmol/L) or Catalase (30, 90, 150 and 300 U/mL). Concentration-effect curves to PE were performed in the presence of inhibitors of endothelial Nitric Oxide Synthase (NOS) and Cyclooxygenase (COX). Protein expression of endothelial NOS (eNOS) and COX was evaluated by Western blot. The production of cyclic GMP, TXA₂ and PGI₂ was quantified by Elisa Kit Imuno enzyme Assay. NO and EROs production was evaluated by flow cytometry using the fluorescence probes DAF-2DA and DHE, respectively. The H₂O₂ production was evaluated by Kit Amplex Red Assay. Our results indicate that the contractile response induced by PE is reduced in 2K-1C E+ aorta as compared to 2K E+ on 1.5 g of rest tension. This reduced response was due to the high production of H₂O₂ and hyperactivity of eNOS in 2K-1C E+. Although COX activity is increased in 2K-1C rat aorta, the vasodilator effect to NO attenuates the contractile response induced by TXA₂ in 2K-1C E+ on 1.5 g but not 3.0 g of rest tension. The H₂O₂ production potentiated the vasodilator effect induced by AuNPs-{Ru-4PySH}_n in 2K-1C E- aorta and the hyperactivity of eNOS reduced its effect in 2K-1C E+ aorta.

Key Words: Nitric Oxide, Hydrogen Peroxide, vascular contraction, α₁-adrenergic agonist, NO-Synthase, Cyclooxygenase.

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Relaxamento vascular induzido por Acetilcolina (ACh) em aortas isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C) | 69 |
| Figura 2. Resposta contrátil estimulada com KCl 60 mmol/L em aortas com (E+) ou sem endotélio (E-) isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C) .. | 70 |
| Figura 3. Resposta contrátil em grama (g) estimulada com KCl nas concentrações de 10, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 mmol/L em aortas com endotélio (E+) isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C)..... | 71 |
| Figura 4. Contração induzida com fenilefrina (PE) em aortas com (E+) ou sem endotélio (E-), isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C) | 72 |
| Figura 5. Contração induzida com fenilefrina (PE) em aortas com (E+) ou sem endotélio (E-), isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C) | 73 |
| Figura 6. Relaxamento vascular induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH} _n em aortas, sem endotélio (E-) e pré-contraídas com fenilefrina, isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C) | 74 |
| Figura 7. Relaxamento vascular induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH} _n em aortas isoladas de ratos normotensos (2R) com (E+) ou sem endotélio (E-), pré-contraídas com fenilefrina | 75 |
| Figura 8. Relaxamento vascular induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH} _n em aortas isoladas de ratos hipertensos (2R-1C) com (E+) ou sem endotélio (E-), contraídas com fenilefrina | 76 |
| Figura 9. Medida indireta da concentração de EROs com ácido tiobarbitúrico (TBARS), pela formação do produto malonaldeído (MDA), em plasma de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C)..... | 77 |
| Figura 10. (A) Fotomicrografias representativas de aortas de ratos normotensos (2R) ou hipertensos (2R-1C) incubadas ou não (Controle) com agentes antioxidantes em presença de DHE que produz fluorescência vermelha quando oxidado por EROs. (B) Produção de EROs medida pela intensidade de fluorescência (IF) emitida pela sonda DHE em aortas de ratos normotensos (2R) ou hipertensos (2R-1C) com (E+) ou sem endotélio (E-), na ausência ou presença de Tiron 1 mmol/L ou Peg-Catalase 300 U/mL | 78 |
| Figura 11. Contração induzida com fenilefrina (PE) em aortas de ratos normotensos (2R) com endotélio (E+), em ausência ou presença de Tiron nas concentrações de 0,1 ou 1 mmol/L | 80 |
| Figura 12. Efeito do Tiron sobre a contração (g) induzida com fenilefrina (PE) em aortas sem endotélio (E-), isoladas de ratos normotensos (2R) em ausência ou presença de Tiron, nas concentrações de 0,1 ou 1 mmol/L..... | 81 |

| | |
|---|----|
| Figura 13. Efeito do Tiron sobre a contração (g) induzida com fenilefrina (PE) em aortas com endotélio (E+) isoladas de ratos normotensos (2R), em ausência ou presença de sequestrador de ânion superóxido Tiron nas concentrações de 0,1 ou 1 mmol/L..... | 82 |
| Figura 14. Efeito do Tiron sobre a contração (g) induzida com fenilefrina (PE) em aortas sem endotélio (E-), isoladas de ratos hipertensos (2R-1C), em ausência ou presença de Tiron, nas concentrações de 0,1 ou 1 mmol/L..... | 82 |
| Figura 15. Efeito da catalase sobre a contração (g) induzida com fenilefrina (PE) em aortas com endotélio (E+), isoladas de ratos normotensos (2R). As contrações foram realizadas na ausência (2R E+) ou presença de catalase (Cat), nas concentrações de 30, 90, 150 e 300 U/ml | 84 |
| Figura 16. Efeito da catalase sobre a contração (g) induzida com fenilefrina (PE) em aortas sem endotélio (E-), isoladas de ratos normotensos (2R). As contrações foram realizadas na ausência (2R E-) ou presença de catalase (Cat), nas concentrações de 30, 90, 150 e 300 U/ml..... | 85 |
| Figura 17. Efeito da catalase sobre a contração (g) induzida com fenilefrina (PE) em aortas sem endotélio intacto (E-), isoladas de ratos normotensos (2R). As contrações foram realizadas na ausência (2R E-) ou presença de catalase (Cat), nas concentrações de 30, 90, 150 e 300 U/ml | 85 |
| Figura 18. Efeito da catalase sobre a contração (g) induzida com fenilefrina (PE) em aortas com endotélio (E+), isoladas de ratos hipertensos (2R-1C). As contrações foram realizadas na ausência (2R-1C E+) ou presença de catalase (Cat), nas concentrações de 30, 90, 150 e 300 U/ml | 87 |
| Figura 19. Efeito da catalase sobre a contração (g) induzida com fenilefrina (PE) em aortas sem endotélio (E-), isoladas de ratos hipertensos (2R-1C). As contrações foram realizadas na ausência (2R-1C E-) ou presença de catalase (Cat), nas concentrações de 30, 90, 150 e 300 U/ml | 87 |
| Figura 20. Efeitos da catalase sobre a produção de EROs em células endoteliais isoladas de ratos 2R, na ausência (Basal) ou presença de fenilefrina (PE 0,1 µmol/L), ou PE e Tiron (T) 0,1 e 1 mmol/L, PE e Peg-Catalase (C) 300 e 3000 U/mL ou PE e a associação de Catalase 3000 U/mL e Tiron 1mmol/L (C+T)..... | 89 |
| Figura 21. Efeitos da catalase sobre a produção de EROs em células endoteliais isoladas de ratos 2R-1C, na ausência (Basal) ou presença de fenilefrina (PE 0,1 µmol/L) ou PE e Tiron (T) 0,1 e 1 mmol/L, PE e Peg-Catalase (C) 300 e 3000 U/mL, ou PE mais a associação de Catalase 3000 U/mL e Tiron 1 mmol/L (C+T) ... | 89 |
| Figura 22. Produção de H ₂ O ₂ em aortas com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-) isoladas de ratos normotensos (2R) ou hipertensos (2R-1C), estimuladas ou não (basal) com fenilefrina (PE) em banho para órgãos isolados | 92 |

| | |
|---|-----|
| Figura 23. Produção de H ₂ O ₂ em aortas de ratos normotensos sem estímulo com fenilefrina (PE) (A) e hipertensos (2R-1C) estimuladas com PE 0,1µmol/L (B) em ausência (controle) ou presença dos inibidores L-NAME 100 µmol/L, Ibuprofeno 10 µmol/L, Apocinina 100 µmol/L, Alopurinol 100 µmol/L) e DDC 10 µmol/L) por 30 min | 92 |
| Figura 24. Efeitos da catalase e Tiron em aortas sobre o relaxamento pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH} _n em aortas, sem endotélio (E-), isoladas de ratos normotensos (2R), contraídas com fenilefrina em ausência ou presença de Catalase (Cat) 300 U/mL ou Tiron nas concentrações de 0,1 ou 1 mmol/L | 94 |
| Figura 25. Efeitos da catalase e Tiron em aortas sobre o relaxamento pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH} _n em aortas, sem endotélio (E-), isoladas de ratos hipertensos (2R-1C), contraídas com fenilefrina em ausência ou presença de Catalase (Cat) 300 U/mL ou Tiron nas concentrações de 0,1 ou 1 mmol/L | 94 |
| Figura 26. Efeito do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em aortas de ratos 2R e 2R-1C. Curvas concentração-efeito cumulativas para H ₂ O ₂ foram realizadas em aortas sem endotélio (E-), contraídas com PE 10 nmol/L | 97 |
| Figura 27. Efeito do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em aortas de ratos 2R e 2R-1C. Curvas concentração-efeito cumulativas para H ₂ O ₂ foram realizadas em aortas com endotélio (E+), contraídas com PE 100 nmol/L | 97 |
| Figura 28. Efeito da indometacina (INDO) sobre a resposta ao peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em aortas de ratos 2R, sem endotélio (E-). Curvas concentração-efeito cumulativas para H ₂ O ₂ foram realizadas em aortas sem endotélio (E-), contraídas com PE (10 nmol/L) na ausência (2R E-) ou presença de INDO (10 µmol/L) | 98 |
| Figura 29. Efeito da indometacina (INDO) sobre a resposta ao peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em aortas de ratos 2R-1C, sem endotélio (E-). Curvas concentração-efeito cumulativas para H ₂ O ₂ foram realizadas em aortas sem endotélio (E-), contraídas com PE (10 nmol/L) na ausência (2R E-) ou presença de INDO (10 µmol/L) | 98 |
| Figura 30. Efeito da indometacina (INDO) sobre a resposta ao peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em aortas de ratos 2R, com endotélio (E+). Curvas concentração-efeito cumulativas para H ₂ O ₂ foram realizadas em aortas sem endotélio (E-), contraídas com PE (100 nmol/L) na ausência (2R E-) ou presença de INDO (10 µmol/L) | 99 |
| Figura 31. Efeito da indometacina (INDO) sobre a resposta ao peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em aortas de ratos 2R-1C, com endotélio (E+). Curvas concentração-efeito cumulativas para H ₂ O ₂ foram realizadas em aortas sem endotélio (E-), contraídas com PE (100 nmol/L) na ausência (2R E-) ou presença de INDO (10 µmol/L) | 99 |
| Figura 32. Efeito do inibidor L-NAME sobre a resposta induzida pelo peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em aortas de ratos 2R e 2R-1C com endotélio | 100 |

| | |
|--|-----|
| Figura 33. Efeito dos inibidores L-NAME, ODQ e Indometacina (INDO) sobre a resposta contrátil estimulada com fenilefrina (PE) em aortas de ratos 2R (E+) | 102 |
| Figura 34. Efeito dos inibidores L-NAME, ODQ e Indometacina (INDO) sobre a resposta contrátil estimulada com fenilefrina (PE) em aortas de ratos 2R-1C (E+) 102 | |
| Figura 35. Efeito do inibidor seletivo para COX-1, SC-560 sobre a resposta contrátil induzida com PE em aortas de ratos 2R (A) e 2R-1C (B)..... | 105 |
| Figura 36. Contração induzida com fenilefrina (PE) em aortas com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-) isoladas de ratos 2R (A) e 2R-1C (B), na ausência ou presença do inibidor seletivo para COX2, SC-236 (10 µmol/L)..... | 106 |
| Figura 37. Efeitos dos inibidores da COX sobre a resposta contrátil induzida com fenilefrina em aortas com endotélio de ratos normotensos 2R | 108 |
| Figura 38. Expressão proteica das isoformas da enzima ciclooxigenase, COX-1 (A) e COX-2 (B), normalizada pela expressão de β-Actina, em aortas, com (E+) ou sem endotélio (E-), de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C) | 110 |
| Figura 39. Medida da produção de TXB ₂ (metabólito estável do tromboxano A ₂) e 6-keto-PGF _{1α} (metabólito estável da prostaciclina) em pg/ml em homogenato de aortas, com (E+) ou sem endotélio (E-), de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C), previamente estimuladas com fenilefrina 0,1 µmol/L em banho para órgãos isolados | 112 |
| Figura 40. Intensidade de fluorescência (IF) emitida pela sonda sensível ao NO (DAF-2A) em células endoteliais de aorta de 2R, na ausência (Basal) ou presença do inibidor seletivo para COX-1, SC-560 (10 µmol/L) ou para COX-2 SC-236 (10 µmol/L)..... | 113 |
| Figura 41. Intensidade de fluorescência (IF) emitida pela sonda sensível a EROs (DHE) em células endoteliais de aorta de 2R e 2R-1C, na ausência (Basal) ou na presença do inibidor seletivo para COX-1, SC-560 (10 µmol/L) ou COX-2 SC-236 (10 µmol/L)..... | 114 |
| Figura 42. Contração vascular em grama (g) induzida com fenilefrina (PE) em aortas com endotélio intacto (E+), isoladas de ratos normotensos (2R) em ausência ou presença de Indometacina (INDO 10 µmol/L) ou Ibuprofeno (IBUP 10 µmol/L) ou associação desses com catalase 300 U/ml..... | 115 |
| Figura 43. Efeito máximo (Emax) de contração vascular induzida com KCl 60 mmol/L, PE 0,1 µmol/L ou U-46619 0,1 µmol/L em aortas com endotélio (E+), isoladas de ratos normotensos (2R), em ausência ou presença de indometacina (INDO, 10 µmol/L) | 116 |
| Figura 44. Contração induzida com PE ou com o U-46619 em aortas com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-), isoladas de ratos 2R | 117 |

| | |
|---|-----|
| Figura 45. Contração induzida com PE ou com o U-46619 em aortas com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-), isoladas de ratos 2R-1C..... | 118 |
| Figura 46. Efeito do inibidor não seletivo da COX (INDO) sobre a contração induzida com PE ou com o U-46619 em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R..... | 118 |
| Figura 47. Efeito do inibidor não seletivo da COX (INDO) sobre a contração induzida com PE ou com o U-46619 em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R-1C..... | 119 |
| Figura 48. A. Expressão proteica da NO-Sintase endotelial (eNOS) em aorta de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C) normalizada pela expressão de β -Actina (B) Fosforilação (f) da Ser ¹¹⁷⁷ da eNOS vs β -Actina em aorta com endotélio sem tensão e sem estímulo (C) Fosforilação da Ser ¹¹⁷⁷ da eNOS vs β -Actina em aorta E+ sobre tensão de 1,5g e estímulo com KCl 60 mmol/L. (D) Fosforilação da Ser ¹¹⁷⁷ ou (E) Thr ⁴⁹⁵ da eNOS vs β -Actina em aorta com endotélio sobre tensão de 1,5g e estímulo com PE 0,1 μ mol/L | 122 |
| Figura 49. Efeito da inibição de Tirosina Quinase (PP ₁ , 10 μ mol/L) ou PI3K/Akt (Wortmannin, 20 μ mol/L) sobre a fosforilação da Ser ¹¹⁷⁷ e Thr ⁴⁹⁵ da NO-Sintase endotelial em aorta com endotélio de ratos hipertensos (2R-1C) estimuladas com fenilefrina 0,1 μ mol/L | 123 |
| Figura 50. Intensidade de Fluorescência (IF) emitida por DAF-2DA em células endoteliais isoladas de aorta de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C), em ausência de sonda (Branco) ou na presença, sem estímulo (Basal) ou estimuladas por 10 min com PE 0,1 μ mol/L ou 1 μ mol/L | 124 |
| Figura 51. Expressão protéica das subunidades α (A) e β (B) da enzima Guanilato Ciclase solúvel (GC) em aorta de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C) | 125 |
| Figura 52. Efeito relaxante do Sildenafil em aortas com ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C | 126 |
| Figura 53. Quantificação de GMPc em aortas com endotélio, de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C) estimuladas com PE 0,1 μ mol/L sob tensão de 1,5 g, em banho para órgãos isolados, em presença do sildenafil .. | 128 |
| Figura 54. Contração induzida com PE em aorta de ratos normotensos 2R com endotélio sob diferentes tensões de 0,5; 1,0, 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 g | 128 |
| Figura 55. Contração induzida com PE em aorta de ratos hipertensos 2R-1C com endotélio sob diferentes tensões de 0,5; 1,0, 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 g | 129 |
| Figura 56 (A). Efeitos da fenilefrina (PE) no endotélio (E+) e músculo liso vascular da aorta de ratos normotensos (2R), sob tensão de repouso de 1,5 g..... | 173 |
| Figura 56 (B). Efeitos da fenilefrina (PE) no endotélio (E+) e músculo liso vascular da aorta de ratos hipertensos (2R-1C), sob tensão de repouso de 1,5 g.. | 174 |

Lista de Tabelas

| | |
|--|-----|
| Tabela 1. Valores de Emax e pD ₂ obtidos na contração induzida com fenilefrina (PE) em aortas com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-), isoladas de ratos normotensos (2R), em ausência ou presença de Tiron 0,1 ou 1 mmol/L | 81 |
| Tabela 2. Valores de Emax e pD ₂ obtidos na contração induzida com fenilefrina (PE) em aortas com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-), isoladas de ratos hipertensos (2R-1C) em ausência ou presença de Tiron, nas concentrações de 0,1 ou 1 mmol/L..... | 83 |
| Tabela 3. Valores de Emax e pD ₂ obtidos na contração induzida com fenilefrina (PE) em aortas com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-), isoladas de ratos normotensos (2R), em ausência ou presença de diferentes concentrações de catalase..... | 85 |
| Tabela 4. Valores de Emax e pD ₂ obtidos na contração vascular induzida com fenilefrina (PE) em aortas com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-), isoladas de ratos hipertensos (2R-1C), em ausência ou presença de diferentes concentrações de catalase | 88 |
| Tabela 5. Valores de Intensidade de fluorescência (IF) emitida pela sonda DHE em células endoteliais de aorta de ratos 2R ou 2R-1C, na ausência (Basal) ou na presença de PE, PE e Tiron 0,1 ou 1 mmol/L, PE e Peg-Catalase (Cat) 300 ou 3000 U/mL ou PE e associação de Catalase 3000 U/mL e Tiron 1mmol/L..... | 90 |
| Tabela 6. Valores de Emax e pD ₂ obtidos no relaxamento induzido pelo composto doador de óxido nítrico AuNPs-{Ru-4PySH} _n em aortas sem endotélio (E-), isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C) em ausência ou presença de catalase ou de Tiron, nas concentrações de 0,1 e 1 mmol/L..... | 95 |
| Tabela 7. Valores de Emax e pD ₂ obtidos na contração com fenilefrina (PE) em aorta com endotélio (E+) isolada de 2R-1C, em ausência ou presença de inibidor não seletivo da NO-sintase (L-NAME, 100 µmol/L), seletivo para iNOS (1400W, 100 µmol/L), seletivo para nNOS (N-Propil L-Arginina, 100 µmol/L) e inibidor para PKG, Rp-8BrGMPc (30 µmol/L) | 103 |
| Tabela 8. Valores de Emax e pD ₂ obtidos na contração induzida com fenilefrina (PE) em aorta com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-), isoladas de ratos 2R e 2R-1C em ausência (PE) ou presença dos inibidores seletivos para COX-1 (SC-560, 10 µmol/L) ou COX-2 (SC-236, 10 µmol/L) | 107 |
| Tabela 9. Valores de Emax e pD ₂ obtidos na contração induzida com fenilefrina (PE) ou U-46619 em aorta com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-), isolada de ratos 2R e 2R-1C, em ausência ou presença de inibidor não seletivo da COX, Indometacina (INDO) 10 µmol/L..... | 120 |
| Tabela 10. Valores de Emax e pD ₂ para resposta contrátil em grama (g) induzida por fenilefrina em aortas com endotélio de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C) sob diferentes tensões de estiramento radial em grama | 129 |

Lista de Abreviaturas e Siglas

| | |
|--------------------------------------|--|
| [Ca⁺²]_c | concentração citosólica de cálcio |
| 1400W | inibidor seletivo para nNOS |
| 2R | rato normotenso |
| 2R-1C | rato hipertenso |
| 4Py-SH | 4-Mercaptopiridina |
| A23187 | ionóforo de cálcio |
| AA | ácido araquidônico |
| ACh | acetilcolina |
| AC | adenilato ciclase |
| Ang II | angiotensina II |
| Akt | proteína quinase B |
| AMP_c | adenosina monofosfatada cíclica |
| ANOVA | análise de variância |
| AT1 | subtipo I do receptor para angiotensina |
| AuNPs | nanopartículas de ouro |
| AuNPs-{Ru-4PySH}_n | Ru-4-Mercapto-NO (GOLD) |
| BH₄ | tetrahidrobiopterina |
| Bpy | 1,2' bipyridina |
| c-Src | classe de tirosinas quinases |
| Ca⁺² | íon cálcio |
| CaCl₂ | cloreto de cálcio |
| Cat | catalase |
| CAM | calmodulina |
| CMLV | células do músculo liso vascular |
| CO₂ | monóxido de carbono |
| COX | ciclooxigenase |
| COX-1 | isoforma 1 da COX |
| COX-2 | isoforma 2 da COX |
| DHE | sonda fluorescente dihidroetidina |
| DAF-2DA | sonda fluorescente 4,5-diaminofluoresceína |
| DC | débito cardíaco |
| DDC | dietilditiocarbamato |
| E+ | aorta com endotélio |
| E- | aorta sem endotélio |

| | |
|-------------------------------------|---|
| EC₅₀ | concentração de uma droga que produz 50% do efeito máximo |
| ECA | enzima conversora de angiotensina |
| EDCF | fator de contração derivado do endotélio |
| EDHF | fator hiperpolarizante derivado do endotélio |
| EDRF | fator de relaxamento derivado do endotélio |
| E_{max} | efeito máximo |
| eNOS | NO-Sintase endotelial |
| EPM | erro padrão da média |
| EROS | espécies reativas derivadas do oxigênio |
| ET-1 | Endotelina 1 |
| f-eNOS | NO-Sintase fosforilada |
| Fe⁺² | ion ferro II |
| Fe⁺³ | ion ferro III |
| GC_s | guanilato ciclase solúvel |
| GMPc | guanosina monofosfatada cíclica |
| H₂O₂ | peróxido de hidrogênio |
| INDO | indometacina |
| IF | intensidade de fluorescência |
| iNOS | NO-Sintase induzível |
| K⁺ | íon potássio |
| KCl | cloreto de potássio |
| KH₂PO₄ | fosfato de potássio monobásico |
| L-NAME | N ^G -nitro-L-arginina metil Ester |
| L-Arg | L-Arginina |
| L-Cit | L-Citrulina |
| MgSO₄ | sulfato de magnésio |
| MDA | malonoaldeído |
| Na⁺ | íon sódio |
| NaCl | cloreto de sódio |
| NADPH | nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato |
| NaHCO₃ | bicarbonato de sódio |
| nNOS | NO-Sintase neuronal |
| NO | óxido nítrico |

| | |
|----------------------------------|--|
| NO₂ | dióxido de nitrogênio |
| NOS | NO-Sintase |
| NPS | nitroprussiato de sódio |
| O₂⁻ | ânion superóxido |
| O₂ | oxigênio |
| ODQ | (1H)-(1,2,4)oxadiazole(4,3-a)quinoxalin-1-one |
| ONOO⁻ | peroxinitrito |
| PA | pressão arterial |
| pD₂ | co-logaritmo da concentração de uma droga que produz a metade do Emax |
| PDE 5 | isoforma 5 da fosfodiesterase |
| PE | fenilefrina |
| Peg | polietilenoglicol |
| PGE₂ | prostanglandina E ₂ |
| PGF_{1α} | prostanglandina PGF _{1α} |
| PGF_{2α} | prostanglandina PGF _{2α} |
| PGG₂ | prostanglandina G ₂ |
| PGH₂ | prostanglandina H ₂ |
| PGHS | prostaglandin endoperoxide H synthase |
| PGI₂ | prostaciclina |
| pH | potencial hidrogeniônico |
| PI3K | fosfatidilinositol-3-OH quinase |
| PKA | proteína quinase A |
| PKC | proteína quinase C |
| PKG | proteína quinase G |
| PLA₂ | fosfolipase A ₂ |
| PP1 | inibidor de tirosina quinases da c-Src |
| ROS | reactive oxygen species |
| Rp-8BrGMPc | inibidor da PKG |
| Ru-4Py-SH | complexo cis-[Ru(4pySH)(bpy) ₂ (NO)](PF ₆) ₃ |
| RVP | resistência vascular periférica |
| SC-236 | inibidor seletivo da isoforma COX-2 |
| SC-560 | inibidor seletivo da isoforma COX-1 |
| Ser | resíduo do aminoácido serina |

| | |
|------------------------|--|
| Serca | Ca ⁺² ATPase do retículo sarcoplasmático |
| SHR | rato espontaneamente hipertenso |
| SOD | superóxido dismutase |
| TBARS | substâncias reativas ao ácido tio-barbitúrico |
| TERPY | complexo doador de NO [Ru(terpy)(bdq)NO ⁺] ³⁺ |
| Thr | resíduo do aminoácido treonina |
| TXA₂ | tromboxano A ₂ |
| U-46619 | análogo do tromboxano A ₂ |

Sumário

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 31 |
| 2 OBJETIVOS | 45 |
| 2.1 Objetivo Geral | 45 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 45 |
| 3 MÉTODOS | 48 |
| 3.1. Animais | 48 |
| 3.2. Implantação da hipertensão renovascular pelo modelo experimental 2R-1C | 48 |
| 3.3. Estudo por reatividade vascular | 49 |
| 3.3.1. Montagem de preparações isoladas | 49 |
| 3.3.2. Protocolos específicos executados para análise da reatividade vascular | 50 |
| 3.4 Medida do estresse oxidativo sistêmico por Substâncias Reativas de Ácido Tio-Barbitúrico (TBARS) | 55 |
| 3.5 Medida da produção de EROs por microscopia de fluorescência | 55 |
| 3.6 Medida da produção de H ₂ O ₂ em aortas de 2R e 2R-1C por Amplex Red | 56 |
| 3.7 <i>Western Blot</i> para expressão protéica da eNOS fosforilada no resíduo de Ser ¹¹⁷⁷ ou Thr ⁴⁹⁵ | 57 |
| 3.8 <i>Western Blot</i> para expressão protéica da eNOS e GCs | 59 |
| 3.9 <i>Western Blot</i> para expressão protéica das isoformas COX-1 e COX-2 | 59 |
| 3.10 Estudos por kit de Elisa Imuno-Ensaio | 60 |
| 3.10.1 Atividade da GCs pela produção de GMPc | 60 |
| 3.10.2 Atividade da COX pela produção de Tromboxano A ₂ e Prostaciclina | 61 |
| 3.11 Estudos por citometria de fluxo | 61 |
| 3.11.1 Isolamento de células endoteliais de aorta de ratos | 61 |
| 3.11.2 Protocolos específicos de citometria de fluxo em células endoteliais de aorta de ratos 2R e 2R-1C | 63 |
| Efeito dos inibidores seletivos da COX sobre a concentração citosólica de NO ([NO] _c) em células endoteliais de ratos 2R. | 63 |
| Medida de EROs em células endoteliais de ratos 2R e 2R-1C | 64 |
| 3.12 Análise Estatística | 64 |
| 4 MATERIAIS | 67 |
| 5 RESULTADOS | 69 |
| 5.1 Relaxamento vascular dependente do endotélio induzido por acetilcolina em aorta de ratos normotensos e hipertensos | 69 |

| | |
|--|-----|
| 5.2 Resposta contrátil induzida por KCl 60 mmol/L em aorta de ratos normotensos e hipertensos, com ou sem endotélio..... | 70 |
| 5.3 Contração induzida por fenilefrina (PE), expressa como percentual da contração induzida por KCl 60 mmol/L, em aorta de ratos normotensos e hipertensos, com ou sem endotélio | 71 |
| 5.4 Contração induzida por fenilefrina em aorta de ratos normotensos e hipertensos, com ou sem endotélio | 72 |
| 5.5 Relaxamento vascular induzido pelo doador de óxido nítrico, AuNPs-{Ru-4PySH} _n , em aorta de ratos normotensos e hipertensos..... | 74 |
| 5.6 Participação do endotélio no relaxamento vascular induzido pelo doador de óxido nítrico, AuNPs-{Ru-4PySH} _n , em aorta de ratos normotensos e hipertensos | 75 |
| 5.7 Avaliação do estresse oxidativo sistêmico e produção de espécies reativas de oxigênio em aortas de ratos normotensos e hipertensos..... | 76 |
| 5.8 Efeitos da remoção do ânion superóxido e peróxido de hidrogênio sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina e vasodilatadora induzida por AuNPs-{Ru-4PySH} _n | 80 |
| 5.8.1 Participação do ânion superóxido na contração induzida com fenilefrina em aorta de ratos normotensos e hipertensos, com ou sem endotélio | 80 |
| 5.8.2 Participação do peróxido de hidrogênio na contração vascular induzida por fenilefrina em aorta de ratos normotensos e hipertensos, com ou sem endotélio..... | 83 |
| 5.8.3 Avaliação da produção de EROs estimulada por fenilefrina em aortas ou células endoteliais isoladas de aortas de ratos normotensos e hipertensos. | 88 |
| 5.8.4 Participação do ânion superóxido e peróxido de hidrogênio no relaxamento vascular induzido pelo doador de óxido nítrico AuNPs-{Ru-4PySH} _n em aortas de ratos normotensos e hipertensos, sem endotélio | 93 |
| 5.8.5 Efeito do peróxido de hidrogênio exógeno sobre aortas de ratos normotensos e hipertensos, com ou sem endotélio, contraídas com fenilefrina..... | 95 |
| 5.9 Expressão proteica e atividade das enzimas NO-sintase, Ciclooxigenase e Guanilato-Ciclase solúvel | 100 |
| 5.9.1 Efeito da inibição das enzimas NO-sintase (NOS), Ciclooxigenase (COX), Guanilato-Ciclase solúvel (GCs) e Proteína Quinase G (PKG) sobre a contração induzida com fenilefrina em aortas de ratos normotensos e hipertensos, com endotélio. | 100 |
| 5.9.2 Efeito da inibição das isoformas da COX, COX-1 e COX-2, sobre a contração vascular induzida com fenilefrina em aortas de ratos normotensos e hipertensos..... | 104 |
| 5.9.3 Expressão proteica das isoformas da COX em aortas de ratos normotensos e hipertensos. | 109 |
| 5.9.4 Produção de Tromboxano A ₂ e Prostaciclina estimulada com fenilefrina em aortas de ratos normotensos e hipertensos | 111 |

| | |
|--|------------|
| 5.9.5 Efeito da inibição seletiva das isoformas da enzima Ciclooxigenase sobre a produção de NO e EROs em células endoteliais isoladas de ratos normotensos e hipertensos | 113 |
| 5.9.6 Participação do peróxido de hidrogênio na reduzida resposta contrátil à fenilefrina induzida por inibidores não seletivos da COX em aortas de ratos normotensos, com endotélio | 114 |
| 5.9.7 Seletividade do efeito da indometacina em reduzir a resposta contrátil à fenilefrina em aortas de ratos normotensos | 116 |
| 5.9.8 Inibição não seletiva de Ciclooxigenase sobre a contração vascular induzida com U-46619 em aortas de ratos normotensos e hipertensos, com endotélio..... | 117 |
| 5.9.9 Expressão proteica da eNOS total e fosforilação do resíduos de Ser ¹¹⁷⁷ ou Thr ⁴⁹⁵ em aorta de ratos 2R e 2R-1C com endotélio..... | 121 |
| 5.9.10 Papel da Tirosina Quinase c-Src e da Via PI3K/Akt para fosforilação dos resíduos de Ser ¹¹⁷⁷ e Thr ⁴⁹⁵ em aorta de ratos 2R-1C | 123 |
| 5.9.11 Importância da Fenilefrina para produção de NO em células endoteliais da aorta de ratos 2R e 2R-1C | 124 |
| 5.9.12 Expressão proteica das sub unidades da Guanilato Ciclase solúvel em aortas de ratos 2R e 2R-1C | 125 |
| 5.9.13 Inibição da fosfodiesterase 5 com Sildenafil em aortas de ratos 2R e 2R-1C contraídas com fenilefrina..... | 126 |
| 5.9.14 Produção de GMPc em aorta de ratos 2R e 2R-1C com endotélio estimuladas com fenilefrina..... | 127 |
| 5.9.15 Efeito de diferentes tensões de estiramento radial para contração induzida por fenilefrina em aorta de ratos 2R e 2R-1C com endotélio | 127 |
| | |
| 6 DISCUSSÃO | 131 |
| | |
| 7 SUMÁRIO DOS RESULTADOS | 169 |
| | |
| 8 CONCLUSÃO | 176 |
| | |
| 9 REFERÊNCIAS..... | 178 |
| | |
| ANEXO DE PUBLICAÇÃO..... | 193 |

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial é uma doença multifatorial que representa um fator de risco para outras comorbidades cardiovasculares e renais. Celebrando o dia mundial de saúde de 2013, a Organização Mundial de Saúde lançou uma publicação intitulada “A global brief on hypertension – Silent Killer, global public health crisis”. O relato aponta que atualmente as doenças cardiovasculares acarretam cerca de 17 milhões de mortes por ano, o que corresponde a aproximadamente um terço do total. Dentre essas, 9,4 milhões de mortes ocorrem no mundo anualmente por complicações de hipertensão arterial.

A pressão arterial (PA) é determinada por dois importantes parâmetros funcionais, o débito cardíaco (DC) e a resistência vascular periférica (RVP). Múltiplas vias incluindo o Sistema Nervoso Autônomo, Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona e outras substâncias vasoativas atuam sobre o DC e RVP para uma regulação precisa da PA, garantindo um fluxo sanguíneo apropriado para perfusão dos vários órgãos do organismo (Blaustein, 1996; Saper, 2002; Guyenet, 2006). Entretanto, em muitos casos clínicos o DC encontra-se normal enquanto a RVP está elevada devido à constrição anormal de arteríolas e pequenas artérias (Safar et al., 1976; Beevers et al. 2001). Nas últimas três décadas, as descobertas a respeito da função das células endoteliais sobre a modulação do tônus vascular atribuíram ao endotélio vascular um importante papel sobre a regulação da RVP.

O endotélio vascular consiste de uma monocamada de células de espessura variável, que recobre de forma contínua a porção luminal dos vasos sanguíneos, representando no total uma área de superfície média com cerca de 4000 a 7000 m². Sua permeabilidade, altamente seletiva, regula de forma ativa o transporte de

moléculas em resposta a sinais moleculares ou variações das condições no meio biológico (Van Hinsbergh, 1997).

No passado, acreditava-se que o endotélio representava uma simples membrana semipermeável que recobria a porção endoluminal de todos os vasos sanguíneos. No entanto, as pesquisas sobre endotélio e suas funções, provaram que o endotélio desempenha indispensáveis funções fisiológicas, especialmente na manutenção da homeostase do tônus e da estrutura vascular (Moncada e Vane, 1976; Furchgott e Zawadzki, 1980; Van Hinsbergh, 2001), além do papel de revestimento.

As células endoteliais apresentam sistemas intracelulares altamente complexos capazes de responder a vários estímulos endógenos ou exógenos, pela liberação de uma vasta quantidade de substâncias vasoativas. A liberação de algumas dessas substâncias está associada a alterações transitórias nas concentrações citosólicas de cálcio ($[Ca^{+2}]_c$) endotelial.

Várias substâncias vasoativas foram caracterizadas nos últimos anos, química ou bioquimicamente e classificadas como fatores relaxantes ou contráteis derivados do endotélio (EDRFs – *Endothelium-Derived Relaxing Factors* e EDCFs - *Endothelium-Derived Contractile Factors*, respectivamente) por exercerem tais efeitos sobre as células do músculo liso vascular (CMLV).

A manutenção do tônus do músculo liso vascular se deve à mobilização de $[Ca^{+2}]_c$ nas CMLV por agentes específicos como agonistas, ou inespecíficos como substâncias que despolarizem ou hiperpolarizem a membrana celular. A despolarização ou hiperpolarização da membrana das CMLV promove, respectivamente, contração ou relaxamento muscular, devido à abertura ou bloqueio de canais para Ca^{+2} do tipo dependentes de voltagem e conseqüente aumento ou

diminuição da $[Ca^{+2}]_c$. O controle do tônus do músculo liso vascular está relacionado aos efeitos induzidos por fatores como EDRFs ou EDCFs, ou exógenos como estímulos mecânicos, elétricos e/ou químicos.

Dentre as substâncias vasoativas sintetizadas e liberadas pelo endotélio, encontra-se a endotelina-1 (ET-1), a molécula mais potente representante dos EDCFs. Por outro lado, as três últimas décadas foram marcadas pelo advento dos EDRFs, cujas moléculas de maior interesse tem sido o óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI_2) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio, EDHF (*Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*).

O termo EDHF pode tornar-se confuso pelo fato de parecer implícito que uma única substância difusível possa mediar esse tipo de relaxamento dependente do endotélio. De fato, não somente o NO, mas também outros fatores endoteliais em diferentes tecidos e espécies pode induzir a hiperpolarização da membrana plasmática das células do músculo liso vascular (Duvallet et al., 2005). Dentre eles, encontram-se como candidatos o íon potássio (K^+) (Edwards et al., 2007), metabólitos do citocromo P_{450} (Campbell & Falck, 2007; Larsen et al., 2008), produtos da lipoxigenase (Faraci et al., 2001), espécies reativas de oxigênio (EROs) como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Ellis & Triggle, 2003), adenosina monofosfatada cíclica – AMPc (Popp et al., 2002), peptídeo natriurético tipo-C (Wei et al., 1994), acoplamento elétrico através de junções mioendoteliais denominadas junções *gap* (Griffith, 2004; Griffith et al., 2004), o próprio NO (Bolotina et al., 1994), entre outros.

Especial atenção tem sido dada aos EDRFs, visto que alterações na atividade endotelial, principalmente em relação à produção de EDRFs, estão associadas ao desenvolvimento de diversas doenças imunológicas e cardiovasculares, como hipertensão (Panza et al., 1990; Linder et al., 1990), eventos trombóticos (De

Agostini et al, 1990; Steffelet al, 2006), dislipidemias (Casino et al, 1993; Spieker et al.,2002), Diabetes *Melittus* (Makimattila et al, 1996; Steinberg et al, 1996), hiperhomocisteinemia (Viridis et al, 2001; Tawakol et al, 2002), doenças inflamatórias ou infecciosas (Hurlimann et al, 2002; Flammer et al, 2008), entre outras.

À luz do atual conhecimento, células endoteliais saudáveis são cruciais para prevenção de inúmeras doenças e o entendimento de suas alterações por eventuais doenças possibilita o desenvolvimento de recursos terapêuticos para intervenção e correção de anormalidades. Por exemplo, a PGI₂, um EDRF prostanóide descoberto por Vane em 1976, é liberado parcialmente em resposta ao estresse de cisalhamento sanguíneo sobre o endotélio. A PGI₂ é sintetizada pela enzima ciclooxigenase (COX) a partir de Ácido Araquidônico e ao ativar seu receptor farmacológico, denominado IP, ativa a enzima Adenilil-Ciclase, aumentando os níveis de AMPc tanto em CMLV quanto em plaquetas. Em CMLV, a PGI₂ reduz a concentração de [Ca⁺²]_c promovendo vasodilatação e, em plaquetas, inibe a agregação plaquetária, prevenindo eventos trombolíticos (Bunting& Vane,1976;Gryglewski& Vane,1976; Moncada & Vane, 1976).

Ao contrário da PGI₂ que é liberada somente de forma transitória, o NO, outro EDRF, contribui para manutenção do tônus vascular basal de artérias de condutância (Mitchell et al, 1992) e, em leito vascular de resistência, pode ser produzido constantemente pela ativação por substâncias endógenas ou por agonistas (Harrington et al, 2007).

Até meados do século XX, o NO foi considerado apenas um poluente ambiental. Em 1977, Ferid Murad com a descoberta de que nitratos causavam relaxamento do músculo liso pelo aumento da produção de um nucleotídeo cíclico, o GMPc (Arnold et al., 1977; Katsuki et al., 1977); somada aos subsequentes relatos

de Furchgott e Zawadzki em 1980, que acetilcolina (ACh) causava relaxamento de aortas isoladas de coelho via EDRF, possibilitou que Ignarro e colaboradores (1987) propusessem e comprovassem que o EDRF era o NO. Tais trabalhos conferiram a Murad, Furchgott e Ignarro, Prêmio Nobel em Medicina e Fisiologia em 1998, apontando o NO como importante sinalizador celular no sistema cardiovascular.

Atualmente, o NO constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares, pois sendo uma molécula não-carregada, é capaz de se difundir para dentro ou fora das células e também entre compartimentos celulares. A biossíntese do NO resulta da oxidação da L-arginina a L-citrulina, reação catalisada pela enzima NO-sintase (NOS). Existem três isoformas da NOS, uma induzida por estímulo imunológico (iNOS ou NOS II) e duas delas constitutivas, a NOS endotelial (eNOS ou NOS III) e neuronal (nNOS ou NOS I), sendo que as isoformas constitutivas dependem do aumento transitório de íons Ca^{+2} , com consequente formação do complexo Ca^{+2} -calmodulina necessário para sua ativação (Moncada et al., 1991). O NO é reconhecido como importante fator endógeno envolvido no controle da pressão arterial (Huang et al., 1995; Ohashi et al., 1998). A inibição da NOS *in vivo*, com análogos não hidrolisáveis da L-arginina (como L-NAME), ou o desenvolvimento de camundongos “Knockout” deixaram evidente o fato que reduções nos níveis de NO resultam em aumento na pressão arterial (Rees et al., 1989; Huang et al., 1995).

A eNOS é uma oxigenase dependente de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADPH) e requer tetrahydrobiopterina (BH_4), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina adenina mononucleotídeo (FMN) como cofatores (Moncada et al., 1991) e está localizada preferencialmente nas cavéolas. As cavéolas são invaginações características da membrana plasmática de células de

mamíferos, presentes em adipócitos, CMLV e células endoteliais. As cavéolas se apresentam como invaginações de 55-80 nm de diâmetro, visualizadas primeiramente por Palade (1953) e Yamada (1955), por microscopia eletrônica. A caveolina-1 é a principal proteína estrutural da cavéola e interage com a eNOS promovendo a inibição dessa enzima. No entanto, esse processo é revertido pela ativação do complexo Ca^{+2} -calmodulina (Michel et al., 1997; Feron et al., 1998).

A ativação de receptores das células endoteliais por agonistas tais como ACh, bradicinina, serotonina e vasopressina, induz um transiente de cálcio intracelular e ativa o complexo Ca^{+2} -calmodulina, desencadeando a dissociação do complexo caveolina-eNOS e permitindo a ativação da eNOS e conseqüentemente, a síntese de NO. Embora a atividade da NO-Sintase seja associada a alterações na $[\text{Ca}^{+2}]_c$ nas células endoteliais, apenas o aumento de cálcio não é suficiente para afetar a atividade da enzima, porque a ligação de calmodulina e o fluxo de elétrons do domínio redutase para o domínio oxidase da enzima é dependente de fosforilação e desfosforilação de resíduos específicos de aminoácidos da proteína.

Dimmeler e cols. (1999) e Fulton e cols. (1999) demonstraram que a fosforilação de resíduos de serina (Ser) e treonina (Thr) da proteína quinase B, atualmente denominada Akt (Franke et al., 1995; Downward, 1998), medeia a ativação da eNOS e produção do NO. A inibição da via do fosfatidilinositol-3-OH quinase/Akt (PI3K/Akt) ou a mutação da Ser¹¹⁷⁷ da eNOS atenua a fosforilação da Ser¹¹⁷⁷ e impede a ativação da eNOS. A fosforilação direta da Ser¹¹⁷⁷ da eNOS aumenta sua atividade e altera sua sensibilidade ao cálcio. Os autores demonstraram que a fosforilação da eNOS pela Akt representa um novo mecanismo regulatório para ativação da eNOS independente de cálcio (Fleming et al., 1998).

Atualmente, sabe-se que dois aminoácidos, dentre outros, parecem ter uma grande importância na regulação da atividade da enzima NO-Sintase: um resíduo de serina (Ser¹¹⁷⁷ em humanos e ratos, Ser¹¹⁷⁹ em bovino) no domínio redutase e um resíduo de treonina (Thr⁴⁹⁵ em humanos e ratos, Thr⁴⁹⁷ em bovinos) localizada dentro do domínio de ligação para a calmodulina. Quando a Ser¹¹⁷⁷ é fosforilada, o fluxo de elétrons através do domínio redutase e, como consequência, a produção de NO são aumentados cerca de duas vezes em relação ao basal. Por outro lado, a desfosforilação da Thr⁴⁹⁵ é geralmente associada a estímulos como bradicinina, histamina, ionóforo de cálcio, que elevam $[Ca^{+2}]_c$ nas células endoteliais aumentando a atividade da NO-Sintase de 10 a 20 vezes em relação ao basal. A desfosforilação desse resíduo parece estar relacionada à maior acessibilidade da calmodulina ao domínio Ca^{+2} -Calmodulina. Provavelmente, a proteína quinase C (PKC) seja a quinase constitutivamente ativa que fosforila a Thr⁴⁹⁵, reduzindo a produção de NO (Fleming e Busse, 2003).

Normalmente, nos vasos sanguíneos o NO produzido pela eNOS se difunde do endotélio para o músculo liso vascular promovendo relaxamento vascular. Isto ocorre porque o NO se liga ao grupo heme da enzima guanilil-ciclase solúvel (GCs) produzindo guanosina monofosfatada cíclica (GMPc), que por sua vez ativa a Proteína Quinase G (PKG) desencadeando uma cascata de sinalização celular que promove redução da $[Ca^{2+}]_c$ e relaxamento vascular (Rapoport e Murad, 1983). O NO produzido endogenamente desempenha múltiplos papéis fisiológicos na regulação de diversas funções orgânicas. Redução na sua biodisponibilidade, bem como de GMPc devido à degradação pela isoforma 5 das fosfodiesterases (PDE 5), são potencialmente associadas ao desenvolvimento de muitas doenças cardiovasculares, entre elas a hipertensão arterial, hipertensão pulmonar,

aterosclerose, doença arterial coronariana, agregação plaquetária pós-angioplastia coronariana, isquemia e outras doenças sistêmicas (Prasad et al., 2000; Ignarro, 2002; Michelakis et al., 2002).

Por ser uma espécie radicalar, o NO reage rapidamente com outros radicais, como oxigênio (O_2) e ânion superóxido (O_2^-). Quando o NO reage com o O_2 , forma dióxido de nitrogênio (NO_2), porém quando reage com o O_2^- , forma peroxinitrito ($ONOO^-$), um potente agente oxidante (Ischiropoulos e Al-Mehdi, 1995), reduzindo assim a biodisponibilidade do NO. Dessa forma, um desequilíbrio na biodisponibilidade do NO pela redução na produção de NO ou aumento na sua degradação pela produção de EROs, principalmente O_2^- , pode acarretar disfunção endotelial (Higashi et al., 2002).

O termo disfunção endotelial tem sido associado a várias condições patológicas, incluindo alterações nas propriedades anticoagulantes e antiinflamatórias endoteliais (Gimbrone et al., 1995). O termo disfunção endotelial tem sido mais amplamente empregado para referir-se ao comprometimento da vasodilatação dependente do endotélio, causado pela perda da biodisponibilidade do NO vascular. Além do consumo do NO por EROs, a menor biodisponibilidade do NO pode ser causada pela redução na expressão de eNOS (Wilcox et al., 1997), falta de substrato ou de cofatores para a eNOS (Pou et al., 1992), condição essa determinante para o seu desacoplamento, induzindo a produção de EROs ao invés de NO.

É amplamente descrito que a ativação de receptores presentes em células do músculo liso vascular por agonistas, tais como angiotensina II (ANG II) e ET-1 rapidamente aumentam a produção de EROs como O_2^- e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Vários sistemas enzimáticos oxidantes podem produzir O_2^- , como as

xantinas oxidases (Nakazono et al., 1991) , cicloxigenases (Tang et al., 2007) e NOS desacoplada (Sato et al., 2005). Porém, a maior fonte desta espécie reativa de oxigênio em células vasculares tem sido atribuída ao complexo enzimático nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADPH oxidase) (Griendling et al., 1994, Griendling et al., 2000).

A NADPH oxidase catalisa a produção de O_2^- por atuar como um doador de elétrons, promovendo redução do O_2 utilizando NADH ou NADPH. Tal enzima apresenta cinco subunidades: p47phox (o termo “phox” se deve às primeiras descrições como oxidase fagocítica), p67phox, p40phox, p22phox e a subunidade catalítica gp91phox (também conhecida como Nox) que apresenta um par de grupamentos heme, responsável pela transferência de elétrons (Babior et al., 2004). Em células não estimuladas, os complexos p47phox, p67phox e p40phox localizam-se no citosol, enquanto que p22phox e gp91phox estão na membrana, onde atuam com uma flavoproteína heterodimérica, o citocromo b558. Quando estimulada, a p47phox é fosforilada e as subunidades citosólicas se translocam para a membrana, onde se associam ao citocromo b558 para aumentar a atividade oxidase da enzima.

Embora esteja bem estabelecido que a NADPH oxidase é ativada por fatores de crescimento, citocinas, estresse de cisalhamento, fatores metabólicos e agonistas de receptores acoplados à proteína G, a regulação e função de cada Nox permanece pouco conhecida. Entretanto, é evidente que as enzimas Nox são importantes para respostas biológicas normais e que elas contribuem para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e renais, incluindo hipertensão e aterosclerose (Paravicini e Touyz, 2008).

Tem sido demonstrado, tanto em modelo animal (De Nifriset al., 2001) como em humanos (Higashi et al., 2002), que o estresse oxidativo deve ser um dos

mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de hipertensão arterial e disfunções no miocárdio, embora outros mecanismos relacionados, como redução na expressão ou atividade da eNOS, possam também contribuir (Cai e Harrison, 2000). Embora muitos trabalhos apontem as EROs apenas como moléculas responsáveis por um série de danos biológicos, outros autores têm conjuntamente atribuído a elas funções como moléculas sinalizadoras intracelulares (Griendling et al., 1994, Griendling et al., 2000).

Particularmente, a hipertensão renovascular causada por estenose da artéria renal promove a ativação do sistema renina-angiotensina, aumentando a produção do seu principal peptídeo ativo Ang II. A Ang II, via receptor AT1, é importante e potente regulador da atividade da NADPH oxidase pelas vias de sinalização da PKC, fosfolipase D e fosfolipase A₂ (Paravicini e Touyz, 2008). Por conseguinte, no modelo experimental de hipertensão renovascular o aumento do estresse oxidativo vascular apresenta importante papel na sua patogenia. A hipertensão renovascular, experimental e a humana, estão associadas a alterações na vasodilatação dependente do endotélio (Higashi et al., 2002).

Não se pode desconsiderar o fato de que em certos modelos de hipertensão arterial, como o modelo L-NAME (Rees et al., 1989; Qu et al., 2010) ou mesmo o modelo SHR (*Spontaneously Hypertensive Rat*) (Lüscher & Vanhoutte, 1986; Lüscher et al., 1987), o reduzido relaxamento vascular dependente do endotélio induzido por ACh tem sido associado não somente à redução de EDRFs como o NO, mas também ao concomitante aumento na liberação de EDCFs como tromboxano (TXA₂), prostaglandinas PGE₂ e PGF_{2α}, prostanóides contráteis oriundos da atividade de ciclooxigenases (COX) que contrapõem-se ao relaxamento vascular induzido pelos EDRFs. Estudos apontam que o estresse oxidativo pode não

somente comprometer a biodisponibilidade de NO como também contribuir para exacerbação na produção de EDCFs prostanóides (García-Redondo et al., 2009).

Conforme relatado por Shimokawa e cols. (1991), na aterogênese, o menor relaxamento dependente do endotélio pode estar relacionado ao prejuízo funcional das proteínas G endoteliais, somado ao aumento na resposta do MLV a agentes contráteis. De fato, o aumento na produção de EROs nas doenças cardiovasculares poderia modificar a ativação de receptores, ativando distintas vias de sinalização celular, como receptores tirosina-quinase, serina/ treonina quinase, fosfolipases e outras vias dependentes de Ca^{2+} , seja para indução de relaxamento ou contração vascular, evidenciando a disfunção endotelial.

Alguns autores tem discutido sobre o efeito pleiotrópico sinérgico de drogas antihipertensivas. Estudos apontam que os efeitos benéficos de agentes antihipertensivos, tais como: antagonistas β -adrenérgicos (carvedilol), inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), antagonistas de receptores AT1 e bloqueadores de canais para Ca^{2+} , são mediados em parte, pela redução no estresse oxidativo (Ghiadoniet al., 2003; Yoshida et al., 2004). Esses efeitos são atribuídos à direta inibição ou redução da atividade da NADPH oxidase, como demonstrado para os antagonistas de receptores AT1, com propriedade antioxidante intrínseca. A inibição da NADPH oxidase com apocinina, a inibição da COX ou vitamina-C (sequestrador de O_2^-) potencializam o relaxamento vascular induzido pela ACh no leito mesentérico de ratos SHR, minimizando o diminuído relaxamento vascular, atenuando a disfunção endotelial (Virids e cols., 2009).

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, com compostos doadores de NO, $[Ru(terpy)(bdq)NO^+]^{3+}$ (TERPY) e nitroprussiato de sódio (NPS), demonstraram que o relaxamento do MLV de ratos hipertensos (2R-1C) induzido por

tais compostos também está prejudicado (Bonaventura et al., 2007). No entanto, a incubação com vitamina-C normalizou estas diferenças (Rodrigues et al., 2008).

Com base nessa prerrogativa, em meu trabalho de mestrado, sintetizamos e caracterizamos farmacologicamente um novo doador de NO, Ru-4-Mercapto-NO-GOLD (AuNPs- $\{Ru-4PySH\}_n$), que é um complexo de rutênio doador de NO, em que um dos ligantes é uma mercaptopiridina que interage diretamente com um sítio áurico. Tal estratégia química, de ligação de nanopartículas de ouro (AuNPs) com o complexo, conferiu uma liberação de NO mais lenta, porém constante. Esta propriedade se deve à sua considerável resistência a EROs, sendo atribuída ao complexo uma ação antioxidante intrínseca. A característica marcante desse novo doador de NO é o seu mecanismo vasodilatador, que associado à liberação de NO apresenta considerável ação colinérgica. Estimula a produção endógena de NO, via interação com receptores muscarínicos presentes na membrana plasmática de células endoteliais da aorta, cujo efeito é bloqueado pelo antagonista muscarínico, atropina (Silva, B.R.; Dissertação de Mestrado, FMRP-USP, 2009).

Com base no conhecimento prévio das propriedades do complexo AuNPs- $\{Ru-4PySH\}_n$ como droga colinomimética e antioxidante, a proposta inicial do presente trabalho foi utilizar tal composto como ferramenta farmacológica para avaliar os fatores potencialmente relacionados à disfunção endotelial em aorta de ratos 2R-1C, avaliando potenciais fatores como EROs, envolvidos na resposta vasodilatadora induzida pelo complexo AuNPs- $\{Ru-4PySH\}_n$ em aortas de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C) contraídas com o agonista α_1 -adrenérgico fenilefrina.

Considerando que estudos funcionais de relaxamento vascular são, geralmente, realizados com vasos sanguíneos previamente contraídos e dada a

importância do sistema nervoso autonômico simpático para a modulação do tônus vascular, a hipótese do presente trabalho é que, pelo menos em parte, a diminuição da resposta vasodilatadora para ACh em aorta de ratos 2R-1C seja devido a alterações na resposta contrátil α_1 -adrenérgica decorrente do aumento na produção EROs e conseqüente alterações na atividade das enzimas NOS e COX endoteliais.

Objetivo

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel do endotélio e da produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio na resposta contrátil induzida por fenilefrina e na vasodilatação induzida pelo doador de NO AuNPs-{Ru-4PySH}_n em aorta de ratos 2R e 2R-1C.

2.2 Objetivos Específicos

Em aortas de ratos hipertensos renais (2R-1C) e normotensos (2R):

1. Avaliar o papel do endotélio na contração induzida por altas concentrações de KCl ou por fenilefrina
2. Avaliar o efeito vasodilatador induzido pelo doador de NO AuNPs-{Ru-PySH}_n
3. Comparar o estresse oxidativo sistêmico entre ratos normotensos e hipertensos renais
4. Avaliar o papel das espécies reativas de oxigênio (EROs) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em aortas com ou sem endotélio.
5. Avaliar o papel das EROs sobre a resposta vasodilatadora induzida pelo doador de NO AuNPs-{Ru-PySH}_n.
6. Avaliar o papel do estímulo α_1 -adrenérgico sobre a produção de EROs
7. Avaliar o papel do peróxido de hidrogênio sobre a atividade das enzimas NO-Sintase (NOS) e Ciclooxygenase (COX) em aortas pré-contraídas com fenilefrina.

8. Avaliar o efeito de inibidores das enzimas NOS, COX, Guanilato Ciclase solúvel (GCs) e Proteína Quinase G (PKG) sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em aortas com ou sem endotélio.

9. Quantificar a produção de GMPc em aortas com endotélio, estimuladas com fenilefrina.

10. Quantificar os prostanóides Tromboxano A₂ (TxA₂) e Prostaciclina(PGI₂) produzidos em aortas com ou sem endotélio, estimuladas com fenilefrina.

11. Avaliar o papel do endotélio e da inibição da COX sobre a resposta contrátil induzida pelo análogo do TxA₂ (U-46619).

12. Avaliar o papel da tensão de estiramento radial sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em aortas com endotélio.

Métodos

3 MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, com peso entre 180 e 200 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto–USP. Os animais foram mantidos no biotério à temperatura constante de 22°C, em ciclo claro/escuro de 12h, com ração e água à vontade.

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

Os protocolos experimentais foram realizados nos grupos de ratos normotensos Sham-operados (2R) e hipertensos renais (2R-1C). A hipertensão renovascular (2 Rins–1 Clipe) foi realizada pela colocação de um clipe de prata com abertura de 0,2 mm na artéria renal esquerda. Os animais foram anestesiados com tribromoetanol para realização de laparotomia mediana e exposição do pedículo da artéria renal esquerda, onde foi implantado um clipe de prata (2R-1C). Após a cirurgia, o animal foi tratado com dose única de antibiótico oxitetraciclina (0,2 g/kg), por via intramuscular. O grupo de ratos sham-operados ou dois rins (2R), foi submetido ao mesmo estresse cirúrgico, porém sem a implantação do clipe. Os animais foram utilizados seis semanas após a cirurgia, período em que o grupo 2R-1C apresentou hipertensão estabelecida. Os ratos foram considerados hipertensos quando a pressão arterial caudal (sistólica) foi maior ou igual a 180 mmHg. Após seis semanas da indução da hipertensão arterial, os ratos foram anestesiados com isoflurano, anestésico geral inalatório, e em seguida mortos por decapitação, para

então serem exsanguinados. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de animais do Campus da USP-Ribeirão Preto (No. 156/2009).

3.3 Estudo por reatividade vascular

3.3.1 Montagem de preparações isoladas

Para registro da tensão isométrica foram utilizadas preparações de aorta torácica isolada de ratos (350-500g), hipertensos renais 2R-1C e normotensos 2R (Sham-operados). A aorta foi isolada, dissecada de tecidos conjuntivos e gorduras e foram retirados anéis de 4 mm de comprimento. Em alguns anéis o endotélio vascular foi removido mecanicamente, dependendo do protocolo a ser realizado. A efetividade da remoção ou manutenção do endotélio foi verificada pela ausência ou presença, respectivamente, de relaxamento à acetilcolina (ACh, 1 μ mol/L) em aortas pré-contraídas com a EC₅₀ da fenilefrina (PE). Foram consideradas aortas com endotélio intacto preparações cujos estímulos com ACh produziram um relaxamento vascular igual ou maior do que 70% da pré-contração com PE.

As aortas foram montadas entre dois ganchos de metal inseridos no lúmen da artéria para produzir tensão. Um dos ganchos foi conectado a um suporte fixo ajustável e o outro a um transdutor de registro de força. O sistema foi montado em câmara para órgão isolado contendo 10 mL de solução fisiológica de Krebs modificado com a seguinte composição (em mmol/L): NaCl 130,0; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,2; CaCl₂ 1,6; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 14,9; glicose 5,5, em pH 7,4, sob gaseificação constante com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂), a 37°C. As preparações

permaneceram em repouso por 60 min, sob tensão basal constante, para estabilização. Em seguida, as aortas foram estimuladas com fenilefrina (EC_{50} :100 nmol/L) até que as contrações fossem reproduzidas para, posteriormente, iniciar os protocolos específicos. A tensão isométrica foi registrada por meio de transdutor acoplado a polígrafo.

3.3.2 Protocolos específicos executados para análise da reatividade vascular

Relaxamento endotélio-dependente induzido com acetilcolina em aortas de ratos 2R e 2R-1C.

Objetivo: Avaliar a disfunção endotelial por meio do relaxamento induzido por ACh em aorta de ratos 2R-1C comparados a 2R.

Foram realizadas curvas concentração-efeito para Acetilcolina (0,1 nmol/L a 1 μ mol/L) em aortas de ratos 2R e 2R-1C, pré-contraídas com fenilefrina (EC_{50} :100 nmol/L).

Resposta contrátil induzida por KCl em aortas de ratos 2R e 2R-1C, com ou sem endotélio.

Objetivo: Avaliar a contração induzida por KCl (60 mmol/L) em aortas de ratos 2R e 2R-1C, com ou sem endotélio.

Em aortas de ratos 2R e 2R-1C com ou sem endotélio, foram induzidas contrações com solução de Krebs modificada contendo KCl 60 mmol/L. A composição da solução de Krebs com alta concentração de KCl foi compensada pela redução da concentração de NaCl. A contração máxima obtida foi registrada e analisada em gramas de contração.

Em aortas de ratos 2R e 2R-1C, com endotélio, foram induzidas contrações com solução de Krebs modificada contendo KCl a 10, 20, 30, 45, 60, 90 ou 120 mmol/L. A contração máxima obtida para cada concentração de KCl foi registrada e analisada em gramas de contração.

Resposta contrátil induzida por fenilefrina (PE), expressa como percentual da contração prévia induzida por KCl (60 mmol/L), em aortas de ratos 2R e 2R-1C, com ou sem endotélio.

Objetivo: Avaliar a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em aortas de ratos 2R e 2R-1C, com ou sem endotélio.

Foram realizadas contrações prévias com solução de Krebs modificada contendo KCl 60 mmol/L. O valor máximo da contração foi registrado e a solução de KCl foi substituída por Krebs normal. Após 20 minutos em Krebs normal, foram realizadas curvas concentração-efeito para fenilefrina (0,1 nmol/L a 1 µmol/L) em aortas de ratos 2R e 2R-1C, com ou sem endotélio, e as respostas foram expressas tanto em gramas quanto em valores percentuais da resposta máxima induzida previamente por KCl 60 mmol/L.

Relaxamento induzido pelo doador de óxido nítrico AuNPs-{Ru-4PySH}_n. O papel das EROs sobre este efeito em aortas de ratos 2R e 2R-1C, sem endotélio.

Objetivo: Avaliar o papel das EROs sobre o efeito relaxante induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}_n em aortas de ratos 2R e 2R-1C sem endotélio.

Na ausência (Controle) ou presença do antioxidante sequestrador de ânion superóxido Tiron 0,1 mmol/L ou 1 mmol/L, ou com catalase 300 U/mL, por 30 minutos, as preparações foram contraídas com fenilefrina (EC₅₀: 100 nmol/L). Em

seguida, concentrações crescentes e cumulativas do composto AuNPs-{Ru-4PySH}_n foram adicionadas até a obtenção do relaxamento máximo (E_{max}).

Participação do endotélio no relaxamento vascular induzido pelo doador de óxido nítrico AuNPs-{Ru-4PySH}_n em aortas de ratos 2R e 2R-1C.

Objetivo: Avaliar o papel do endotélio sobre o efeito relaxante induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}_n em aortas de ratos 2R e 2R-1C.

Sobre a contração mantida com fenilefrina (EC₅₀: 100 nmol/L) foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas do composto até a obtenção do relaxamento máximo (E_{max}).

Efeito de inibidores enzimáticos ou sequestradores de EROs sobre a contração induzida por fenilefrina em aorta de ratos 2R e 2R-1C, com ou sem endotélio.

Objetivo: Avaliar o papel de enzimas ou EROs sobre a resposta contrátil absoluta (grama) induzida pela fenilefrina em aorta de ratos 2R e 2R-1C, com ou sem endotélio.

Foram realizadas curvas concentração-efeito para fenilefrina (0,1 nmol/L a 1 µmol/L) em aorta de ratos 2R e 2R-1C, com ou sem endotélio, na ausência ou presença de inibidores enzimáticos, associação desses inibidores ou sequestradores de EROs. Abaixo, segue a relação de inibidores enzimáticos ou sequestradores de EROs e as respectivas concentrações utilizadas ao longo desse trabalho. Estes compostos foram adicionados por 30 minutos previamente a adição de fenilefrina.

Inibidores enzimáticos: Inibidor não seletivo para NO-Sintase (L-NAME, 100 µmol/L), inibidor seletivo para NO-Sintase neuronal ou NOS I (N-Propil L-Arginina,

100 $\mu\text{mol/L}$), inibidor seletivo para NO-Sintase induzida ou NOS II (1400W, 100 $\mu\text{mol/L}$), inibidores não seletivos para Ciclooxigenase, COX (Indometacina 10 $\mu\text{mol/L}$ ou Ibuprofeno 10 $\mu\text{mol/L}$), inibidor seletivo para isoforma COX-1 (SC-560, 10 $\mu\text{mol/L}$), inibidor seletivo para isoforma COX-2 (SC-236, 10 $\mu\text{mol/L}$), inibidor da Guanilato Ciclase solúvel (ODQ, 1 $\mu\text{mol/L}$), inibidor da proteína quinase G ou GK (Rp-8BrGMPc, 30 $\mu\text{mol/L}$).

Sequestradores de EROs: Sequestrador de ânion superóxido Tiron 0,1 mmol/L ou 1 mmol/L, catalisador de peróxido de hidrogênio Catalase de fígado bovino 30, 90, 150 e 300 U/mL.

Efeito da inibição de COX sobre a contração induzida por fenilefrina (PE), KCl 60 mmol/L ou análogo do tromboxano A_2 (U-46619) em aorta de ratos 2R, com endotélio.

Objetivo: Avaliar o efeito da inibição da COX com indometacina sobre a resposta dos diferentes agentes contráteis PE, KCl ou U-46619 em aorta de ratos 2R, com endotélio.

Na ausência (controle) ou presença de Indometacina 10 $\mu\text{mol/L}$ por 30 minutos, aortas de ratos foram estimuladas com PE 0,1 $\mu\text{mol/L}$ ou KCl 60 mmol/L ou U-46619 0,1 $\mu\text{mol/L}$. As respostas contráteis máximas atingidas foram registradas em gramas de contração.

Efeito da inibição da COX sobre a contração induzida pelo análogo do tromboxano A_2 (U-46619) em aorta de ratos 2R e 2R-1C, com ou sem endotélio.

Objetivo: Avaliar o papel da COX sobre a resposta contrátil induzida pelo U-46619 em aorta de ratos 2R e 2R-1C, com endotélio.

Foram realizadas curvas concentração-efeito para U-46619 (0,1 nmol/L a 1 μ mol/L) em aorta de ratos 2R e 2R-1C com endotélio, na ausência ou presença de inibidor não seletivo para COX, indometacina 10 μ mol/L.

Efeito do peróxido de hidrogênio exógeno sobre a atividade das enzimas COX e NO-Sintase em aortas de ratos 2R e 2R-1C, com ou sem endotélio, contraídas com fenilefrina.

Objetivo: Avaliar o(s) efeito(s) induzido(s) pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) exógeno sobre a atividade das enzimas COX e NO-Sintase em aortas de ratos 2R e 2R-1C, com ou sem endotélio, contraídas com fenilefrina.

Foram realizadas curvas concentração-efeito para H_2O_2 (1 nmol/L a 10 mmol/L). Aortas com endotélio foram contraídas com fenilefrina (100 nmol/L) para preservar a diferente modulação endotelial entre 2R e 2R-1C e 10 nmol/L em aortas sem endotélio, para induzir contração submáxima e sustentada. Curvas concentração-efeito para H_2O_2 foram construídas em aortas de 2R e 2R-1C, com ou sem endotélio, previamente incubadas com inibidor não seletivo para COX, indometacina 10 μ mol/L, e em aorta de 2R e 2R-1C com endotélio, previamente incubadas com o inibidor não seletivo da NO-Sintase, L-NAME 100 μ mol/L.

Relaxamento induzido pelo inibidor seletivo da fosfodiesterase 5 (PDE5) em aortas de ratos 2R e 2R-1C, com ou sem endotélio, contraídas com fenilefrina.

Objetivo: Avaliar o papel da PDE5 em aortas de ratos 2R e 2R-1C, com endotélio, estimuladas com fenilefrina.

Sobre a contração mantida com fenilefrina (EC_{50} : 100 nmol/L), concentrações crescentes e cumulativas de inibidor seletivo da isoforma PDE5 (Sildenafil) foram adicionadas até a obtenção do relaxamento máximo.

Efeito de diferentes tensões de estiramento vascular radial sobre a contração induzida por fenilefrina em aorta de ratos 2R e 2R1C, com endotélio.

Objetivo: Avaliar a importância do estiramento radial vascular para a resposta contrátil induzida com fenilefrina em aorta de ratos 2R e 2R-1C.

Curvas concentração-efeito foram construídas para fenilefrina (0,1 nmol/L - 0,1 µmol/L) em aortas de ratos 2R e 2R-1C, com endotélio, sob tensões de estiramento radial de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 gramas.

3.4 Medida do estresse oxidativo sistêmico por Substâncias Reativas de Ácido Tio-Barbitúrico (TBARS)

Ratos 2R e 2R-1C foram anestesiados e 5 mL de sangue foram coletados lentamente, para evitar hemólise, por punção da cavidade atrial cardíaca. O sangue foi centrifugado em tubo heparinizado, para separação do plasma. Os níveis de peróxidos lipídicos plasmáticos foram determinados pela medida de TBARS, usando método fluorométrico (Montenegro et al., 2009). Esse método requer a excitação em 515 nm e emissão em 553 nm e utiliza 1,1,3,3- tetrametoxipropano como padrão (Yagi et al., 1998). Os níveis de lipoperóxidos foram expressos em malonaldeído (nmol/L).

3.5 Medida da produção de EROs por microscopia de fluorescência

A produção de ânion superóxido (O_2^-) em aortas de ratos 2R e 2R-1C, com ou sem endotélio, em ausência de estímulo ou previamente incubadas por 20 min com Tiron 1 mmol/L ou Peg Catalase 300 U/mL, foi medida com sonda fluorescente

sensível a EROs, DHE (Dihidroetidina). Segmentos de aorta foram incubados por 30 min, em temperatura ambiente com DHE (10 $\mu\text{mol/L}$), analisados por microscopia de fluorescência (Sistema de Imagens Leica Ltda, Cambridge, UK) e as imagens foram capturadas em 400 pixels. A fluorescência foi avaliada usando o software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), como previamente descrito por Castro et al. (2009).

3.6 Medida da produção de H₂O₂ em aortas de 2R e 2R-1C por Amplex Red

Aortas de ratos 2R e 2R-1C, com e sem endotélio, foram estimuladas ou não (basal) com fenilefrina (PE) 0,1 $\mu\text{mol/L}$ em banhos para órgãos isolados. Em outra série de experimentos, aortas de ratos 2R-1C, com endotélio, foram estimuladas com PE 0,1 $\mu\text{mol/L}$, enquanto aortas de ratos 2R com endotélio não foram estimuladas com PE, respeitando as condições de maior produção de H₂O₂ em aorta dos diferentes animais. As aortas de ambos os animais, em banho para órgãos isolados, foram previamente incubadas por 30 min com inibidor não seletivo para NO-Sintase (L-NAME, 100 $\mu\text{mol/L}$), inibidor não seletivo para COX (Ibuprofeno, 100 $\mu\text{mol/L}$), inibidor da NADPH Oxidase (Apocinina, 100 $\mu\text{mol/L}$), inibidor da Xantina Oxidase (Alopurinol, 100 $\mu\text{mol/L}$) ou inibidor da Superóxido Dismutase (Dietilditiocarbamato - DDC, 10 $\mu\text{mol/L}$).

Após estabilização da resposta contrátil, as aortas foram rapidamente removidas, colocadas em “ependorfs”, congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C. Posteriormente, as amostras foram maceradas em solução de Krebs gelada e centrifugadas. A produção de H₂O₂ foi avaliada em alíquotas de 50 μL do sobrenadante, em placas de 96 poços, usando *kit* para dosagem de H₂O₂, Amplex Red (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA).

A fluorescência emitida foi medida nos comprimentos de excitação: 530 nm e emissão: 590 nm. Curva padrão para H₂O₂ foi construída com o padrão do fabricante, em temperatura ambiente e utilizada para determinar a concentração de H₂O₂ das amostras. O resultado foi expresso como a média ± EPM das concentrações absolutas de H₂O₂ detectadas nas amostras (µmol/L). A quantificação não foi corrigida pela massa tecidual ou proteínas totais, uma vez que o objetivo desse protocolo experimental foi avaliar a concentração absoluta de H₂O₂ produzida em aortas de ratos 2R e 2R-1C, em ausência ou presença do estímulo com PE e verificar suas possíveis fontes enzimáticas.

3.7 Western Blot para expressão protéica da eNOS fosforilada no resíduo de Ser¹¹⁷⁷ ou Thr⁴⁹⁵

Para avaliação da fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ ou Thr⁴⁹⁵ da eNOS, aortas de ratos 2R e 2R-1C, com endotélio, foram montadas em banho para órgãos isolados. Após estabilização por 60 min sob tensão de 1,5 g, foram contraídas com fenilefrina (PE) 0,1 mmol/L. Após estabilização da resposta contrátil, a integridade endotelial foi verificada com ACh.

Após lavagem da preparação por 30 min para remoção da PE e ACh, as preparações foram novamente contraídas com PE ou KCl 60 mmol/L. Uma vez atingido o platô da resposta contrátil para PE ou KCl, as aortas foram removidas do banho e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido.

Foram também coletadas aortas intactas de 2R e 2R-1C e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido (sem tensão e sem estímulo). Esse grupo foi avaliado no intuito de verificar se a hipertensão, independentemente de estímulo,

geraria alguma alteração nas fosforilações dos resíduos de Ser¹¹⁷⁷ ou Thr⁴⁹⁵ da eNOS ou se algum dos estímulos seria responsável por tal fosforilação. Outro grupo de aortas de ratos 2R-1C, com endotélio, foi estimulado com PE 0,1 µmol/L. As preparações foram incubadas ou não com inibidor de tirosina quinase c-Src (PP1, 10 µmol/L) ou inibidor da via PI₃K/Akt (Wortmannin, 20 µmol/L), para verificar se alguma dessas enzimas participaria na fosforilação da Ser¹¹⁷⁷ e Thr⁴⁹⁵ da eNOS.

Em seguida, cada amostra foi homogeneizada em Tampão RIPA Modificado (Tris-HCl 65,2 mmol/L, NaCl 154 mmol/L, NP-40 1%; Deoxicolato de sódio 0,25%; EDTA 0,8 mmol/L; PMSF 1 mmol/L, Ortovanadato de Sódio 10 mmol/L, Fluoreto de Sódio 100 mmol/L, Pirofosfato de Sódio 10 mmol/L e inibidor de protease) para evitar proteólise e manter a fosforilação das proteínas. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm a 4°C por 10 min para remover os resíduos teciduais. A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo Método de Bradford. Trinta µg de proteínas foram separadas por eletroforese em placa de poliacrilamida com sulfato dodecil de sódio (8% SDS-PAGE) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 5% por 60 min em temperatura ambiente. A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpo primário de coelho contra Ser¹¹⁷⁷ ou contra Thr⁴⁹⁵ fosforiladas na eNOS (1:1000, Millipore) por 12h a 4°C. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário de camundongo HRP-conjugado anti-coelho (1:1000, Santa cruz) por 60 min em temperatura ambiente. As bandas das proteínas foram visualizadas por quimioluminescência (ECL plus, GE Healthcare) e mensuradas por densitometria. A expressão da eNOS fosforilada (f-eNOS) foi normalizada pela β-actina. Células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) estimuladas com bradicinina, foram utilizadas como controle positivo.

3.8 Western Blot para expressão protéica da eNOS e GCs

A análise da expressão protéica total da eNOS e subunidades α e β da GCs foi realizada como descrito para f-eNOS. Entretanto, nessa análise, as aortas não foram previamente estimuladas em banho para órgãos isolados e foram utilizados anticorpos primários de coelho anti-eNOS (1:2500, BD), de cabra anti-subunidades α (1:500, Santa Cruz) e de camundongo anti-subunidades β (1:500, Santa Cruz) da GCs e depois anticorpos secundários anti-coelho para eNOS (1:2000, BD), anti-cabra para α GCs (1:4000, Santa Cruz) e anti-camundongo para β GCs (1:1000, Santa Cruz), por 60 min. As bandas das proteínas foram visualizadas por quimioluminescência (ECL plus, GEHealthcare) e medidas por densitometria. A expressão da eNOS total e da GCs foi normalizada pela β -actina.

3.9 Western Blot para expressão protéica das isoformas COX-1 e COX-2

A análise da expressão protéica das isoformas COX-1 e COX-2 foi realizada como descrito para f-eNOS. Entretanto, nessa análise, a integridade endotelial das aortas foi previamente avaliada em banho para órgãos isolados. Foram utilizados anticorpos primários anti-COX-1 (1:1000, Abcam) e anti-COX-2 (1:500, BD) e depois anticorpos secundários anti COX-1 (1:2000, Abcam), anti COX-2 (1:2000, BD), por 60 min. As bandas das proteínas foram visualizadas por quimioluminescência (ECL plus, GEHealthcare) e mensuradas por densitometria. A expressão das isoformas COX-1 e COX-2 foi normalizada pela β -actina.

3.10 Estudos por kit de Elisa Imuno-Ensaio

3.10.1 Atividade da GCs pela produção de GMPc

A concentração de GMPc produzido foi determinada em presença de sildenafil (10 $\mu\text{mol/L}$), inibidor seletivo da PDE5, para evitar a degradação do produto formado. Neste protocolo experimental, as aortas foram estimuladas com PE 0,1 $\mu\text{mol/L}$, como descrito para avaliação da f-eNOS. Após o período de estabilização da resposta contrátil induzida pela PE, foi adicionado o sildenafil. Após 10 min (tempo para relaxamento máximo induzido pelo sildenafil), as aortas foram removidas do banho para órgãos e congeladas em nitrogênio líquido.

Homogeneização do tecido e dosagem de proteínas: aortas congeladas foram homogeneizadas em solução de Krebs e após completa maceração do tecido, alíquotas foram separadas para dosagem de proteína pelo Método de Bradford.

Preparação das amostras: Às amostras de tecido foi adicionado TCA (Ácido Tricloro Acético) a 10%. Após centrifugação a 2000xg por 15 min a 4°C, o sobrenadante foi removido e lavado com éter dietílico saturado com água. Em seguida, a fração etílica (superior) foi descartada. Este processo foi repetido por 4 vezes. Após as lavagens, as amostras foram secadas em atmosfera de nitrogênio a 60°C e re-suspendidas no tampão de ensaio do *kit* imunoenzimático para medida do GMPc. Utilizamos o método de acetilação e os resultados foram expressos em femtomoles absolutos de GMPc e femtomoles de GMPc por mg de proteína do tecido.

3.10.2 Atividade da COX pela produção de Tromboxano A₂ e Prostaciclina

Aortas de ratos 2R e 2R-1C, com ou sem endotélio, incubadas ou não com o inibidor não seletivo da NO-Sintase (L-NAME, 100 µmol/L) por 30 min foram estimuladas com fenilefrina (PE) 0,1 µmol/L. Após o período de estabilização da resposta contrátil induzida pela PE, as aortas foram removidas do banho para órgãos e congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C até a coleta de todas as amostras.

As aortas foram maceradas e purificadas para quantificação dos prostanóides: Tromboxano B₂ (metabólito estável do Tromboxano A₂) e 6-Keto prostaglandina F_{1α} (metabólito estável da Prostaciclina) conforme instruções do fabricante do Kit de Elisa Imuno Ensaio da Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, U.S.A.). O resultado foi expresso pela média (em pg/mL) ± EPM das amostras analisadas.

3.11 Estudos por citometria de fluxo

3.11.1 Isolamento de células endoteliais de aorta de ratos

Segmentos de aorta de ratos 2R e 2R-1C (15 mm) foram dissecados dos tecidos adjacentes, isolados, cortados longitudinalmente e mantidos em solução de Hanks completa, modificada (CaCl₂ 1,6 mmol/L; MgCl₂ 1,0 mmol/L; NaCl 120,0 mmol/L; KCl 5,0 mmol/L; NaH₂PO₄ 0,5 mmol/L; dextrose 10,0 mmol/L; HEPES 10,0 mmol/L; pH 7,4). A remoção das células endoteliais foi feita mecanicamente com o auxílio de uma haste plástica plana (rodinho). A suspensão de células obtida foi

centrifugada a 200 xg por 5 min e concentrada em 500 µL de solução de Hanks contida em tubos de poliestireno para citometria de fluxo. A seguir, as células permaneceram acondicionadas em incubadora de CO₂ (37°C) até o momento do experimento. O *n* experimental representa um animal. A análise por citometria de fluxo foi realizada em FACS Canto, BD.

Nos estudos de citometria de fluxo, foram analisados os traçados citofluorográficos (histogramas) gerados pelo programa DIVA (Software DIVA) após leitura pelo citômetro. Os histogramas obtidos descrevem fenômenos de dispersão do laser que incide sobre as células, de absorção da luz e de emissão de fluorescência. Os histogramas biparamétricos correlacionam a luz dispersa lateralmente (*Side-scattered light*, SSC), proporcional à complexidade ou granulosidade interna da célula, em função da luz dispersa para frente (*Forward-scattered light*, FSC), proporcional à área da superfície celular.

A correlação das medidas de SSC e FSC permitem diferenciar os tipos celulares em populações celulares heterogêneas, agrupadas em *gates* (fronteiras gráficas que definem as características de uma população celular). Os histogramas biparamétricos gerados pela análise citofluorográfica foram utilizados para analisar a homogeneidade da população de células endoteliais empregada na leitura. Os histogramas monoparamétricos relacionam o número de eventos celulares adquiridos por leitura em função da intensidade de fluorescência emitida pela sonda fluorescente em análise e foram utilizados para analisar a biodisponibilidade de NO ou EROs nas amostras empregadas durante a leitura.

3.11.2 Protocolos específicos de citometria de fluxo em células endoteliais de aorta de ratos 2R e 2R-1C

Efeito dos inibidores seletivos da COX sobre a concentração citosólica de NO ([NO]_c) em células endoteliais de ratos 2R.

Células endoteliais sem qualquer estímulo foram fracionadas em diferentes tubos e um dos tubos de cada grupo ou “n” amostral foi submetido à leitura, para verificar a emissão de fluorescência basal (Branco). Em um dos tubos incubou-se por 20 min somente a sonda fluorescente 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2/DA - 10 µmol/L, excitada com laser azul em 488 nm, com emissão em 530/30, utilizando detector D). Após ter sua porção diacetato clivada por esterases da membrana plasmática, a sonda reage com o produto de oxidação do NO, o trióxido de dinitrogênio (N₂O₃), produzindo o composto fluorescente estável DAF-2T (Nakatsubo et al., 1998). A leitura dessa amostra foi realizada para obtenção dos valores basais de fluorescência emitidos pelo DAF-2/DA.

Os outros grupos de amostras foram incubados com os inibidores seletivos para as isoformas da COX: COX-1 SC-560 (10 µmol/L) ou COX-2 SC-236 (10 µmol/L), 10 min antes da incubação por 20 min com a sonda DAF-2DA, totalizando 30 min de incubação com o inibidor. Outros grupos de células endoteliais de 2R e 2R-1C foram analisados em ausência ou presença de fenilefrina (PE) 0,1 µmol/L ou 1µmol/L. Foram realizadas aquisições de 2500 a 5000 eventos para cada protocolo realizado. A mediana da intensidade de fluorescência foi medida em todas as amostras usando *software* DIVA.

Medida de EROs em células endoteliais de ratos 2R e 2R-1C.

Células endoteliais de ratos 2R e 2R-1C foram submetidas à leitura para verificar a emissão de fluorescência basal (Branco). Um dos tubos de cada grupo com a suspensão de células foi então incubado por 20 min, somente com a sonda fluorescente Dihidroetidina (DHE – 2,5 $\mu\text{mol/L}$ – excitada com laser azul em 488 nm, com emissão em 585/42, utilizando detector C). A sonda DHE permeia as membranas celulares, onde é oxidada a 2-hidroxi-etídio (2-OH Et^+) por O_2^- , ou a etídio (Et^+) por outras EROs, que por sua vez, são então intercaladas ao DNA celular sob a forma de brometo de etídio, responsável pela emissão de fluorescência vermelha (De luliis et al., 2006). A leitura dessa amostra foi realizada para obtenção dos valores basais de fluorescência emitidos pelo DHE no interior das células endoteliais.

Os outros grupos das amostras na ausência ou presença de fenilefrina (0,1 $\mu\text{mol/L}$ por 10 min), foram incubados com agentes antioxidantes como seqüestrador de ânion superóxido Tiron 0,1 mmol/L ou 1 mmol/L, Peg-Catalase 300 U/mL ou 3000 U/mL, ou associação desses agentes antioxidantes, com os inibidores seletivos para as isoformas da COX: COX-1 SC-560 (10 $\mu\text{mol/L}$) ou COX-2 SC-236 (10 $\mu\text{mol/L}$) por 30 min. É válido ressaltar que em todos protocolos executados sempre foi respeitado a incubação de 20 min com a sonda DHE. Em seguida, foram realizadas aquisições de 2500 a 5000 eventos para cada protocolo realizado. A mediana da intensidade de fluorescência foi medida em todas as amostras usando o software DIVA.

3.12 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média de valores quantificados \pm EPM em preparações de aorta obtidas de diferentes animais. Em estudos de reatividade

vascular, as determinações da EC_{50} (concentração que produz 50% da resposta máxima) e de efeito máximo (E_{max}) foram realizadas utilizando o método de regressão não-linear dos mínimos quadrados (Meddings et al., 1989) utilizando-se o programa GraphPad Prism (graphPad software, versão 3.00,2000). Para a análise da potência do agonista, foi utilizado o valor de pD_2 ($-\log EC_{50}$). O estudo foi realizado em preparações independentes, portanto utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do pós-teste de Newman-keuls (para comparações múltiplas) ou Dunnet (quando comparações foram feitas apenas com o controle); ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni (para 2 fatores envolvidos) ou teste t de Student (para comparações entre 2 grupos). Valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Materials

4 MATERIAIS

O composto doador de NO, complexo de rutênio cis-[Ru(bpy)₂(py)NO](PF₆)₃ (Ru-4PySH) funcionalizando Nanopartículas de Ouro (AuNPs-{Ru-4PySH}_n) foi sintetizado sob supervisão do Prof. Dr. Roberto Santana da Silva no Laboratório de Química Analítica, do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (Silva, B.R.; Dissertação de Mestrado, FMRP-USP, 2009). As drogas: Acetilcolina, Fenilefrina, L-NAME, 1400W, N-Propil L-Arginina, Rp-8BrGMPc, ODQ, Indometacina, Ibuprofeno, SC-560, SC-236, Tiron, Catalase de fígado bovino, Peg-Catalase, Apocinina, Alopurinol, Dietilditiocarbamato (DDC) foram obtidas da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Peróxido de hidrogênio 29% (Synth) foi obtido no Laboratório de Química Analítica, do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Relaxamento vascular dependente do endotélio induzido por acetilcolina em aorta de ratos normotensos e hipertensos

Para investigar os mecanismos celulares envolvidos na disfunção endotelial e os efeitos do composto AuNPs-{Ru-4PySH}_n em aortas de ratos 2R-1C, realizamos estudo por reatividade vascular. Com este objetivo, construímos curvas concentração-efeito para acetilcolina (ACh) em aorta de ratos hipertensos (2R-1C) e de ratos controle normotensos sham-operados (2R). Como pode ser observado na figura 1, ACh induziu relaxamento vascular dependente de concentração tanto em 2R quanto em 2R-1C. No entanto, o efeito máximo (Emáx) e a potência (pD₂) da ACh foram menores em 2R-1C (Emáx: 81,4 ± 4,7%; pD₂: 7,34±0,24; n= 7; p<0,001) comparados a 2R (Emáx: 100,5 ± 2,4%; pD₂: 7,79±0,18; n=5).

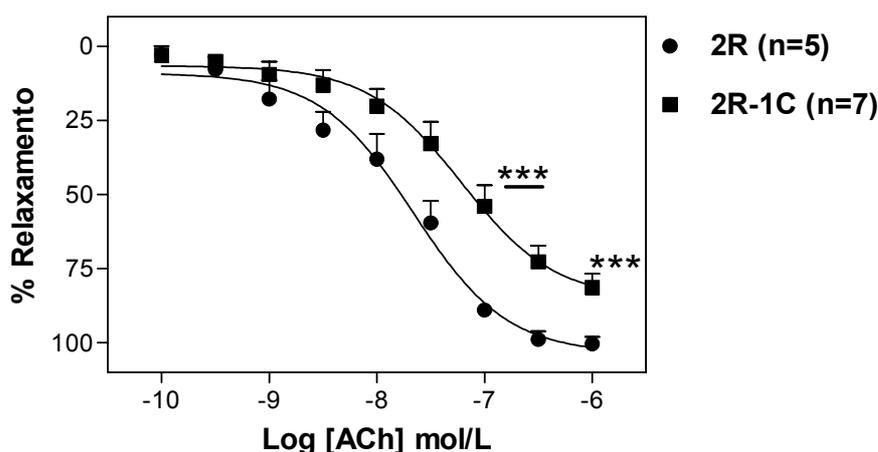


Fig. 1. Relaxamento vascular induzido por acetilcolina (ACh) em aortas isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C). Os pontos representam a média percentual de relaxamento vascular ± EPM induzido por concentrações crescentes e cumulativas de Acetilcolina após pré-contracção com fenilefrina em “n” preparações isoladas de diferentes ratos. ***Representa diferença de Emáx e pD₂ em relação ao controle normotenso (p<0,001).

5.2 Resposta contrátil induzida por KCl 60 mmol/L em aorta de ratos normotensos e hipertensos, com ou sem endotélio

Aortas de ratos 2R e 2R-1C, com ou sem endotélio, foram estimuladas com KCl 60 mmol/L e as contrações máximas em gramas de tensão foram registradas. Como mostra a figura 2, apenas aortas de ratos 2R-1C com endotélio comparadas as de ratos 2R apresentaram uma redução significativa da resposta ao estímulo contrátil induzido por KCl 60 mmol/L (2R E+: $2,87 \pm 0,29$ g, n=4 ; 2R E-: $2,60 \pm 0,41$ g, n=4; 2R-1C E+: $2,10 \pm 0,09$ g, n=4, $p < 0,01$; 2R-1C E-: $2,75 \pm 0,27$ g, n=4).

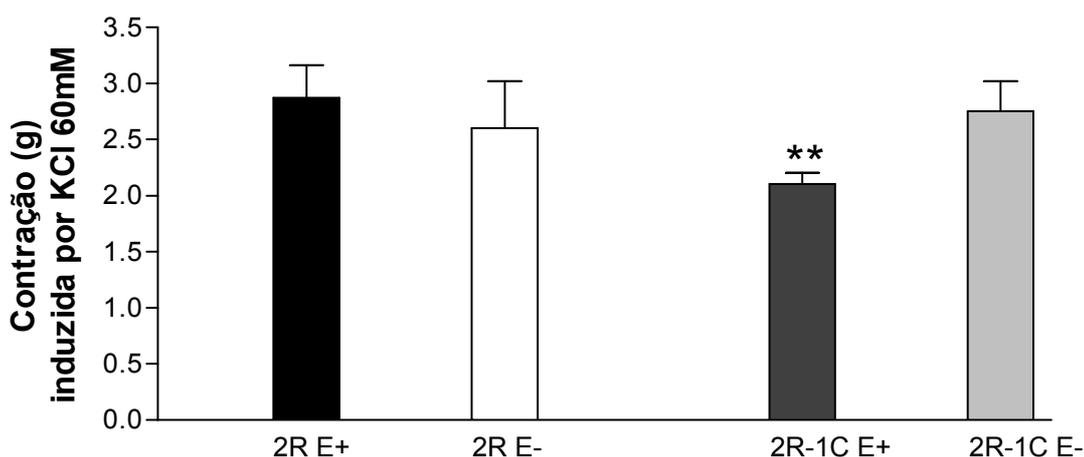


Fig. 2. Resposta contrátil estimulada com KCl 60 mmol/L em aortas com (E+) ou sem endotélio (E-) isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C). As barras representam a média de contração vascular \pm EPM em 4 preparações isoladas de diferentes ratos. **Representa diferença em relação ao controle normotenso com endotélio ($p < 0,01$).

Para verificar se a resposta contrátil induzida por altas concentrações de KCl estava reduzida em aortas de ratos 2R-1C com endotélio, preparações foram submetidas ao estímulo com concentrações crescentes e cumulativas de KCl. Como pode ser observado na Figura 3, as aortas com endotélio, de ratos 2R-1C apresentam respostas contráteis ao KCl 30, 45 e 60 mmol/L significativamente menores quando comparadas as de 2R com endotélio (**KCl 30** mmol/L, 2R E+:

1,97±0,28 g, n=4; 2R-1C E+: 1,19±0,16 g, n=4; p<0,05; **KCl 45 mmol/L**, 2R E+: 2,67±0,43 g, n=4; 2R-1C E+: 1,63±0,20 g, n=4; p<0,05; **KCl 60 mmol/L**, 2R E+: 2,84±0,46 g, n=4; 2R-1C E+: 1,73±0,21 g, n=4; p<0,05).

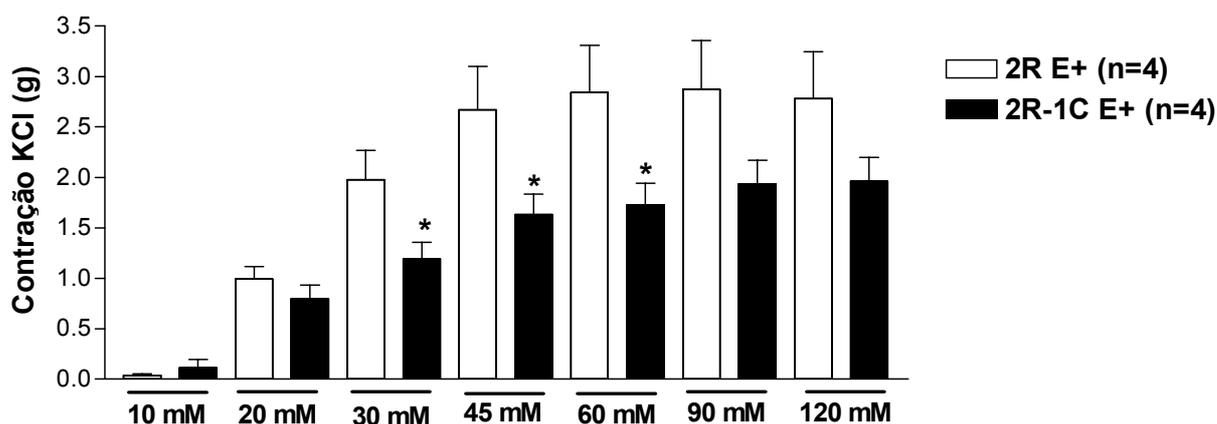


Fig. 3. Resposta contrátil, em gramas (g), estimulada com KCl nas concentrações de 10, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 mmol/L em aortas com endotélio (E+) isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C). As barras representam a média de contração vascular ± EPM em “n” preparações isoladas de diferentes ratos. *Representa diferença em relação à contração no normotenso para a mesma concentração de KCl (p<0,05).

5.3 Contração induzida por fenilefrina (PE), expressa como percentual da contração induzida por KCl 60 mmol/L, em aorta de ratos normotensos e hipertensos, com ou sem endotélio

Para comparar a contração das aortas de ratos 2R e 2R-1C à fenilefrina e KCl, realizamos curvas concentração-efeito em aortas de 2R e 2R-1C, com ou sem endotélio, estimuladas com concentrações crescentes e cumulativas de fenilefrina.

A fenilefrina induziu contração dependente de concentração em aorta de ratos 2R e 2R-1C com e sem endotélio (Fig. 4). Sob condição de normalização por KCl 60 mmol/L, aortas de 2R e 2R-1C com endotélio apresentam respostas contráteis sobreponíveis (2R/E+ Emax: 64,8 ± 6,9%, pD₂: 7,30 ± 0,05, n=4; 2R-1C/E+ Emax:

68,9 ± 2,1% , pD_2 : 7,32 ± 0,11, n=4). A remoção do endotélio aumentou o efeito máximo e a potência da fenilefrina em induzir contração nessas preparações, tanto em 2R quanto 2R-1C (2R/E- Emax: 89,2 ± 2,9%, pD_2 : 7,66 ± 0,17, n=4; 2R-1C/E-: Emax: 101,6 ± 5,18%, pD_2 : 7,66 ± 0,17, n=4; $p < 0,001$). Por outro lado, a remoção do endotélio tornou o Emax maior em 2R-1C do que 2R ($p < 0,01$), indicando hipercontratibilidade à fenilefrina se comparado a 2R.

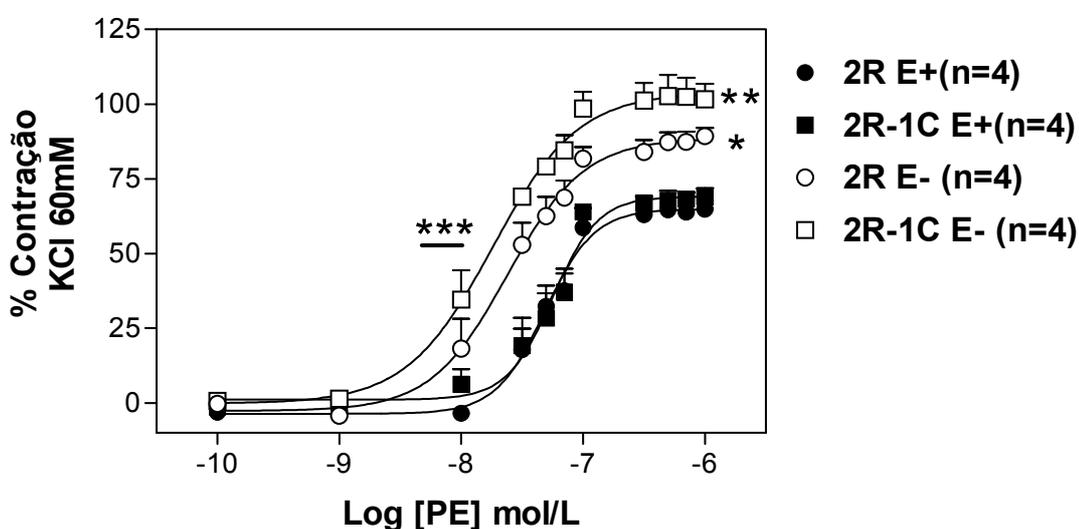


Fig. 4. Contração induzida com fenilefrina (PE) em aortas com (E+) ou sem endotélio (E-), isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C). Os pontos representam a média (%) de contração vascular ± EPM em relação à contração induzida por KCl 60 mmol/L em “n” preparações isoladas de diferentes ratos. *Representa diferença de Emax em relação aos respectivos controles com endotélio ($p < 0,001$). **Representa diferença de Emax em relação a aortas de ratos 2R sem endotélio ($p < 0,01$). ***Representa diferença de pD_2 entre aortas com e sem endotélio ($p < 0,001$).

5.4 Contração induzida por fenilefrina em aorta de ratos normotensos e hipertensos, com ou sem endotélio

Para comparar a contração estimulada com fenilefrina e a contração induzida com KCl 60 mmol/l, as respostas à fenilefrina foram expressas em valores absolutos de contração (grama, g) em aortas de ratos 2R e 2R-1C, com ou sem endotélio.

Como mostra a Fig. 5, em preparações com endotélio de ambos os animais, a fenilefrina foi menos potente (2R/E+ pD_2 : $7,44 \pm 0,03$; $n=5$; 2R-1C/E+ pD_2 : $7,54 \pm 0,06$; $n=7$) do que em preparações sem endotélio (2R/E- pD_2 : $7,93 \pm 0,10$; $n=8$ e 2R-1C/E- pD_2 : $7,89 \pm 0,08$; $n=9$; $p < 0,001$). Por outro lado, ao contrário do que demonstramos na figura 4, a resposta contrátil à fenilefrina não foi diferente entre aortas de ratos 2R (2R/E- E_{max} : $2,5 \pm 0,2g$; pD_2 : $7,93 \pm 0,10$; $n=8$) e 2R-1C sem endotélio (2R-1C/E- E_{max} : $2,6 \pm 0,2g$; pD_2 : $7,89 \pm 0,08$; $n=9$). Porém, o efeito contrátil máximo foi diminuído pela presença do endotélio em aortas de ratos 2R-1C (2R/E+ E_{max} : $2,2 \pm 0,1g$; $n=5$; e 2R-1C/E+ E_{max} : $1,2 \pm 0,2g$; $n=7$; $p < 0,001$).

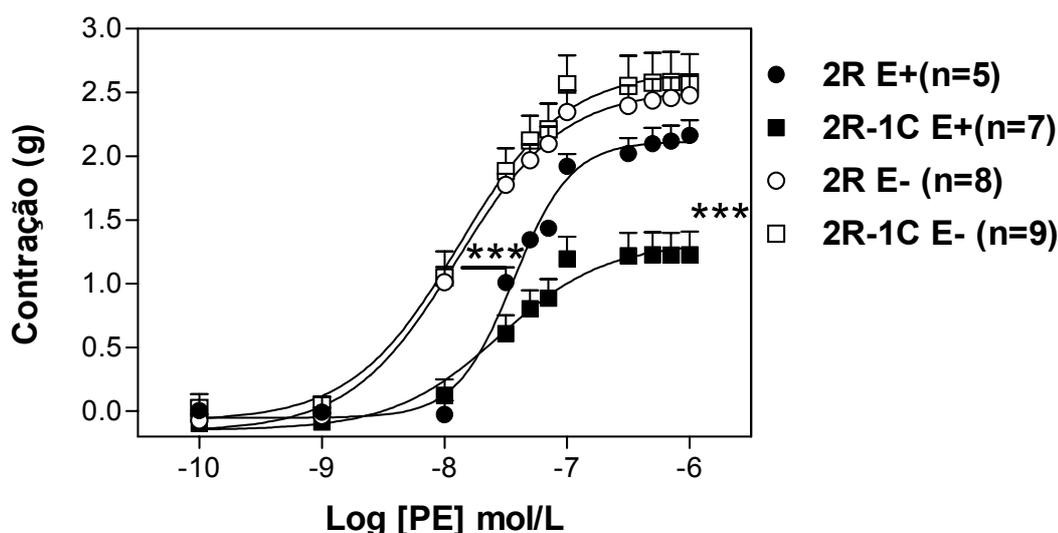


Fig. 5. Contração induzida com fenilefrina (PE) em aortas com (E+) ou sem endotélio (E-), isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C). Os resultados foram expressos em gramas de tensão. Os pontos representam a média de contração vascular \pm EPM em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. ***Representa diferença de E_{max} entre 2R-1C E+ e 2R E+; de E_{max} entre 2R-1C E+ e 2R-1C E-; diferença de valores de pD_2 entre aortas E+ e E- ($p < 0,001$).

5.5 Relaxamento vascular induzido pelo doador de óxido nítrico, AuNPs-{Ru-4PySH}_n, em aorta de ratos normotensos e hipertensos

O composto AuNPs-{Ru-4PySH}_n induziu relaxamento de forma dependente da concentração em aortas de 2R e 2R-1C, com ou sem endotélio. Como pode ser visto na figura 6, em aortas sem endotélio, o relaxamento máximo induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}_n não foi diferente entre 2R e 2R-1C. Porém, a potência do composto foi maior em 2R-1C (2R-1C/E- Emax: 110,9±6,3%; pD₂: 6,29±0,04; n=4; p<0,001) do que em 2R (2R/E- Emax: 99,1±1,0%; pD₂: 6,10±0,04; n=4).

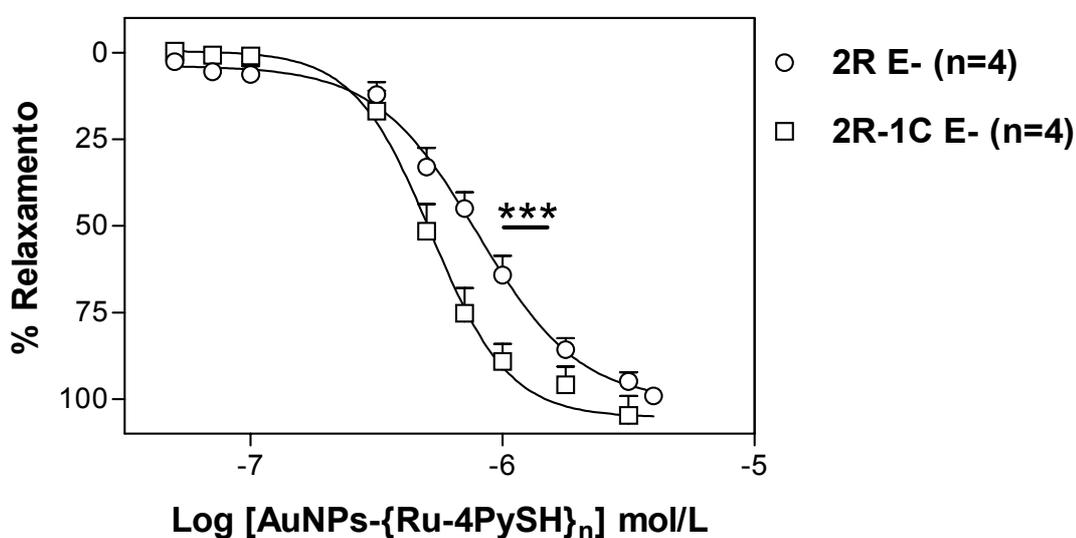


Fig. 6. Relaxamento induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}_n em aortas, sem endotélio (E-) e pré-contraídas com fenilefrina, isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C). Os pontos representam a média ± EPM dos relaxamentos obtidos em 4 preparações isoladas de diferentes ratos. *** Representa diferença de pD₂ em relação ao controle normotenso (p<0,001).

5.6 Participação do endotélio no relaxamento vascular induzido pelo doador de óxido nítrico, AuNPs-{Ru-4PySH}_n, em aorta de ratos normotensos e hipertensos

Observa-se na figura 7 que em aortas de ratos 2R com endotélio, a potência do composto AuNPs-{Ru-4PySH}_n (2R/E+ Emax: 97,4±2,9%; pD₂: 6,24±0,02; n=4; p<0,05) foi maior do que em aortas sem endotélio (2R/E- Emax: 99,1±1,0%; pD₂: 6,10±0,04; n= 4). Porém, como mostra a Fig. 8, a presença do endotélio não alterou o efeito de relaxamento vascular induzido pelo composto em aorta de 2R-1C.

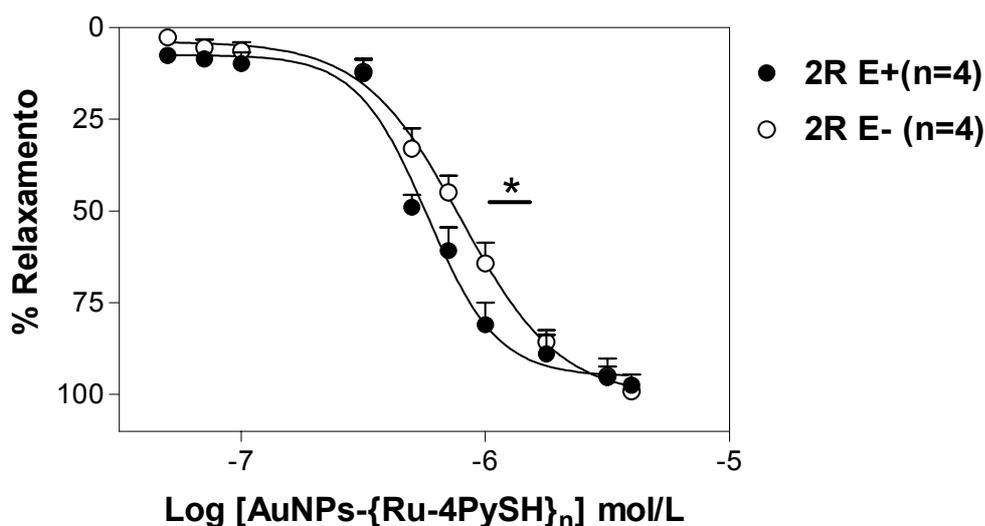


Fig. 7. Relaxamento induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}_n em aortas, com (E+) ou sem endotélio (E-) pré-contraídas com fenilefrina, isoladas de ratos normotensos (2R). Os pontos representam a média ± EPM dos relaxamentos obtidos em 4 preparações isoladas de diferentes ratos. * Representa diferença de pD₂ em relação a preparações com endotélio intacto (p<0,05).

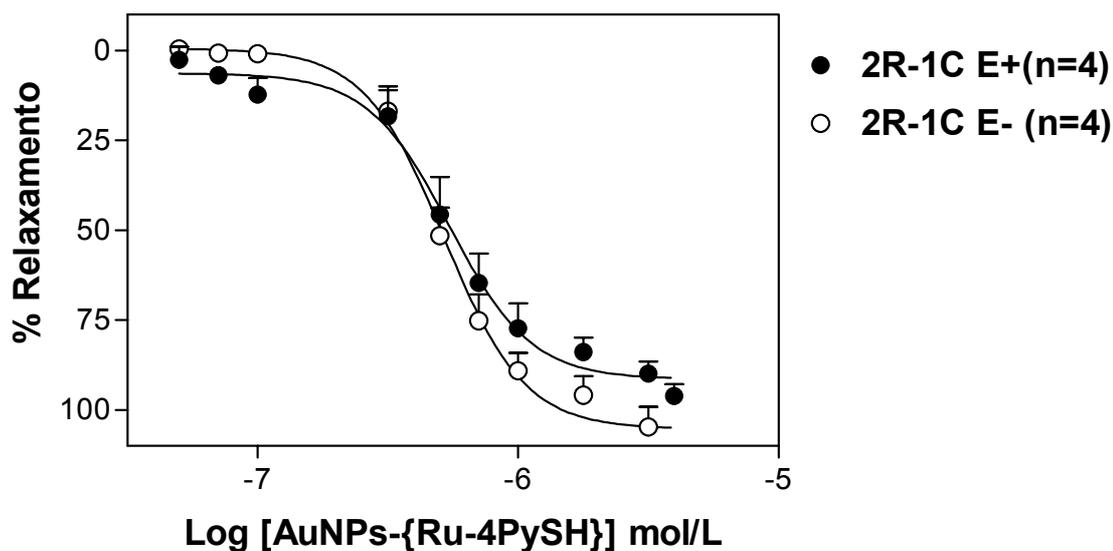


Fig. 8. Relaxamento vascular induzido pelo composto $\text{AuNPs}\{-\text{Ru-4PySH}\}_n$ em aortas isoladas de ratos hipertensos (2R-1C) com (E+) ou sem endotélio (E-), contraídas com fenilefrina. Os pontos representam a média \pm EPM obtidos em 4 preparações isoladas de diferentes ratos.

5.7 Avaliação do estresse oxidativo sistêmico e produção de espécies reativas de oxigênio em aortas de ratos normotensos e hipertensos

Nossos resultados indicam que ocorre estresse oxidativo sistêmico de maior intensidade em ratos 2R-1C ($11,1 \pm 1,2$ nmol/L; $n=8$; $p<0,05$) do que em 2R ($8,0 \pm 0,6$ nmol/L; $n=9$) (Fig. 9). Avaliamos o estresse oxidativo com a sonda fluorescente DHE sensível a EROs, em aortas isoladas de ratos 2R e 2R-1C, com ou sem endotélio, em condição basal. Nessas condições, avaliamos também o papel dos agentes antioxidantes tiron 1 mmol/L e Peg Catalase 300 U/mL (Fig. 10).

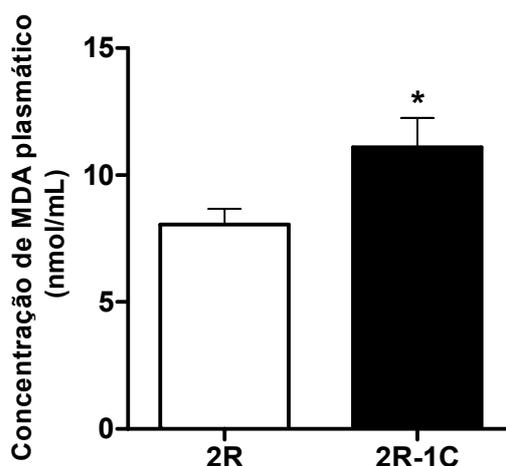
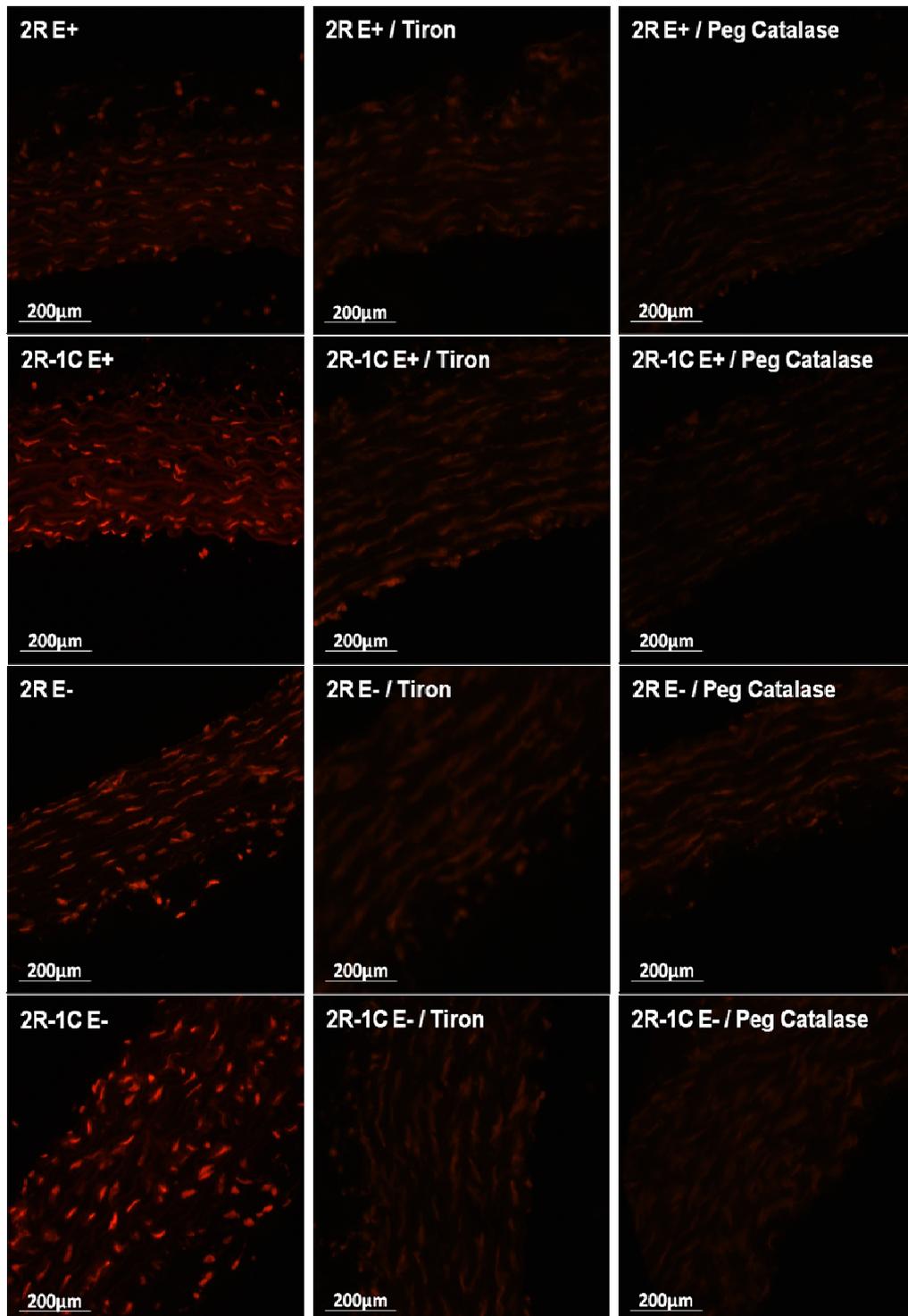


Fig. 9. Medida indireta da concentração de EROs com ácido tiobarbitúrico (TBARS), pela formação do produto malonaldeído (MDA), em plasma de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C). As barras representam a média da concentração \pm EPM para $n=8-9$ preparações isoladas de diferentes ratos. *Representa diferença entre 2R-1C e 2R ($p<0,05$).

Na Fig. 10A encontram-se as fotomicrografias representativas das preparações analisadas e na Fig. 10B as quantificações dessas análises, representadas pela intensidade de fluorescência emitida pela sonda DHE. Verificamos que aortas de ratos 2R-1C com endotélio (IFE+: $14,30 \pm 0,85$; $n=3$; $p<0,001$) ou sem endotélio (IFE-: $14,83 \pm 0,27$; $n=3$; $p<0,001$), apresentam maior concentração tecidual de EROs do que de ratos 2R (IFE+: $9,26 \pm 0,91$; $n=4$; IFE-: $9,35 \pm 0,33$; $n=3$). Entretanto, tanto o tiron como a Peg Catalase, reverteram a concentração de EROs em aortas de ratos 2R-1C para valores semelhantes aos encontrados em 2R.

A



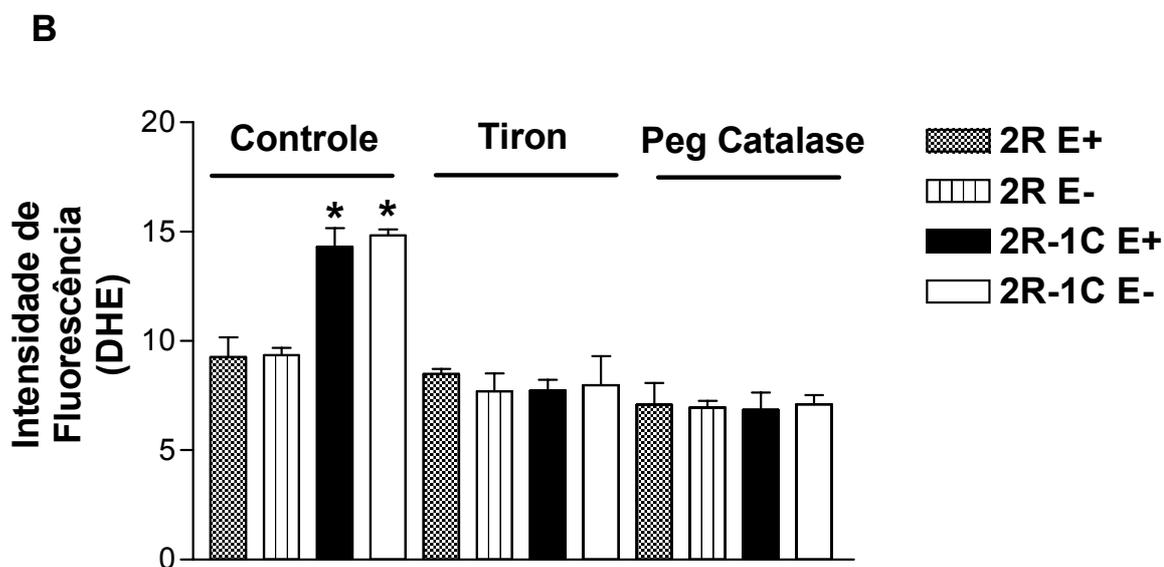


Fig. 10. (A) Fotomicrografias representativas de aortas de ratos normotensos (2R) ou hipertensos (2R-1C) na ausência (Controle) ou presença com agentes antioxidantes em presença de DHE que produz fluorescência vermelha quando oxidado por EROs. **(B)** Produção de EROs medida pela intensidade de fluorescência (IF) emitida pela sonda DHE em aortas de ratos normotensos (2R) ou hipertensos (2R-1C) com (E+) ou sem endotélio (E-), na ausência ou presença de Tiron 1 mmol/L ou Peg-Catalase 300 U/mL. As barras representam a média da IF \pm EPM (n=3-5). *Representa diferença entre 2R-1C e 2R ($p < 0,05$).

5.8 Efeitos da remoção do ânion superóxido e peróxido de hidrogênio sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina e vasodilatadora induzida por AuNPs-{Ru-4PySH}_n

5.8.1 Participação do ânion superóxido na contração induzida com fenilefrina em aorta de ratos normotensos e hipertensos, com ou sem endotélio

Curvas concentração-efeito foram construídas para fenilefrina em valores absolutos de contração (g), em aortas de ratos 2R e 2R-1C, com e sem endotélio. Avaliamos como o ânion superóxido poderia contribuir para a resposta contrátil à fenilefrina. Após incubação com o sequestrador de ânion superóxido, tiron 0,1 ou 1 mmol/L por 30 min, as preparações foram estimuladas com concentrações crescentes e cumulativas de fenilefrina até atingir o efeito contrátil máximo.

Verificamos que o tiron, 0,1 ou 1 mmol/L não alterou na resposta contrátil à fenilefrina em aortas de 2R com endotélio (Fig. 11).

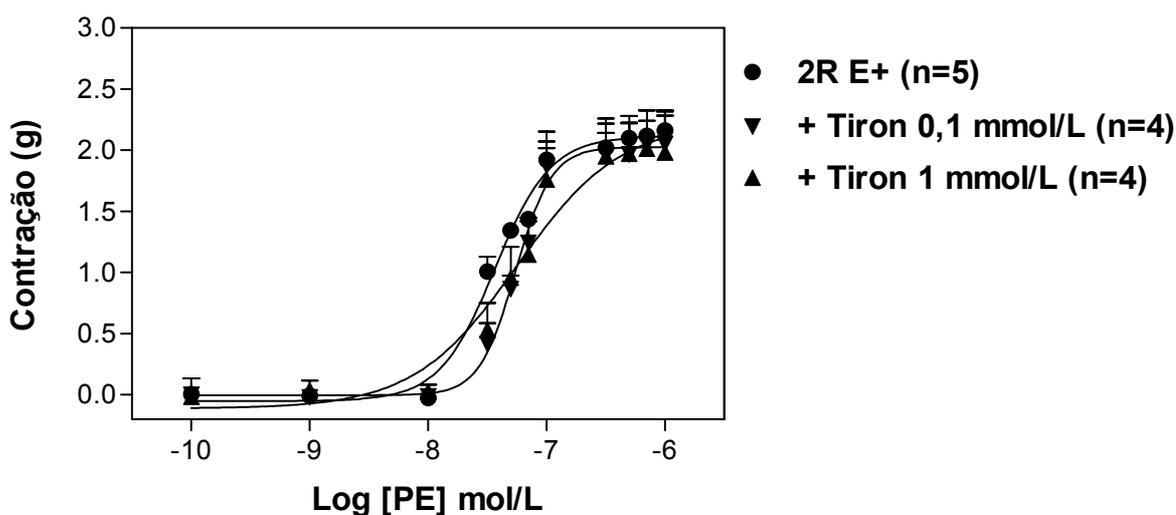


Fig. 11. Contração induzida com fenilefrina (PE) em aortas de ratos normotensos (2R) com endotélio (E+), em ausência ou presença de Tiron nas concentrações de 0,1 ou 1 mmol/L. Os pontos representam a média de contração vascular \pm EPM em “n” preparações isoladas de diferentes ratos.

Por outro lado, o tiron reduziu a resposta contrátil (g) em 2R, sem endotélio. Nota-se que a redução da resposta contrátil ocorre de forma dependente da concentração de tiron (Fig. 12 e Tab. 1).

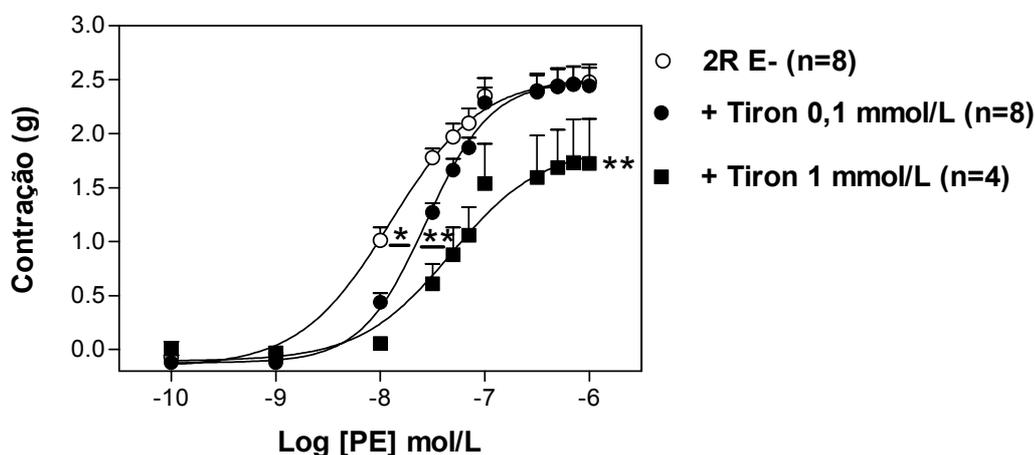


Fig. 12. Efeito do Tiron sobre a contração (g) induzida com fenilefrina (PE) em aortas sem endotélio (E-), isoladas de ratos normotensos (2R) em ausência ou presença de Tiron, nas concentrações de 0,1 ou 1 mmol/L. Os pontos representam a média \pm EPM em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. *Representa diferença de pD_2 em relação ao controle na ausência de Tiron ($p < 0,05$). **Representa diferença de E_{max} e pD_2 em relação ao controle ($p < 0,01$).

Tabela 1. Valores de E_{max} e pD_2 obtidos na contração induzida com fenilefrina (PE) em aortas com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-), isoladas de ratos normotensos (2R), em ausência ou presença de Tiron 0,1 ou 1 mmol/L.

| Aorta/ Endotélio | Agente contrátil / Incubação | $E_{max} \pm EPM$ (g) | pD_2 | n |
|------------------|------------------------------|-----------------------|-------------------|---|
| 2R / E+ | PE | $2,2 \pm 0,1$ | $7,44 \pm 0,03$ | 5 |
| 2R / E+ | PE / Tiron 0,1 mmol/L | $2,1 \pm 0,3$ | $7,30 \pm 0,04$ | 4 |
| 2R / E+ | PE / Tiron 1 mmol/L | $2,0 \pm 0,3$ | $7,26 \pm 0,06$ | 4 |
| 2R / E- | PE | $2,5 \pm 0,2$ | $7,93 \pm 0,10$ | 8 |
| 2R / E- | PE / Tiron 0,1 mmol/L | $2,4 \pm 0,2$ | $7,60 \pm 0,06$ * | 8 |
| 2R / E- | PE / Tiron 1 mmol/L | $1,7 \pm 0,4$ * | $7,32 \pm 0,04$ * | 4 |

Os valores representam o efeito contrátil máximo (E_{max}) \pm EPM expresso em gramas (g) e pD_2 ($-\log EC_{50}$) obtidos em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. *Representa diferença significativa ($p < 0,001$) em relação à aorta de ratos normotensos E-, na ausência de Tiron.

Assim como em aortas de 2R, aortas de 2R-1C com e sem endotélio, foram pré-incubadas com tiron nas concentrações de 0,1 e 1 mmol/L para avaliar a participação do ânion superóxido. Assim como os resultados obtidos com 2R, o tiron não alterou a resposta contrátil à fenilefrina em aortas de 2R-1C com endotélio (Fig. 13 e Tab. 2). Ao contrário dos resultados demonstrados com aortas de 2R, em aortas de 2R-1 E-, a resposta contrátil a fenilefrina não foi alterada pelo tiron (Fig. 14 e Tab. 2), ou seja, independentemente da presença do endotélio, a remoção do ânion superóxido não modifica a contração induzida com fenilefrina em aorta de 2R-1C.

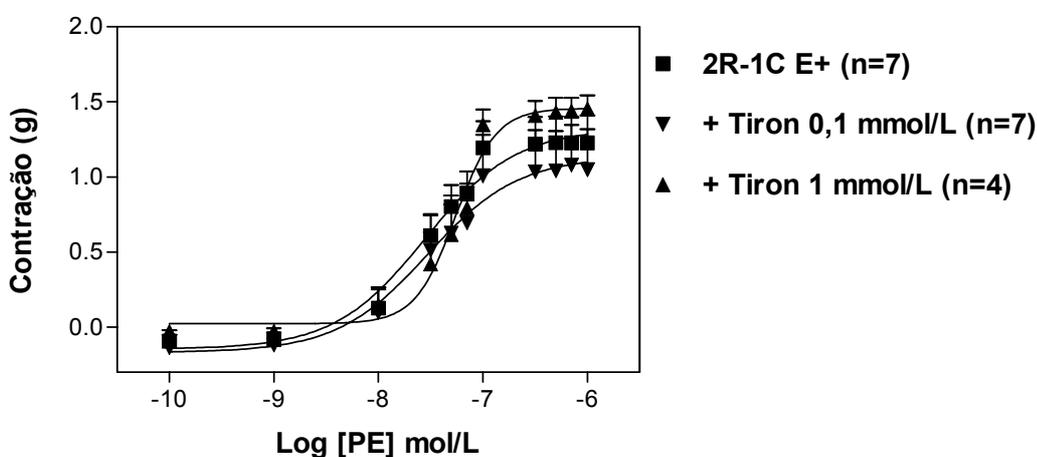


Fig. 13. Efeito do Tiron sobre a contração (g) induzida com fenilefrina (PE) em aortas com endotélio (E+) isoladas de ratos normotensos (2R), em ausência ou presença de sequestrador de ânion superóxido Tiron nas concentrações de 0,1 ou 1 mmol/L. Os pontos representam a média \pm EPM em “n” preparações isoladas de diferentes ratos.

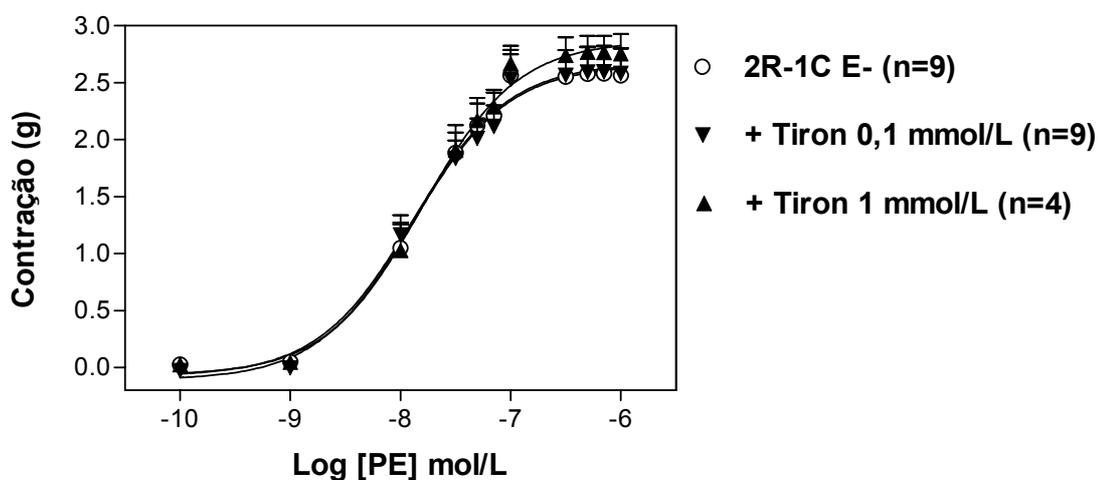


Fig. 14. Efeito do Tiron sobre a contração (g) induzida com fenilefrina (PE) em aortas sem endotélio (E-), isoladas de ratos hipertensos (2R-1C), em ausência ou presença de Tiron, nas concentrações de 0,1 ou 1 mmol/L. Os pontos representam a média \pm EPM em “n” preparações isoladas de diferentes ratos.

Tabela 2. Valores de E_{max} e pD_2 obtidos na contração induzida com fenilefrina (PE) em aortas com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-), isoladas de ratos hipertensos (2R-1C) em ausência ou presença de Tiron, nas concentrações de 0,1 ou 1 mmol/L.

| Aorta/ Endotélio | Agente contrátil / Incubação | $E_{max} \pm EPM$ (g) | pD_2 | n |
|------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------|---|
| 2R-1C / E+ | PE | 1,2 \pm 0,2 | 7,54 \pm 0,06 | 7 |
| 2R-1C / E+ | PE / Tiron 0,1 mmol/L | 1,0 \pm 0,3 | 7,50 \pm 0,08 | 7 |
| 2R-1C / E+ | PE / Tiron 1 mmol/L | 1,4 \pm 0,1 | 7,32 \pm 0,11 | 4 |
| 2R-1C / E- | PE | 2,6 \pm 0,2 | 7,89 \pm 0,08 | 9 |
| 2R-1C / E- | PE / Tiron 0,1 mmol/L | 2,6 \pm 0,2 | 7,91 \pm 0,06 | 9 |
| 2R-1C / E- | PE / Tiron 1 mmol/L | 2,7 \pm 0,2 | 7,81 \pm 0,10 | 4 |

Os valores representam o efeito contrátil máximo (E_{max}) \pm erro padrão da média (EPM) expresso em gramas (g) e pD_2 ($-\log EC_{50}$) obtidos em “n” preparações isoladas de diferentes ratos.

5.8.2 Participação do peróxido de hidrogênio na contração vascular induzida por fenilefrina em aorta de ratos normotensos e hipertensos, com ou sem endotélio

Dentre as EROs, além do O_2^- , encontra-se também o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ambas as formas de EROs apresentam estreita relação. O O_2^- é substrato para a enzima superóxido dismutase (SOD), que catalisa a conversão de O_2^- a H_2O_2 . A princípio, uma maior produção de O_2^- resultaria em maior conversão a H_2O_2 , que se acumularia caso não houvesse catalase suficiente e ativa para catalisar a degradação de H_2O_2 em água e oxigênio molecular.

Nesse contexto, avaliamos se o H_2O_2 poderia participar da resposta contrátil à fenilefrina em aortas de 2R e 2R-1C, com ou sem endotélio. Aortas foram incubadas por 30 min com Catalase (Cat) nas concentrações de 30 U/mL, 90 U/mL, 150 U/mL e 300 U/mL para promover a catálise do H_2O_2 . Em seguida, as preparações foram estimuladas com concentrações crescentes e cumulativas de fenilefrina para verificarmos o efeito contrátil.

Como demonstramos nas Figs. 15 e 16 e na Tab. 3, em aortas de 2R com endotélio, a catalase não alterou a resposta contrátil à fenilefrina em nenhuma das concentrações utilizadas. Embora em aortas de 2R sem endotélio, pareça haver uma tendência de alteração da contração máxima induzida com fenilefrina (Fig. 16), essa diferença não é significativa (Fig. 17).

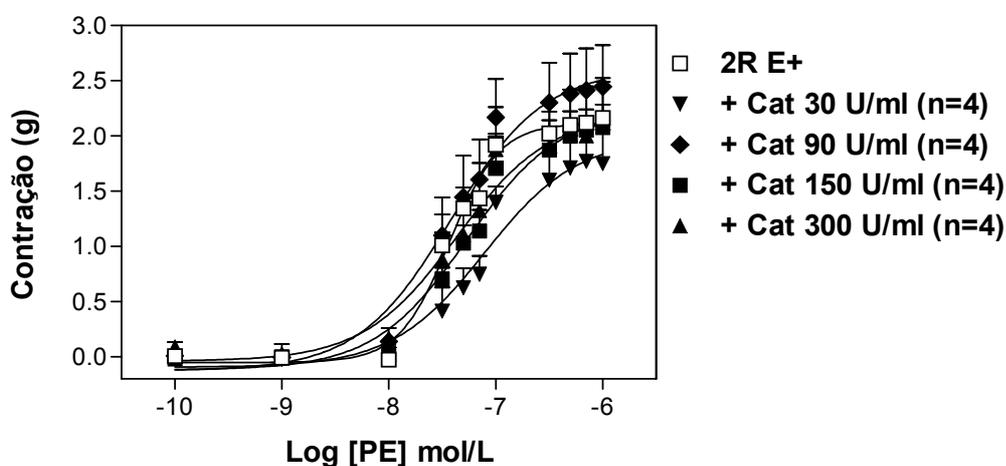


Fig. 15. Efeito da catalase sobre a contração (g) induzida com fenilefrina (PE) em aortas com endotélio (E+), isoladas de ratos normotensos (2R). As contrações foram realizadas na ausência (2R E+) ou presença de catalase (Cat), nas concentrações de 30, 90, 150 e 300 U/ml. Os pontos representam a média \pm EPM em "n" preparações isoladas de diferentes ratos.

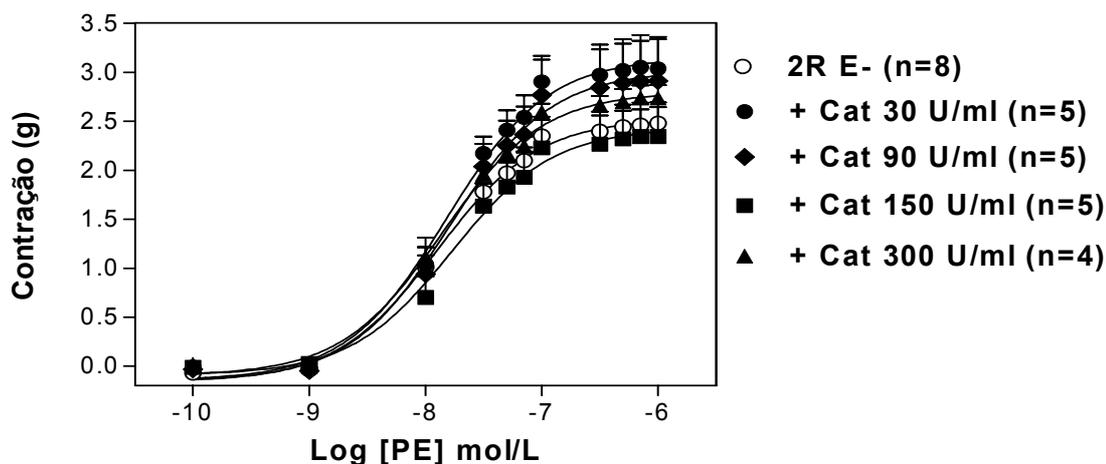


Fig. 16. Efeito da catalase sobre a contração (g) induzida com fenilefrina (PE) em aortas sem endotélio (E-), isoladas de ratos normotensos (2R). As contrações foram realizadas na ausência (2R E-) ou presença de catalase (Cat), nas concentrações de 30, 90, 150 e 300 U/ml. Os pontos representam a média \pm EPM em "n" preparações isoladas de diferentes ratos.

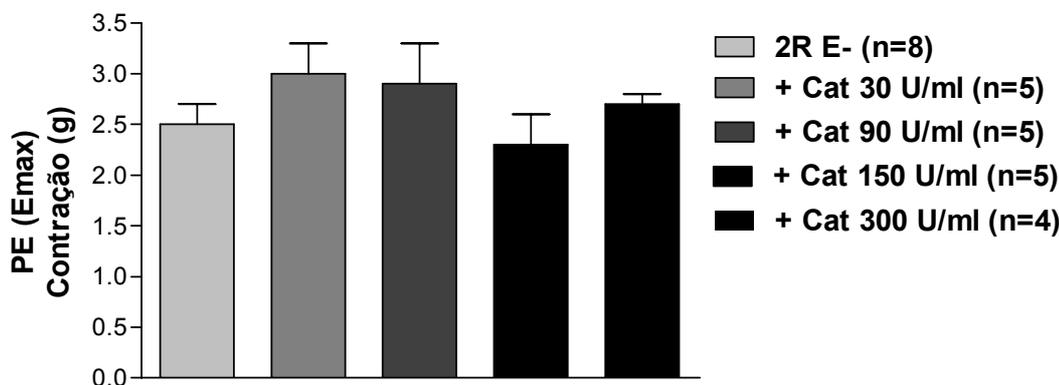


Fig. 17. Efeito da catalase sobre a contração (g) induzida com fenilefrina (PE) em aortas sem endotélio intacto (E-), isoladas de ratos normotensos (2R). As contrações foram realizadas na ausência (2R E-) ou presença de catalase (Cat), nas concentrações de 30, 90, 150 e 300 U/ml. As barras representam a média \pm EPM em "n" preparações isoladas de diferentes ratos.

Em aortas de ratos 2R, com ou sem endotélio, não verificamos a participação de H_2O_2 . Porém, em aortas de 2R-1C, com ou sem endotélio, o H_2O_2 parece promover um efeito vasodilatador ou contrátil que depende da sua concentração.

Tabela 3. Valores de Emax e pD₂ obtidos na contração induzida com fenilefrina (PE) em aortas com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-), isoladas de ratos normotensos (2R), em ausência ou presença de diferentes concentrações de catalase.

| Aorta/ Endotélio | Agente contrátil / Incubação | Emax ± EPM (g) | pD ₂ | n |
|------------------|------------------------------|----------------|-----------------|---|
| 2R / E+ | PE | 2,2 ± 0,1 | 7,44 ± 0,03 | 5 |
| 2R/ E+ | PE/ Catalase 30 U/ml | 1,7 ± 0,3 | 7,25 ± 0,11 | 4 |
| 2R/ E+ | PE/ Catalase 90 U/ml | 2,4 ± 0,4 | 7,40 ± 0,10 | 4 |
| 2R/ E+ | PE/ Catalase 150 U/ml | 2,1 ± 0,4 | 7,30 ± 0,06 | 4 |
| 2R/ E+ | PE/ Catalase 300 U/ml | 2,1 ± 0,4 | 7,34 ± 0,08 | 4 |
| 2R/ E- | PE | 2,5 ± 0,2 | 7,93 ± 0,10 | 8 |
| 2R/ E- | PE/ Catalase 30 U/ml | 3,0 ± 0,3 | 7,84 ± 0,09 | 5 |
| 2R/ E- | PE/ Catalase 90 U/ml | 2,9 ± 0,4 | 7,84 ± 0,10 | 5 |
| 2R/ E- | PE/ Catalase 150 U/ml | 2,3 ± 0,3 | 7,80 ± 0,07 | 5 |
| 2R/ E- | PE/ Catalase 300 U/ml | 2,7 ± 0,1 | 7,87 ± 0,08 | 4 |

Os valores representam o efeito contrátil máximo (Emax) ± erro padrão da média (EPM) expresso em gramas (g) e pD₂ (-logEC₅₀) obtidos em “n” preparações isoladas de diferentes ratos.

Como pode ser observado na Fig. 18 e Tab. 4, em aortas de 2R-1C com endotélio, a catálise de H₂O₂ pela catalase, nas concentrações de 30, 90 e 150 U/mL, promoveu aumento da contração máxima induzida com fenilefrina. No entanto, a concentração de 300U/mL não alterou a resposta à fenilefrina.

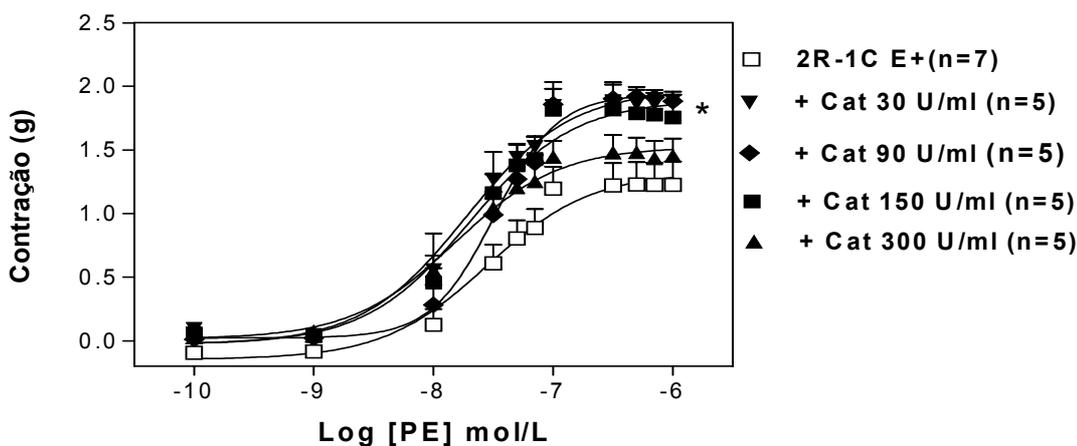


Fig. 18. Efeito da catalase sobre a contração (g) induzida com fenilefrina (PE) em aortas com endotélio (E+), isoladas de ratos hipertensos (2R-1C). As contrações foram realizadas na ausência (2R-1C E+) ou presença de catalase (Cat), nas concentrações de 30, 90, 150 e 300 U/mL. Os pontos representam a média \pm EPM em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. (*) Representa diferença de E_{max} em relação ao controle hipertenso com endotélio na ausência de catalase ($p < 0,001$).

Por outro lado, como pode ser observado na Fig. 19 e Tab. 4, em aortas de 2R-1C sem endotélio, a catálise de H_2O_2 pela catalase, em todas as concentrações utilizadas, promoveu uma diminuição na contração máxima induzida com fenilefrina.

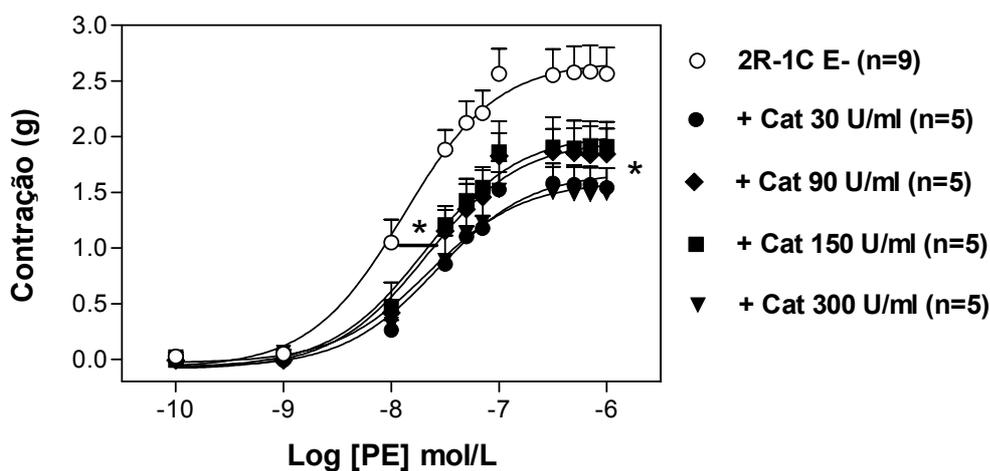


Fig. 19. Efeito da catalase sobre a contração (g) induzida com fenilefrina (PE) em aortas sem endotélio (E-), isoladas de ratos hipertensos (2R-1C). As contrações foram realizadas na ausência (2R-1C E-) ou presença de catalase (Cat), nas concentrações de 30, 90, 150 e 300 U/mL. Os pontos representam a média \pm EPM em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. (*) Representa diferença de E_{max} e pD_2 em relação ao controle hipertenso sem endotélio na ausência de catalase ($p < 0,001$).

Tabela 4. Valores de Emax e pD_2 obtidos na contração vascular induzida com fenilefrina (PE) em aortas com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-), isoladas de ratos hipertensos (2R-1C), em ausência ou presença de diferentes concentrações de catalase.

| Aorta/ Endotélio | Agente contrátil / Incubação | Emax \pm EPM (g) | pD_2 | N |
|------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------|---|
| 2R-1C/ E+ | PE | 1,2 \pm 0,2 | 7,54 \pm 0,06 | 7 |
| 2R-1C/ E+ | PE/ Catalase 30 U/ml | 1,9 \pm 0,1* | 7,71 \pm 0,14 | 5 |
| 2R-1C/ E+ | PE/ Catalase 90 U/ml | 1,9 \pm 0,1* | 7,52 \pm 0,09 | 5 |
| 2R-1C/ E+ | PE/ Catalase 150 U/ml | 1,75 \pm 0,2* | 7,67 \pm 0,07 | 5 |
| 2R-1C/ E+ | PE/ Catalase 300 U/ml | 1,4 \pm 0,2 | 7,78 \pm 0,07 | 5 |
| 2R-1C/ E- | PE | 2,6 \pm 0,2 | 7,89 \pm 0,08 | 9 |
| 2R-1C/ E- | PE/ Catalase 30 U/ml | 1,5 \pm 0,2 [#] | 7,54 \pm 0,03** | 5 |
| 2R-1C/ E- | PE/ Catalase 90 U/ml | 1,8 \pm 0,3 [#] | 7,64 \pm 0,12** | 5 |
| 2R-1C/ E- | PE / Catalase 150 U/ml | 1,9 \pm 0,2 [#] | 7,64 \pm 0,03** | 5 |
| 2R-1C/ E- | PE/ Catalase 300 U/ml | 1,5 \pm 0,2 [#] | 7,58 \pm 0,07** | 5 |

Os valores representam o efeito contrátil máximo (Emax) \pm EPM expresso em gramas (g) e pD_2 (-logEC₅₀) obtidos em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. *Representa diferença de Emax e pD_2 em relação ao controle 2R-1C/E+, na ausência de catalase ($p < 0,001$). [#]Representa diferença de Emax e pD_2 em relação ao controle 2R-1C/E- na ausência de catalase ($p < 0,001$).

5.8.3 Avaliação da produção de EROs estimulada por fenilefrina em aortas ou células endoteliais isoladas de aortas de ratos normotensos e hipertensos

Em células endoteliais de ratos 2R, a PE não alterou a IF a EROs em relação ao basal (Fig. 20 e Tab. 5). Apenas a Peg-Catalase 3000 U/mL ou sua associação com o Tiron 1 mmol/L foram capazes de reduzir a IF da sonda DHE. Porém, surpreendentemente, a PE aumentou intensamente a IF para sonda DHE em células

endoteliais de 2R-1C e todos os agentes antioxidantes empregados reverteram o aumento da IF promovido pela PE (Fig. 21 e Tab. 5).

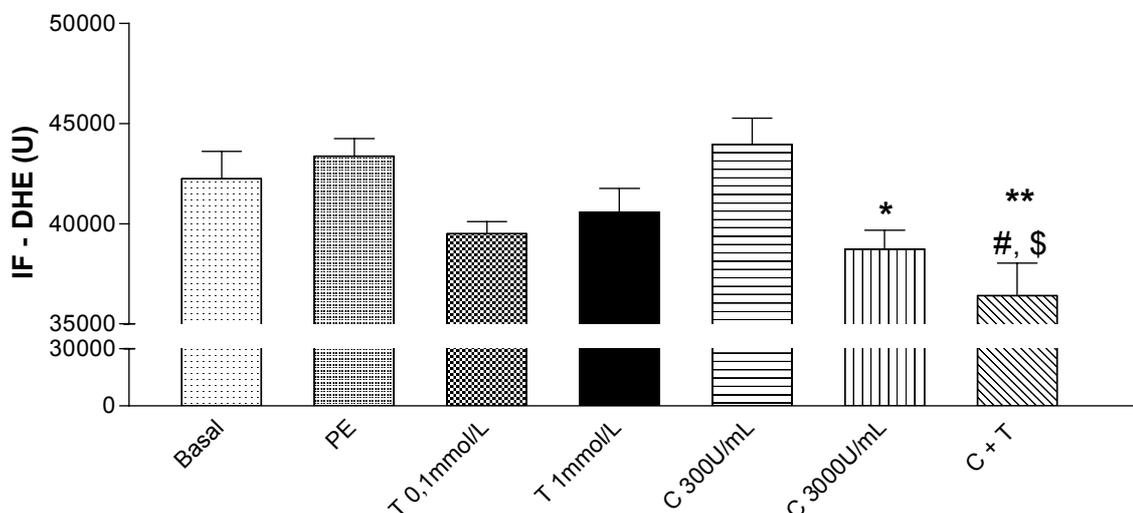


Fig. 20. Efeitos da catalase e tiron sobre a produção de EROs em células endoteliais isoladas de ratos 2R, na ausência (Basal) ou presença de fenilefrina (PE 0,1 $\mu\text{mol/L}$), ou PE e Tiron (T) 0,1 e 1 mmol/L, PE e Peg-Catalase (C) 300 e 3000 U/mL ou PE e a associação de Catalase 3000 U/mL e Tiron 1mmol/L (C+T). As barras representam a média das medianas da intensidade de fluorescência das células com marcação positiva (P3) para a sonda fluorescente DHE \pm EPM em 3 grupos de células endoteliais isoladas de aortas de diferentes ratos. *diferença em relação a Catalase 300U ($p < 0,05$). **diferença em relação à Catalase 300 U ($p < 0,01$). #diferença em relação à PE ($p < 0,01$). \$Representa diferença em relação ao Basal ($p < 0,05$).

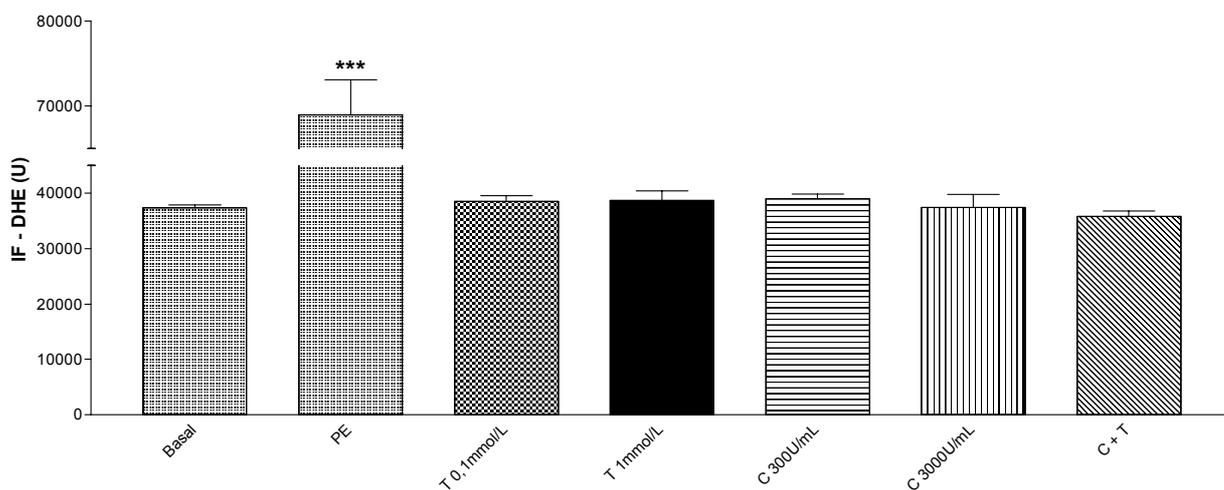


Fig. 21. Efeitos da catalase e tiron sobre a produção de EROs em células endoteliais isoladas de ratos 2R-1C, na ausência (Basal) ou presença de fenilefrina (PE 0,1 $\mu\text{mol/L}$) ou PE e Tiron (T) 0,1 e 1 mmol/L, PE e Peg-Catalase (C) 300 e 3000 U/mL, ou PE mais a associação de Catalase 3000 U/mL e Tiron 1 mmol/L (C+T). As barras representam a média das medianas da intensidade de fluorescência das células com marcação positiva (P3) para a sonda fluorescente DHE \pm EPM em 4 grupos de células endoteliais isoladas de aortas de diferentes ratos. ***diferença em relação ao basal ($p < 0,001$)

Tabela 5. Valores de Intensidade de fluorescência (IF) emitida pela sonda DHE em células endoteliais de aorta de ratos 2R ou 2R-1C, na ausência (Basal) ou na presença de PE, PE e Tiron 0,1 ou 1 mmol/L, PE e Peg-Catalase (Cat) 300 ou 3000 U/mL ou PE e associação de Catalase 3000 U/mL e Tiron 1mmol/L.

| Células isoladas de ratos | Incubação | IF ± EPM | n |
|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------|----------|
| 2R | Basal | 42240,2 ± 1381,1 | 4 |
| 2R | PE | 43388,5 ± 869,8 | 4 |
| 2R | PE/ Tiron 0,1 mmol/L | 39512,7 ± 585,3 | 4 |
| 2R | PE/ Tiron 1 mmol/L | 40560,2 ± 1214,9 | 4 |
| 2R | PE/ Cat 300 U/mL | 43959,3 ± 1316,3 | 4 |
| 2R | PE/ Cat 3000 U/mL | 38743,5 ± 947,1 * | 4 |
| 2R | PE/ Tiron 1 mmol/L/Cat 3000U/mL | 36424 ± 1623,4 **#\$ | 4 |
| 2R-1C | Basal | 37373,0 ± 536,2 | 4 |
| 2R-1C | PE | 68911,5 ± 4146,6*** | 4 |
| 2R-1C | PE/ Tiron 0,1mmol/L | 38487,0 ± 1005,6 | 4 |
| 2R-1C | PE / Tiron 1mmol/L | 38670,3 ± 1737,4 | 4 |
| 2R-1C | PE/ Cat 300 U/mL | 38910,5 ± 997,8 | 4 |
| 2R-1C | PE/ Cat 3000 U/mL | 37456,5 ± 2636,1 | 4 |
| 2R-1C | PE/ Tiron 1 mmol/L /Cat 3000 U/mL | 35827,3 ± 1002,2 | 4 |

Os valores representam IF para a sonda fluorescente DHE ± EPM obtidos em “n” preparações isoladas de diferentes ratos. *Representa diferença em relação à Peg-Catalase 300 U/mL ($p < 0,05$). **diferença em relação à Peg-Catalase 300 U/mL em 2R ($p < 0,01$). ***diferença em relação ao Basal em 2R-1C ($p < 0,001$). #diferença em relação à PE em 2R ($p < 0,01$). \$diferença em relação ao Basal em 2R ($p < 0,05$).

Utilizando o kit Amplex Red, específico para detecção de H_2O_2 , medimos a concentração de H_2O_2 em aortas de ratos 2R e 2R-1C E+/E-, em condição basal (sem tensão) e após estimulação com fenilefrina em banho para órgãos isolados sob tensão de 1,5 grama. Verificamos que a produção de H_2O_2 em aortas E+ foi semelhante entre ratos 2R ($1,47 \pm 0,21 \mu\text{mol/L}$; $n=5$) e 2R-1C ($1,71 \pm 0,51 \mu\text{mol/L}$; $n=5$) e maior que em aortas E- (2R: $0,90 \pm 0,25 \mu\text{mol/L}$; $n=5$; $p<0,05$ e 2R-1C: $0,71 \pm 0,07 \mu\text{mol/L}$; $n=5$; $p<0,05$) (Fig. 22). Por outro lado, comparando a condição basal em aortas E+, o estímulo com PE reduziu a concentração de H_2O_2 apenas em ratos 2R, sem alterar a concentração de H_2O_2 em ratos 2R-1C (2R E+/PE: $0,89 \pm 0,07 \mu\text{mol/L}$; $n=5$; $p<0,05$ e 2R-1C E+/PE: $2,00 \pm 0,36 \mu\text{mol/L}$; $n=5$). Em aortas E-, o estímulo com PE aumentou a produção de H_2O_2 apenas em aortas de ratos 2R-1C (2R: $0,60 \pm 0,12 \mu\text{mol/L}$; $n=5$ e 2R-1C: $1,27 \pm 0,16 \mu\text{mol/L}$; $n=5$; $p<0,05$).

Com base nos resultados até então obtidos, propusemos determinar a fonte de produção do H_2O_2 em aortas de ratos 2R e 2R-1C com endotélio pela inibição das enzimas NO-Sintase (NOS), Ciclooxygenase (COX), NADPH Oxidase, Xantina Oxidase e Superóxido Dismutase (SOD), geralmente associadas à produção de EROs. Nossos resultados evidenciam que em aorta de ratos 2R com endotélio, sem tensão e sem estímulo, a inibição dessas enzimas não reduz a produção de H_2O_2 ($0,66 \pm 0,30 \mu\text{mol/L}$; $n=7$) (Fig. 23A). Por outro lado, sob tensão e estímulo com PE, a aumentada produção de H_2O_2 em aorta de 2R-1C E+ ($3,12 \pm 0,43 \mu\text{mol/L}$; $n=6$; $p<0,001$) comparada a 2R E+ é reduzida com a inibição das enzimas COX com ibuprofeno ($10 \mu\text{mol/L}$) ($1,17 \pm 0,17 \mu\text{mol/L}$; $n=5$; $p<0,01$), NADPH Oxidase com apocinina ($100 \mu\text{mol/L}$) ($1,25 \pm 0,27 \mu\text{mol/L}$; $n=6$; $p<0,01$), Xantina Oxidase com alopurinol ($100 \mu\text{mol/L}$) ($0,30 \pm 0,06 \mu\text{mol/L}$; $n=5$; $p<0,001$) e SOD com DDC ($10 \mu\text{mol/L}$) ($1,55 \pm 0,43 \mu\text{mol/L}$; $n=6$; $p<0,05$) (Fig. 23B). Entretanto, a inibição da NO-

Sintase com L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$) ($2,56 \pm 0,52 \mu\text{mol/L}$; $n=6$) não teve efeito sobre a produção de H_2O_2 em aorta de ratos 2R-1C E+.

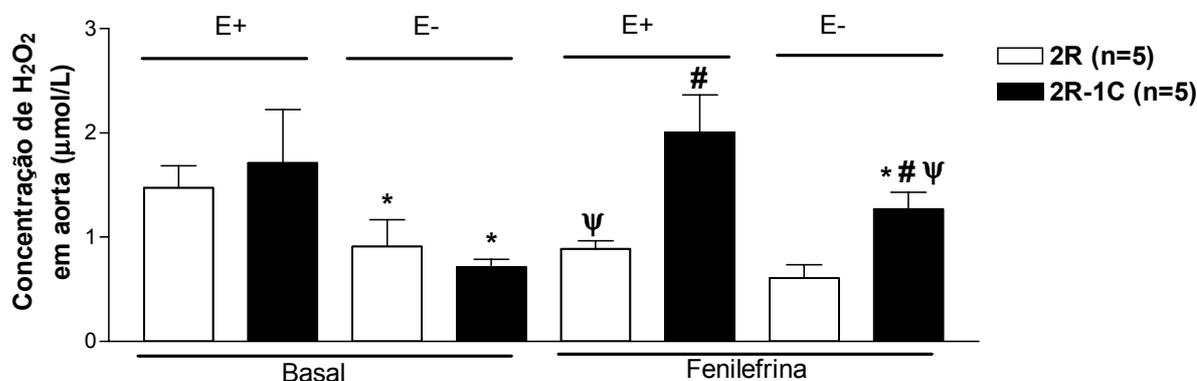


Fig. 22. Produção de H_2O_2 em aortas com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-) isoladas de ratos normotensos (2R) ou hipertensos (2R-1C), estimuladas ou não (basal) com fenilefrina (PE) em banho para órgãos isolados. As barras representam a média \pm EPM ($n=5$). * $p<0,05$ vs E+ basal. # $p<0,001$ vs 2R estimuladas com PE. Ψ $p<0,05$ Indica diferença entre 2R/E+/PE vs 2R/E+/basal ou 2R-1C/E-/PE vs 2R-1C/E-/basal.

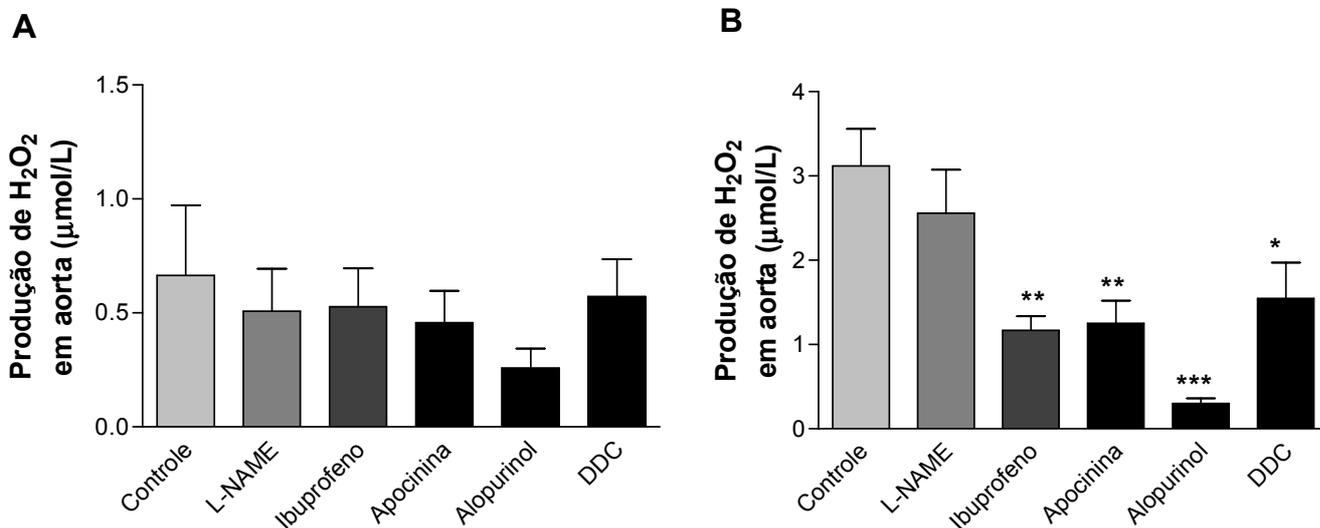


Fig. 23. Produção de H_2O_2 em aortas de ratos normotensos sem estímulo com fenilefrina (PE) (A) e hipertensos (2R-1C) estimuladas com PE $0,1 \mu\text{mol/L}$ (B) em ausência (controle) ou presença dos inibidores L-NAME $100 \mu\text{mol/L}$, Ibuprofeno $10 \mu\text{mol/L}$, Apocinina $100 \mu\text{mol/L}$, Alopurinol $100 \mu\text{mol/L}$ e DDC $10 \mu\text{mol/L}$ por 30 min. As barras representam a média \pm EPM ($n=4-7$). * $p<0,05$ vs controle. ** $p<0,01$ vs controle. *** $p<0,001$ vs controle.

5.8.4 Participação do ânion superóxido e peróxido de hidrogênio no relaxamento vascular induzido pelo doador de óxido nítrico AuNPs-{Ru-4PySH}_n em aortas de ratos normotensos e hipertensos, sem endotélio

Após avaliar a participação de O_2^- e H_2O_2 na resposta contrátil à fenilefrina em 2R e 2R-1C avaliamos também a participação destas EROs na resposta relaxante induzida pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}_n.

Para tal efeito, curvas concentração-efeito foram realizadas para o doador em aorta de ratos 2R e 2R-1C sem endotélio, contraídos com fenilefrina, em ausência e presença de seqüestrador de ânion superóxido Tiron, nas concentrações de 0,1 ou 1 mmol/L ou de Catalase 300 U/mL.

O O_2^- e H_2O_2 não modulam o relaxamento vascular induzido pelo composto doador de óxido nítrico AuNPs-{Ru-4PySH}_n em aortas de 2R, sem endotélio (Fig. 24 e Tab. 6). Por outro lado, os resultados apresentados na Fig. 25 e Tab. 6 sugerem que o H_2O_2 é a EROs responsável por modular o relaxamento induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}_n em aorta de 2R-1C sem endotélio. Estes dados indicam que a retirada do H_2O_2 diminui a potência do relaxamento vascular induzido pelo doador de NO em aorta de ratos 2R-1C.

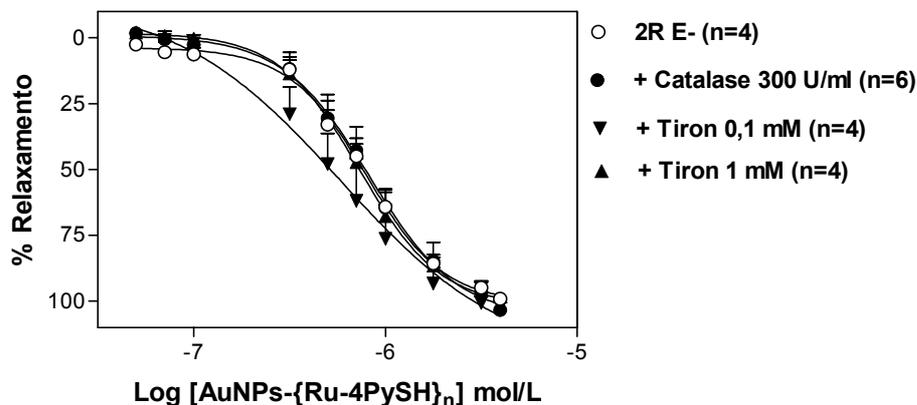


Fig. 24. Efeitos da catalase e Tiron sobre o relaxamento induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}_n em aortas, sem endotélio (E-), isoladas de ratos normotensos (2R), contraídas com fenilefrina em ausência ou presença de Catalase (Cat) 300 U/ml ou Tiron nas concentrações de 0,1 ou 1 mmol/L. Os pontos representam a média ± EPM de relaxamentos obtidos em “n” aortas isoladas de diferentes ratos.

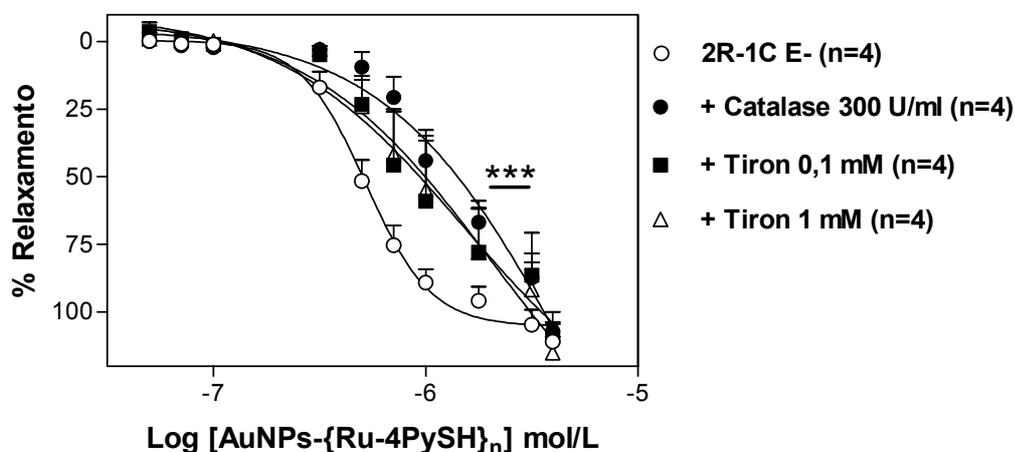


Fig. 25. Efeitos da catalase e Tiron sobre o relaxamento induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}_n em aortas, sem endotélio (E-), isoladas de ratos hipertensos (2R-1C), contraídas com fenilefrina em ausência ou presença de Catalase (Cat) 300 U/ml ou Tiron nas concentrações de 0,1 ou 1 mmol/L. Os pontos representam a média ± EPM de relaxamentos obtidos em “n” aortas isoladas de diferentes ratos. *** Representa diferença de pD₂ entre 2R-1C E- sem ou com catalase (p<0,001).

Tabela 6. Valores de E_{max} e pD_2 obtidos no relaxamento induzido pelo composto doador de óxido nítrico AuNPs- $\{Ru-4PySH\}_n$ em aortas sem endotélio (E-), isoladas de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C) em ausência ou presença de catalase ou de Tiron, nas concentrações de 0,1 e 1 mmol/L.

| Aorta/ Endotélio | Agente contrátil / Incubação | $E_{max} \pm EPM$ (%) | pD_2 | n |
|------------------|------------------------------|-----------------------|------------------|---|
| 2R/ E- | PE | 99,1 \pm 1,0 | 6,10 \pm 0,04 | 4 |
| 2R/ E- | PE/ Tiron 0,1 mmol/L | 102,2 \pm 2,0 | 6,23 \pm 0,12 | 4 |
| 2R/ E- | PE/ Tiron 1 mmol/L | 101,5 \pm 1,3 | 6,12 \pm 0,07 | 4 |
| 2R/ E- | PE/ Catalase 300 U/ml | 103,4 \pm 2,8 | 5,93 \pm 0,20 | 6 |
| 2R-1C/ E- | PE | 110,9 \pm 6,3 | 6,29 \pm 0,04 | 4 |
| 2R-1C/ E- | PE/ Tiron 0,1 mmol/L | 109,3 \pm 5,5 | 5,22 \pm 1,00 | 4 |
| 2R-1C/ E- | PE/ Tiron 1 mmol/L | 115,1 \pm 5,9 | 5,08 \pm 1,07 | 4 |
| 2R-1C/ E- | PE/ Catalase 300 U/ml | 107,1 \pm 7,1 | 5,60 \pm 0,17* | 4 |

Os valores representam o efeito relaxante máximo (E_{max}) \pm erro padrão da média (EPM) expresso em porcentagem (%) e pD_2 ($-\log EC_{50}$) induzido pelo doador de NO obtidos em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. *Representa diferença de pD_2 em relação ao controle 2R-1C E- ($p < 0,001$).

5.8.5 Efeito do peróxido de hidrogênio exógeno sobre aortas de ratos normotensos e hipertensos, com ou sem endotélio, contraídas com fenilefrina

O H_2O_2 induziu contração até a concentração de 0,3 mmol/L e relaxamento a partir de 1 mmol/L, de forma semelhante em 2R e 2R-1C E- (Fig. 26). Por outro lado, em aortas de 2RE+, o H_2O_2 nas concentrações de 10 nmol/L ($1,27 \pm 0,23$ g; n=6) a

10 $\mu\text{mol/L}$ ($0,9 \pm 0,1$ g; $n=4$) induziu relaxamento e reduziu a pré-contracção à PE apenas em aorta de 2R. Este efeito eliminou as diferenças existentes entre aortas E+ de 2R (com 1 nmol/L : $1,5 \pm 0,2$ g; $n=6$) e 2R-1C (com 1 nmol/L : $0,9 \pm 0,1$ g; $n=4$; $p<0,05$) (Fig. 27).

Em aortas de 2R-1C (E+), nas concentrações de 0,3 mmol/L e 1 mmol/L o H_2O_2 promoveu aumento da resposta contrátil. Com 0,3 mmol/L : $1,25 \pm 0,13$ g; $n=4$; ($p<0,05$) e 1 mmol/L : $1,39 \pm 0,10$ g; $n=4$ ($p<0,01$). Os valores foram superiores ao da contracção inicial induzida pela PE ($0,9 \pm 0,1$ g; $n=4$), o que não ocorreu em aortas de 2R (E+) (Fig. 27).

Em aorta de ratos 2R (E-) contraídas com PE ($1,47 \pm 0,24$ g; $n=5$), a inibição não seletiva da COX com indometacina inibiu a resposta contrátil induzida por H_2O_2 nas concentrações de 0,1 mmol/L (de $1,76 \pm 0,24$ g; $n=5$ para $0,93 \pm 0,18$ g; $n=4$; $p<0,001$) e de 0,3 mmol/L (de $1,83 \pm 0,23$ g; $n=5$ para $0,653 \pm 0,17$ g; $n=4$; $p<0,001$) (Fig. 28). Isto não foi observado em 2R-1C (Fig. 29).

Por outro lado, a inibição não seletiva da COX em aorta de ratos com endotélio, inibiu a resposta contrátil induzida por H_2O_2 tanto em 2R (PE: $1,50 \pm 0,22$ g; $n=6$) (Fig. 30) quanto em 2R-1C (PE: $0,90 \pm 0,24$ g; $n=4$) (Fig. 31). Entretanto, em aortas de 2R (E+), isso ocorreu nas concentrações de 0,1 mmol/L ($1,51 \pm 0,23$ g; $n=6$, 2R/E+/INDO: $0,87 \pm 0,08$ g; $n=8$; $p<0,001$) e 0,3 mmol/L ($1,76 \pm 0,24$ g; $n=6$, 2R/E+/INDO: $0,93 \pm 0,18$ g; $n=4$; $p<0,001$). Em 2R-1C (E+) ocorreu em maiores concentrações como 0,3 mmol/L ($1,25 \pm 0,13$ g; $n=4$, com INDO: $0,85 \pm 0,08$ g; $n=6$; $p<0,001$) e 1 mmol/L ($1,39 \pm 0,10$ g; $n=4$, com INDO: $0,94 \pm 0,08$ g; $n=6$; $p<0,001$).

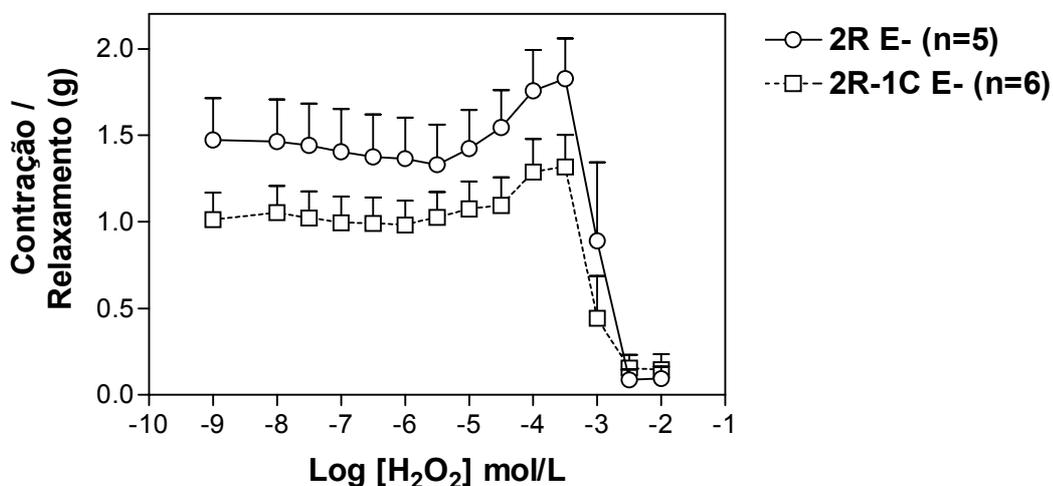


Fig. 26. Efeito do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em aortas de ratos 2R e 2R-1C. Curvas concentração-efeito cumulativas para H_2O_2 foram realizadas em aortas sem endotélio (E-), contraídas com PE 10 nmol/L. Os pontos representam a média \pm EPM em "n" preparações isoladas de diferentes ratos.

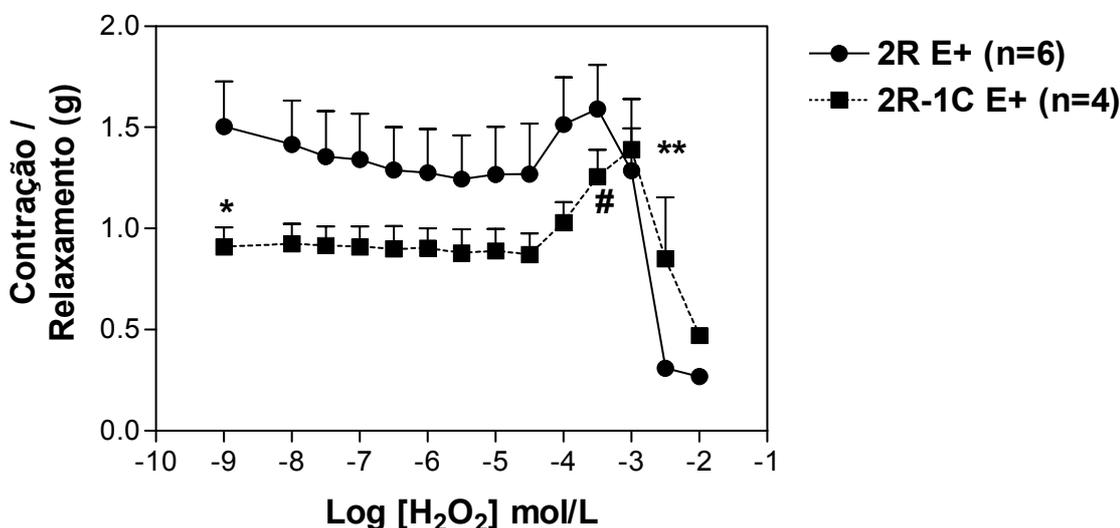


Fig. 27. Efeito do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em aortas de ratos 2R e 2R-1C. Curvas concentração-efeito cumulativas para H_2O_2 foram realizadas em aortas com endotélio (E+), contraídas com PE 100 nmol/L. Os pontos representam a média \pm EPM em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. *Representa diferença entre 2R E+ e 2R-1C E+ ($p < 0,05$). **diferença entre a concentração de 1 mmol/L e as demais concentrações inferiores a 0,1 mmol/L em 2R-1C E+ ($p < 0,01$). #diferença entre a concentração 0,3 mmol/L e as demais concentrações inferiores a 0,1 mmol/L em 2R-1C E+ ($p < 0,05$).

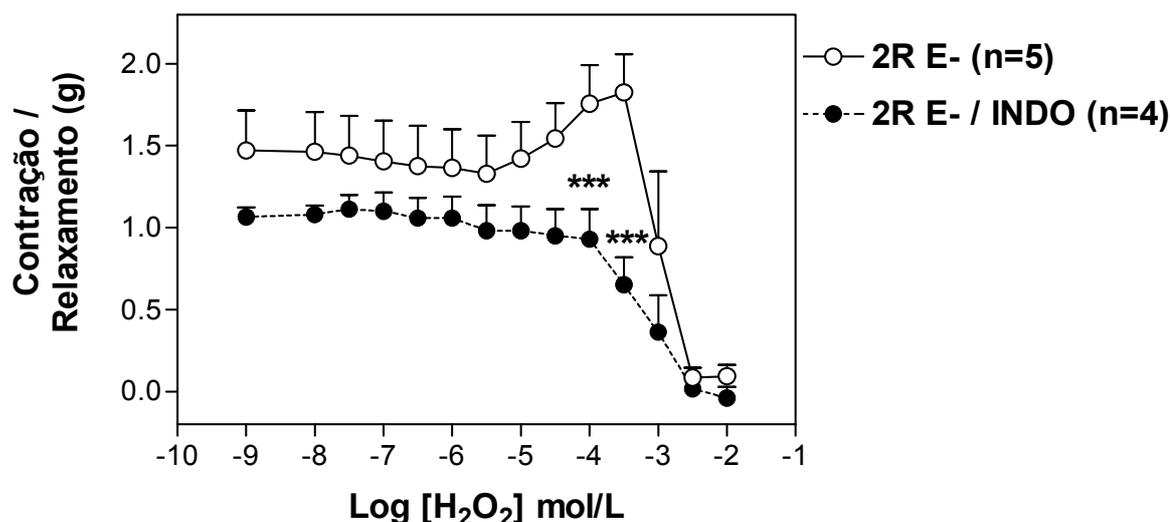


Fig. 28. Efeito da indometacina (INDO) sobre a resposta ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em aortas de ratos 2R, sem endotélio (E-). Curvas concentração-efeito cumulativas para H_2O_2 foram realizadas em aortas sem endotélio (E-), contraídas com PE (10 nmol/L) na ausência (2R E-) ou presença de INDO (10 μ mol/L). Os pontos representam a média \pm EPM em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. ***diferença em relação ao controle 2R E- ($p < 0,001$).

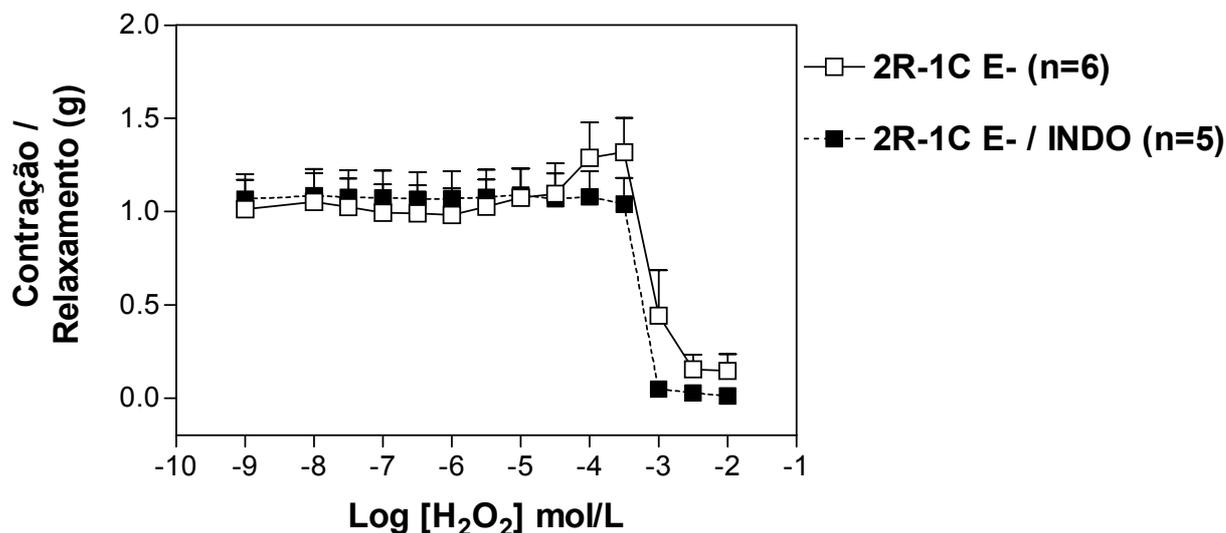


Fig. 29. Efeito da indometacina (INDO) sobre a resposta ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em aortas de ratos 2R-1C, sem endotélio (E-). Curvas concentração-efeito cumulativas para H_2O_2 foram realizadas em aortas sem endotélio (E-), contraídas com PE (10 nmol/L) na ausência (2R E-) ou presença de INDO (10 μ mol/L). Os pontos representam a média \pm EPM em "n" preparações isoladas de diferentes ratos.

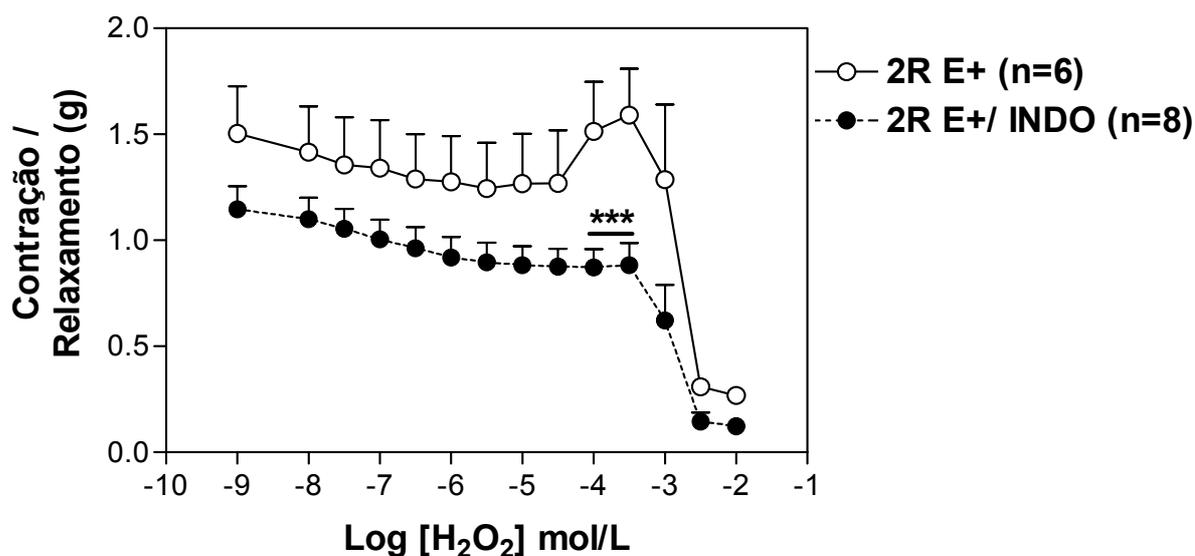


Fig. 30. Efeito da indometacina (INDO) sobre a resposta ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em aortas de ratos 2R, com endotélio (E+). Curvas concentração-efeito cumulativas para H_2O_2 foram realizadas em aortas sem endotélio (E-), contraídas com PE (100 nmol/L) na ausência (2R E-) ou presença de INDO (10 μ mol/L). Os pontos representam a média \pm EPM em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. *diferença relação ao controle 2R E+ ($p < 0,001$).

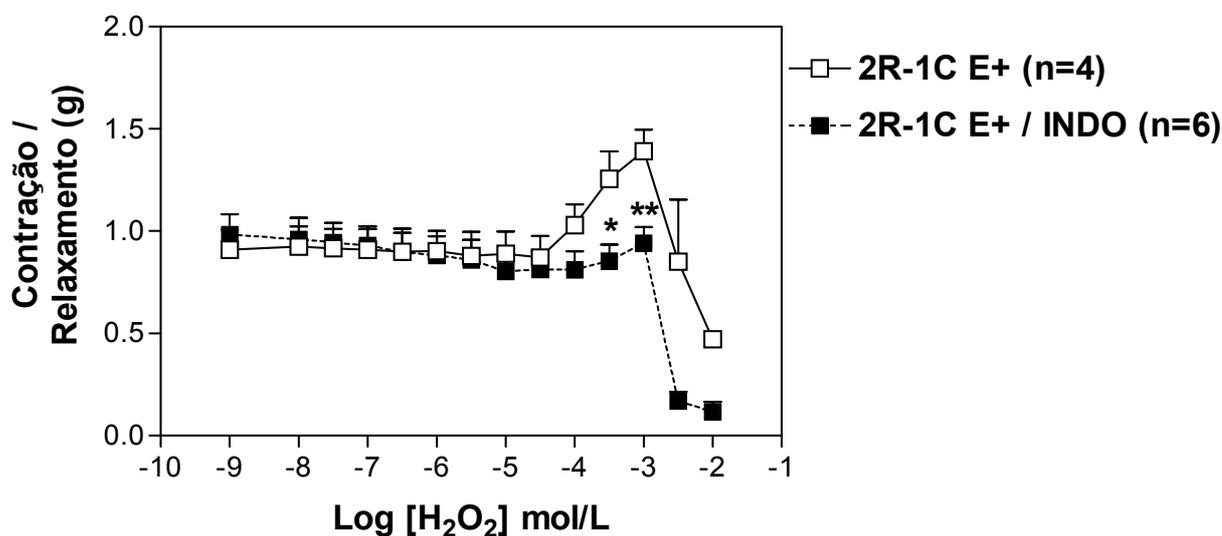


Fig. 31. Efeito da indometacina (INDO) sobre a resposta ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em aortas de ratos 2R-1C, com endotélio (E+). Curvas concentração-efeito cumulativas para H_2O_2 foram realizadas em aortas sem endotélio (E-), contraídas com PE (100 nmol/L) na ausência (2R E-) ou presença de INDO (10 μ mol/L). Os pontos representam a média \pm EPM em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. *Representa diferença em relação a 2R-1C E+ ($p < 0,05$). **diferença em relação a 2R-1C E+ ($p < 0,01$).

A inibição não seletiva da NO-Sintase com L-NAME potencializou a pré-contracção induzida com PE 100 nmol/L em aortas E+ de 2R-1C e, principalmente, impediu o efeito do H₂O₂ em acentuar a modulação negativa endotelial em aortas E+ de 2R (Fig. 32).

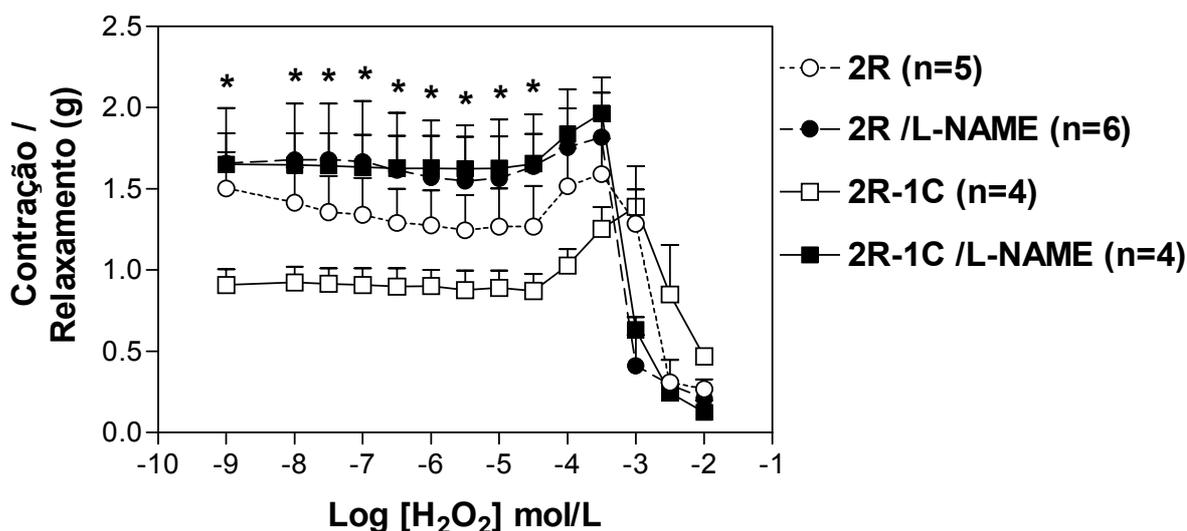


Fig. 32. Efeito do inibidor L-NAME sobre a resposta induzida pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em aortas de ratos 2R e 2R-1C com endotélio. Foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para H₂O₂ em aortas contraídas com PE 100 nmol/L, na ausência ou presença do L-NAME 100 µmol/L. Os pontos representam a média ± EPM em “n” preparações isoladas de diferentes ratos. *diferença entre 2R E+ e 2R-1C (p<0,05). #diferença entre 2R/L-NAME, 2R-1C/L-NAME e 2R-1C (p<0,001).

5.9 Expressão proteica e atividade das enzimas NO-sintase, Ciclooxygenase e Guanilato-Ciclase solúvel

5.9.1 Efeito da inibição das enzimas NO-sintase (NOS), Ciclooxygenase (COX), Guanilato-Ciclase solúvel (GCs) e Proteína Quinase G (PKG) sobre a contração induzida com fenilefrina em aortas de ratos normotensos e hipertensos, com endotélio

Para avaliar como o produto das enzimas NOS e COX poderia contribuir para a menor contração à PE em aortas E+, as preparações foram incubadas com os

inibidores não seletivos, L-NAME e Indometacina, respectivamente, e curvas concentração-efeito foram desenvolvidas para fenilefrina.

Como pode ser observado na Fig. 33 e Fig. 34, L-NAME teve efeito inibitório semelhante à remoção do endotélio sobre a resposta contrátil à fenilefrina em aortas de ratos 2R (Emax: $2,8 \pm 0,3$ g; pD_2 : $7,47 \pm 0,07$; $n=4$) e 2R-1C (Emax: $2,6 \pm 0,3$ g; pD_2 : $7,63 \pm 0,15$; $n=6$). Resultados semelhantes foram obtidos em aortas pré-incubadas com a associação de L-NAME e Indometacina (2R Emax: $2,9 \pm 0,3$ g; pD_2 : $7,46 \pm 0,08$; $n=4$ e 2R-1C Emax: $2,4 \pm 0,2$ g; pD_2 : $7,48 \pm 0,07$; $n=7$). Por outro lado, em aortas pré-incubadas somente com indometacina, houve inibição do efeito contrátil da fenilefrina somente em aortas de ratos 2R (Emax: de $2,2 \pm 0,1$ g para $1,4 \pm 0,3$ g) e (pD_2 de $7,54 \pm 0,06$; $n=7$ para $7,22 \pm 0,05$; $n=4$).

Para verificar se o NO produzido na célula endotelial contribuiria para a menor contração à PE por ativar a GCs, realizamos curvas concentração-efeito para PE em presença do inibidor seletivo da GCs (ODQ $1 \mu\text{mol/L}$). O ODQ aboliu a diferença na resposta contrátil à PE, em aortas de ratos 2R E+ (Emax: $2,7 \pm 0,3$ g; pD_2 : $7,55 \pm 0,02$; $n=5$) e 2R-1C E+ (Emax: $2,7 \pm 0,4$ g; pD_2 : $7,71 \pm 0,10$; $n=4$). Além disso, o efeito da indometacina em reduzir a resposta contrátil foi abolido pelo ODQ em aortas de 2R E+ (Indometacina+ODQ Emax: $2,6 \pm 0,2$ g; pD_2 : $7,58 \pm 0,11$; $n=4$).

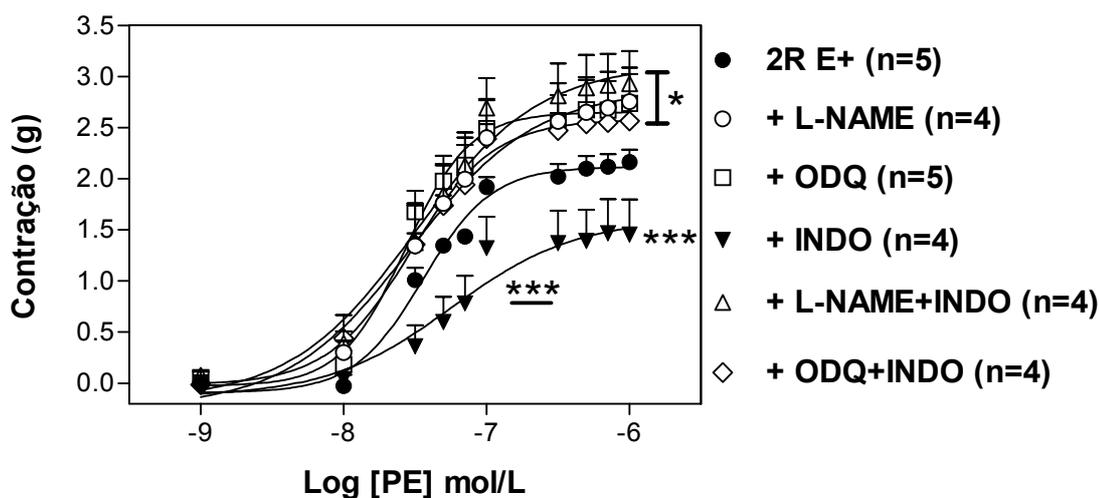


Fig. 33. Efeito dos inibidores L-NAME, ODQ e Indometacina (INDO) sobre a resposta contrátil estimulada com fenilefrina (PE) em aortas de ratos 2R (E+). Curvas concentração-efeito para PE foram realizadas na ausência e presença dos inibidores L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$), ODQ (1 $\mu\text{mol/L}$), INDO (10 $\mu\text{mol/L}$) ou associação de INDO+L-NAME ou INDO+ODQ. Os resultados são expressos em gramas de tensão. Os pontos representam a média de contração vascular \pm EPM em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. *Representa diferença de Emax em relação ao controle ($p < 0,05$). ***Representa diferença de Emax e pD_2 entre 2R INDO e controle ($p < 0,001$).

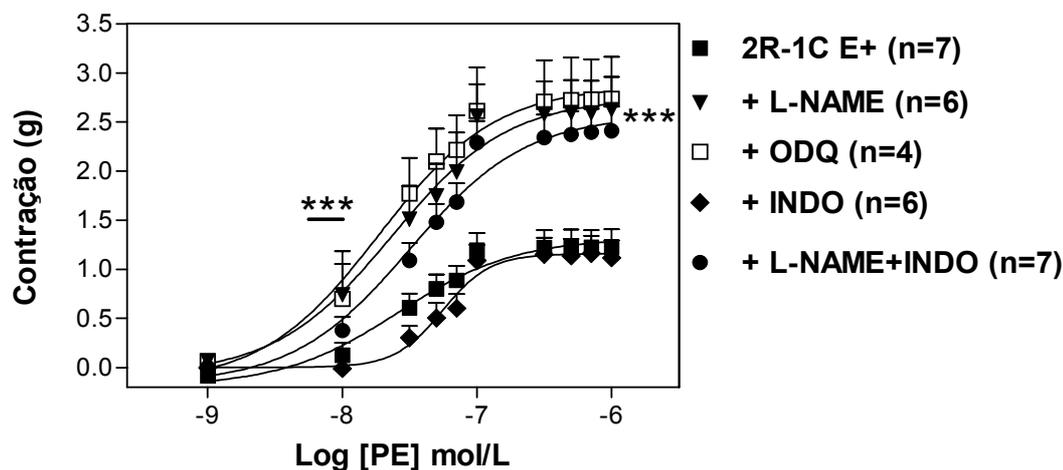


Fig. 34. Efeito dos inibidores L-NAME, ODQ e Indometacina (INDO) sobre a resposta contrátil estimulada com fenilefrina (PE) em aortas de ratos 2R-1C (E+). Curvas concentração-efeito para PE foram realizadas na ausência e presença dos inibidores L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$), ODQ (1 $\mu\text{mol/L}$), INDO (10 $\mu\text{mol/L}$) ou associação de INDO+L-NAME ou INDO+ODQ. Os resultados são expressos em gramas de tensão. Os pontos representam a média de contração vascular \pm EPM em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. ***Representa diferença de Emax e pD_2 em relação ao controle ($p < 0,001$).

Como mostra a Tabela 7, o inibidor não seletivo da NO-Sintase L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$) inibiu a reduzida resposta contrátil induzida pela PE em aorta de ratos 2R-1C com endotélio. Entretanto, os inibidores seletivos para as isoformas induzida ou NOS II (1400W, 100 $\mu\text{mol/L}$) e neuronal ou NOS I (N-Propil L-Arginina, 100 $\mu\text{mol/L}$) não alteraram a resposta contrátil à PE. Por outro lado, se comparada ao efeito do L-NAME, a inibição da PKG reverteu parcialmente a resposta contrátil máxima à PE em aorta de 2R-1C com endotélio (de $1,2 \pm 0,2$ g; n=7 para $1,9 \pm 0,2$ g; n=5; $p < 0,05$), sem efeito sobre a potência.

Tabela 7. Valores de E_{max} e pD_2 obtidos na contração com fenilefrina (PE) em aorta com endotélio (E+) isolada de 2R-1C, em ausência ou presença de inibidor não seletivo da NO-sintase (L-NAME, 100 $\mu\text{mol/L}$), seletivo para iNOS (1400W, 100 $\mu\text{mol/L}$), seletivo para nNOS (N-Propil L-Arginina, 100 $\mu\text{mol/L}$) e inibidor para PKG, Rp-8BrGMPc (30 $\mu\text{mol/L}$).

| Grupo | Inibidor | $E_{\text{max}} \pm \text{EPM}$ | pD_2 | N |
|-----------|---------------------|---------------------------------|-----------------|---|
| 2R-1C/ E+ | PE | $1,2 \pm 0,2$ | $7,54 \pm 0,06$ | 7 |
| 2R-1C/ E+ | PE + L-NAME | $2,6 \pm 0,3^{***}$ | $7,63 \pm 0,15$ | 6 |
| 2R-1C/ E+ | PE + 1400W | $1,2 \pm 0,2$ | $7,37 \pm 0,10$ | 4 |
| 2R-1C/ E+ | PE + N-Propil L-Arg | $1,2 \pm 0,2$ | $7,37 \pm 0,08$ | 4 |
| 2R-1C/ E+ | PE + Rp-8BrGMPc | $1,9 \pm 0,2^*$ | $7,44 \pm 0,10$ | 5 |

Os valores representam o efeito contrátil máximo (E_{max}) \pm EPM expresso em gramas (g) e pD_2 ($-\log EC_{50}$) obtidos em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. *Representa diferença de E_{max} em relação ao controle 2R-1C E+ ($p < 0,05$). ***Representa diferença de E_{max} em relação ao controle 2R-1C E+ ($p < 0,001$).

5.9.2 Efeito da inibição das isoformas da COX, COX-1 e COX-2, sobre a contração vascular induzida com fenilefrina em aortas de ratos normotensos e hipertensos

A inibição da COX-1 reduziu a potência da PE em aorta de ratos 2R com endotélio (E+) (de $7,44 \pm 0,03$ para $7,14 \pm 0,04$) e sem endotélio (E-) (de $7,93 \pm 0,10$ para $7,34 \pm 0,04$) (Fig. 35A e Tabela 8). Porém, o Emax foi reduzido apenas em aortas de 2R E+ (de $2,2 \pm 0,1$ g para $1,7 \pm 0,2$ g). Em aortas de ratos 2R-1C (Fig. 35B e Tabela 8) a inibição da COX-1 reduziu a potência e Emax da PE apenas em aortas sem endotélio (Emax: $2,6 \pm 0,2$ g para $1,5 \pm 0,1$ g e pD_2 : $7,89 \pm 0,08$ para $7,74 \pm 0,04$).

A inibição da COX-2 reduziu a potência e o efeito máximo da PE em aorta de ratos 2R E- (Emax de $2,5 \pm 0,2$ para $1,1 \pm 0,1$ g e pD_2 : de $7,93 \pm 0,10$ para $7,17 \pm 0,03$) (Fig. 36A e Tab. 8). Entretanto, a inibição da COX-2 em aortas de 2RE+ praticamente abole a resposta contrátil induzida pela PE (Emax de $2,2 \pm 0,1$ g para $0,3 \pm 0,1$ g). Por outro lado, em aortas de ratos 2R-1C E+ ou E- (Fig. 36B e Tab. 8) reduz a potência (E+: de $7,54 \pm 0,06$ para $7,17 \pm 0,06$; E-: de $7,89 \pm 0,08$ para $7,37 \pm 0,04$) e Emax (E+: de $1,2 \pm 0,2$ g para $0,6 \pm 0,1$ g; E-: de $2,6 \pm 0,2$ g para $1,8 \pm 0,2$ g). Em aortas de ratos E+ o efeito inibitório foi maior sobre o Emax induzido pela PE em 2R do que em 2R-1C.

A inibição das isoformas da COX reduziu a contração induzida pela PE em aortas de 2R (E+: $2,16 \pm 0,12$ g; E+/SC-560: $1,70 \pm 0,12$ g; E+/SC-236: $0,28 \pm 0,09$ g). A inibição não seletiva da NO-Sintase reverteu totalmente a reduzida contração para PE induzida pela inibição da COX-1 (E+/SC-560/L-NAME: $2,38 \pm 0,11$ g), mas reverteu apenas parcialmente a inibição da COX-2 (E+/SC-236/L-NAME: $1,05 \pm 0,12$ g) (Fig. 37).

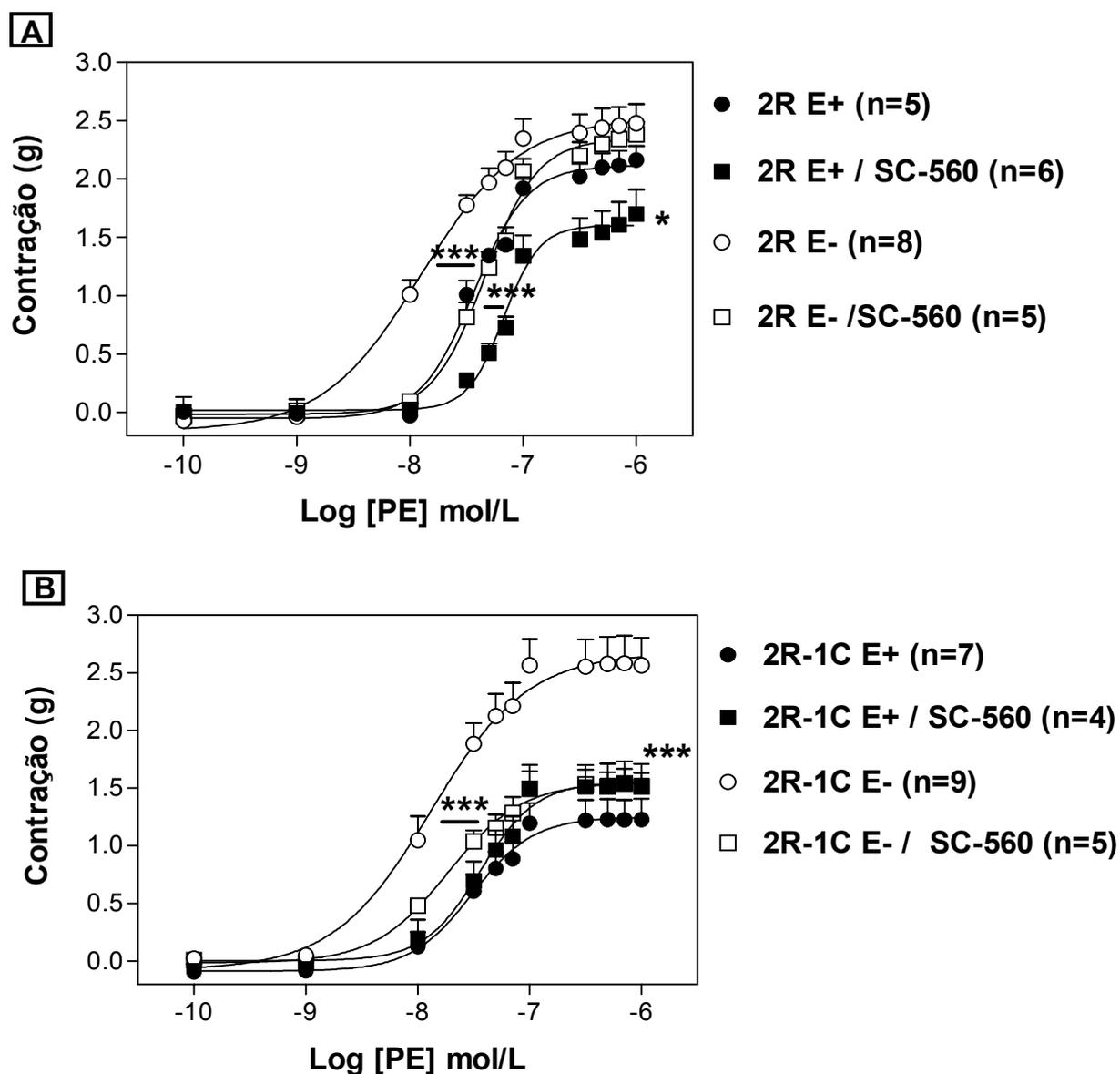


Fig. 35. Efeito do inibidor seletivo para COX-1, SC-560 sobre a resposta contrátil induzida com PE em aortas de ratos 2R (A) e 2R-1C (B). Curvas concentração-efeito para PE foram realizadas em aortas com (E+) ou sem endotélio (E-), isoladas de ratos na ausência ou presença do inibidor seletivo para COX-1, SC-560 (10 μ mol/L). Os pontos representam a média \pm EPM em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. ***diferença de pD_2 entre as aortas com inibidor e controle E+ ou E- ($p < 0,001$). *diferença de E_{max} entre as aortas com inibidor e controle 2R E+ vs 2R E+/SC-560 ($p < 0,05$). ****diferença de E_{max} entre as aortas com inibidor e controle 2R-1C E- vs 2R-1C E-/SC-560 ($p < 0,001$).

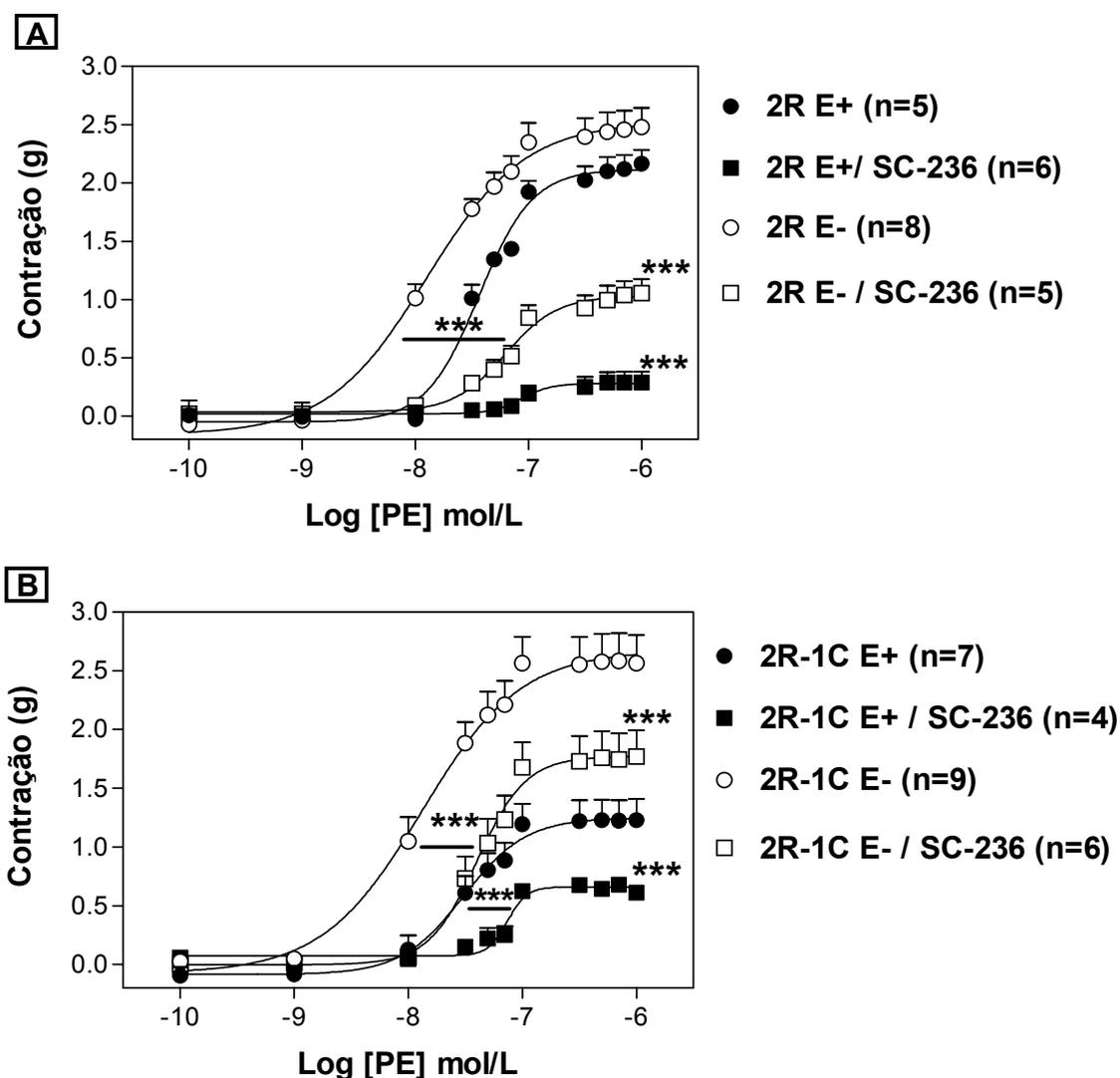


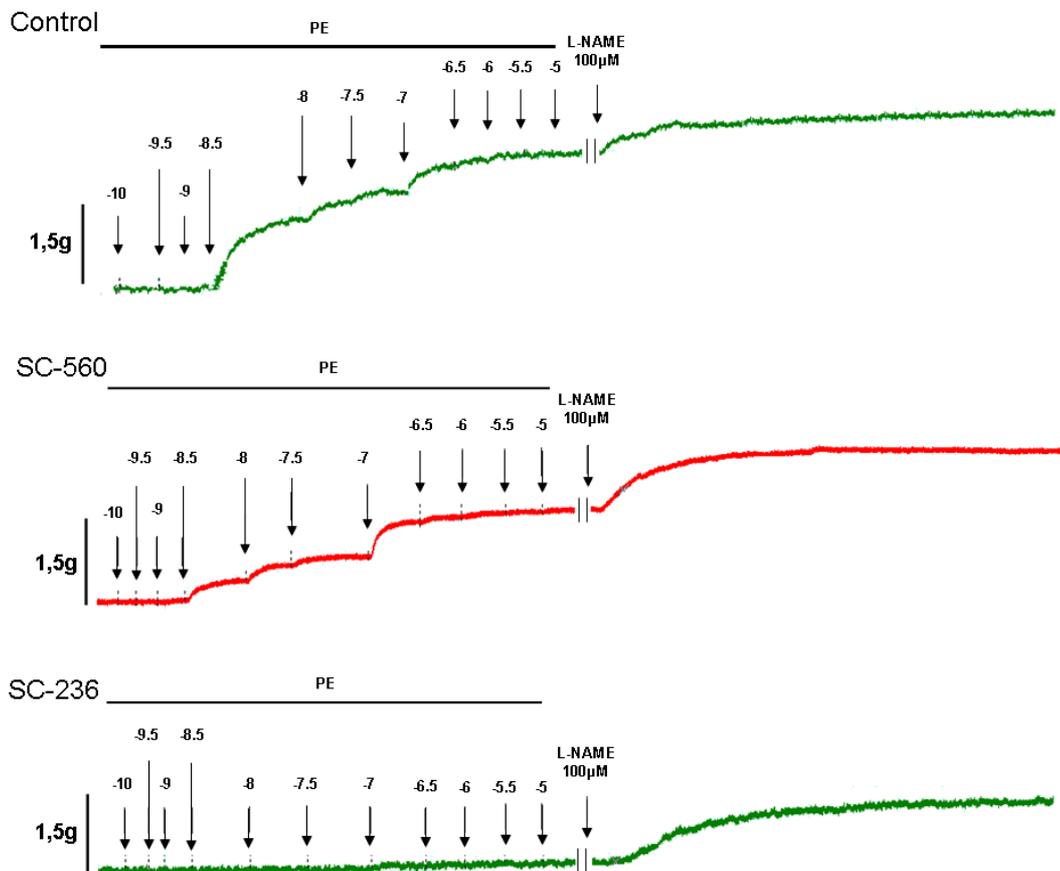
Fig. 36. Contração induzida com fenilefrina (PE) em aortas com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-) isoladas de ratos 2R (A) e 2R-1C (B), na ausência ou presença do inibidor seletivo para COX2, SC-236 (10 μ mol/L). Os pontos representam a média \pm EPM em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. ***Representa diferença de E_{max} e pD_2 entre as aortas com inibidor e controles E+ e E- ($p < 0,001$).

Tabela 8. Valores de Emax e pD₂ obtidos na contração induzida com fenilefrina (PE) em aorta com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-), isoladas de ratos 2R e 2R-1C em ausência (PE) ou presença dos inibidores seletivos para COX-1 (SC-560, 10 µmol/L) ou COX-2 (SC-236, 10 µmol/L)

| Grupo | Inibidor | Emax ± EPM | pD ₂ | N |
|------------|-------------|---------------|-----------------|---|
| 2R/ E+ | PE | 2,2 ± 0,1 | 7,44 ± 0,03 | 5 |
| 2R/ E+ | PE + SC-560 | 1,7 ± 0,2* | 7,14 ± 0,04*** | 6 |
| 2R/ E+ | PE + SC-236 | 0,3 ± 0,1*** | 6,93 ± 0,16*** | 6 |
| 2R/ E- | PE | 2,5 ± 0,2 | 7,93 ± 0,10 | 8 |
| 2R/ E- | PE + SC-560 | 2,4 ± 0,1 | 7,34 ± 0,04*** | 5 |
| 2R/ E- | PE + SC-236 | 1,1 ± 0,1*** | 7,17 ± 0,03*** | 5 |
| 2R-1C/ E+ | PE | 1,2 ± 0,2 | 7,54 ± 0,06 | 7 |
| 2R-1C/ E+ | PE + SC-560 | 1,5 ± 0,2 | 7,46 ± 0,08 | 4 |
| 2R-1C / E+ | PE + SC-236 | 0,6 ± 0,1*** | 7,17 ± 0,06*** | 4 |
| 2R-1C/ E- | PE | 2,6 ± 0,2 | 7,89 ± 0,08 | 9 |
| 2R-1C/ E- | PE + SC-560 | 1,5 ± 0,1***# | 7,74 ± 0,04***# | 5 |
| 2R-1C/ E- | P + SC-236 | 1,8 ± 0,2***# | 7,37 ± 0,04***# | 6 |

Os valores representam Emax ± EPM expresso em gramas (g) e pD₂ (-logEC₅₀) obtidos em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. *Representa diferença de Emax entre as aortas com inibidor e controle E+ ou E- (p<0,05), ** (p<0,001). ***Representa diferença de pD₂ entre as aortas com inibidor e controle E+ ou E- (p<0,001). #Representa diferença de Emax ou pD₂ entre 2R-1C E- e 2R E- na presença de SC-560 e SC-236 (p<0,01).

A



B

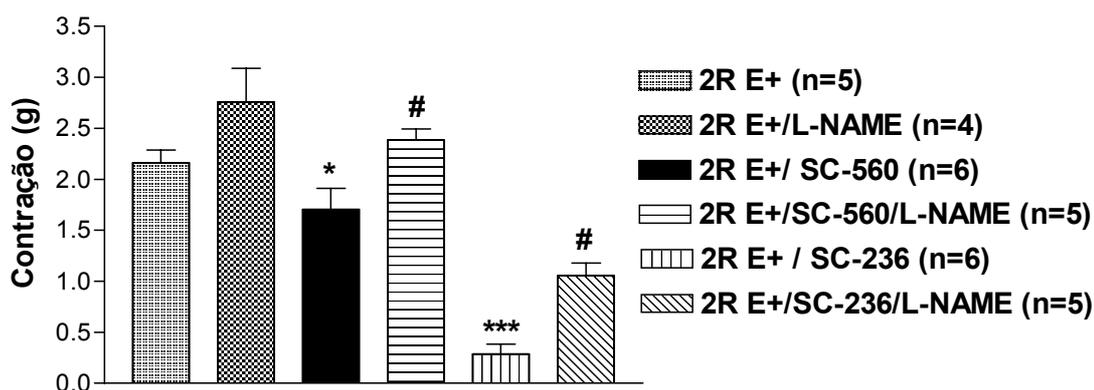


Fig. 37. Efeitos dos inibidores da COX sobre a resposta contrátil induzida com fenilefrina em aortas com endotélio de ratos normotensos 2R. O efeito máximo à fenilefrina foi medido na ausência ou presença do inibidor seletivo da COX-1 SC-560 (10 $\mu\text{mol/L}$) ou COX-2, SC-236 (10 $\mu\text{mol/L}$), na ausência ou presença do L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$). A. Representa os traçados representativos de 5-6 experimentos. B. As barras representam a média \pm EPM em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. *Representa diferença de E_{max} induzido pela PE com SC-560 e controle ($p < 0,05$). ***Representa diferença de E_{max} induzido pela PE entre as preparações SC-236 e SC-560 ($p < 0,001$). #Representa diferença de E_{max} entre SC-560/L-NAME e SC-560 ($p < 0,001$), SC-236/L-NAME e SC-236 ($p < 0,001$).

5.9.3 Expressão proteica das isoformas da COX em aortas de ratos normotensos e hipertensos

A expressão proteica de ambas isoformas da COX foi maior em aorta de ratos 2R-1C do que em 2R com ou sem endotélio (**2R E+/** COX1: $0,14 \pm 0,02$, n=7; COX2: $0,37 \pm 0,02$, n=7; **2R E-/** COX1: $0,10 \pm 0,02$, n=6; COX2: $0,31 \pm 0,04$, n=6; **2R-1C E+/** COX1: $0,53 \pm 0,05$, n=7; COX2: $0,66 \pm 0,05$, n=7; **2R-1C E-/** COX1: $0,31 \pm 0,06$, n=6; COX2: $0,55 \pm 0,02$, n=6; $p < 0,001$) (Fig. 38). Entretanto, em aorta de ratos 2R-1C a expressão proteica das isoformas da COX foi maior em aorta com endotélio do que sem endotélio.

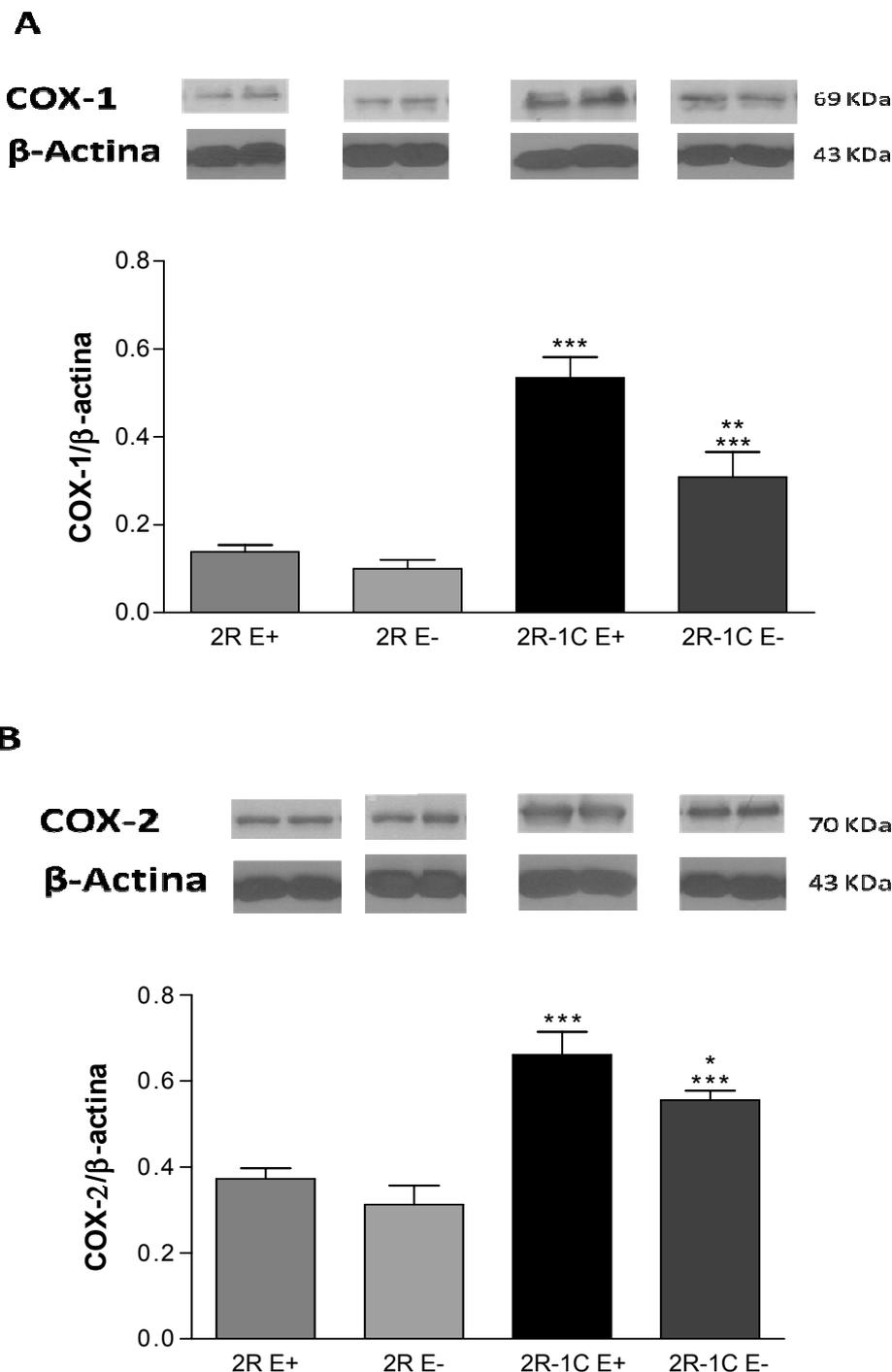


Fig. 38. Expressão proteica das isoformas da enzima ciclooxigenase, COX-1 (A) e COX-2 (B), normalizada pela expressão de β -Actina, em aortas, com (E+) ou sem endotélio (E-), de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C). Os dados representam a média \pm EPM (n=6-7). (A) ***Indica diferença entre 2R-1C e 2R ($p < 0,001$). **Indica diferença entre 2R-1C E+ e E- ($p < 0,01$). (B) *** Indica diferença entre 2R-1C e 2R ($p < 0,001$). *Indica diferença entre 2R-1C E+ e E- ($p < 0,05$).

5.9.4 Produção de Tromboxano A₂ e Prostaciclina estimulada com fenilefrina em aortas de ratos normotensos e hipertensos

Aortas de ratos 2R-1C previamente estimuladas com fenilefrina em banho para órgãos isolados apresentaram maior produção de tromboxano B₂ (metabólito estável do tromboxano A₂) e 6 keto-prostaglandina F_{1α} (metabólito estável da prostaciclina, PGI₂) quando comparadas a 2R (2R/ E+ TXB₂: 50,01 ± 3,96 pg/mL, n=4; E+ PGI₂: 62,45 ± 9,04 pg/mL, n=4; E- TXB₂: 45,97 ± 4,29 pg/mL, n=4; E- PGI₂: 66,62 ± 9,39 pg/mL, n=4; 2R-1C/ E+ TXB₂: 125,88 ± 11,45 pg/mL, n=4; E+ PGI₂: 144,49 ± 5,62 pg/mL, n=4; E- TXB₂: 71,98 ± 6,94 pg/mL, n=4; E- PGI₂: 112,25 ± 14,52 pg/mL, n=4; p<0,001) (Fig. 39). A inibição não seletiva da NO-Sintase com L-NAME não modificou a produção TXB₂ e PGI₂ em aortas com endotélio de ratos 2R (2R/L-NAME TXB₂: 56,99 ± 3,84 pg/mL, n=4; PGI₂: 80,02 ± 6,51 pg/mL, n=4) e 2R-1C (2R-1C/L-NAME TXB₂: 101,66 ± 17,76 pg/mL, n=4, PGI₂: 149,27 ± 12,78 pg/mL, n=4). Entretanto, a remoção do endotélio reduz a produção de TXB₂ somente em aortas de ratos 2R-1C (p<0,01).

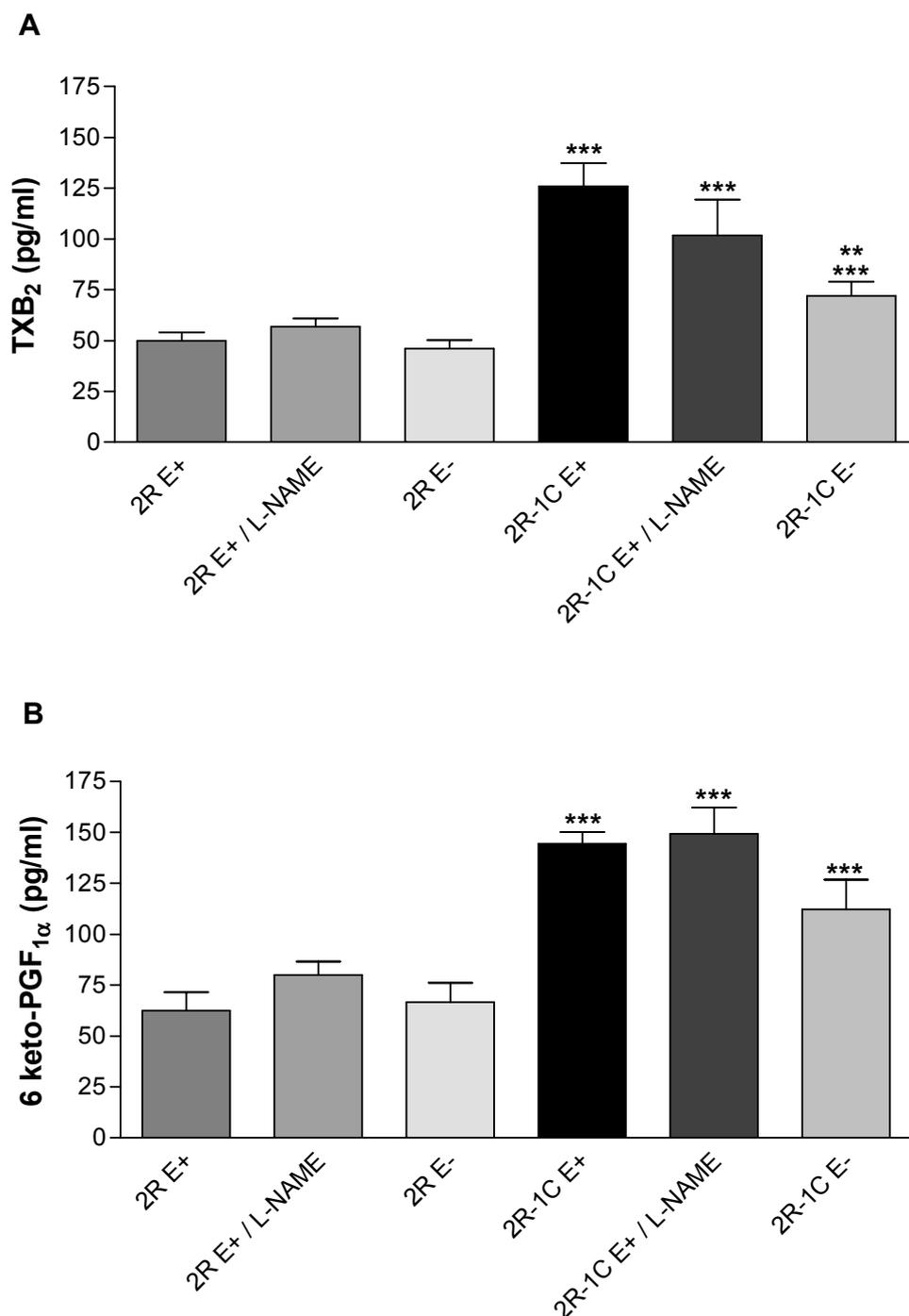


Fig. 39. Medida da produção de TXB₂ (metabólito estável do tromboxano A₂) e 6-keto-PGF_{1α} (metabólito estável da prostaciclina) em pg/ml em homogenato de aortas, com (E⁺) ou sem endotélio (E⁻), de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C), previamente estimuladas com fenilefrina 0,1 μmol/L em banho para órgãos isolados. Os dados representam a média ± EPM (n=4). (A) *** Indica diferença entre 2R-1C e 2R (p<0,001). **Indica diferença entre 2R-1C E⁺ e E⁻ (p<0,01). (B) ***Indica diferença entre 2R-1C e 2R (p<0,001).

5.9.5 Efeito da inibição seletiva das isoformas da enzima Ciclooxigenase sobre a produção de NO e EROs em células endoteliais isoladas de ratos normotensos e hipertensos

A inibição seletiva das isoformas da COX não alterou a produção de NO nas células endoteliais de ratos 2R (Basal: $2802,7 \pm 146,9$; n= 4; SC-560: $2609,0 \pm 335,2$; n=4; SC-236: $2505,0 \pm 86,8$; n=4) (Fig. 40).

Em relação ao basal, a inibição seletiva das isoformas da COX reduziu a produção de EROs nas células endoteliais de ratos 2R (Basal: $30807,5 \pm 384,3$; n= 4; SC-560: $21987,3 \pm 737,2$; n=4; SC-236: $22652,0 \pm 457,6$; n=4) e 2R-1C (Basal: $34465,3 \pm 4357,5$; n= 3; SC-560: $9822,3 \pm 4410,6$; n=3; SC-236: $14275,3 \pm 3355,9$; n=3) (Fig. 41). A inibição da COX-1 em células endoteliais de 2R-1C promoveu maior redução na produção de EROs do que em 2R.

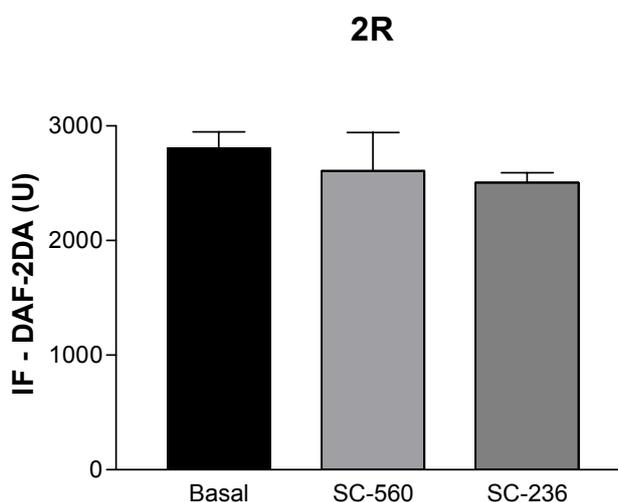


Fig. 40. Intensidade de fluorescência (IF) emitida pela sonda sensível ao NO (DAF-2A) em células endoteliais de aorta de 2R, na ausência (Basal) ou presença do inibidor seletivo para COX-1, SC-560 (10 µmol/L) ou para COX-2 SC-236 (10 µmol/L). As barras representam a média das medianas da intensidade de fluorescência (IF) das células com marcação positiva (P3) para a sonda fluorescente DAF-2/DA \pm EPM em 4 grupos de células endoteliais isoladas de aortas de diferentes ratos.

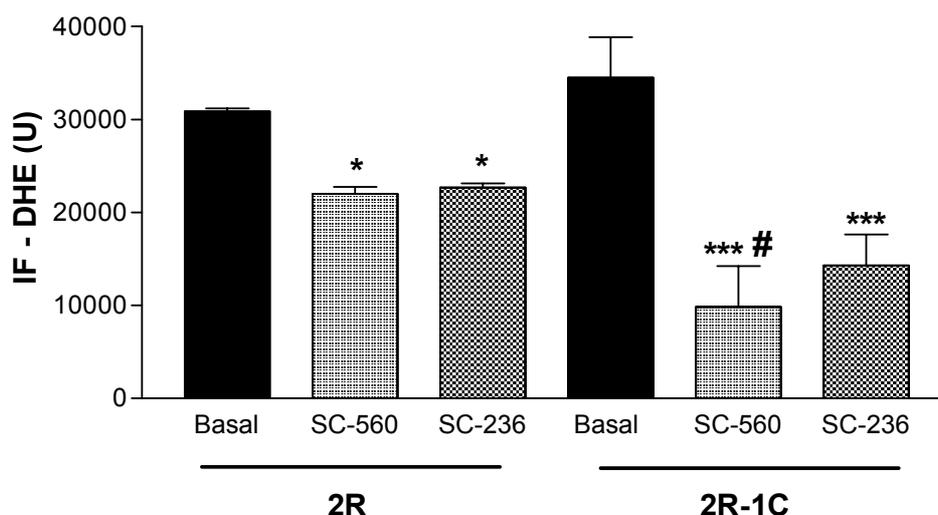


Fig. 41. Intensidade de fluorescência (IF) emitida pela sonda sensível a EROs (DHE) em células endoteliais de aorta de 2R e 2R-1C, na ausência (Basal) ou na presença do inibidor seletivo para COX-1, SC-560 (10 $\mu\text{mol/L}$) ou COX-2 SC-236 (10 $\mu\text{mol/L}$). As barras representam a média das medianas da intensidade de fluorescência (IF) das células com marcação positiva (P3) para a sonda fluorescente DHE \pm EPM em 3-4 grupos de células endoteliais isoladas de aortas de diferentes ratos. *diferença com o Basal em 2R ($p < 0,05$). *diferença com o Basal em 2R-1C ($p < 0,001$). #Representa diferença entre SC-560 em 2R-1C e 2R ($p < 0,01$).**

5.9.6 Participação do peróxido de hidrogênio na reduzida resposta contrátil à fenilefrina induzida por inibidores não seletivos da COX em aortas de ratos normotensos, com endotélio

Como pode ser observado na figura 33 a inibição da COX com indometacina reduz a resposta contrátil à PE em aorta de ratos 2R com endotélio, mas não em 2R-1C (Figura 34). Por outro lado, aortas de ratos 2R-1C com endotélio, apresentam reduzida resposta contrátil à fenilfrina, que é independente da inibição não seletiva da COX.

Com base nos resultados apresentados na Fig. 18, em que a catálise de H_2O_2 por Catalase possibilitou o aumento na resposta induzida com fenilefrina em aortas de ratos 2R-1C, investigamos a possibilidade da inibição da COX, por se tratar de uma peroxidase, estar relacionada à redução no consumo de H_2O_2 vascular com

consequente aumento na sua biodisponibilidade e indução de menor contração à fenilefrina. Dessa forma, aortas de 2R, com endotélio, foram incubadas com os inibidores não seletivos da COX, Indometacina 10 $\mu\text{mol/L}$ e Ibuprofeno 10 $\mu\text{mol/L}$, na ausência ou presença de Catalase 300U/mL por 30 min e curvas concentração-efeito foram desenvolvidas para fenilefrina.

Como mostra a Fig. 42, ambos inibidores da COX, Indometacina (E_{max} : $1,4 \pm 0,3$ g; pD_2 : $7,22 \pm 0,05$; $n=4$) e Ibuprofeno (E_{max} : $1,6 \pm 0,1$ g; pD_2 : $7,24 \pm 0,05$; $n=5$), inibiram a resposta contrátil à fenilefrina, reduzindo a sua potência e o seu efeito máximo em relação ao controle (E_{max} : $2,2 \pm 0,1$ g; pD_2 : $7,44 \pm 0,03$; $n=5$). A incubação simultânea com catalase não foi capaz de reverter a hiporreatividade induzida pelos inibidores da COX, Indometacina (E_{max} : $1,6 \pm 0,2$ g; pD_2 : $7,05 \pm 0,10$; $n=4$) e Ibuprofeno (E_{max} : $1,3 \pm 0,2$ g; pD_2 : $7,07 \pm 0,10$; $n=4$).

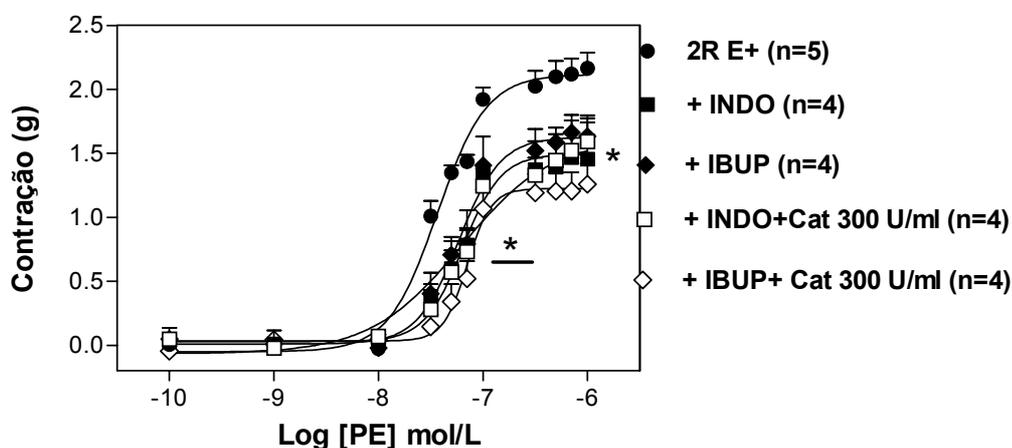


Fig. 42. Contração vascular em grama (g) induzida com fenilefrina (PE) em aortas com endotélio intacto (E+), isoladas de ratos normotensos (2R) em ausência ou presença de Indometacina (INDO 10 $\mu\text{mol/L}$) ou Ibuprofeno (IBUP 10 $\mu\text{mol/L}$) ou associação desses com catalase 300 U/ml. Os pontos representam a média percentual de contração vascular \pm EPM em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. *Representa diferença de E_{max} e pD_2 em relação ao controle normotenso com endotélio intacto ($p < 0,001$).

5.9.7 Seletividade do efeito da indometacina em reduzir a resposta contrátil à fenilefrina em aortas de ratos normotensos

Para averiguar se a redução da resposta contrátil induzida pelos inibidores da COX em aortas de 2R com endotélio, seria seletiva para o agonista do receptor metabotrópico do tipo α 1-adrenérgico, aortas de 2R foram contraídas com KCl 60 mmol/L ou U-46619 em ausência ou após incubação com Indometacina 10 μ mol/L, por 30 min. Experimentalmente, tomamos o cuidado para que na solução KCl 60 mmol/L utilizada para contrair preparações houvesse Indometacina 10 μ mol/L, a fim de que a inibição não fosse interrompida após a troca de solução para o estímulo contrátil.

Como mostra a Fig. 43, a Indometacina reduziu a resposta contrátil induzida tanto com fenilefrina (2R/E+/PE Emax: 2,2 \pm 0,1 g; n=5 para 2R/E+/PE/INDO Emax: 1,4 \pm 0,3 g; n=4; p<0,001) como com KCl (2R/E+/KCl 60mM Emax: 2,9 \pm 0,3 g; n=4; para 2R/E+/KCl 60mM/ INDO Emax: 2,0 \pm 0,3 g; n=4; p<0,001). Entretanto, a indometacina não modificou a resposta contrátil induzida pelo U-46619 em aortas de ratos 2R E+ (Emax: 3,43 \pm 0,11 g; n=6; INDO Emax: 3,36 \pm 0,22 g; n=6).

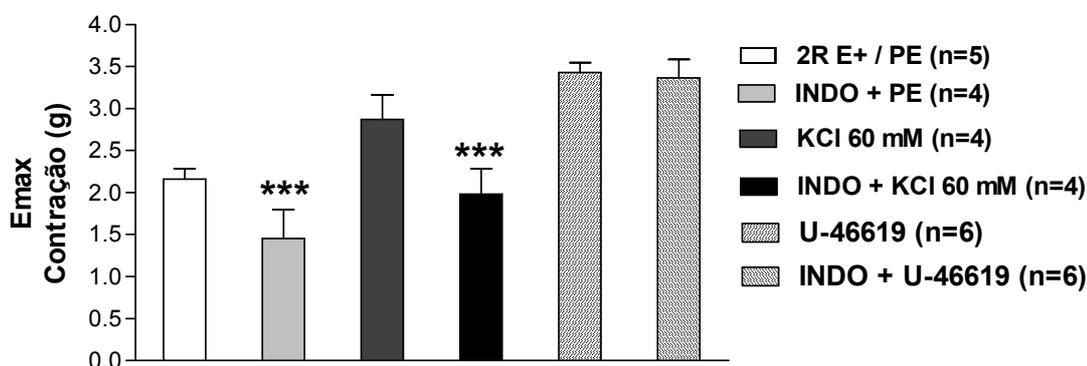


Fig. 43. Efeito máximo (Emax) de contração vascular induzida com KCl 60 mmol/L, PE 0,1 μ mol/L ou U-46619 0,1 μ mol/L em aortas com endotélio (E+), isoladas de ratos normotensos (2R), em ausência ou presença de indometacina (INDO, 10 μ mol/L). As barras representam a média de contração vascular \pm EMP em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. ***Representa diferença em relação ao respectivo controle estimulado com PE ou KCl em ausência de Indometacina (p<0,001).

5.9.8 Inibição não seletiva de Ciclooxigenase sobre a contração vascular induzida com U-46619 em aortas de ratos normotensos e hipertensos, com endotélio

O análogo do TXA₂ induziu resposta contrátil de maior amplitude que a PE em aorta de ratos 2R, E+ ou E- (Fig. 44 e Tab. 9), sem apresentar maior potência na resposta contrátil em relação à PE. De forma independente do agonista, o endotélio modula negativamente a potência da resposta contrátil. Por outro lado, verificamos que a acentuada modulação endotelial presente na resposta contrátil induzida pela PE (Emax) em aorta de ratos 2R-1C desapareceu quando a resposta contrátil foi induzida pelo U-46619 (Fig. 45 e Tab. 9).

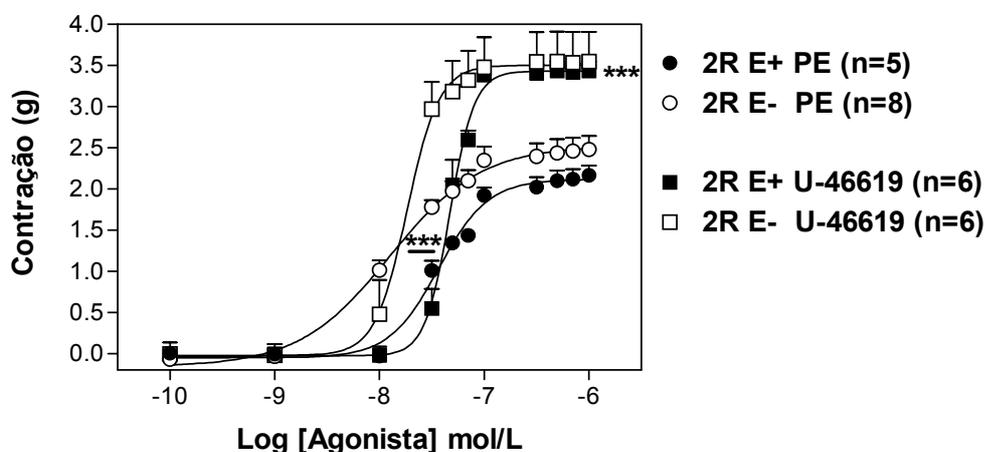


Fig. 44. Contração induzida com PE ou com o U-46619 em aortas com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-), isoladas de ratos 2R. Os pontos representam a média de contração \pm EPM em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. ***Representa diferença de Emax entre preparações contraídas com U-46619 em relação à PE, E+ ou E- ($p < 0,001$). ***Representa diferença de pD_2 entre preparações E- e controles E+ ($p < 0,001$).

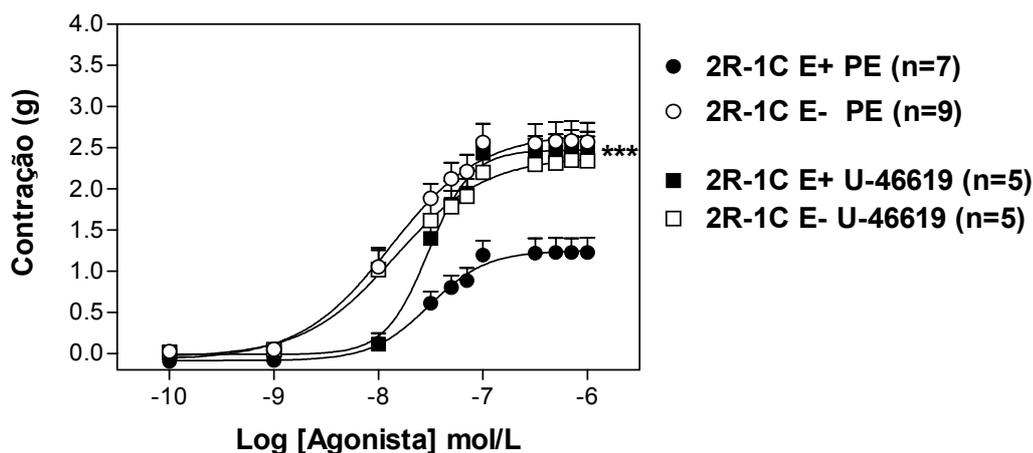


Fig. 45. Contração induzida com PE ou com o U-46619 em aortas em aortas com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-), isoladas de ratos 2R-1C. Os pontos representam a média \pm EPM em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. ***Representa diferença de Emax entre preparações com endotélio contraídas com U-46619 em relação à PE ($p < 0,001$).

A inibição não seletiva da COX reduziu a contração máxima induzida pela PE (Fig. 46 e Tab. 9). Entretanto, a contração máxima induzida pelo U-46619 foi maior do que para a PE. Além disso, a resposta ao U46619 não foi modulada pela inibição não seletiva da COX. Conforme os dados apresentados na Fig. 47 e Tab. 9, sob inibição não seletiva da COX, a resposta contrátil máxima induzida pelo U-46619 foi maior que a resposta para a PE em aorta de 2R-1C. As respostas contráteis induzidas por esses agonistas não foram moduladas pela inibição não seletiva da COX.

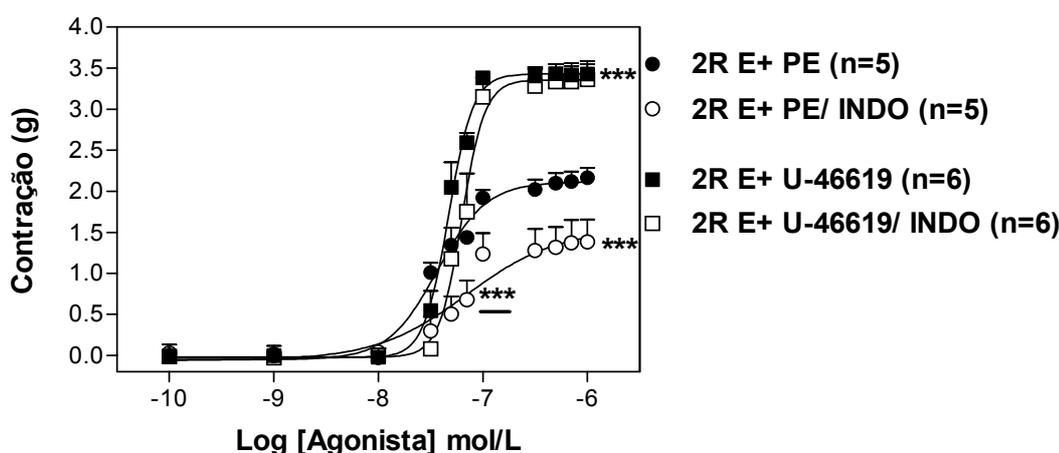


Fig. 46. Efeito do inibidor não seletivo da COX (INDO) sobre a Contração induzida com PE ou com o U-46619 em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R. Os pontos representam a média \pm EPM em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. ***diferença de Emax e pD_2 entre preparações contraídas com PE em ausência e presença de INDO 10 μ mol/L ($p < 0,001$).***diferença de Emax entre aortas E+ e E- contraídas com PE ou U-46619 ($p < 0,001$).

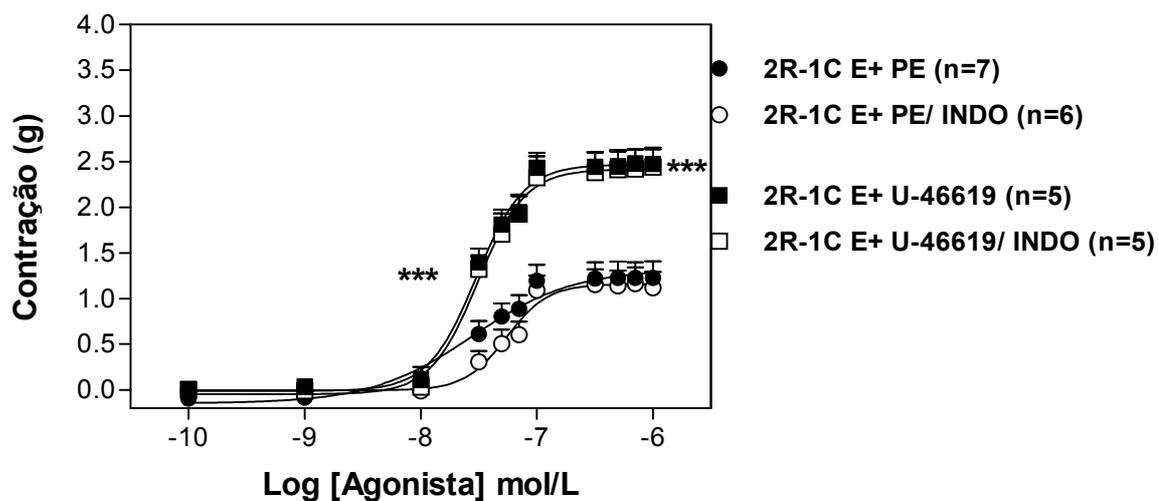


Fig. 47. Efeito do inibidor não seletivo da COX (INDO) sobre a Contração induzida com PE ou com o U-46619 em aortas com endotélio, isoladas de ratos 2R-1C. Os pontos representam a média \pm EPM em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. ***Representa diferença de Emax e pD_2 entre preparações contraídas com PE e U-46619 ($p < 0,001$).

Tabela 9. Valores de Emax e pD₂ obtidos na contração induzida com fenilefrina (PE) ou U-46619 em aorta com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-), isolada de ratos 2R e 2R-1C, em ausência ou presença de inibidor não seletivo da COX, Indometacina (INDO) 10 µmol/L.

| Grupos | PE ou U46619 | Emax ± EPM | pD ₂ | n |
|-----------|---------------|--------------------------|----------------------------|---|
| 2R/ E+ | PE | 2,2 ± 0,1 | 7,44 ± 0,03 | 5 |
| 2R/ E+ | PE/ INDO | 1,4 ± 0,3 ^{***} | 7,22 ± 0,05 ^{***} | 4 |
| 2R/ E+ | U-46619 | 3,5 ± 0,1 [#] | 7,34 ± 0,03 | 6 |
| 2R/ E+ | U-46619/ INDO | 3,4 ± 0,2 | 7,19 ± 0,04 | 6 |
| 2R/ E- | PE | 2,5 ± 0,2 | 7,93 ± 0,10 | 8 |
| 2R/ E- | U-46619 | 3,5 ± 0,4 [#] | 7,74 ± 0,7 | 6 |
| 2R-1C/ E+ | PE | 1,2 ± 0,2 | 7,54 ± 0,06 | 7 |
| 2R-1C/ E+ | PE/ INDO | 1,1 ± 0,2 | 7,25 ± 0,05 ^{***} | 6 |
| 2R-1C/ E+ | U-46619 | 2,47 ± 0,2 [#] | 7,51 ± 0,02 | 5 |
| 2R-1C/ E+ | U-46619/ INDO | 2,4 ± 0,2 | 7,49 ± 0,03 | 5 |
| 2R-1C/ E- | PE | 2,6 ± 0,2 | 7,89 ± 0,08 | 9 |
| 2R-1C/ E- | U-46619 | 2,3 ± 0,3 | 7,82 ± 0,09 | 5 |

Os valores representam o Emax ±EPM e pD₂ obtidos em “n” preparações isoladas de diferentes ratos. ^{***}Representa diferença de Emax entre preparações contraídas com U-46619 ou PE e os controles E+, sem INDO (p<0,001). ^{***}Representa diferença de pD₂ entre preparações contraídas com U-46619 ou PE e controles E+ sem INDO (p<0,001). [#]Representa diferença de Emax entre preparações contraídas com U-46619 em relação à PE, E+ ou E- (p<0,001).

5.9.9 Expressão proteica da eNOS total e fosforilação do resíduos de Ser¹¹⁷⁷ ou Thr⁴⁹⁵ em aorta de ratos 2R e 2R-1C com endotélio

Como mostra a Fig. 48A, a expressão proteica da eNOS, normalizada pela expressão de β -Actina, foi semelhante entre aortas E+ de ratos 2R ($0,44 \pm 0,05$; $n=7$) e 2R-1C ($0,55 \pm 0,03$; $n=7$). Quando avaliamos a intensidade de fosforilação da Ser¹¹⁷⁷ da eNOS em aortas congeladas, imediatamente após sua retirada dos ratos 2R e 2R-1C, sem tensão em banho para órgãos isolados e sem estímulo com PE, verificamos que a fosforilação basal da Ser¹¹⁷⁷ da eNOS foi semelhante entre aortas de ratos 2R ($0,25 \pm 0,05$; $n=8$) e 2R-1C ($0,35 \pm 0,04$; $n=10$) (Fig. 48B). Em outra série de experimentos, aortas com endotélio foram previamente montadas em banho para órgãos isolados, estabilizadas sob tensão de 1,5 g por 60 min e congeladas após a estabilização da resposta contrátil induzida por KCl 60 mmol/L, mimetizando a condição dos estudos funcionais de reatividade vascular. Nessas condições, verificamos que sob estímulo com KCl 60 mmol/L a fosforilação da Ser¹¹⁷⁷ da eNOS foi semelhante entre aortas de ratos 2R ($0,23 \pm 0,03$; $n=6$) e 2R-1C ($0,25 \pm 0,03$; $n=6$) (Fig. 48C).

Por outro lado, quando aortas com endotélio foram previamente montadas em banho para órgãos isolados, estabilizadas sob tensão de 1,5 g por 60 min e congeladas após a estabilização da resposta contrátil induzida por PE 0,1 μ mol/L, evidenciamos uma maior intensidade de fosforilação da Ser¹¹⁷⁷ da eNOS em aorta de ratos 2R-1C ($0,54 \pm 0,05$; $n=7$; $p < 0,001$) do que em aortas de ratos 2R ($0,17 \pm 0,04$; $n=7$) (Fig. 48D). Entretanto, em aortas estimuladas com PE 0,1 μ mol/L não houve diferença entre a fosforilação da Thr⁴⁹⁵ da eNOS em aorta de ratos 2R-1C ($0,20 \pm 0,03$; $n=8$) e 2R ($0,20 \pm 0,02$; $n=8$) (Fig. 48E).

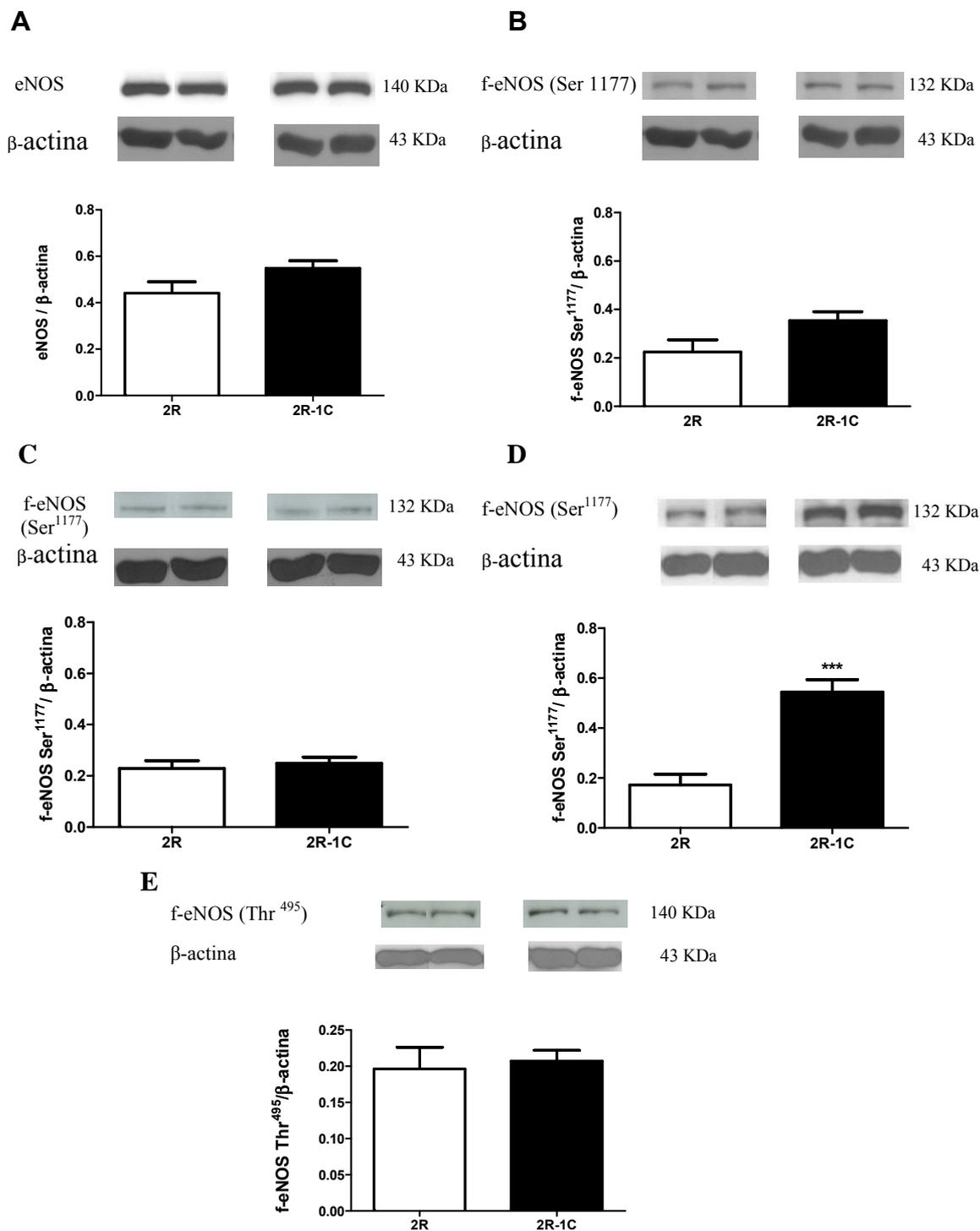


Fig. 48. A. Expressão proteica da NO-Sintase endotelial (eNOS) em aorta de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C) normalizada pela expressão de β-Actina (B) Fosforilação (f) da Ser¹¹⁷⁷ da eNOS vs β-Actina em aorta com endotélio sem tensão e sem estímulo (C) Fosforilação da Ser¹¹⁷⁷ da eNOS vs β-Actina em aorta E+ sobre tensão de 1,5g e estímulo com KCl 60 mmol/L. (D) Fosforilação da Ser¹¹⁷⁷ ou (E) Thr⁴⁹⁵ da eNOS vs β-Actina em aorta com endotélio sobre tensão de 1,5g e estímulo com PE 0,1 μmol/L. As barras representam a média ± EPM de n=7-10 aortas isoladas de diferentes ratos. *** Indica diferença entre 2R-1C e 2R (p<0,001).

5.9.10 Papel da Tirosina Quinase c-Src e da Via PI3K/Akt para fosforilação dos resíduos de Ser¹¹⁷⁷ e Thr⁴⁹⁵ em aorta de ratos 2R-1C

A inibição de tirosina quinase c-Src com PP₁ (10 μmol/L) por 30 min não modificou a fosforilação da Ser¹¹⁷⁷ (Controle: 0,19 ± 0,02; n=6; PP₁: 0,23 ± 0,03; n=7), mas reduziu a fosforilação da Thr⁴⁹⁵ da eNOS (Controle: 0,31 ± 0,01; n=7; PP₁: 0,21 ± 0,01; n=7; p<0,001) induzida pela PE 0,1 μmol/L. Por outro lado, a inibição da via PI3K/Akt com Wortmannin (20 μmol/L) por 30 min reduziu a fosforilação da Ser¹¹⁷⁷ para 0,09 ± 0,02; n=5 (p<0,05) e não modificou a fosforilação da Thr⁴⁹⁵ da eNOS induzida pela PE 0,1 μmol/L (0,33 ± 0,02; n=7) (Fig. 49).

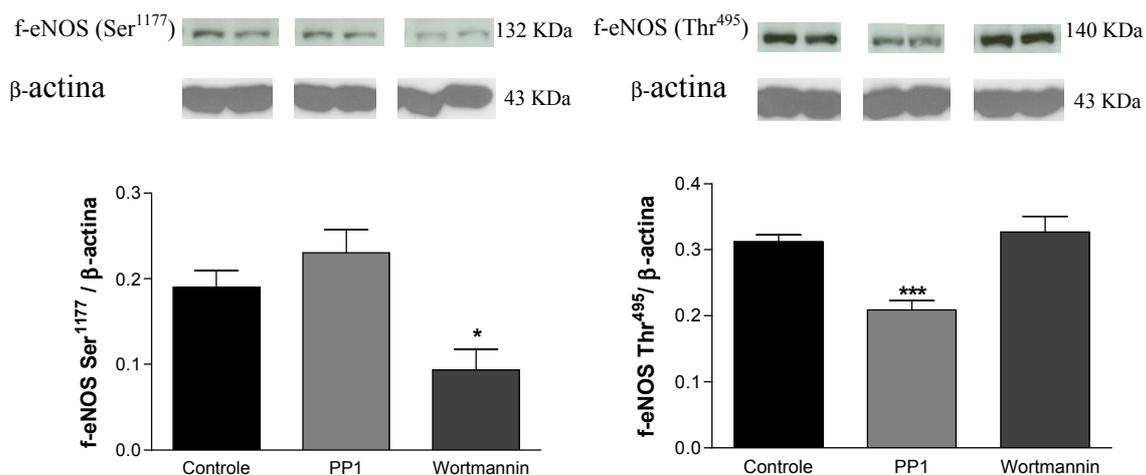


Fig. 49. Efeito da inibição de Tirosina Quinase (PP₁, 10 μmol/L) ou PI3K/Akt (Wortmannin, 20 μmol/L) sobre a fosforilação da Ser¹¹⁷⁷ e Thr⁴⁹⁵ da NO-Sintase endotelial em aorta com endotélio de ratos hipertensos (2R-1C) estimuladas com fenilefrina 0,1 μmol/L. *Indica diferença em relação ao controle (p<0,05). *Indica diferença em relação ao controle (p<0,001).**

5.9.11 Importância da Fenilefrina para produção de NO em células endoteliais da aorta de ratos 2R e 2R-1C

Utilizando a sonda fluorescente DAF-2DA, por Citometria de Fluxo, analisamos a produção de NO nas células endoteliais isoladas de ratos 2R e 2R-1C estimuladas ou não com PE (0,1 $\mu\text{mol/L}$ e 1 $\mu\text{mol/L}$).

A produção basal de NO foi maior em células endoteliais de ratos 2R (2R Basal: $7.758,0 \pm 356,3$; $n=4$; $p<0,001$; 2R-1C Basal: $5.901,7 \pm 396,8$; $n=4$) do que em 2R-1C. Entretanto, após estímulo com PE, a produção de NO foi reduzida em células endoteliais de ratos 2R (PE 0,1 $\mu\text{mol/L}$: $4.940,5 \pm 651,9$; PE 1 $\mu\text{mol/L}$: $4.284,2 \pm 181,3$; $n=4$), mas não é modificada em 2R-1C (PE 0,1 $\mu\text{mol/L}$: $6.712,5 \pm 323,9$; PE 1 $\mu\text{mol/L}$: $6.312,5 \pm 357,9$; $n=4$). Em células estimuladas com PE, a produção de NO em células de ratos 2R-1C foi maior do que em 2R (Fig. 50).

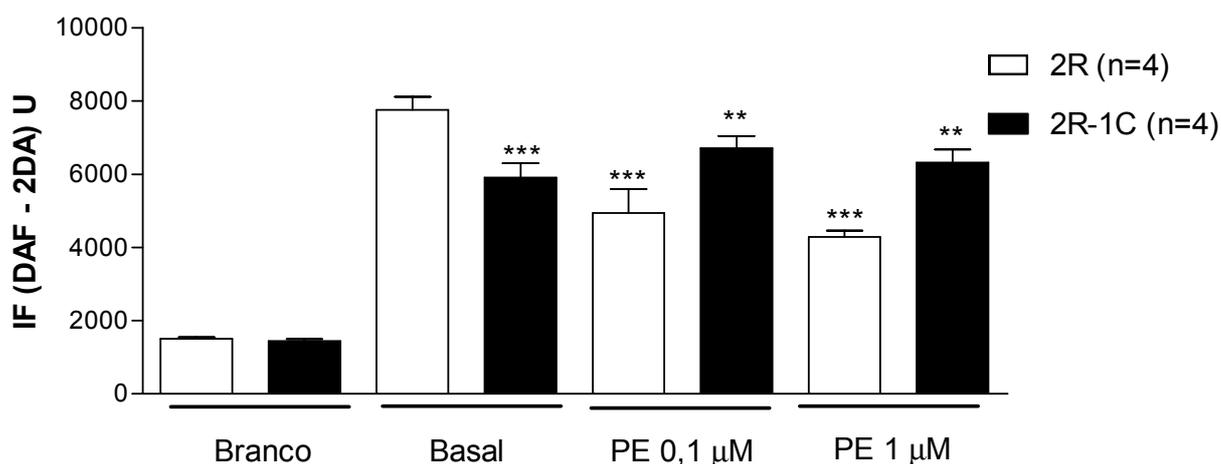


Fig. 50. Intensidade de Fluorescência (IF) emitida por DAF-2DA em células endoteliais isoladas de aorta de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C), em ausência de sonda (Branco) ou na presença, sem estímulo (Basal) ou estimuladas por 10 min com PE 0,1 $\mu\text{mol/L}$ ou 1 $\mu\text{mol/L}$. As barras representam a média \pm EPM de amostras de células endoteliais isoladas de 4 ratos diferentes. ***Indica diferença em relação ao 2R basal ($p<0,001$). **Indica diferença entre 2R-1C e 2R estimuladas com PE nas respectivas concentrações ($p<0,001$).

5.9.12 Expressão proteica das sub unidades da Guanilato Ciclase solúvel em aortas de ratos 2R e 2R-1C

Tanto a expressão da subunidade α da enzima Guanilato Ciclase solúvel (GCs) (2R-1C: $0,14 \pm 0,04$; $n=4$, 2R: $0,44 \pm 0,04$; $n=4$) quanto da subunidade β da GCs (2R-1C: $0,15 \pm 0,01$; $n=4$; $p < 0,001$, 2R: $0,28 \pm 0,03$; $n=4$) foi menor em aorta de ratos 2R-1C do que de 2R (Fig. 51).

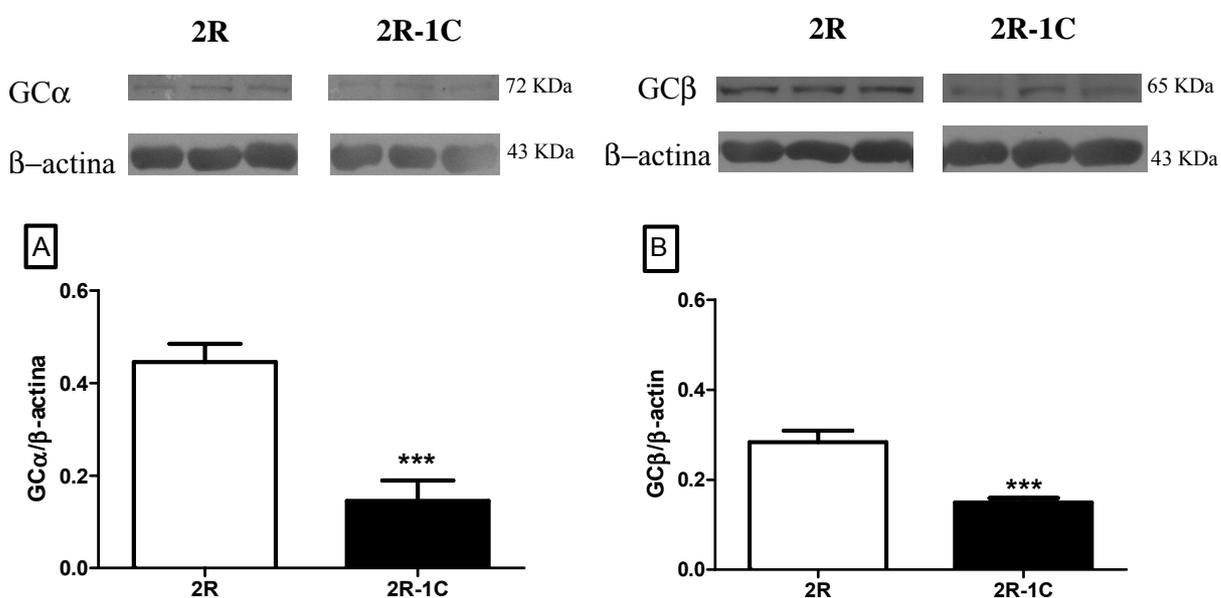


Fig. 51. Expressão proteica das subunidades α (A) e β (B) da enzima Guanilato Ciclase solúvel (GC) em aorta de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C). As barras representam a média \pm EPM para $n=7-10$ preparações isoladas de diferentes ratos. ***Representa diferença de 2R-1C e 2R, $p < 0,001$.

5.9.13 Inibição da fosfodiesterase 5 com Sildenafil em aortas de ratos 2R e 2R-1C contraídas com fenilefrina

Observamos que a adição cumulativa do sildenafil, até a concentração de 3 $\mu\text{mol/L}$, induziu resposta relaxante vascular apenas em aortas com endotélio. Embora nessa concentração ambas as preparações induzam efeito relaxante máximo semelhante, a inibição da PDE5 induziu relaxamento com maior potência em aortas de ratos 2R (E_{max} : $99,0 \pm 0,9\%$; pD_2 : $7,46 \pm 0,18$) do que em aortas de ratos 2R-1C (E_{max} : $104,5 \pm 4,0\%$; pD_2 : $6,03 \pm 0,31$; $p < 0,001$) (Fig.52).

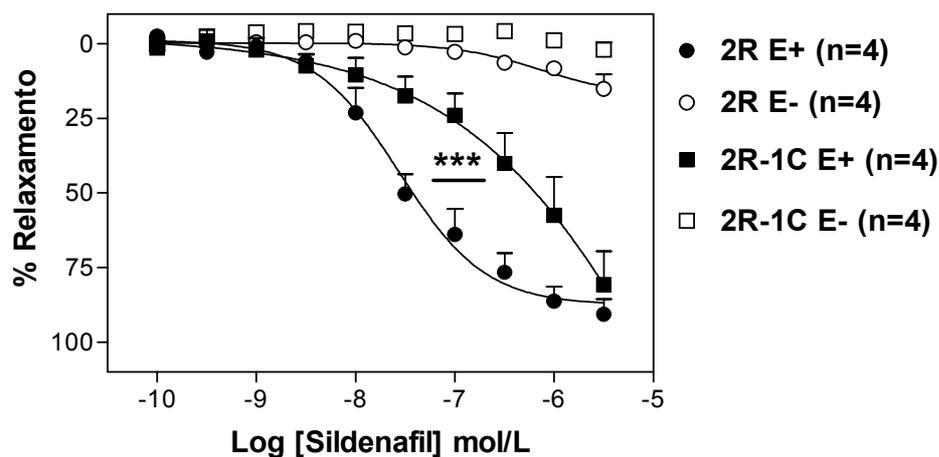


Fig. 52. Efeito relaxante do Sildenafil em aortas com ou sem endotélio, isoladas de ratos 2R e 2R-1C. Os pontos representam a média \pm EPM em "n" preparações isoladas de diferentes ratos. ***Representa diferença de E_{max} entre preparações E+ e E- e diferença de pD_2 entre 2R-1C E+ e 2R E+ ($p < 0,001$).

5.9.14 Produção de GMPc em aorta de ratos 2R e 2R-1C com endotélio estimuladas com fenilefrina

Após estímulo com PE, a produção de GMPc foi maior em aortas com endotélio de ratos 2R-1C ($220,0 \pm 10,7$ fmol; n=5; $p < 0,001$) do que em 2R ($125,6 \pm 12,3$ fmol; n=6) (Fig. 53A). Entretanto, como mostra a Fig. 53B, a concentração protéica de proteínas totais das aortas revela maior concentração protéica em amostras de ratos 2R-1C ($0,90 \pm 0,12$ g/mL; n=5; $p < 0,001$) do que de 2R ($0,32 \pm 0,05$ g/mL; n=6). Porém, quando a concentração absoluta de GMPc é expressa em relação à concentração de proteínas totais, desaparece a diferença entre os níveis de GMPc entre aortas de ratos 2R-1C ($510,4 \pm 158,9$ fmol/mg proteína; n=5) e 2R ($622,7 \pm 139,9$ fmol/mg proteína; n=6) com endotélio, estimuladas com PE (Fig. 53C).

5.9.15 Efeito de diferentes tensões de estiramento radial para contração induzida por fenilefrina em aorta de ratos 2R e 2R-1C com endotélio

Devido à importância da tensão de estiramento para o aumento da fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS e a produção de GMPc induzida por fenilefrina, avaliamos o efeito de diferentes tensões de estiramento radial sobre a resposta contrátil induzida por fenilefrina em aorta de ratos 2R e 2R-1C. Nossos resultados evidenciam que a resposta contrátil induzida por concentrações crescentes e cumulativas de fenilefrina aumentaram de forma dependente da tensão em aortas de ratos 2R e 2R-1C (Fig. 54, Fig. 55 e Tabela 10). Entretanto, a melhor resposta contrátil induzida por PE em aorta de ratos 2R E+ ocorreu em tensão de 1,5 g. Por outro lado, a melhor resposta contrátil induzida por fenilefrina em aorta de ratos 2R-1C E+ ocorreu em tensão de 3,0 g.

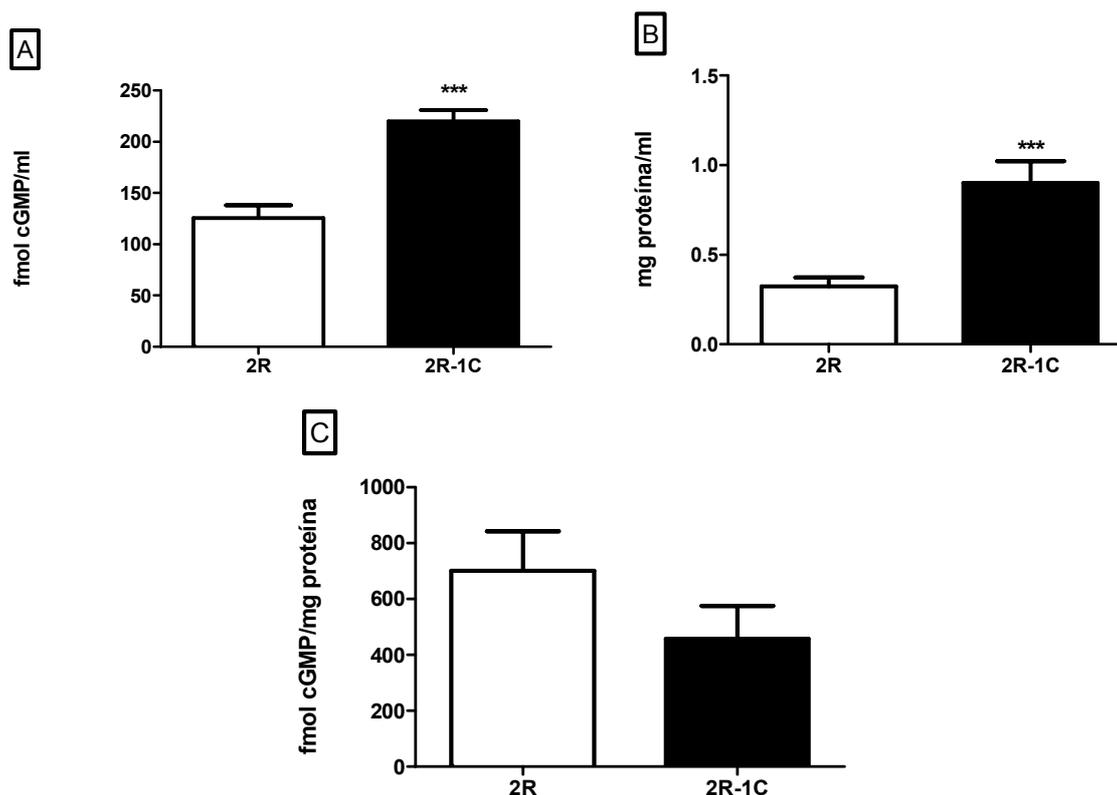


Fig. 53. Quantificação de GMPc em aortas com endotélio, de ratos normotensos (2R) e hipertensos renais (2R-1C) estimuladas com PE 0,1 $\mu\text{mol/L}$ sob tensão de 1,5 g, em banho para órgãos isolados, em presença do sildenafil. (A) Produção absoluta de GMPc. (B) Concentração de proteínas totais em aortas de ratos 2R e 2R-1C. (C) Produção de GMPc expressa em relação a proteínas totais. As barras representam a média \pm EPM para $n=5-6$ preparações isoladas de diferentes ratos. ***Representa diferença entre 2R-1C e 2R ($p<0,001$).

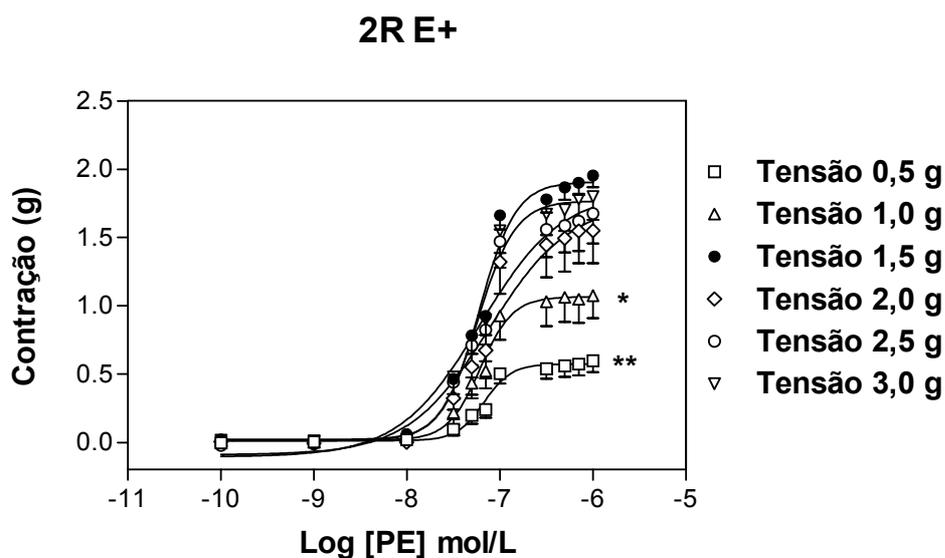


Fig. 54. Contração induzida com PE em aorta de ratos normotensos 2R com endotélio sob diferentes tensões de 0,5; 1,0, 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 g. Os pontos representam a média \pm EPM de ($n=6-8$) preparações isoladas de diferentes ratos. *Representa diferença de Emax em relação a preparação sob tensão de 1,5 g ($p<0,05$). **Representa diferença de Emax em relação a preparação sob tensão de 1,5 g ($p<0,01$).

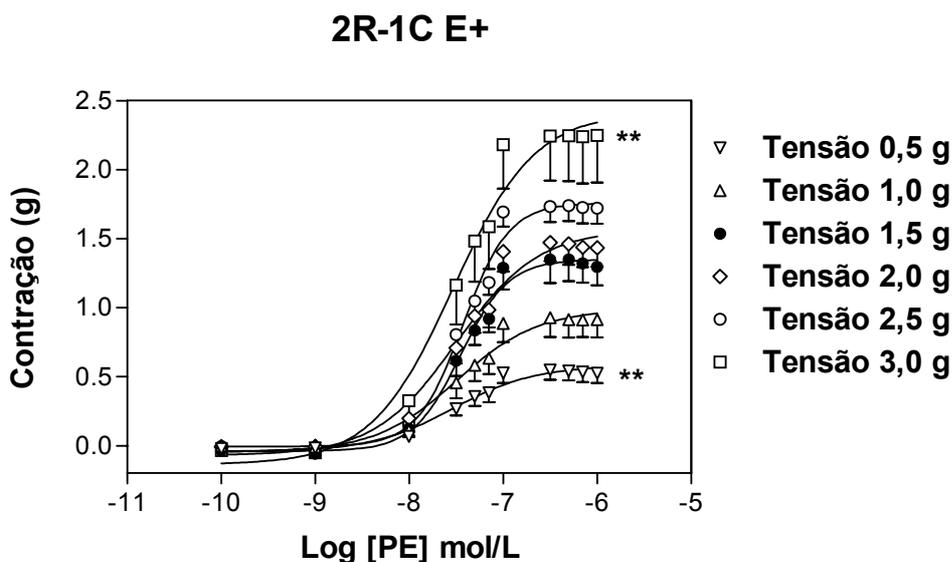


Fig. 55. Contração induzida com PE em aorta de ratos hipertensos 2R-1C com endotélio sob diferentes tensões de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 g. Os pontos representam a média \pm EPM de 5 preparações isoladas de diferentes ratos. **Representa diferença de Emax em relação à preparação sob tensão de 1,5 g ($p < 0,01$).

Tabela 10 – Valores de Emax e pD_2 para resposta contrátil em grama (g) induzida por fenilefrina em aortas com endotélio de ratos normotensos (2R) e hipertensos (2R-1C) sob diferentes tensões de estiramento radial em grama.

| Fenilefrina | | | | | | | |
|-------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------|-----------------------------------|-------------------------------------|----------|---|
| Tensão (g) | 2R | | | 2R-1C | | | n |
| | Emax (g) | pD_2 | n | Emax (g) | pD_2 | n | |
| 0,5 | 0,6 \pm 0,1 | 7,18 \pm 0,04 | 7 | 0,5 \pm 0,1 | 7,48 \pm 0,06** | 5 | |
| 1,0 | 1,2 \pm 0,2 | 7,20 \pm 0,05 | 7 | 0,9 \pm 0,1 | 7,46 \pm 0,08* | 5 | |
| 1,5 | 1,9 \pm 0,1 | 7,23 \pm 0,05 | 7 | 1,3 \pm 0,1** | 7,47 \pm 0,04** | 5 | |
| 2,0 | 1,6 \pm 0,2 | 7,17 \pm 0,04 | 8 | 1,4 \pm 0,1 | 7,47 \pm 0,04*** | 5 | |
| 2,5 | 1,7 \pm 0,2 | 7,24 \pm 0,06 | 6 | 1,7 \pm 0,1 | 7,43 \pm 0,04* | 5 | |
| 3,0 | 1,8 \pm 0,2 | 7,24 \pm 0,06 | 8 | 2,2 \pm 0,3 | 7,49 \pm 0,06* | 5 | |

*Indica diferença de pD_2 em relação ao controle 2R ($P < 0,05$). ** Indica diferença de Emax ou pD_2 em relação ao controle 2R ($P < 0,01$). ***Indica diferença de pD_2 em relação ao controle 2R ($P < 0,001$).

Discussão

6 DISCUSSÃO

O principal achado do nosso estudo foi que em aortas com endotélio sob tensão de repouso de 1,5 g, a resposta contrátil induzida pelo estímulo com agonista α_1 -adrenérgico (fenilefrina) é menor em aorta de ratos hipertensos (2R-1C) do que em aorta de ratos normotensos (2R). O ânion superóxido desempenha importante papel na resposta contrátil induzida pela fenilefrina em aortas de ratos 2R, sem endotélio. Em aorta de ratos 2R-1C este papel é atribuído ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A produção endotelial de H_2O_2 , induzida pela fenilefrina, contribui para ativação da eNOS, resultando na menor resposta contrátil à fenilefrina em aorta de 2R-1C, com endotélio, em relação à resposta contrátil à fenilefrina em aorta de ratos 2R.

Estudos biológicos têm sido desenvolvidos em vários leitos vasculares como artéria femoral, carótida, mesentérica e aortas de diferentes espécies de animais. Entretanto, as artérias de resistência com diâmetro luminal menor do que 300 μm contribuem para o controle da pressão arterial através dos efeitos sobre a RVP (Christensen and Mulvany, 2001; Martinez-Lemus et al., 2009). Embora artérias de condutância, como aorta, não participem do controle da PA, o estudo desses leitos vasculares tem contribuído para a descoberta de sinalizações celulares tanto em situações fisiológicas como patológicas.

Desde a surpreendente descoberta de Robert Furchgott em 1980, de que a remoção da camada endotelial de aortas isoladas de coelho impedia o efeito relaxante *in vitro* induzido por acetilcolina, vários grupos de pesquisa se empenharam na compreensão do controle local do tônus vascular (Furchgott & Zawadzki, 1980). Desta forma, substâncias vasoativas produzidas no endotélio têm

sido classificadas como fatores relaxantes ou contráteis derivados do endotélio (EDRFs ou EDCFs, respectivamente) por exercerem tais efeitos sobre as células do músculo liso vascular (CMLV).

A partir de então, muito tem se discutido sobre anormalidades da função endotelial, caracterizada como disfunção endotelial e sua contribuição para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como a hipertensão. Clinicamente, o termo disfunção endotelial tem sido associado a várias condições patológicas, embora experimentalmente o termo seja utilizado para definir um menor efeito vasodilatador dependente do endotélio relacionada à perda da biodisponibilidade do NO, atualmente, o mais potente e bem descrito EDRF.

Nosso laboratório de pesquisa tem se empenhado em estudar o papel do NO na indução do relaxamento vascular em ratos hipertensos renais (2R-1C), desenvolvidos pelo Modelo de Hipertensão Renovascular, descrito por Goldblatt. Nossos resultados demonstram que tanto o relaxamento vascular dependente (Callera et al., 2000) quanto o independente do endotélio (Callera et al., 2000; Oliveira et al., 2004; Bonaventura et al., 2005; Rodrigues et al., 2007; Rodrigues et al., 2008) estão prejudicados em vasos de ratos 2R-1C comparados aos seus controles normotensos 2R sham-operados.

Assim como descrito por Callera e cols. (2000), no presente estudo verificamos que aortas de ratos 2R-1C contraídas com fenilefrina, apresentam menor relaxamento vascular induzido com acetilcolina em relação a aortas de ratos 2R (Fig. 1). Este resultado reproduz estudos anteriores e, principalmente, confirma a efetividade na indução da disfunção endotelial, condição fundamental para execução do presente estudo. Contudo, a disfunção endotelial acima descrita também pode ser observada em outros modelos de hipertensão, como em ratos espontaneamente

hipertensos (SHR) (Konishi and Su, 1983; Lüscher and Vanhoutte, 1986), Dahl sensível a sal (Lüscher et al., 1987), Doca-sal (Wu et al., 1996) e ratos espontaneamente hipertensos com propensão ao desenvolvimento de acidente cerebral vascular (SHR-StrokeProne; Sunano et al., 1999).

A disfunção endotelial tem sido associada a múltiplas modificações funcionais celulares. Callera e cols. (2000) descreveram que a pré-contração de aortas de ratos 2R-1C, com KCl 60 mmol/L, abole as diferenças no relaxamento vascular tanto dependente quanto independente do endotélio. Com estes resultados, os autores descartam a possibilidade de alterações nos fatores endoteliais em aortas de ratos 2R-1C. Estes dados sugerem uma alteração na atividade de canais para potássio na membrana de CMLV, uma vez que o potencial de repouso da membrana plasmática foi menos eletronegativo, dificultando o processo de hiperpolarização de membrana destas células em 2R-1C. Por outro lado, Bonaventura e cols. (2005) estudaram os efeitos do NO independente do endotélio, utilizando o composto doador de NO, 15-ANE, em aortas de ratos 2R-1C e 2R sem endotélio. Os autores observaram efetiva participação dos canais para potássio no relaxamento vascular induzido por 15-ANE em 2R. Porém, tal mecanismo estava comprometido em 2R-1C, indicando um possível prejuízo na ativação de canais para potássio em CMLV de 2R-1C, corroborando os achados de Callera e cols. (2000).

Abordando outro importante aspecto da hipertensão 2R-1C, os estudos de Rodrigues e cols (2008), utilizando outro composto doador de NO, TERPY, contribuiu para discutir outra questão. O mais importante achado desse estudo foi que o menor efeito relaxante induzido pelo TERPY em 2R-1C comparado a 2R foi normalizado pela vitamina C, um agente antioxidante. Estes resultados evidenciaram o envolvimento de O_2^- no menor efeito relaxante induzido pelo TERPY.

Particularmente, na hipertensão renovascular o estresse oxidativo parece realmente ocupar posição de destaque no desenvolvimento da disfunção endotelial e na fisiopatologia da doença (Costa et al., 2009; Nishi et al., 2010). Nos estudos em que avaliamos o estresse oxidativo sistêmico pela reação com ácido tiobarbitúrico (TBARS), confirmamos o aumento do estresse oxidativo sistêmico em ratos 2R-1C em relação aos ratos 2R (Fig. 9). Nossas análises por fotomicrografias de segmentos de aortas com e sem endotélio de ratos 2R e 2R-1C, confirmam uma maior produção basal de EROs, detectada pela sonda DHE, em aortas de ratos 2R-1C com ou sem endotélio comparadas a 2R (Fig. 10). Entretanto, tanto o sequestrador de O_2^- quanto catalase reverteram essa maior produção de EROs em aorta de ratos 2R-1C para valores equiparáveis a 2R, evidenciando uma possível coexistência de O_2^- e H_2O_2 em aortas de ratos 2R-1C.

Anteriormente, estudos com o novo doador de NO, o Ru-4-Mercapto-NO-GOLD ($AuNPs-\{Ru-4PySH\}_n$) haviam sido iniciados devido a sua característica ação antioxidante e colinomimética endotelial. Os efeitos do doador de NO foram avaliados em aortas com disfunção endotelial provenientes do modelo de hipertensão renovascular. Conforme pode ser observado na figura 6, o composto $AuNPs-\{Ru-4PySH\}_n$ foi mais potente em aortas sem endotélio, de ratos 2R-1C do que de ratos 2R. Por outro lado, em aortas de 2R, o endotélio potencializou o relaxamento vascular induzido por $AuNPs-\{Ru-4PySH\}_n$ (Fig. 7). No entanto, em aorta de ratos 2R-1C a presença do endotélio não modificou o relaxamento vascular (Fig. 8). A partir de então, surgiram os seguintes questionamentos: O que faria o composto $AuNPs-\{Ru-4PySH\}_n$ ser mais potente em MLV de 2R-1C do que em 2R? Seria sua ação antioxidante? Qual seria a importância das EROs, O_2^- e H_2O_2 , na resposta vasodilatadora induzida por $AuNPs-\{Ru-4PySH\}_n$? Por que o endotélio

potencializa o relaxamento vascular em 2R, mas não em 2R-1C? O motivo seria a disfunção endotelial em 2R-1C?

Observações experimentais possibilitaram perceber que para melhor entender a disfunção endotelial sobre os aspectos de relaxamento vascular, precisaríamos inicialmente entender a contração sobre a qual tal relaxamento vascular seria induzido. É estabelecido que curvas de relaxamento vascular são desenvolvidas sobre uma contração prévia estável induzida por um agente contrátil de interesse. Durante a execução dos estudos com o doador AuNPs-{Ru-4PySH}_n, observamos que as pré-contrações induzidas com fenilefrina 0,1 µmol/L em aortas de ratos 2R-1C, com endotélio, apresentam menor amplitude do que 2R. No entanto, o relaxamento vascular percentual induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}_n apresentam-se idênticos nessas preparações. Portanto, partindo da afirmativa de que em 2R-1C a disfunção endotelial é caracterizada pelo menor relaxamento vascular dependente do endotélio em virtude da reduzida biodisponibilidade de NO, restou-nos questionar o porquê de aortas de 2R-1C com endotélio, contraírem menos do que 2R. Teria algum EDRF, diferente de NO ou somado a ele, modulando mais intensamente a contração induzida por fenilefrina em 2R-1C?

Tais resultados evidenciaram que para entender e responder o conjunto de questões, em estudo de reatividade vascular, seria necessário perceber a disfunção endotelial de fato como um binômio: endotélio e músculo, onde antes de averiguar a funcionalidade do endotélio com alguma ferramenta farmacológica (drogas), seria necessário compreender o quanto o agente pré-contrátil poderia influenciar as respostas do músculo liso vascular. Com o objetivo de responder tais questões e entender os mecanismos celulares envolvidos na disfunção endotelial, presente na hipertensão renovascular, avaliamos as respostas contráteis ao agonista α_1 -

adrenérgico em aortas com endotélio ou sem endotélio, em ausência ou presença de alguma ferramenta farmacológica de interesse.

A princípio, curvas concentração-efeito foram desenvolvidas e apresentadas, normalizadas (comparadas) ou não por uma referência científica considerada padrão ouro. Em estudos de reatividade vascular envolvendo contratilidade, a fim de se detectar alterações em mecanismos celulares em respostas dependentes de receptores metabotrópicos, preconiza-se expressar suas respostas em termos percentuais da resposta contrátil induzida por altas concentrações de Cloreto de Potássio (KCl). Isso se deve ao fato de que nessas condições, a contração é induzida por agente independente de receptor metabotrópico e ocorre por reduzir a probabilidade de efluxo de íons potássio do meio intracelular, conseqüentemente despolarizando a membrana celular e abrindo canais para cálcio voltagem-dependente.

Observa-se nas figuras 2 e 5, que a concentração de KCl 60 mmol/L foi inicialmente selecionada de forma que seu efeito contrátil sobre aortas sem endotélio de 2R e 2R-1C apresentasse semelhante magnitude de efeito máximo à contração induzida por fenilefrina em seu máximo efeito, de aproximadamente 2,5 gramas de contração. O referido estudo (Fig. 2) evidencia que KCl 60 mmol/L induz semelhante resposta contrátil entre aortas de ratos 2R e 2R-1C sem endotélio. Entretanto, o endotélio vascular reduz a resposta contrátil ao KCl 60 mmol/L somente em aortas de ratos 2R-1C (Fig. 2). A reduzida resposta contrátil em aortas de ratos 2R-1C com endotélio comparada a 2R foi confirmada para diferentes concentrações de KCl (Fig. 3).

Recorrendo-se a essa comparação com KCl 60 mmol/L, observa-se na figura 4 que em aortas de 2R e 2R-1C com endotélio, as respostas contráteis induzidas por

fenilefrina e expressas em porcentagem são sobreponíveis. O endotélio, tanto em 2R quanto 2R-1C, modula negativamente a resposta contrátil à fenilefrina. Por outro lado, aortas de 2R-1C sem endotélio, apresentam hipercontratibilidade à fenilefrina comparada à resposta induzida em 2R sem endotélio.

Em contrapartida, os resultados da figura 5 são diferentes daqueles observados na figura 4, visto que a resposta contrátil é apresentada em termos absolutos (grama). Na figura 5, aortas de ratos 2R e 2R-1C sem endotélio, revelaram que a resposta contrátil à fenilefrina não foram diferentes entre si em relação ao efeito máximo e potência. Conforme esperado, o endotélio vascular modula negativamente a contração induzida com fenilefrina, reduzindo sua potência em aorta de ratos 2R e potência e efeito máximo em aortas de ratos 2R-1C. Por outro lado, esperava-se que, devido à disfunção endotelial, a modulação negativa exercida pelo endotélio de aortas de ratos 2R-1C fosse menor do que a de ratos 2R. No entanto, ocorreu maior modulação negativa endotelial para aortas de ratos 2R-1C.

Tal discrepância entre os dados obtidos nas figuras 4 e 5 pode ser justificada pelos resultados observados na figura 2, onde é apresentada a contração máxima induzida por KCl 60 mmol/L em aortas de ratos 2R e 2R-1C, com e sem endotélio. Em aortas de 2R-1C com endotélio, a contração máxima induzida com KCl foi menor quando comparada a 2R, fato esse também observado em respostas contráteis absolutas máximas induzidas por fenilefrina. Conseqüentemente, contrações de aortas de 2R e 2R-1C com endotélio, induzidas com fenilefrina comparadas com KCl 60 mmol/L, apresentam respostas percentuais máximas semelhantes entre si, distribuindo proporcionalmente as alterações entre 2R e 2R-1C. Com base nos resultados da figura 4, é possível pressupor hipercontratibilidade do MLV de aortas de ratos 2R-1C ao estímulo com fenilefrina, como descrito por vários autores que

estudam respostas contráteis vasculares e as expressam em termos de contração prévia com KCl (Budzyn et al., 2005; Giachini et al., 2011). Contudo, considerando que a alteração funcional dos canais para K^+ em aortas de ratos 2R-1C invalida sua utilização como padrão de normalização, julgamos coerente prosseguir a avaliação por meio de respostas contráteis absolutas induzidas com fenilefrina em grama de contração.

Embora Callera e cols. (2000) e Bonaventura e cols. (2005) tenham descrito prejuízo na ativação dos canais para potássio em MLV de 2R-1C estudando relaxamento vascular independente do endotélio, os resultados das figuras 2 e 3 evidenciam também haver prejuízo na inativação dos canais para potássio em MLV aórtico de 2R-1C. Porém, essa inativação deve ser acentuada pelo endotélio. Assim, conclui-se que em 2R-1C parece ocorrer ineficiência de ativação dos canais para potássio em CMLV para relaxamento independente do endotélio e ineficiência de inativação para contração dependente do endotélio.

Considerando a disfunção dos canais para K^+ em aortas de 2R-1C com endotélio, seria interessante avaliar como estaria a resposta contrátil α_1 -adrenérgica nessas aortas após o seqüestro de ânion superóxido (O_2^-), visto que Rodrigues e cols. (2008) descreveram o envolvimento de uma elevada produção dessas EROs em 2R-1C, relacionando-a ao menor relaxamento vascular induzido com TERPY.

Com este propósito, observamos nas figuras 13 e 14 que a resposta contrátil absoluta induzida por fenilefrina em aortas de 2R-1C, com e sem endotélio respectivamente, não é influenciada pelo seqüestro de ânion superóxido por Tiron, independente de sua concentração. Entretanto, observa-se na figura 11 que a resposta contrátil absoluta induzida com fenilefrina em aortas de 2R, com endotélio, também não é influenciada pelo sequestro de ânion superóxido por Tiron,

independente de sua concentração. Por outro lado, na figura 12, onde semelhante estudo foi realizado em preparações sem endotélio, observa-se que o sequestro de ânion superóxido com Tiron, reduz a resposta contrátil induzida com fenilefrina. A resposta contrátil à fenilefrina é reduzida de forma concentração dependente com o seqüestro de O_2^- .

Os resultados indicam que a presença de O_2^- contribui para a contração em aortas, sem endotélio, apenas em aortas de ratos 2R. Entretanto, este resultado era esperado em aortas de ratos 2R-1C devido à aumentada concentração de EROs observada em aorta desses animais. Entretanto, o resultado mais controverso foi de que Tiron (1 mmol/L) não modificou a resposta contrátil induzida por PE em aorta de ratos (não-operados) de 200-250g (50-60 dias de idade) (Yogi et al., 2010). A critério de confirmação, ratos de 200g foram submetidos a esse protocolo (dados não apresentados) e de fato, o Tiron 1mmol/L não modificou a contração induzida por PE em aortas desses animais, sem endotélio. Com base nesses dados, é possível pressupor que o envelhecimento do animal ou mesmo o estresse cirúrgico contribua para que haja um rearranjo redox celular e que o O_2^- passe a participar da resposta contrátil celular induzida por PE em aorta de ratos normotensos (2R), sem endotélio, visto que apresentam peso corporal (400-450g) e idade (80-95 dias) superiores aos dos ratos não operados.

Com base em tais resultados e na relação existente entre O_2^- e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) explorada por vários autores (Rodríguez-Martínez et al., 1998; Patterson et al., 1999; Boulden et al., 2006; Yin & Huang, 2007; García-Redondo et al., 2009), passamos a avaliar se o H_2O_2 poderia contribuir de alguma forma, para os eventos até então observados. Foi demonstrado que o O_2^- é substrato para a enzima superóxido dismutase (SOD), responsável pela catálise reacional de O_2^- a H_2O_2 . A

princípio, uma maior produção de O_2^- resultaria em maior conversão a H_2O_2 , que se acumularia caso não houvesse catalase suficiente e ativa para catalisar a degradação de H_2O_2 em água e oxigênio molecular. De fato, há relatos de que a atividade da catalase está reduzida em aorta e rins de ratos com insuficiência renal induzida pelo modelo experimental de nefrectomia 5/6 (Sindhu et al., 2005), embora em alguns modelos de hipertensão sua expressão e/ou atividade esteja ou não alterada (Ülker et al., 2003; Husain et al., 2007; Xu et al., 2008).

Observa-se nas figuras 15 e 16, que a remoção de H_2O_2 por catalase, em aortas de 2R com e sem endotélio, não alterou a resposta contrátil induzida com fenilefrina. Embora em aortas de 2R, sem endotélio, nossos resultados indiquem um aparente aumento na contração para fenilefrina dependente da remoção de H_2O_2 , confirma-se na figura 17 que o efeito máximo induzido com fenilefrina não foi significativo para diferentes intensidades de remoção de H_2O_2 . Por outro lado, na figura 19 observa-se que, independente da intensidade de remoção de H_2O_2 em aortas de 2R-1C sem endotélio, a remoção de H_2O_2 reduziu a potência e o efeito máximo da resposta contrátil induzida com fenilefrina. Tal resultado indica que o H_2O_2 contribui para a resposta contrátil induzida com fenilefrina em aortas de 2R-1C. Dentre os resultados apresentados, é interessante ressaltar que o O_2^- , que é importante para a contração do MLV de 2R, é aparentemente substituído por H_2O_2 em 2R-1C.

Surpreendentemente, a remoção de menores concentrações de H_2O_2 em aortas de 2R-1C com endotélio, aumenta o efeito máximo da resposta contrátil induzida por fenilefrina (Fig. 18), revertendo a hiporreatividade à fenilefrina observada na figura 5. No entanto, a maior concentração de H_2O_2 não altera a hiporreatividade à fenilefrina. Gil-Longo e González-Vásquez (2005) estudando os

efeitos de H_2O_2 exógeno em aortas de ratos, mostraram em um único trabalho a existência de quatro possíveis diferentes efeitos vasculares induzidos pelo H_2O_2 em aorta de ratos.

Embora paradoxal, o H_2O_2 aparentemente pode induzir tanto efeito contrátil quanto relaxante em aorta de ratos, cuja condição determinante para a observação de cada efeito é a concentração em que se encontra o H_2O_2 no MLV. Dentre os relatos de Gil-Longo e González-Vásquez (2005), destaca-se que sobre a pré-contracção com fenilefrina, a adição de concentrações de H_2O_2 até $30 \mu\text{mol/L}$ induziu aumento no tônus do MLV e concentrações próximas de $100 \mu\text{mol/L}$ produziu uma contracção transiente seguida de um rápido relaxamento vascular independente do endotélio.

Com base no possível duplo efeito induzido por H_2O_2 em células do MLV, o resultado da figura 18 pode indicar que em aortas de 2R-1C com endotélio, o H_2O_2 encontra-se em elevada concentração, condicionando um efeito relaxante vascular indutor de hiporreatividade à fenilefrina. Logo, uma remoção parcial de tal H_2O_2 poderia reverter a hiporreatividade induzida. Contudo, uma remoção mais intensa desse H_2O_2 pode prejudicar seu efeito como agente contrátil do MLV observado na figura 19, evidenciando uma aparente não alteração da resposta de hiporreatividade à fenilefrina.

Nesse contexto, avaliamos a produção de EROs em células endoteliais isoladas de aortas de ratos 2R e 2R-1C. Em células endoteliais isoladas de aorta de ratos 2R, na ausência ou presença dos agentes antioxidantes Tiron e Catalase em baixas concentrações, a presença de fenilefrina não alterou a produção de EROs em relação ao basal (Fig. 20, Tabela 5). Porém, a maior concentração de catalase ou sua associação com Tiron reduziram a produção de EROs. Para nossa surpresa,

como pode ser observado na Fig. 21 e Tabela 5, em células endoteliais de aorta de 2R-1C, a produção de EROs foi intensamente aumentada pelo estímulo com fenilefrina. Porém, os agentes antioxidantes em todas as concentrações utilizadas, ou suas combinações, reduziram a aumentada produção de EROs aos níveis basais. Estes resultados indicam que, em células endoteliais da aorta de ratos 2R-1C, receptores α_1 -adrenérgicos podem contribuir para o aumento na produção de EROs.

Visto a importância do H_2O_2 para modificação da resposta contrátil induzida por PE em aorta de ratos 2R-1C com e sem endotélio, recorreremos a uma quantificação mais específica para detecção de H_2O_2 , o Amplex Red. Assim, aortas com e sem endotélio, previamente estimuladas ou não com PE em banho para órgãos isolados, tiveram a produção de H_2O_2 quantificada. Como pode ser observado na figura 22, em condição basal, a produção de H_2O_2 é maior em aortas com endotélio tanto em ratos 2R quanto 2R-1C. Por outro lado, após estímulo com PE, aortas de ratos 2R com endotélio tem a produção de H_2O_2 reduzida em relação ao basal, porém tal produção é mantida em aortas de ratos 2R-1C com endotélio. Em aortas sem endotélio, apenas 2R-1C tem a produção de H_2O_2 aumentada após estímulo com PE. Entretanto, mesmo sob estímulo, a produção de H_2O_2 em aortas de ratos 2R-1C com endotélio é maior do que em aortas sem endotélio. Estes dados reafirmam a importância da estimulação adrenérgica para produção de H_2O_2 no MLV e células endoteliais de ratos 2R-1C.

Outro ponto importante seria determinar a fonte de produção de H_2O_2 em aortas de ratos 2R-1C. Respeitando as condições de maior produção de H_2O_2 , realizamos inibições enzimáticas em aortas de ratos 2R sem tensão de repouso e sem estímulo com fenilefrina, e em 2R-1C sob tensão de 1,5 grama e estímulo com

fenilefrina. Com base nos resultados da figura 23, observa-se que as enzimas COX, NADPH Oxidase, Xantina Oxidase e SOD contribuem para produção de H_2O_2 em aortas de ratos 2R-1C. A participação de SOD nessa produção torna evidente que parte do H_2O_2 advém da conversão de O_2^- . Entretanto, embora tenha sido relatado desacoplamento da NOS e consequente produção de EROs em alguns modelos de hipertensão, nossos dados revelam que para o estímulo com PE a enzima NOS não participa na produção de H_2O_2 . Embora essas tenham sido as enzimas geralmente associadas à produção de EROs vascular, outras não avaliadas poderiam também contribuir para esse aporte de H_2O_2 , o que significa inferir que a inibição de uma única enzima pode não anular a produção de H_2O_2 visto que outras poderiam compensar tal inibição.

Tem sido proposto no modelo de hipertensão renovascular, que a pressão arterial sistólica tem um significativo aumento a partir da segunda semana após introdução do clipe na artéria renal, que se estabiliza a partir da 5ª semana (Oliveira-Sales, 2010). Durante esse período, observa-se um gradual aumento na produção de O_2^- , possivelmente proveniente do aumento da atividade de NADPH Oxidase, estimulada pela elevação dos níveis circulantes de Ang II (Griendling et al., 1994). Entretanto, embora a NADPH Oxidase seja predominantemente importante como fonte inicial de produção de EROs nesse modelo, os danos causados até a condição de hipertensão estabelecida possam culminar na alteração funcional de outras enzimas, as quais passariam a contribuir para manutenção do estresse oxidativo.

Mediante o conjunto de evidências da presença de O_2^- em MLV de 2R e H_2O_2 em 2R-1C, avaliamos a influência dessas EROs sobre o efeito relaxante induzido pelo composto doador de NO AuNPs-{Ru-4PySH}_n. Observa-se na figura 24 que tanto a remoção de O_2^- quanto H_2O_2 , por Tiron e Catalase respectivamente, não

alteraram a resposta relaxante induzida pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}_n em aortas de ratos 2R sem endotélio. Por outro lado, a presença específica da catalase removendo o H₂O₂ foi determinante para reduzir o efeito relaxante induzido pelo composto (Fig. 25).

Há de se entender que, assim como o O₂⁻, o H₂O₂ é uma molécula cuja propriedade redox é altamente dependente do meio em que se encontra, ou seja, dependendo do potencial redutor das moléculas do meio, essas EROs podem se comportar como agentes oxidantes ou redutores (Sawyer & Valentine, 1981; Baker et al., 2000). Assim, o Tiron como molécula antioxidante pode contribuir para redução química do H₂O₂ a oxigênio molecular, diminuindo sua concentração no meio. Por outro lado, a catalase tem especificidade peroxidase para o H₂O₂, incapaz de dismutar o O₂⁻. Ou seja, o Tiron em aortas de ratos 2R-1C, deve estar promovendo a diminuição da concentração do H₂O₂ com menor eficiência do que a catalase, contudo podendo resultar num efeito final semelhante ao promovido pela catalase.

Dado interessante é o fato de que, ao contrário do observado para o doador de NO TERPY em nosso laboratório (Rodrigues et al., 2008), em aortas de 2R-1C as EROs, mais especificamente o H₂O₂, contribuem para o relaxamento vascular induzido pelo composto AuNPs-{Ru-4PySH}_n. Recentemente, trabalhos químicos têm proposto a utilização de AuNPs para o desenvolvimento de eletrodos para detecção de H₂O₂, devido a sua alta sensibilidade ao H₂O₂ (Yáñez-Sedeño and Pingárron, 2005). Visto que a remoção de H₂O₂ do MLV de aortas de ratos 2R-1C com catalase reduz a resposta contrátil induzida pela PE, possivelmente, a maior potência vasodilatadora observada para o composto AuNPs-{Ru-4PySH}_n se deva ao mecanismo sinérgico de liberação de NO do composto, induzindo

vasodilatação, associado à redução da resposta contrátil da PE pela remoção de EROs, principalmente H_2O_2 .

Em conjunto, nossos resultados revelam a importância da produção de H_2O_2 em aortas de ratos 2R-1C como sinalizador celular para resposta contrátil induzida por fenilefrina. Contudo, seus efeitos sobre o MLV e células endoteliais parecem ser determinados pela concentração em que se encontra em aortas com ou sem endotélio. Nessas condições, coube-nos questionar sobre o papel do H_2O_2 para a atividade das enzimas NO-Sintase e COX nas aortas de 2R e 2R-1C. Dentre os relatos de Gil-Longo and González-Vásquez (2005), destaca-se que sobre a pré-contracção com fenilefrina, a adição de concentrações de H_2O_2 até 0,03 mM induz aumento no tônus do MLV e concentrações próximas de 0,1mM produz contracção transiente seguida de rápido relaxamento vascular. Contudo, o mais surpreendente é o fato de que a inibição não seletiva da ciclooxigenase com indometacina (20 μ M) abole a contracção induzida por H_2O_2 , embora não interfira com o efeito relaxante. O fato é que realmente deve existir uma relação entre EROs, como o H_2O_2 e a produção de fatores contráteis prostanóides provenientes da atividade da COX e além disso atue como fator relaxante independente de COX. Logo, esse relato possibilitou-nos utilizar H_2O_2 exógeno como ferramenta inicial para avaliar a atividade da enzima COX em aorta de ratos 2R e 2R-1C, com e sem endotélio.

Dessa forma, para a execução desse nosso estudo nos atentamos para alguns pontos que julgamos importantes. Visto que em aortas de 2R e 2R-1C, sem endotélio, a resposta contrátil induzida pela fenilefrina é semelhante, poderíamos utilizar a mesma concentração de fenilefrina como agente pré-contrátil em ambos os casos, desde que a concentração selecionada permitisse ao H_2O_2 a capacidade de induzir uma modulação tanto positiva (contracção) ou negativa (relaxamento) do

tônus vascular aórtico. Resguardada tal condição, utilizamos uma concentração de 10 nM de fenilefrina, em aortas sem endotélio. Entretanto, em aortas de ratos com endotélio, onde os efeitos contráteis máximos induzidos pela fenilefrina são diferentes entre 2R e 2R-1C (Fig. 5), inicialmente reduzimos a concentração de fenilefrina em aorta de ratos 2R para aproximar a amplitude contrátil à observada em 2R-1C, porém a capacidade de sustentação da pré-contração mostrou-se comprometida. Dessa forma, utilizamos a concentração de 100 nM de fenilefrina tanto em aortas intactas de 2R quanto 2R-1C, resguardando a acentuada modulação negativa endotelial observada em 2R-1C.

Com base na figura 26, observa-se que o H_2O_2 induz semelhante perfil de resposta (contração/relaxamento em grama) entre aortas de 2R e 2R-1C. No entanto, como pode ser visto na figura 27, em aortas com endotélio, o aumento na concentração de H_2O_2 em 2R induz a uma redução da resposta contrátil aproximando-a da resposta contrátil vascular observada em 2R-1C. Em aorta com endotélio de 2R-1C, nenhuma alteração é observada quanto à resposta até a concentração de 0,1 mmol/L de H_2O_2 . Entretanto, a partir dessa concentração observa-se que o aumento na concentração de H_2O_2 até 1 mmol/L em aortas de 2R-1C com endotélio induz uma resposta contrátil que é significativamente superior aos níveis de pré-contração induzido por fenilefrina, o que não é observado em aortas de 2R com endotélio.

Tais resultados indicam que em presença de H_2O_2 em baixas concentrações, as aortas de 2R contraídas com fenilefrina podem ter acentuada sua modulação negativa endotelial. No entanto, as aortas de 2R-1C encontram-se inicialmente sujeitas a uma forte modulação negativa endotelial e a adição de H_2O_2 não intensifica tal resposta. Por outro lado, a presença de H_2O_2 em concentrações mais

elevadas contribui para um aumento significativo na resposta contrátil sustentada por fenilefrina, o que não acontece em aortas de ratos 2R.

Conforme resultados de estudos por citometria de fluxo (dados não apresentados), células endoteliais de ratos 2R expostas à H_2O_2 , em concentrações superiores a 1 mmol/L, passam a apresentar redução de suas dimensões e complexidade, indicativo de indução do processo de apoptose. É válido observar na figura 27 que é justamente a partir dessa concentração que se inicia o acentuado processo de relaxamento vascular em aortas intactas de ratos 2R, embora ainda não induza relaxamento vascular em 2R-1C, um indicativo de adaptação das aortas de 2R-1C a maiores concentrações de H_2O_2 . Por esse motivo, para concentração de H_2O_2 superiores a 1 mmol/L não consideramos o efeito observado como uma resposta de relaxamento vascular para células viáveis.

Semelhante ao relatado por Gil-Longo e González-Vásquez (2005), embora utilizando indometacina 10 $\mu\text{mol/L}$ ao invés de 20 $\mu\text{mol/L}$ como os autores, observamos na figura 28 que a inibição não seletiva da COX, em aorta de ratos 2R sem endotélio, reduz a resposta contrátil sustentada pela fenilefrina evidenciando uma abolição da resposta contrátil induzida por H_2O_2 a 0,1 mmol/L. Entretanto, sob as mesmas condições (Fig. 29), nenhuma alteração foi observada em aortas de 2R-1C, sem endotélio. Os dados sugerem que a resposta contrátil induzida por H_2O_2 apresenta como estrutura efetora produtos da enzima COX em aortas de ratos 2R. A falha do H_2O_2 em induzir resposta contrátil dependente de COX em aortas de 2R-1C, sem endotélio, pode ser indicativo de que em MLV de aortas de ratos 2R-1C tal enzima encontra-se inativa ou, mais provavelmente, essa enzima já esteja sobre condições de máxima atividade e a presença de H_2O_2 exógeno não é capaz de aumentar sua atividade, ao contrário do que ocorre em 2R.

A inibição da COX em aorta com endotélio de ratos 2R (Fig. 30) apresenta resultado semelhante ao observado em aortas sem endotélio (Fig. 28). Por outro lado, a inibição da COX em aortas com endotélio de ratos 2R-1C (Fig. 31) reduz a intensa resposta contrátil observada na condição controle. Esses resultados sugerem existência da enzima COX em células endoteliais de aorta de ratos 2R-1C potencialmente capazes de ter sua atividade intensificada pela elevação nas concentrações de H_2O_2 . Uma vez saturada a capacidade máxima de ativação da COX por H_2O_2 em MLV aórtico de 2R-1C, um aumento na expressão de COX em células endoteliais pode representar uma forma da aorta amplificar sua capacidade contrátil, em presença de maiores concentrações de H_2O_2 , pela produção de prostanoídes contráteis derivados da COX.

Por outro lado, como mostra a figura 32, a inibição da NO-sintase em aorta reverte tanto em 2R, o relaxamento vascular inicial observado para baixas concentrações de H_2O_2 , quanto em 2R-1C, a exacerbada modulação negativa endotelial para pré-contração induzida por fenilefrina. Em conjunto, os dados apresentados indicam que o H_2O_2 pode aumentar a atividade da NO-sintase em baixas concentrações (0,01 $\mu\text{mol/L}$ a 0,03 mmol/L) em células endoteliais de ratos normotensos, porém em células endoteliais de ratos hipertensos renais isso não é visto, uma vez que a atividade da NO-sintase já se encontra aumentada, possivelmente devido à maior concentração basal de H_2O_2 . Por outro lado, em maiores concentrações (0,03 mmol/L a 0,3 mmol/L) o H_2O_2 pode aumentar a atividade de COX, no MLV da aorta de ratos 2R independente da presença do endotélio. Entretanto, tal efeito contrátil pode ser claramente observado em aortas de ratos 2R-1C apenas com endotélio intacto.

Por se tratar de dados estimados de uma análise por reatividade vascular e visto que o H_2O_2 regula tanto o processo de relaxamento quanto contração vascular, as faixas de concentrações de H_2O_2 propostas para indução de relaxamento via ativação da NO-sintase e contração via ativação de COX provavelmente se sobrepõem, uma vez que em concentrações intermediárias a indução dos processos de relaxamento e contração provavelmente coexistam.

Uma vez evidenciada uma diferente participação de EROs na modulação do tônus vascular entre aortas de ratos 2R e 2R-1C, e uma estreita relação entre a concentração de H_2O_2 e a atividade das enzimas NOS e COX, nesse ponto do trabalho iniciamos uma avaliação da contribuição dos produtos das enzimas endoteliais NOS e COX, visto que estão amplamente relacionadas com os EDRFs e EDCFs. Para tal estudo, verificamos o efeito dos inibidores L-NAME, indometacina ou a combinação de ambos, sobre a contração induzida pela fenilefrina em aortas de ratos 2R e 2R-1C, com endotélio. Observa-se nas figuras 33 e 34 a existência de uma nítida diferente interação entre a atividade da NO-sintase e da ciclooxigenase entre aortas de 2R e 2R-1C, uma vez que em aortas de ratos 2R-1C de forma contrária a 2R, a acentuada modulação negativa induzida por fatores endoteliais foi abolida por L-NAME, mas Indometacina não produziu nenhum efeito (Fig. 34). Esses resultados evidenciam que a aparente inatividade da COX está possivelmente condicionada à hiperativação da NO-sintase em aorta de ratos 2R-1C com endotélio.

Em aortas de ratos 2R, após inibição da COX com indometacina, observa-se a intensificação da modulação negativa endotelial (Fig. 33). Esses resultados possibilitam sugerir que, em 2R, a COX endotelial quando não inibida deva contribuir com a produção de um fator contrátil e que esse fator seja perdido após sua inibição,

ou que a COX após sua inibição contribua para potencialização na produção de um fator relaxante.

Para verificar o quanto da modulação negativa endotelial poderia ser atribuído ao NO, a contração à fenilefrina foi avaliada em aortas de ratos 2R e 2R-1C com endotélio, em presença de ODQ, a fim de inibir o principal alvo biológico para o NO, a guanilato ciclase solúvel (GCs). Para nossa surpresa, tal inibição resultou na total inibição da modulação negativa exercida pelo endotélio, tanto em aortas de ratos 2R-1C, quanto de 2R na presença de inibição da COX por indometacina.

É proposto que a ativação da GCs pelo NO seja proveniente de sua interação, de forma reversível, com o grupamento heme da enzima. No entanto, a efetividade da interação do NO com porção heme da GCs depende de que o ferro (Fe) esteja no estado de oxidação Fe^{+2} . A interação com o Fe^{+2} promove o tensionamento de um resíduo de histidina, que aumenta a atividade da GCs (Evgenov et al.; 2006). Por outro lado, a efetividade da inibição da GCs por ODQ depende justamente da oxidação do grupamento heme para o estado de oxidação Fe^{+3} , impedindo a interação com o NO.

É importante ressaltar que, embora haja na hipertensão renovascular um prejuízo no relaxamento vascular dependente do endotélio em ratos 2R-1C e evidente redução na biodisponibilidade de NO proveniente de doadores de NO exógeno (Rodrigues et al., 2008), a atividade da GCs está aparentemente íntegra, visto que a produção de GMPc estimulada com acetilcolina em 2R-1C, não está alterada em relação a 2R (Callera et al., 2000).

Interessantemente, a inibição não seletiva da NO-sintase, possível fonte de NO; ou a inibição da GCs, principal alvo biológico do NO; ou a inibição da PKG, inibem a modulação negativa induzida pelo endotélio em aortas de ratos 2R-1C

sugerindo uma hiperativação da via nitrérgica. Entretanto, Capettini e cols. (2008; 2010) relataram a existência de relativa contribuição das isoformas eNOS e nNOS no relaxamento vascular de aortas de camundongos, produzindo NO e H₂O₂, respectivamente. Embora tenhamos visto que a inibição não seletiva da NOS não reduza a produção de H₂O₂, a inibição seletiva das demais isoformas da NOS, nNOS e iNOS, confirmou o não envolvimento dessas isoformas da NOS na acentuada modulação negativa endotelial observada para resposta contrátil induzida por PE em aorta de ratos 2R-1C com endotélio (Tabela 7). Em 1999, Iesaki e cols. relataram que o H₂O₂ é capaz de ativar a GCs em artérias coronarianas e pulmonares bovinas. Entretanto, considerando que a inibição não seletiva da NOS não reduz a produção de H₂O₂, se o H₂O₂ advindo de outras enzimas estivesse ativando a GCs possivelmente não observaríamos reversão da resposta contrátil para PE em aorta de ratos 2R-1C, pois o H₂O₂ continuaria disponível para ativação da GCs.

Resgatando as observações a cerca da redução da resposta contrátil induzida por PE em aortas com endotélio de ratos 2R, em presença de indometacina, ou de 2R-1C na ausência ou presença de indometacina, procedemos avaliações sob o efeito dos inibidores seletivos para as isoformas da COX, COX-1 e COX-2. Inicialmente questionamos se a inibição da COX resultaria na redução de produção de um fator contrátil prostanóide, como o TXA₂, concomitantemente ao aumento na produção de um fator relaxante endotelial, como o NO ou H₂O₂. Afinal, o que possibilitaria um “Cross-Talk” entre eNOS e COX? Quais mecanismos regulam a atividade enzimática da COX?

Embora a enzima seja amplamente conhecida por ciclooxigenase, sua denominação científica é Sintase de Prostaglandina Endoperóxido H (Prostaglandin

Endoperoxide H Synthases – PGHS), cuja função é catalisar a formação de prostaglandinas (Smith et al., 2000; Rouzer et al., 2003). A PGHS apresenta duas isoformas, a PGHS-1 e a PGHS-2, mais conhecidas por COX-1 e COX-2, ambas localizadas na porção luminal do retículo endoplasmático e envelope nuclear (Rollins et al., 1980; Otto et al., 1994).

A conversão do substrato da PGHS, Ácido Araquidônico (AA) ao produto PGH_2 , depende de duas etapas distintas, uma reação de ciclooxygenação (que denomina a enzima COX) e outra de peroxidação (POX). Apesar destas reações ocorrerem de forma distinta, elas são funcionalmente interconectadas (Smith et al., 2000; Rouzer et al., 2003). Em síntese, a atividade COX converte AA em PGG_2 (Prostaglandina G_2), que é convertida em PGH_2 (Prostaglandina H_2) pela atividade POX. Posteriormente, PGH_2 dependerá de isomerases teciduais específicas para convertê-la em prostanóides específicos como TXA_2 ou PGI_2 .

No entanto, PGG_2 tem sido considerada o substrato natural para a atividade POX da PGHS, mas outros peróxidos também são substratos. A identidade do peróxido que inicia a atividade COX *in vivo* não é conhecida. Por outro lado, há relatos de que a COX-1 tenha predileção por alquil-hidroperóxidos primários e secundários a H_2O_2 ou butil-peróxidos como terc-butil hidroperóxido (t-BuOOH). As bases moleculares para preferências desses substratos não é conhecida. Porém, estudos com estruturas cristalizadas do sítio ativo POX para COX-1 em ovelhas e COX-2 em camundongos indicam que a superfície distal do grupo heme é aberta para solventes e que o sítio é suficientemente espaçoso para acomodar hidroperóxidos largos e lineares (Malkowski et al., 2000; Picot et al., 1994). Por outro lado, a inativação irreversível da PGHS durante as reações por ela catalisada, tem sido um fato conhecido (Hemler et al., 1980; Tsaplina et al., 2007), mas a natureza

desse fenômeno ainda não é clara. Sabe-se que embora a reação POX seja considerada secundária, a reação COX é absolutamente dependente da reação POX para sua atividade (Smith et al., 1992; Smith et al., 2000).

Em aorta de ratos, a COX-1 encontra-se constitutivamente expressa tanto no MLV quanto no endotélio vascular e a COX-2 encontra-se expressa constitutivamente no MLV, sendo sua expressão evidenciada e aumentada no endotélio em decorrência do envelhecimento. Tem sido proposto que os fatores idade e hipertensão estão intimamente relacionados aos níveis de expressão das isoformas da COX (Tang and Vanhoutte, 2008). De fato, observamos em aortas de ratos 2R-1C uma maior expressão de COX-1 e COX-2 comparadas a 2R. O endotélio vascular confere a aorta de ratos 2R-1C um aporte adicional quanto à expressão proteica de COX-1 e COX-2 (Fig. 38). Com base nos resultados da figura 39, em aortas de ratos 2R-1C previamente estimuladas com PE há uma aumentada produção de TXA₂ e PGI₂ comparada a 2R, contudo o endotélio vascular contribui para uma maior produção de TXA₂ em aortas de ratos 2R-1C. A inibição não seletiva da NOS não modifica a produção de TXA₂ nem PGI₂ em aortas de ratos 2R ou 2R-1C estimuladas com PE, indicando que a hiperativação da via nitrérgica aparentemente não iniba agudamente a atividade COX. Possivelmente, o efeito vasodilatador do NO sobre o tônus vascular prevalece sobre o efeito contrátil de prostanóides oriundos da COX.

Estudos que avaliam a interação entre a tríplice: **isoformas de PLA₂**, para produção de AA, a **isoforma da COX** para gerar PGH₂, e o tipo de **isomerase tecidual específica** para gerar o prostanóide específico (TXA₂, PGI₂, ou outro), apontam que as condições experimentais de estímulo são determinantes para observação do produto final (Ueno et al., 2005). Em síntese, em condições de

transiente de cálcio é observado a tríplice **PLA₂-COX-1-tromboxano sintase**, **PLA₂-COX-2-prostaciclina sintase**, embora em condição de exposição a LPS (lipopolissacarídeos) possa ser também encontrado a tríplice **PLA₂-COX-2-tromboxano sintase** (Naraba et al., 1998; Brock et al., 1999). Esses dados possibilitam supor que em aorta de ratos 2R-1C, a COX-1 esteja envolvida na produção de TXA₂, enquanto a atividade de COX-2 esteja envolvida com a produção de PGI₂.

Estudos recentes demonstraram que a PGI₂, embora classicamente definida como um EDRF, em determinadas condições como hipertensão, quando produzida em altas concentrações possa atuar como um EDCF, assim como outros prostanóides já descritos por promoverem efeitos contráteis tais como PGE₂, PGF_{2α} e TXA₂. Conforme estudo desenvolvido por Gluais e cols (2006) em aorta de ratos SHR, o ionóforo de cálcio A23187, por meio do aumento transiente das concentrações de cálcio endotelial, induz a liberação de PGI₂ e TXA₂ como EDCFs, ambos atuando em receptores prostanóides contráteis do tipo TP acoplados à proteína Gq. Nessa condição, a inibição da prostaciclina sintase reduz a liberação de PGI₂, porém não reduz a aumentada liberação de TXA₂. Em contrapartida, tal inibição acentua a liberação de outros prostanóides contráteis como PGE₂ e PGF_{2α} para compensar a perda da atividade contrátil induzida pela inibição da prostaciclina sintase. Com base nesses dados, possivelmente a aumentada produção de PGI₂ em aortas de ratos 2R-1C, comparada a 2R, possa também contribuir para resposta contrátil induzida por PE.

No modelo de hipertensão renovascular, é evidente que há uma exacerbada ativação da via nitrérgica e, a julgar apenas pelos dados de reatividade vascular, presumíamos que a atividade da enzima COX encontraria-se alterada,

aparentemente inibida, em aortas com endotélio de ratos 2R-1C, fato evidenciado pela contração induzida por fenilefrina não ser alterada pelo inibidor indometacina. Embora a indometacina seja caracterizada como um inibidor não seletivo para as isoformas da COX, trabalho publicado por Kurumbail e colaboradores (1996) revela que a concentração necessária para inibir 50% da atividade máxima da enzima COX indica maior seletividade para a isoforma COX-1.

Por conseguinte, utilizando inibidores seletivos para COX-1 e COX-2, SC-560 e SC-236 respectivamente, com base nas fig. 35 e 36 e tab. 8, observa-se que a inibição seletiva da COX-1 inibiu a resposta contrátil máxima à fenilefrina com maior intensidade em aortas sem endotélio de ratos 2R-1C que de 2R. Este resultado indica que a atividade da COX-1 é extremamente importante para a contração da fenilefrina em 2R-1C. Entretanto, em aortas com endotélio, a inibição da COX-1 em 2R-1C não altera a resposta contrátil da fenilefrina, porém é extremamente reduzida em 2R, assim como observado para inibição com indometacina. Em aorta de 2R com endotélio, a redução da resposta contrátil sugere a soma da resposta de modulação negativa endotelial à inibição da COX-1 em aorta sem endotélio. Por outro lado, em aorta de 2R-1C sem endotélio a redução da resposta contrátil devido à inibição de COX-1 no MLV sugere ter o mesmo efeito produzido pela modulação negativa endotelial, ou seja, o endotélio atuaria como um modulador natural da aumentada atividade de COX-1 no MLV de 2R-1C. Na figura 36 e tabela 8, podemos observar também que a inibição seletiva da COX-2, inversamente ao observado para COX-1, induz uma redução na resposta contrátil induzida pela fenilefrina de maior intensidade em aortas com ou sem endotélio de 2R do que em 2R-1C, indicando que a atividade da COX-2 é extremamente importante para a contração da fenilefrina em aorta de 2R principalmente com endotélio.

Com base nesses dados é possível sugerir que ocorre um aumento da atividade da COX-1 e redução de COX-2 em aortas de 2R-1C, quando comparadas a 2R. Entretanto, se a inibição da COX resulta em intensificação dos efeitos do NO sobre o MLV, possivelmente a não abolição da resposta contrátil para PE em aortas de 2R-1C com endotélio, mediante inibição de COX-2, pode ser decorrente também da alteração da atividade de canais para K^+ .

É impressionante como a resposta contrátil induzida pela fenilefrina é abolida em resposta à inibição da COX-2 em aortas de 2R com endotélio. Por isso, utilizamos o inibidor não seletivo da NO-sintase ao término da realização da curva concentração-efeito para fenilefrina em presença dos inibidores seletivos da COX, a fim de avaliar o quanto do bloqueio da resposta contrátil à fenilefrina para inibidores seletivos da COX poderia ser atribuído ao NO endógeno. Como observamos na fig. 37, na inibição de COX-1 e COX-2, o efeito depressor da resposta contrátil induzida pela fenilefrina pode ser atribuído, pelo menos em parte, à produção de NO pela NO-sintase visto que sua inibição reverte os efeitos dos inibidores seletivos da COX. A julgar pelo efeito depressor dos inibidores da COX diretamente no MLV para contração induzida pela fenilefrina, a inibição da NO-sintase em aortas com endotélio possivelmente não reverteria totalmente a modulação negativa endotelial.

Buscando avaliar os efeitos de um possível “Cross Talk” existente entre NO-sintase e COX, juntamente com o observado papel da NO-sintase para depressão da resposta contrátil à fenilefrina induzida pela inibição seletiva da COX em aortas de ratos 2R, avaliamos se a inibição seletiva das isoformas da COX em células endoteliais isoladas de aortas de ratos 2R seria uma condição suficiente para o aumento da produção de NO pela NO-sintase. Verificamos na figura 40 que a inibição seletiva das isoformas da COX não alterou a produção de NO. Entretanto,

tal inibição reduziu muito a produção de EROs em células endoteliais, tanto de ratos 2R quanto 2R-1C (Fig. 41). Tal resultado sugere que embora a produção de NO não seja aumentada pela inibição das COX, a redução na produção de EROs poderia garantir a estabilidade do NO produzido para exercer seu efeito vasodilatador sobre o MLV.

A atividade da COX, além da síntese de prostanóides, pode também contribuir para a produção de EROs (Kontos et al., 1985). De fato, a inibição da atividade da COX-1 reduz com maior intensidade a produção de EROs em células endoteliais de 2R-1C do que em 2R, confirmando a evidência de que a presença de H₂O₂ observada em 2R-1C possa ser também proveniente da atividade da COX, principalmente da isoforma COX-1. Esses dados sugerem que a relação entre a COX e o H₂O₂ é extremamente estreita, pois a aumentada atividade da COX pode resultar em maior produção de H₂O₂, bem como a maior produção de H₂O₂ pode aumentar a atividade da COX.

Com base no ciclo vicioso existente entre a produção H₂O₂ por COX e o papel ativador do H₂O₂ para a COX, a nossa próxima pergunta foi: o acúmulo de H₂O₂ proveniente da inibição da COX por indometacina poderia participar na hiporreatividade à fenilefrina em aortas de ratos 2R com endotélio? Em nosso estudo (Fig. 42), verificamos que os dois diferentes inibidores não seletivos da enzima COX, indometacina e ibuprofeno, induziram semelhante hiporreatividade à fenilefrina em aortas de ratos 2R-1C com endotélio. Contudo, a presença de catalase 300 U/mL, não foi capaz de reverter esse efeito, reforçando nossa hipótese de que a hiporreatividade à fenilefrina seja induzida por aumentar a sensibilidade do MLV aórtico ao NO produzido endotelialmente durante seu estímulo contrátil.

Connolly e cols. (1998) avaliando o efeito da nimesulida, inibidor seletivo da COX-2 disponível comercialmente, sobre a contração induzida por fenilefrina em aorta de ratos normotensos sem endotélio, verificaram a participação de prostanóides na sinalização α -adrenérgica, onde os inibidores da COX reduzem a resposta contrátil de agonistas α -adrenérgicos em aorta. É válido lembrar que um extenso número de estudos envolvendo relaxamento vascular, dependente ou independente de endotélio, são conduzidos sob pré-contrações com agonista α -adrenérgico e um eventual desequilíbrio nessa atividade contrátil proveniente de prostanóides contráteis seria determinante para influenciar as respostas de mecanismos vasorelaxantes. Além disso, a participação de prostanóides contráteis também foi recentemente observada para o agonista contrátil Ang II em aorta de ratos (Castillo-Hernández et al., 2010), agonista esse diretamente relacionado com a evolução do quadro hipertensivo no Modelo de Hipertensão Renovascular.

A julgar pelos nossos resultados (Fig. 36 B), a utilização de inibidores seletivos COX-2, em condições de hipertensão renovascular, deprimiria a resposta contrátil à fenilefrina, acentuando os efeitos da exacerbada modulação negativa endotelial observada. É clara a necessidade da compreensão do mecanismo envolvido na ativação da COX e a importância das isoformas COX-1 e COX-2 para o fino ajuste do controle do tônus vascular. Não pode ser esquecido o fatídico episódio da utilização de inibidores seletivos COX-2 e desenvolvimento de sérias complicações cardiovasculares, resultando na retirada de várias dessas drogas do mercado (Brueggeman et al., 2010). A inibição seletiva de COX-2 intensificaria a incapacidade do sistema adrenérgico do organismo aumentar a contração vascular constituindo uma possível explicação para a limitação do uso desses inibidores em indivíduos com complicações cardiovasculares. Extrapolando tal possível condição

para vasos importantes para o controle da resistência vascular, como leito mesentérico, a inibição de COX-2 dificultaria a eficiência do sistema adrenérgico sobre o controle da pressão arterial momento a momento.

Questionamos se essa hiporreatividade induzida por inibidores de COX em aorta de ratos 2R com endotélio ocorreria exclusivamente para ativação de receptores metabotrópicos do tipo α_1 -adrenérgico ativado com fenilefrina. Para nossa surpresa, com base nos resultados da figura 43, observa-se que a hiporreatividade induzida pela inibição da COX ocorre tanto para o estímulo com PE quanto com KCl 60 mmol/L. Entretanto, tal inibição não modifica resposta contrátil induzida pelo análogo do TXA₂, U-46619. O mais interessante é que, embora ambos agonistas ativem receptores acoplados à proteína G que mobilizam cálcio para o citosol via fosfolipase C, tais agonistas são diferentemente influenciados pelo inibidor não seletivo da COX. Esse resultado possibilita presumir que, se ativação α_1 -adrenérgica aumenta a atividade da COX produzindo TXA₂ e a inibição da COX aumenta a sensibilidade do MLV ao NO, possivelmente em aorta de ratos 2R-1C mediante exacerbada produção de NO, a aumentada produção de TXA₂ possibilitaria maior efetividade contrátil vascular por não ser influenciado, ou ser menos influenciado, pela sensibilidade vascular gerada pelo NO.

Mediante todas as alterações observadas entre aortas de ratos 2R e 2R-1C, coube-nos perguntar como estaria a resposta contrátil dessas aortas para um agonista cujo mecanismo de ação e efeito contrátil não fosse influenciado pela atividade COX. Com base no estudo apresentado na figura 43, optamos pelo uso do análogo do TXA₂, uma vez que tal agonista é intensamente produzido em aorta de ratos 2R-1C. TXA₂ como produto da COX-1 é geralmente associado a modelos de hipertensão por infusão de Ang II (Viridis et al., 2007) e a utilização deste agonista

possibilitaria verificar o efeito desse possível produto da COX diretamente disponibilizado ao tecido, sem necessidade da atividade enzimática da COX.

Nesse estudo, observamos que a inibição da COX com indometacina não interfere com a resposta contrátil induzida pelo análogo do TXA₂, seja em aorta de 2R (Figura 46 e Tabela 9) ou em aorta de 2R-1C (Figura 47 e Tabela 9), ao contrário do que foi observado para fenilefrina, indicando sua independência da atividade da COX.

Como pode ser observado na figura 44 e tabela 9, em aorta de ratos 2R sem endotélio, o análogo do TXA₂ induz uma resposta contrátil de maior efeito máximo que a fenilefrina, embora ambos tenham sua potência modulada pelo endotélio. Por outro lado, em aorta de ratos 2R-1C sem endotélio (Figura 45), o análogo do TXA₂ induz uma resposta contrátil de amplitude semelhante à da fenilefrina, porém de menor efeito máximo que a observada em 2R. Além disso, o endotélio não interfere na resposta contrátil máxima induzida pelo análogo do TXA₂ em aortas de ratos 2R-1C, como ocorre para a fenilefrina.

De forma intrigante, a maior produção de TXA₂ em aorta de 2R-1C induziria uma resposta contrátil que anularia os efeitos da exacerbada modulação negativa endotelial para resposta contrátil à fenilefrina. De forma complementar, o efeito máximo de contração induzido por TXA₂ em aorta de 2R-1C está reduzido em relação à 2R (Tabela 9), sugerindo que em virtude de uma maior produção de TXA₂ por COX-1 em 2R-1C, o MLV tenha reduzido a expressão de receptores TP ou ainda que tais receptores possam estar desensibilizados. Enfim, embora a resposta contrátil induzida pela fenilefrina apresente efeito final semelhante em aorta de 2R e 2R-1C sem endotélio (Fig. 5), os mecanismos intracelulares desencadeados pelo

estímulo α_1 -adrenérgico parecem recrutar diferentes efetores quanto a EROs e prostanoídes contráteis oriundos da COX.

No modelo de hipertensão renovascular tem sido descrito um aumento da ativação simpática devido ao aumento do estresse oxidativo (Oliveira-Sales et al., 2009). A julgar pela reduzida resposta contrátil induzida pelo estímulo α_1 -adrenérgico sobre aortas de 2R-1C com endotélio, o aumento na atividade simpática poderia representar um mecanismo de “feedback” positivo devido à reduzida resposta ao agonista α_1 -adrenérgico. Por outro lado, Gürdal e cols (2005) relataram que a exposição de aortas de ratos à fenilefrina por períodos prolongados (6 horas) aumentam a expressão e atividade de eNOS, reduzindo a resposta contrátil à fenilefrina. Dessa forma, o mais difícil é determinar a ordem com que os fenômenos acontecem. As EROs aumentariam a atividade simpática, o que levaria à menor resposta contrátil à fenilefrina pela aumentada e contínua exposição a agonistas α_1 -adrenérgicos, ou as EROS reduziriam resposta contrátil à fenilefrina e a atividade simpática aumentaria em resposta a baixa efetividade em induzir resposta contrátil. O mais provável é que tudo aconteça simultaneamente, e em conjunto, possam contribuir para o efeito final de acentuada modulação negativa endotelial.

Em nossos estudos verificamos reduzida resposta contrátil ao agonista α_1 -adrenérgico fenilefrina associada à hiperatividade da eNOS, sem alteração da sua expressão proteica (Fig. 48A). Na ausência de estiramento e ausência de estímulo com fenilefrina (Fig. 48B) ou sob estiramento radial (tensão de repouso de 1,5 g) e estímulo com KCl 60 mM (Fig. 48C), a expressão da eNOS fosforilada no resíduo de Ser¹¹⁷⁷ foi semelhante entre aortas de ratos 2R e 2R-1C, com endotélio. Por outro lado, a ativação de receptores α_1 -adrenérgicos com fenilefrina em aortas de ratos 2R-1C com endotélio, sob estiramento radial de 1,5 g, induz uma maior fosforilação

do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS comparada a 2R (Fig. 48D). Entretanto, nessas mesmas condições de estiramento e estímulo, o resíduo de Thr⁴⁹⁵ da eNOS apresenta semelhante estado de fosforilação entre aortas de ratos 2R e 2R-1C com endotélio (Fig. 48E). Os achados de Dimmeler e cols. (1999) e Fulton e cols. (1999) revelam que a fosforilação da Ser¹¹⁷⁷ ocorre para o estresse de cisalhamento (“Shear Stress”) gerado pelo fluxo sangüíneo. Entretanto, nossos achados evidenciam que a tensão de repouso de 1,5 g, considerada um estresse mecânico radial, é essencial para fosforilação da Ser¹¹⁷⁷ da eNOS pelo estímulo com PE e confirma os estudos funcionais iniciais sobre a hiperatividade da eNOS para o estímulo α_1 -adrenérgico.

Tendo em vista a elevada produção de H₂O₂ em aortas de ratos 2R-1C com endotélio, nossos dados da figura 49 revelam que a inibição da via PI₃K/Akt com Wortmannin reduz apenas a fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS. Corroborando nossos achados, os estudos moleculares avaliando a fosforilação da serina¹¹⁷⁹ da NO-sintase em células endoteliais bovinas, apontam que concentrações crescentes de H₂O₂ podem aumentar gradativamente a atividade da NO-sintase para produção de NO por uma via dependente de PI₃K/Akt (Cai et al., 2003). Guo e cols. (2009) também relataram a importância dos receptores α_1 -adrenérgicos para a produção de EROs em cardiomiócitos de ratos e seu papel no desenvolvimento de remodelagem cardíaca via ativação da PI₃K/Akt.

Por outro lado, tirosinas quinases da família da c-Src, descritas como sensíveis a agentes como H₂O₂ (Suzaki et al., 2002) e participar de sinalizações celulares envolvidas na hipertrofia muscular (Sato et al., 2005; Torsoni et al., 2005), quando inibidas por PP1 reduzem apenas a fosforilação do resíduo de Thr⁴⁹⁵ da eNOS em aortas de ratos 2R-1C com endotélio, previamente estimuladas com PE

sob estiramento radial de 1,5 g (Fig. 49). Embora tenha sido descrito o desenvolvimento de hipertrofia do MLV em aorta de animais 2R-1C (Castro et al., 2009), nas condições avaliadas não observa-se diferença de fosforilação do resíduo de Thr⁴⁹⁵ da eNOS entre aortas de ratos 2R e 2R-1C previamente estimuladas com PE sob tensão de 1,5 g. Entretanto, enquanto o inibidor PP1 mostra-se efetivo para reduzir a fosforilação específica do resíduo de Thr⁴⁹⁵ da eNOS, o inibidor Wortmannin é específico para o de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS em aorta de ratos 2R-1C.

Uma interessante observação é que, durante os protocolos experimentais onde as aortas em banho para órgãos foram incubadas com os inibidores para os resíduos de Ser¹¹⁷⁷ ou Thr⁴⁹⁵ da eNOS, Wortmannin aboliu a contração induzida por PE 0,1 µmol/L enquanto PP1 aparentemente não modificou essa contração. A julgar pela consequência das inibições sobre a eNOS em aortas de ratos 2R-1C com endotélio, o esperado seria uma maior contração para PE em presença de Wortmannin e possível redução dessa resposta de contração em presença de PP1. Esses dados nos possibilita deduzir que a inibição da via PI3K/Akt apresenta um importante papel na sinalização contrátil induzida por PE no MLV em aorta de ratos 2R-1C e, possivelmente, existam uma intercomunicação da via ativada no MLV e a fosforilação da Ser¹¹⁷⁷ da eNOS reduzindo a resposta contrátil da PE.

Analisando a produção de NO em células endoteliais isoladas de aorta de ratos 2R e 2R-1C estimuladas com PE, observamos que assim como para a produção de H₂O₂, o estímulo com PE reduz a produção de NO em células endoteliais de 2R de forma concentração dependente, mas mantém estável a produção de NO em 2R-1C (Fig. 50). A hiperatividade da eNOS está certamente associada à elevada concentração de H₂O₂ produzido nas células endoteliais, via ativação PI₃K/Akt e fosforilação do resíduo de Ser¹¹⁷⁷ da eNOS, que reduz o limiar

de Ca^{2+} para ativação da eNOS e aumenta sua atividade em aortas de ratos 2R-1C. Nossos achados estão de acordo com trabalho publicado recentemente por Gaete e cols. (2012) que propõe um novo mecanismo de redução da atividade da eNOS via fosforilação do resíduo de Treonina⁴⁹⁵ por O_2^- em artérias mesentéricas de ratos. Nossos resultados também revelam um importante papel sinalizador do O_2^- em aortas de ratos 2R, o que deve condicionar uma baixa atividade da eNOS na aorta desses animais.

Avaliando as demais enzimas envolvidas na sinalização nitrérgica vascular, evidenciamos que a expressão da enzima GCs está reduzida em aortas de ratos 2R-1C, entretanto a sua atividade e a atividade da PDE 5 estão aumentadas quando comparadas a 2R. A elevada produção absoluta de GMPc em aortas de 2R-1C explica o porquê da menor resposta contrátil à fenilefrina. Entretanto, Callera e cols. (2000) relataram semelhante produção de GMPc entre aortas de 2R e 2R-1C estimuladas com ACh. Possivelmente o estímulo com ACh em aorta pré-contraídas com PE, em presença de inibidor de fosfodiesterase 5, tende a igualar de forma compensatória a produção final de GMPc. Por outro lado, nossos resultados ainda indicam que quando a produção absoluta de GMPc é corrigida pela expressão proteica total da aorta ocorre uma equiparada produção de GMPc entre aortas de 2R e 2R-1C com endotélio estimuladas com PE. Para avaliações de atividade enzimática, mediante existência de diferente expressão da enzima entre duas situações estudadas condiz representar a quantificação de sua atividade em termos da expressão da enzima geradora do produto quantificado. Dessa forma, a melhor correção para produção de GMPc seria em termos de expressão da GCs. Nessas condições, visto que a expressão da GCs se encontra menor em aorta de ratos 2R-1C que de 2R, observaríamos que a produção de GMPc em aorta de 2R-1C é muito

maior do que em 2R. Não se pode desconsiderar que tal quantificação só é possível devido à inibição da PDE 5. Tem sido proposto que a atividade da PDE 5 pode ser regulada por mecanismo de feed back positivo dependente de GMPc (Rybalkina et al., 2010), ou seja, a maior produção de GMPc em aorta de ratos 2R-1C com endotélio poderia estimular uma maior atividade da PDE 5 na aorta desses animais.

Esses achados permitem sugerir que o menor relaxamento vascular, dependente ou independente do endotélio, mas dependente de NO em aorta de ratos 2R-1C se deve à menor expressão da GCs associada à maior atividade das PDE5, alteração na atividade de canais para K^+ , possivelmente decorrente da hiperativação da eNOS. O H_2O_2 ainda hiperativaria a produção de prostanóides contráteis oriundos da COX contrapondo-se ao relaxamento vascular.

Por fim, embora a remoção de H_2O_2 possa reverter parcialmente a reduzida resposta contrátil induzida por PE em aorta de ratos 2R-1C com endotélio, possivelmente haveria algum outro fator responsável por determinar essa resposta residual não revertida. Tendo por base a estreita relação entre a ativação de FAK, uma tirosina quinase da família da c-Src envolvida na resposta de hipertrofia cardíaca decorrente de estresse físico, e nossos dados de modulação da fosforilação de resíduos de Thr⁴⁹⁵ da eNOS por PP1, avaliamos o papel do estresse por estiramento radial sobre a atividade da eNOS em aorta de ratos 2R e 2R-1C. Conforme os dados apresentados nas figuras 54 e 55 e tabela 10, em aortas de ratos 2R e 2R-1C com endotélio a resposta contrátil induzida por PE ocorre de forma dependente da tensão de estiramento. Entretanto, em 2R a resposta contrátil de maior eficácia para fenilefrina ocorre em tensão de 1,5 g, enquanto em 2R-1C tal resposta ocorre em tensão de 3,0 g. Esses dados nos possibilitam deduzir que, devido à maior pressão arterial sanguínea, aortas de ratos hipertensos 2R-1C

devem apresentar uma adaptação ao estresse de estiramento mecânico radial, o que interfere diretamente na sinalização celular estimulada pelo agonista α_1 -adrenérgico fenilefrina. Conseqüentemente, quando aortas de ratos 2R-1C com endotélio são estimuladas com fenilefrina, sob tensão de 1,5 g, o que ocorre é uma resposta contrátil submáxima comparada a resposta em 2R, como também ocorre para 2R sob tensões submáximas de 0,5 e 1,0 g de estiramento.

Franchi-Micheli e cols. (2000) avaliando a importância do estiramento radial em aorta de ratos observaram a participação de diferentes componentes endoteliais determinando o tônus vascular. Nesse estudo, os autores avaliaram o efeito vasodilatador da ACh, em aorta de ratos não hipertensos, sob 3 diferentes tensões de repouso: 0,7; 1,2 e 2,5 g. Os resultados apontam que em todas tensões estudadas ACh induziu relaxamento vascular de forma dependente da concentração. Entretanto, sob a menor tensão de 0,7 g inibidores da NOS não modificaram a resposta induzida pela ACh, enquanto que sob 1,2 e 2,5 g as curvas concentração-efeito foram deslocadas para a direita quando comparadas ao controle. Os dados ainda revelam que nas três tensões de estiramento o ODQ, inibidor da GCs, abole a resposta relaxante induzida pela ACh. Esses dados sugerem que a atividade da NOS é modulada pela tensão de estiramento mecânico e que, sob condição de baixo estiramento, a relação enzima-substrato-produto apresenta-se insensível a inibidores enzimáticos por acionar mecanismos celulares de ativação até então desconhecidos.

A julgar pelos nossos resultados, a tensão de repouso de 1,5 g de estiramento radial em aorta de ratos 2R-1C pode ser representada pela situação de baixa tensão e, conforme nossos achados, a produção de H_2O_2 associada à maior fosforilação da Ser¹¹⁷⁷ da eNOS condicionaria a maior ativação da eNOS.

Possivelmente, o resíduo de Thr⁴⁹⁵ da eNOS, que apresenta semelhante intensidade de fosforilação entre aortas de ratos 2R e 2R-1C com endotélio induzida por PE sob 1,5 g de tensão, deve apresentar maior fosforilação em 2R-1C sob tensão de estiramento radial de 3,0g comparada a 2R. Isso reduziria a ativação da eNOS, condicionando o aparecimento do efeito do prostanóide contrátil TXA₂ e possibilitando a observada maior resposta contrátil induzida por PE.

Enfim, após a descoberta do mecanismo fosforilativo de regulação da atividade da eNOS, alterações na capacidade de fosforilação de múltiplos sítios de aminoácidos têm sido associadas a várias condições patológicas como diabetes, obesidade e doenças cardiovasculares. Várias pesquisas têm demonstrado que substâncias como estrogênio (Haynes et al., 2000; Hisamoto et al., 2001), estatinas (Kureishi et al. 2000), leptina (Goetze et al., 2002; Vecchione et al., 2002) e adiponectina (Chen et al., 2003) apresentam efeito protetor, em parte por aumentarem a fosforilação da Ser¹¹⁷⁹ da eNOS e consequente produção de NO, principalmente em doenças que envolvem disfunção endotelial associada à redução da atividade da eNOS.

Sumário dos Resultados

7 SUMÁRIO DOS RESULTADOS

A disfunção endotelial é comumente evidenciada em doenças cardiovasculares, principalmente na hipertensão arterial. Embora essa disfunção seja atribuída ao prejuízo dos efeitos vasorelaxantes dependentes do endotélio, diferentes fatores podem, simultaneamente ou não, estar envolvidos no comprometimento dessa resposta celular. Particularmente, nossos dados evidenciam que na hipertensão renovascular o estresse oxidativo contribui para a menor resposta contrátil α_1 -adrenérgica da fenilefrina, dependente do endotélio, configurando uma nova característica da disfunção endotelial em aortas de ratos 2R-1C.

Nossos resultados indicam que as EROs, O_2^- e H_2O_2 , diferentemente participam na resposta contrátil da fenilefrina entre aortas de ratos 2R e 2R-1C. Em aortas sem endotélio, o O_2^- contribui para resposta contrátil induzida pela fenilefrina no MLV de ratos 2R, função essa substituída por H_2O_2 no MLV de ratos 2R-1C. Embora células endoteliais aórticas de ratos 2R apresentem uma produção basal de EROs, células endoteliais de ratos 2R-1C quando estimuladas com fenilefrina contribuem para uma nítida maior produção de H_2O_2 . Em aorta de 2R-1C com endotélio estimuladas com fenilefrina, o H_2O_2 é proveniente pelo menos em parte da atividade das enzimas NADPH Oxidase, COX, Xantina Oxidase e SOD.

Nossos resultados evidenciam que, a expressão proteica da eNOS é semelhante entre aortas de ratos 2R e 2R-1C. Em aortas de ratos 2R-1C, a eNOS não participa na produção de H_2O_2 , no entanto a eNOS parece ter sua atividade modulada pelo H_2O_2 . A aumentada produção de H_2O_2 , estimulada por fenilefrina em aortas de ratos 2R-1C com endotélio, contribui para menor resposta contrátil induzida pela fenilefrina possivelmente por induzir maior fosforilação da Ser¹¹⁷⁷ da eNOS via PI3K/Akt.

O referido achado provê justificativa para a diferente resposta vasodilatadora induzida pelo complexo doador de NO AuNPs-{Ru-4PySH}_n em aorta de ratos 2R e 2R-1C, com ou sem endotélio. Em aortas sem endotélio, o complexo apresenta maior potência vasodilatadora em aorta de ratos 2R-1C comparada a 2R possivelmente devido à sua capacidade antioxidante reduzir conjuntamente a eficiência contrátil da fenilefrina. Por outro lado, em aortas com endotélio, a aparente perda da sua atividade colinérgica endotelial em 2R-1C se deva a hiperativação prévia da eNOS pelo estímulo com fenilefrina.

No presente trabalho merece destaque a importância do estiramento radial ou tensão basal de 1,5 g, sobre a qual as artérias são submetidas em estudos por reatividade vascular, para que a fosforilação da Ser¹¹⁷⁷ da eNOS induzida por fenilefrina ocorra com maior intensidade em aortas de ratos 2R-1C com endotélio. Conseqüentemente, as quantificações do segundo mensageiro GMPc, produção de H₂O₂ e produção de prostanóides estimuladas com fenilefrina foram realizadas sob prévia montagem das preparações em banho para órgãos isolados sob tensão de 1,5 g.

Nossos resultados sugerem que a hiperativação da eNOS possivelmente induzida por H₂O₂ e a maior produção de NO, estimuladas com fenilefrina em aortas de ratos 2R-1C com endotélio, conseqüentemente resulta em maior produção de GMPc e maior ativação de PKG, modulando negativamente a resposta contrátil da fenilefrina e possivelmente contribuindo para hiperativar a isoforma 5 das fosfodiesterases. A exacerbada produção de NO endotelial, estimulada por agonista α 1-adrenérgico, poderia contribuir para reduzida expressão da GCs e o prejuízo funcional dos canais para potássio em aortas de ratos 2R-1C com endotélio.

Além de hiperativar a eNOS em baixas concentrações, o H₂O₂ mostra-se capaz de também hiperativar COX em altas concentrações. As isoformas da enzima COX, COX-1 e COX-2, apresentam maior expressão proteica e atividade em aortas de ratos 2R-1C comparadas a 2R, produzindo maiores concentrações de TXA₂ e PGI₂ em aortas com ou sem endotélio. Em aortas sem endotélio, altas concentrações de H₂O₂ induzem resposta contrátil dependente de COX apenas em aortas de ratos 2R, possivelmente devido à atividade da COX já estar sobre máxima atividade em 2R-1C devido à elevada produção de H₂O₂ induzida por fenilefrina. Entretanto, em aortas com endotélio, altas concentrações de H₂O₂ induzem resposta contrátil dependente de COX com maior amplitude em 2R-1C. Certamente, a maior expressão de COX-1 e COX-2 endoteliais, em aorta de ratos 2R-1C, garante que o aumento na produção de H₂O₂ possa aumentar a produção do prostanóide contrátil TXA₂, uma vez que a produção de tal prostanóide encontra-se maior em aorta de ratos 2R-1C com endotélio comparada à aorta sem endotélio.

Embora ambas enzimas eNOS e COX apresentem-se hiperativadas com o estímulo α_1 -adrenérgico, a atividade da eNOS sobrepõe-se a atividade da COX em aorta de ratos 2R-1C estimuladas com fenilefrina. A inibição da eNOS não modifica a elevada produção dos prostanóides TXA₂ e PGI₂, mas reverte a reduzida resposta contrátil da fenilefrina em aorta de ratos 2R-1C com endotélio. Por outro lado, a inibição da COX não modifica a produção de NO pela eNOS, mas aumenta a sensibilidade do MLV ao efeito relaxante induzido pelo NO possivelmente por reduzir a produção de EROs para o consumo do NO e reduzir os efeitos contráteis dessas EROs. Esses efeitos de sensibilização do MLV ao NO pela inibição da COX são observados principalmente em aortas de ratos 2R, visto que nesses animais as

vias de relaxamento vascular acionadas pelo NO, como canais para K^+ , não estão alteradas.

A resposta contrátil máxima induzida pelo análogo do TXA_2 não é modulada pelo endotélio ou pela inibição da COX em aortas de ratos 2R e 2R-1C, embora sua resposta contrátil máxima seja menor em 2R-1C do que em 2R. Esses resultados sugerem que a maior produção de TXA_2 estimulada pela fenilefrina em aorta de ratos 2R-1C com endotélio possa ser um mecanismo acionado para contrapor-se aos efeitos da hiperativação da eNOS.

De fato, a hiperativação da eNOS e da COX coexistem para o estímulo contrátil com fenilefrina possivelmente devido a elevada produção de H_2O_2 . Entretanto, o aumento do estiramento radial de aortas de ratos 2R-1C com endotélio de 1,5 g para 3,0 g parece ser determinante para suprimir a exacerbada atividade da eNOS e fazer prevalecer o efeito do prostanóide contrátil TXA_2 , equiparando a resposta contrátil máxima da fenilefrina entre aortas de ratos 2R e 2R-1C.

Enfim, em conjunto nossos dados indicam que em aorta 2R-1C com endotélio, a produção de H_2O_2 induzida pelo estímulo α_1 -adrenérgico é importante para hiperativar as enzimas eNOS e COX. Entretanto, a intensidade de estiramento radial é importante para determinar o prevalectimento de efeito do produto de cada uma dessas enzimas, principalmente em 2R-1C, indicando que as diferenças de resposta contrátil para fenilefrina entre aortas de ratos 2R e 2R-1C devem ir além de possíveis diferenças de subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos.

Propomos na Fig. 56 A e B um modelo para explicar os mecanismos celulares possivelmente envolvidos na resposta contrátil induzida pela fenilefrina em aortas de ratos 2R e 2R-1C, contribuição das EROs à atividade das enzimas eNOS, GCs, PDE5, COX-1 e COX-2.

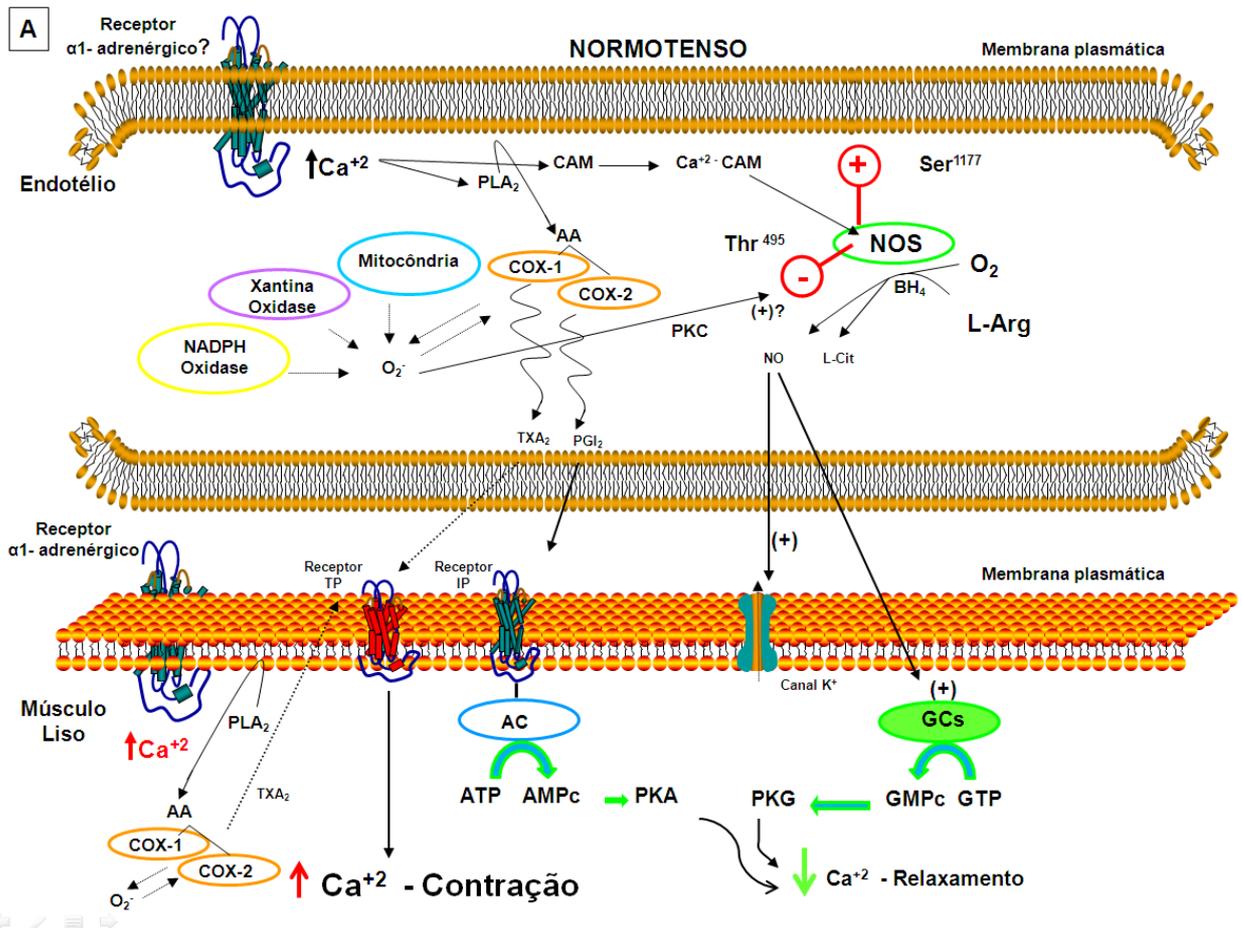


Fig. 56 (A) Efeitos da fenilefrina (PE) no endotélio (E+) e músculo liso vascular da aorta de ratos normotensos (2R), sob tensão de repouso de 1,5 g. Em aorta de ratos 2R sem endotélio, PE ao aumentar a concentração citosólica de cálcio (Ca^{+2}) ativa a fosfolipase A_2 (PLA_2), produzindo Ácido Araquidônico (AA), substrato para a enzima COX. A atividade da COX resulta em produção de ânion superóxido (O_2^-). O O_2^- deve atuar como amplificador da atividade da COX estimulando a síntese de TXA_2 , desempenhando importante papel na contração induzida pela PE. Em aorta E+ de 2R, o O_2^- endotelial possivelmente reduz a atividade da NOS fosforilando seu sítio inibitório Thr^{495} via PKC, condicionando o predomínio dos mecanismos contráteis sobre os vasodilatadores induzidos pelo NO. NO= Óxido Nítrico, NOS= NO-Sintase endotelial, COX= Ciclooxygenase, TXA_2 = Tromboxano, PGI_2 = Prostaciclina, GCs= Guanilil-Ciclase solúvel, PKC= Proteína Quinase C, PI_3/Akt =fosfatidilinositol-3-OHquinase/Akt, PKG=Proteína Quinase G, PDE5= Fosfodiesterase 5.

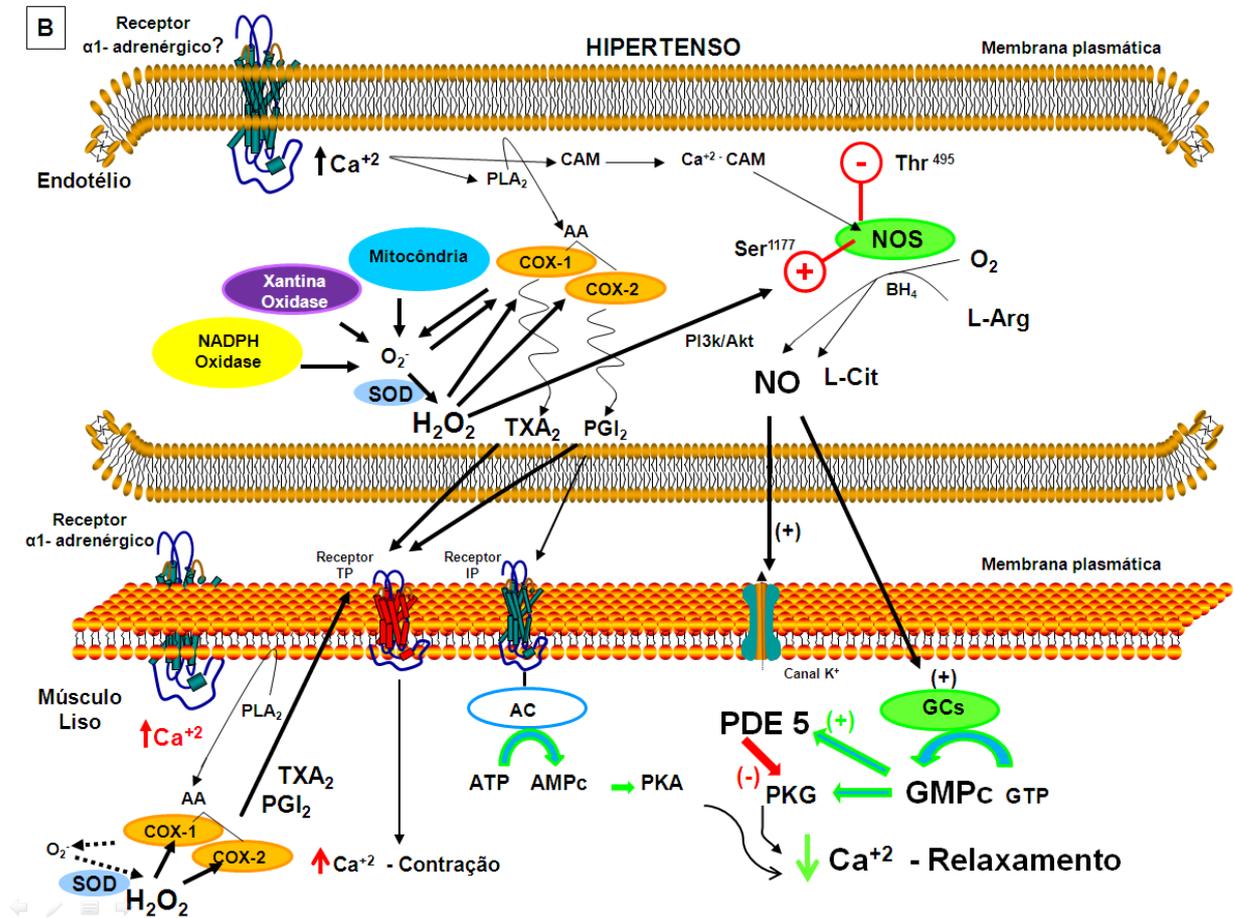


Fig. 56 (B) Efeitos da fenilefrina (PE) no endotélio (E+) e músculo liso vascular da aorta de ratos hipertensos (2R-1C), sob tensão de repouso de 1,5 g. Em aorta de ratos 2R-1C sem endotélio, PE ao aumentar a concentração citosólica de cálcio (Ca^{+2}) ativa a fosfolipase A_2 (PLA₂), produzindo Ácido Araquidônico (AA), substrato para a enzima COX. A atividade da COX, bem como da NADPH Oxidase, Xantina Oxidase e Mitocôndria resulta em elevada produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em parte proveniente da conversão de ânion superóxido (O_2^-) pela superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 deve atuar como amplificador da atividade da COX, ainda mais potente que O_2^- , estimulando a síntese de TXA₂ e PGI₂, desempenhando papel fundamental na contração induzida pela PE. Entretanto, em aorta E+ de 2R-1C, o H_2O_2 endotelial possivelmente hiperativa a NOS por fosforilar seu sítio excitatório Ser¹¹⁷⁷ via PI₃K/Akt, intensificando os mecanismos vasodilatadores induzidos pelo NO sobre os mecanismos contráteis dos prostanóides oriundos da COX. NO= Óxido Nítrico, NOS= NO-Sintase endotelial, COX= Ciclooxygenase, TXA₂= Tromboxano, PGI₂= Prostaciclina, GCs= Guanilil-Ciclase solúvel, PKC= Proteína Quinase C, PI₃K/Akt=fosfatidilinositol-3-OHquinase/Akt, PKG=Proteína Quinase G, PDE5= Fosfodiesterase 5.

Conclusão

8 CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados demonstram que o estresse oxidativo e o estresse sobre a tensão, contribuem para modificar a resposta contrátil α_1 -adrenérgica em aorta de ratos hipertensos 2R-1C. Sob estiramento submáximo, a produção endotelial de H_2O_2 ativa a eNOS e aumenta a produção de NO, reduzindo a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em aorta de ratos 2R-1C. Contudo, sob estiramento máximo, ocorre aparente inibição da NO-Sintase e o H_2O_2 produzido ativaria a COX. Os prostanóides contráteis produzidos pela COX aumentariam a resposta contrátil induzida pela fenilefrina. Por outro lado, a produção de H_2O_2 estimulada por PE, em CMLV de ratos 2R-1C, potencializa relaxamento vascular induzido pelo doador de NO AuNPs-{Ru-4PySH}_n, possivelmente devido à sua ação antioxidante intrínseca. Entretanto, a hiperatividade da eNOS estimulada por PE, em aorta de ratos 2R-1C, reduz a efetividade colinérgica endotelial do doador de NO AuNPs-{Ru-4PySH}_n.

Referências

9 REFERÊNCIAS

- ARNOLD, W.P.; MITTAL, C.K.; KATSUKI, S.; MURAD, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3', 5'-monophosphate levels in various tissue preparations. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** 74, 3203-07, 1977.
- BABIOR, B.M. NADPH oxidase. **Curr Opin Immunol** 16, 42– 47, 2004.
- BAKER, C. J.; DEAHL, K.; DOMEK, J.; ORLANDI, E. W. Scavenging of H₂O₂ and Production of Oxygen by Horseradish Peroxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** 382(2), 232–237, 2000.
- BEEVERS, G.; LIP, G.Y.H.; O'BRIEN, E. The pathophysiology of hypertension. **BMJ.** 322, 912–916, 2001.
- BLAUSTEIN, M.P. Endogenous ouabain: role in the pathogenesis of hypertension. **Kidney International.** 49, 1748–1753, 1996.
- BOLOTINA, V.M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J.J.; PAGANO, P.J.; COHEN, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature.** 368, 850–3, 1994.
- BONAVENTURA, D.; DE LIMA, R.G.; VERGESI, J.A.; DA SILVA, R.S.; BENDHACK, L.M. Comparison of the mechanisms underlying the relaxation induced by two nitric oxide donors: Sodium nitroprusside and a new ruthenium complex. **Vascular Pharmacology.** 46, 215–222, 2007.
- BONAVENTURA, D.; OLIVEIRA, F. S.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Decreased vasodilation induced by a new nitric oxide donor in two kidney, one clip hypertensive rats is due to impaired K⁺ channel activation. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.** 32, 478–481, 2005.
- BOULDEN, B.M.; WIDDER, J.D.; ALLEN, J.C.; SMITH, D.A.; AL-BALDAWI, R. N.; HARRISON, D.G.; DIKALOV, S.I.; JO, H.; DUDLEY JR, S.C. Early Determinants Of H₂O₂-Induced Endothelial Dysfunction. **Free Radical Biology & Medicine.** 41, 810–817, 2006.
- BROCK, T.G.; MCNISH, R.W.; PETERS-GOLDEN, M. Arachidonic Acid Is Preferentially Metabolized by Cyclooxygenase-2 to Prostacyclin and Prostaglandin E₂. **J. Biol. Chem.** 274 (17), 11660–11666, 1999.

- BRUEGGEMANN, L.I.; MANI, B.K.; MACKIE, A.R.; CRIBBS, L.L.; BYRON, K.L. Novel Actions of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on Vascular Ion Channels: Accounting for Cardiovascular Side Effects and Identifying New Therapeutic Applications. **Mol Cell Pharmacol.** 2(1), 15–19, 2010.
- BUDZYN, K.; MARLEY, P.D.; SOBEY, C.G. Opposing Roles of Endothelial and Smooth Muscle Phosphatidylinositol 3-Kinase in Vasoconstriction: Effects of Rho-Kinase and Hypertension. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.** 313, 1248-1253, 2005.
- BUNTING, S.; GRYGLEWSKI, R.; MONCADA, S.; VANE, J.R. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. **Prostaglandins.** 12(6), 897-913, 1976.
- CAI, H.; HARRISON, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circ. Res.** 87, 840–844, 2000.
- CAI, H.; LI, Z.; DAVIS, M.E.; KANNER, W.; HARRISON, D.G.; DUDLEY JR, S.C. Akt-Dependent Phosphorylation of Serine 1179 and Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Cooperatively Mediate Activation of the Endothelial Nitric-Oxide Synthase by Hydrogen Peroxide. **Mol. Pharmacol.** 63 (2), 325–331, 2003.
- CALLERA, G.E.; VARANDA, W.A.; BENDHACK, L.M. Impaired relaxation to acetylcholine in 2K-1C hypertensive rat aortas involves changes in membrane hyperpolarization instead of an abnormal contribution of endothelial factors. **General Pharmacology.** 34, 379– 389, 2000.
- CAMPBELL, W.B.; FALCK, J.R. Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. **Hypertension.** 49, 590–596, 2007.
- CAPETTINI, L. S.A.; CORTES, S.F.; LEMOS, V.S. Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta. **Eur. J. Pharmacol.** 643, 260–266; 2010.
- CAPETTINI, L.S.A.; CORTES, S.F.; GOMES, M.A.; SILVA, G.A.B.; PESQUERO, J.L.; LOPES, M.J.; TEIXEIRA, M.M.; LEMOS, V.S. Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 295, H2503-H2511, 2008.
- CASINO, P.R.; KILCOYNE, C.M.; QUYYUMI, A.A.; HOEG, J.M.; PANZA, J.A. The role of nitric oxide in endothelium-dependent vasodilation of hypercholesterolemic patients. **Circulation.** 88, 2541–2547, 1993.

- CASTILLO-HERNÁNDEZ, M.C.; MARTINEZ-GODINEZ, M.A.; GUEVARA-BALCAZAR, G.; MILIAR-GARCIA, A.; MANCILLA, J.; LOPEZ-MAYORGA, R.M.; E.F. Castillo-Henkel EF, Castillo-Henkel C. Extraendothelial and constitutive COX-2 expression is involved in the contractile effect of angiotensin II in the rat aorta. **Auton. Autacoid Pharmacol.** 30, 205–211, 2010.
- CASTRO, M.M.; RIZZI, E.; RODRIGUES, G.J.; CERON, C.S.; BENDHACK, L.M.; GERLACH, R.F.; TANUS-SANTOS, J.E. Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2-induced vascular changes in renovascular hypertension. **Free Radical Biology & Medicine.** 46, 1298–1307, 2009.
- CHEN, H.; MONTAGNANI, M.; FUNAHASHI, T.; SHIMOMURA, I.; QUON, M.J. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. **J Biol Chem.** 278, 45021–45026, 2003.
- CHRISTENSEN, K.L.; MULVANY, M.J. Location of resistance arteries. **Journal of Vascular Research.** 38, 1-12, 2001.
- CONNOLLY, C.; MCCORMICK, P.A.; DOCHERTY, JR. Effects of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide on vascular contractions in endothelium-denuded rat aorta. **Eur J. Pharmacol.** 352, 53–58, 1998.
- COSTA, C.A.; AMARAL, T.A.S.; CARVALHO, L.C.R.M.; OGNIBENE, D.T.; DA SILVA, A.F.E.; MOSS, M.B.; VALENÇA, S.S.; DE MOURA, R.S.; RESENDE, A.C. Antioxidant Treatment With Tempol and Apocynin Prevents Endothelial Dysfunction and Development of Renovascular Hypertension. **American Journal of Hypertension.** 22(12), 1242-1249, 2009.
- DE AGOSTINI, A.I.; WATKINS, S.C.; SLAYTER, H.S.; YOUSSEOUFIAN, H.; ROSENBERG, R.D. Localization of anticoagulant active heparan sulfate proteoglycans in vascular endothelium: antithrombin binding on cultured endothelial cells and perfused rat aorta. **J Cell Biol.** 111, 1293–1304, 1990.
- DE NIFRIS, F.; LEMAN, L.O.; CONDORELLI, M.; LEMAN, A.; NAPOLI, C. Oxidation-sensitive transcription factors and molecular mechanisms in the arterial wall. **Antioxid. Redox Signal.** 3, 1119-1130, 2001.
- DIMMELER, S.; FLEMING, I.; FISSLTHALER, B.; HERMANN, C.; BUSSE, R.; ZEIHNER, A.M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by akt-dependent phosphorylation. **Nature (London).** 399, 601-605, 1999.
- DOWNWARD, J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. **Curr. Opin. Cell Biol.** 10, 262–267, 1998.

- DUVALL, W.L. Endothelial dysfunction and antioxidants. **Mt Sinai J Med.** 72, 71–80, 2005.
- EDWARDS, G.; DORA, K.A.; GARDENER, M.J.; GARLAND, C.J.; WESTON, A.H. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. **Nature.** 396, 269–272, 1998.
- ELLIS, A.; TRIGGLE, C.R. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. **Can J Physiol Pharmacol.** 81, 1013–28, 2003.
- EVGENOV, O.V.; PACHER, P.; SCHMIDT, P.M.; HASKÓ, G.; SCHMIDT, H.H.; STASCH, J.P. **Nature Rev. Drug Discov.** 5(9), 775-768, 2006.
- FARACI, F.M.; SOBEY, C.G.; CHRISOBOLIS, S.; LUND, D.D.; HEISTAD, D.D.; WEINTRAUB, N.L. Arachidonate dilates basilar artery by lipoxygenase-dependent mechanism and activation of K(+) channels. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 281, R246–253, 2001.
- FERON, O.; SALDANA, F.; MICHEL, J.B.; MICHEL, T. The Endothelial Nitric-oxide Synthase-Caveolin Regulatory Cycle. **The Journal of Biological Chemistry.** 273(6), 3125-3128, 1998.
- FLAMMER, A.J.; SUDANO, I.; HERMANN, F.; GAY, S.; FORSTER, A.; NEIDHART, M. Angiotensin-converting enzyme inhibition improves vascular function in rheumatoid arthritis. **Circulation.** 117, 2262–2269, 2008.
- FLEMING, I.; BAUERSACHS, J.; FISSLTHALER, B.; BUSSE, R. Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. **Circ. Res.** 82, 686-695, 1998.
- FLEMING, I.; BUSSE, R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 284(1), R1-R12, 2003.
- FRANCHI-MICHELI, S.; FAILLI, P.; MAZZETTI, L.; BANI, D.; CIU, M.; ZILLETTI, L. Mechanical stretch reveals different components of endothelial-mediated vascular tone in rat aortic strips. **British Journal of Pharmacology.** 131, 1355-1362, 2000.
- FRANKE, T.F.; YANG, S.I.; CHAN, T.O.; DATTA, K.; KASLAUSKAS, A.; MORRISON, D.K.; KAPLAN, D.R.; TSICHLIS, P.N. The protein kinase encoded by the akt proto-oncogene is a target of the pdgfr-activated phosphatidylinositol 3-kinase. **Cell.** 81, 727–736, 1995.

- FULTON, D.; GRATTON, J.P.; MCCABE, T.J.; FONTANA, J.; FUJIO, Y.; WALSH, K.; FRANKE, T.F.; PAPAPETROPOULOS, A.; SESSA, W.C. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase akt. **Nature (London)**. 399, 597-601, 1999.
- FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells an the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**. 288, 373-376, 1980.
- GAETE, P.S.; LILLO, M.A.; ARDILES, N.M.; PÉREZ, F.R.; FIGUEROA, X.F. Ca^{+2} – activated K^{+} channels of small and intermediate conductance control eNOS activation through NAD(P)H oxidase. **Free Radical Biology & Medicine**. 52, 860-870, 2012.
- GARCÍA-REDONDO, A. B.; BRIONES, A. M.; BELTRÁN, A. E.; ALONSO, M. J.; SIMONSEN, U.; SALÁICES, M. Hypertension Increases Contractile Responses to Hydrogen Peroxide in Resistance Arteries through Increased Thromboxane A_2 , Ca^{2+} , and Superoxide Anion Levels. **JPET** 328, 19–27, 2009.
- GHIADONI, L.; MAGAGNA, A.; VERSARI, D.; KARDASZ, I.; HUANG, Y.; TADDEI, S.; SALVETTI, A. Different effect of antihypertensive drugs on conduit artery endothelial function. **Hypertension**. 41, 1281–1286, 2003.
- GIACHINI, F.R.; LIMA, V.V.; CARNEIRO, F.S.; TOSTES, R.C.; WEBB, C. Decreased cGMP Level Contributes to Increased Contraction in Arteries From Hypertensive Rats : Role of Phosphodiesterase 1. **Hypertension**. 57, 655-663, 2011.
- GIL-LONGO, J.; GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, C. Characterization of four different effects elicited by H_2O_2 in rat aorta. **Vascular Pharmacology**. 43, 128 – 138, 2005.
- GIMBRONE JR, M.A. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. **Am J Cardiol**. 75, 67B–70B, 1995.
- GLUAIS, P.; PAYSANT, J.; BADIÉ-COMMANDER, C.; VERBEUREN, T.; VANHOUTTE, P.M.; FÉLÉTOU, M. In SHR aorta, calcium ionophore A23187 releases prostacyclin and thromboxane A_2 as endothelium-derived contracting factors. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 291, 2255–2264, 2006.
- GOETZE, S.; BUNGENSTOCK, A.; CZUPALLA, C.; EILERS, F.; STAWOWY, P.; KINTSCHER, U.; SPENCER-HANSCH, C.; GRAF, K.; NURNBERG, B.; LAW, R.E.; FLECK, E.; GRAFE, M. Leptin induces endothelial cell migration through Akt, which is inhibited by PPAR γ -ligands. **Hypertension**. 40, 748–754, 2002.

- GOLDBLATT, H.; LYNCH, J.; HAMZAL, R.F.; SUMMERVILLE, W.W. Studies on experimental hypertension, I: the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. **J Exp Med.** 59, 347–379, 1934.
- GRIENDLING, K.K.; MINIERI, C.A.; OLLERENSHAW, J.D.; ALEXANDER, R.W. Angiotensin II Stimulates NADH and NADPH Oxidase Activity in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells. **Circ Res.** 74, 1141-1148, 1994.
- GRIENDLING, K.K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase role in cardiovascular biology and disease. **Circ. Res.** 86, 494-501, 2000.
- GRIFFITH, T.M. Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? **Br J Pharmacol.** 141, 881–903, 2004.
- GRIFFITH, T.M.; CHAYTOR, A.T.; EDWARDS, D.H. The obligatory link: role of gap junctional communication in endothelium dependent smooth muscle hyperpolarization. **Pharmacol Res.** 49, 551–564, 2004.
- GRYGLEWSKI, R.J.; BUNTING, S.; MONCADA, S.; FLOWER, R.J.; VANE, J.R. Arterial walls are protected against deposition of platelet thrombi by a substance (prostaglandin X) which they make from prostaglandin endoperoxides. **Prostaglandins.** 12(5), 685-713, 1976.
- GUO, J.; GERTSBERG, Z.; OZGEN, N.; STEINBERG, S.F. p66Shc Links α_1 -Adrenergic Receptors to a Reactive Oxygen Species–Dependent AKT-FOXO3A Phosphorylation Pathway in Cardiomyocytes. **Circ Res.** 104, 660-669, 2009.
- GÜRDAL, H.; CAN, A.; UGUR, M. The role of nitric oxide synthase in reduced vasocontractile responsiveness induced by prolonged α_1 -adrenergic receptor stimulation in rat thoracic aorta. **Br J Pharmacol.** 145, 203–210, 2005.
- GUYENET, P.G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews Neuroscience.** 7, 335–346, 2006.
- HARRINGTON, L.S.; CARRIER, M.J.; GALLAGHER, N.; GILROY, D.; GARLAND, C.J.; MITCHELL, J.A. Elucidation of the temporal relationship between endothelial-derived NO and EDHF in mesenteric vessels. **Am J Physiol.** 293, 1682–1688, 2007.
- HAYNES, M.P.; SINHA, D.; RUSSELL, K.S.; COLLINGE, M.; FULTON, D.; MORALES-RUIZ, M.; SESSA, W.C.; BENDER, J.R. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. **Circ Res.** 87, 677–682, 2000.

- HEMLER, M.E., LANDS, W.E.M. Evidence for a peroxide-initiated free radical mechanism of prostaglandin biosynthesis. **J. Biol. Chem.** 255, 6253-6261, 1980.
- HIGASHI, Y.; SASAKI, S.; NAKAGAWA, K.; MATSUURA, H.; OSHIMA, T.; CHAYAMA, K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. **N Engl J Med.** 346,1954-1962, 2002.
- HISAMOTO, K.; OHMICHII, M.; KURACHI, H.; HAYAKAWA, J.; KANDA, Y.; NISHIO, Y.; ADACHI, K.; TASAKA, K.; MIYOSHI, E.; FUJIWARA, N.; TANIGUCHI, N.; MURATA, Y. Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. **J Biol Chem.** 276, 3459–3467, 2001.
- HUANG, P.L.; HUANG, Z.; MASHIMO, H.; BLOCH, K.D.; MOSKOWITZ, M.A.; BEVAN, J.A.; FISHMAN, M.C. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. **Nature.** 377, 239–242, 1995.
- HURLIMANN, D.; FORSTER, A.; NOLL, G.; ENSELEIT, F.; CHENEVAR, R.; DISTLER, O. Anti-tumor necrosis factor-alpha treatment improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. **Circulation.** 106, 2184–2187, 2002.
- HUSAIN, K.; VAZQUEZ-ORTIZ, M.; LALLA, J. Down regulation of aortic nitric oxide and antioxidant systems in chronic alcohol-induced hypertension in rats. **Hum Exp Toxicol.** 26, 427-434, 2007
- IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E.; CHAUDHURI, G. Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci USA.** 84, 9265–9269, 1987.
- IGNARRO, L.J.; WEI LUN. Nitric oxide in the regulation of vascular function: an historical overview. **J. Card. Surg.** 17, 301-306, 2002.
- ISCHIROPOULOS, H.; AL-MEHDI, A.B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. **FEBS Lett.** 364(3), 279-282, 1995.
- KATSUKI, S.; ARNOLD, W.P.; MURAD, F. Effect of sodium nitroprusside, nitroglycerin and sodium azide on levels of cyclic nucleotides and mechanical activity of various tissues. **J. Cyclic Nucl. Res.** 3, 239-47, 1977.
- KONISHI, M.; SU, C. Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. **Hypertension.** 5, 881– 886, 1983.

- KONTOS, H.A.; WEI, E.P.; ELLIS, E.F.; JENKINS, L.W.; POVLISHOCK, J.T.; ROWE, G.T.; HESS, M.L. Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. **Circ. Res.** 57, 142-151, 1985.
- KUREISHI, Y.; LUO, Z.; SHIOJIMA, I.; BIALIK, A.; FULTON, D.; LEFER, D.J.; SESSA, W.C.; WALSH, K. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. **Nat Med.** 6, 1004–1010, 2000.
- KURUMBAL, R.G.; STEVENS, A.M.; GIERSE, J.K.; MCDONALD, J.J.; STEGEMAN, R.A.; PAK, J.Y.; GILDEHAUS, D.; MIYASHIRO, J.M.; PENNING, T.D.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P.C.; STALLINGS, W.C. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. **Nature.** 384, 1996.
- LARSEN, B.T.; GUTTERMAN, D.D.; SATO, A.; TOYAMA, K.; CAMPBELL, W.B.; ZELDIN, D.C.; MANTHATI, V.L.; FALCK, J.R.; MIURA, H. Hydrogen peroxide inhibits cytochrome p450 epoxygenases: interaction between two endothelium-derived hyperpolarizing factors. **Circ Res.** 102, 59–67, 2008.
- LINDER, L.; KIEWSKI, W.; BUHLER, F.R.; LUSCHER, T.F. Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo. Blunted response in essential hypertension. **Circulation.** 81, 1762–7, 1990.
- LÜSCHER, T.F.; ROMERO, J.C.; VANHOUTTE, P.M. Bioassay of endothelium-derived vasoactive substances in the aorta of normotensive and spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertens.** 4, S81–S83, 1987.
- LÜSCHER, T.F.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension.** 8, 344–348, 1986.
- MAKIMATTILA, S.; VIRKAMAKI, A.; GROOP, P.H.; COCKCROFT, J.; UTRAIINEN, T.; FAGERUDD, J. Chronic hyperglycemia impairs endothelial function and insulin sensitivity via different mechanisms in insulin-dependent diabetes mellitus. **Circulation.** 94, 1276–1282, 1996.
- MALKOWSKI, M.G.; GINELL, S.L.; SMITH, W.L.; GARAVITO, R.M. The productive conformation of arachidonic acid bound to prostaglandin synthase. **Science** 289, 1933–1937, 2000.
- MARTINEZ-LEMUS, L.A.; HILL, M.A.; MEININGER, G.A. The plastic nature of the vascular wall: a continuum of remodeling events contributing to control of arteriolar diameter and structure. **Physiology.** 24, 45-57, 2009.

- MICHEL, J.B.; FERON, O.; SASE, K.; PRABHAKAR, P.; MICHEL, T. Caveolin versus Calmodulin - counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. **The Journal of Biological Chemistry**. 272(41), 25907-25912, 1997.
- MICHELAKIS, E.; TYMCHAK, W.; LIEN, D.; WEBSTER, L.; HASHIMOTO, K.; ARCHER, S. Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension: comparison with inhaled nitric oxide. **Circulation**. 105, 2398-2403, 2002.
- MITCHELL, J.A.; DE NUCCI, G.; WARNER, T.D.; VANE, J.R. Different patterns of release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin. **Br J Pharmacol**. 105, 485-489, 1992.
- MONCADA, S.; GRYGLEWSKI, R.; BUNTING, S.; VANE, J.R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**. 263(5579), 663-665, 1976.
- MONCADA, S.; GRYGLEWSKI, R.J.; BUNTING, S.; VANE, J.R. A lipid peroxide inhibits the enzyme in blood vessel microsomes that generates from prostaglandin endoperoxides the substance (prostaglandin X) which prevents platelet aggregation. **Prostaglandins**. 12(5), 715-737, 1976.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.** 43(2), 109-42, 1991.
- NAKAZONO, K.; WATANABE, N.; MATSUNO, K.; SASAKI, J.; SATO, T.; INOUE, M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 88, 10045-10048, 1991.
- NARABA, H.; MURAKAMI, M.; MATSUMOTO, H.; SHIMBARA, S.; UENO, A.; KUDO, I.; OH-ISHI, S. Segregated Coupling of Phospholipases A₂, Cyclooxygenases, and Terminal Prostanoid Synthases in Different Phases of Prostanoid Biosynthesis in Rat Peritoneal Macrophages. **J. Immunol.** 160, 2974-2982, 1998.
- NISHI, E.E.; OLIVEIRA-SALES, E.B.; BERGAMASHI, C.T.; OLIVEIRA, T.G.C.; BOIM, M.A.; CAMPOS, R.R. Chronic Antioxidant Treatment Improves Arterial Renovascular Hypertension and Oxidative Stress Markers in the Kidney in Wistar Rats. **American Journal of Hypertension**. 23(5), 473-480, 2010.
- OHASHI, Y.; KAWASHIMA, S.; HIRATA, K.-I.; YAMASHITA, T.; ISHIDA, T.; INOUE, N.; SAKODA, T.; KURIHARA, H.; YAZAKI, Y.; YOKOYAMA, M. Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. **J. Clin. Invest.** 102, 2061-2071, 1998.

- OLIVEIRA, A. P. S.; BENDHACK, L. M. Relaxation Induced by Acetylcholine Involves Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in 2-Kidney 1-Clip Hypertensive Rat Carotid Arteries. **Pharmacology**. 72, 231–239, 2004.
- OLIVEIRA-SALES, E.B.; COLOMBARI, D.S.A.; DAVISSON, R.L.; KASPAROV, S.; HIRATA, A.E.; CAMPOS, R.R.; PATON, J.F.R. Kidney-Induced Hypertension Depends on Superoxide Signaling in the Rostral Ventrolateral Medulla. **Hypertension**. 56, 290-296, 2010.
- OLIVEIRA-SALES, E.B.; NISHI, E.E.; CARILLO, B.A.; BOIM, M.A.; MIRIAM S. DOLNIKOFF, M.S.; BERGAMASCHI, C.T.; CAMPOS, R.R. Oxidative Stress in the Sympathetic Premotor Neurons Contributes to Sympathetic Activation in Renovascular Hypertension. **Am. J. Hypertension**. 22(5), 484-492, 2009.
- OTTO, J.C.; SMITH, W.L. The Orientation of Prostaglandin Endoperoxide Synthases-1 and -2 in the Endoplasmic Reticulum. **The Journal of Biological Chemistry**. 269 (31), 19868-19875, 1994.
- PALADE, G.E. Fine structure of blood capillaries. **J. Appl. Physics**. 24,1424, 1953.
- PANZA, J.A.; QUYYUMI, A.A.; BRUSH, J.J.; EPSTEIN, S.E. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. **N Engl J Med**. 323, 22–27, 1990.
- PARAVACINI, T.M.; TOUYZ, R.M. NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension. **Diabetes Care**. 31 (2),170–180, 2008.
- PATTERSON, C.; RUEF, J.; MADAMANCHI, N. R.; BARRY-LANE, P.; HU, Z; HORAIST, C.; BALLINGER, C. A.; BRASIER, A. R.; BODE, C.; RUNGE, M. S. Stimulation of a Vascular Smooth Muscle Cell NAD(P)H Oxidase by Thrombin. **The Journal of Biological Chemistry**. 274(28), 19814–19822, 1999.
- PICOT, D.; LOLL, P.J.; GARAVITO, R.M. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. **Nature**. 367, 243–249, 1994.
- POPP, R.; BRANDES, R.P.; OTT, G.; BUSSE, R.; FLEMING, I. Dynamic modulation of interendothelial gap junctional communication by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid. **Circ Res**. 90, 800–806, 2002.
- POU, S.; POU, W.S.; BREDET, D.S.; SNYDER, S.H.; ROSEN, G.M. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. **J Biol Chem**. 267, 24173–24176, 1992.

- PRASAD, S.; WILKINSON, J.; GATZOULIS, M.A. Sildenafil in primary pulmonary hypertension. **N Engl J Med.** 343, 1342, 2000.
- QU, C.; LEUNG, S.W.S.; VANHOUTTE, P.M.; MAN, R.Y.K. Chronic Inhibition of Nitric-Oxide Synthase Potentiates Endothelium-Dependent Contractions in the Rat Aorta by Augmenting the Expression of Cyclooxygenase-2. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 334(2), 373–380, 2010.
- RAPOPORT, R.M.; MURAD, F. Agonist-Induced Endothelium-Dependent Relaxation in Rat Thoracic Aorta May Be Mediated through cGMP. **Circ. Res.** 52, 352–357, 1983.
- REES, D.D.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 86, 3375–3378, 1989.
- RODRIGUES, G. J.; LUNARDI, C. N.; LIMA, R.G.; SANTOS, C. X.; LAURINDO, F. R.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Vitamin C improves the effect of a new nitric oxide donor on the vascular smooth muscle from renal hypertensive rats. **Nitric Oxide.** 18(3),176-183, 2008.
- RODRIGUES, G. J.; RESTINI, C. B.; LUNARDI, C. N.; MOREIRA, J. E.; LIMA, R. G.; DA SILVA, R. S.; BENDHACK, L. M. Caveolae Dysfunction Contributes to Impaired Relaxation Induced by Nitric Oxide Donor in Aorta from Renal Hypertensive Rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.** 323, 831–837, 2007.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, M.A.; GARCÍA-COHEN E.C.; BAENA A.B.; GONZÁLEZ, R.; SALAÍCES, M.; MARÍN, J. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. **British Journal of Pharmacology.** 125, 1329 – 1335, 1998.
- ROLLINS, T.E.; SMITH, W.L. Subcellular localization of prostaglandin-forming cyclooxygenase in Swiss mouse 3T3 fibroblasts by electron microscopic immunocytochemistry. **J. Biol. Chem.** 255, 4872–4875, 1980.
- ROUZER, C., MARNETT, L. Mechanism of free radical oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cyclooxygenases. **Chem. Rev.** 103, 2239–2304, 2003.
- RYBALKINA, I.G.; TANG, X.; RYBALKIN, S.D. Multiple Affinity States of cGMP-Specific Phosphodiesterase for Sildenafil Inhibition Defined by cGMP-Dependent and cGMP-Independent Mechanisms. **Mol Pharmacol.** 77, 670–677, 2010.

- SAFAR, M.E.; CHAU, N.P.; WEISS, Y.A.; LONDON, G.M.; MILLIEZ, P.L. Control of cardiac output in essential hypertension. **The American Journal of Cardiology**. 38, 332–336, 1976.
- SAPER, C.B. The central autonomic nervous system: conscious visceral perception and autonomic pattern generation. **Annual Review of Neuroscience**. 25, 433–469, 2002.
- SATO, M.; KAWAI-KOWASE, K.; SATO, H.; OYAMA, Y.; KANAI, H.; OHYAMA, Y.; SUGA, T.; MAENO, T.; AOKI, Y.; TAMURA, J.; SAKAMOTO, H.; NAGAI, R.; KURABAYASHI, M. c-Src and Hydrogen Peroxide Mediate Transforming Growth Factor- β 1-Induced Smooth Muscle Cell -Gene Expression in 10T1/2 Cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 25, 341-347, 2005.
- SATOH, M.; FUJIMOTO, S.; HARUNA, Y.; ARAKAWA, S.; HORIKE, H.; KOMAI, N.; SASAKI, T.; TSUJIOKA, K.; MAKINO, H.; KASHIHARA, N. NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. **Am. J. Physiol. Renal Physiol**. 288, F1144-F1152, 2005.
- SAWYER, D.; VALENTINE, J. How Super Is Superoxide? **Acc. Chem. Res**. 14, 393-400, 1981.
- SHIMOKAWA, H.; FLAVAHAN, N.A.; VANHOUTTE, P.M. Loss of endothelial pertussis toxin-sensitive G protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. **Circulation**. 83, 652– 660, 1991.
- SILVA, B.R. Efeito vasodilatador do novo composto doador de Óxido Nítrico “Ru-4-Mercapto-NO (GOLD) (AuNPs-{Ru-4PySH}_n) em aorta de ratos. **Dissertação (Mestrado)** – Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2009.
- SINDHU, R.K.; EHDAIE, A.; FARMAND, F.; DHALIWAL, K.K.; NGUYEN, T.; ZHAN, C.; ROBERTS, C.K.; VAZIRI, N.D. Expression Of Catalase And Glutathione Peroxidase In Renal Insufficiency. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1743, 86–92, 2005.
- SMITH, W.L.; DE WITT, D.L.; GARAVITO, R.M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. **Annu. Rev. Biochem**. 69, 145–182, 2000.
- SMITH, W.L.; ELING, T.E.; KULMACZ, R.J.; MARNETT, L.J.; TSAI, A. Tyrosyl radicals and their role in hydroperoxide-dependent activation and inactivation of prostaglandin endoperoxide synthase. **Biochemistry**. 31, 3–7, 1992.

- SPIEKER, L.E.; SUDANO, I.; HURLIMANN, D.; LERCH, P.G.; LANG, M.G.; BINGGELI, C. High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. **Circulation**. 105, 1399–402, 2002.
- STEFFEL, J.; LUSCHER, T.F.; TANNER, F.C. Tissue factor in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical implications. **Circulation**. 113, 722–31, 2006.
- STEINBERG, H.O.; CHAKER, H.; LEAMING, R.; JOHNSON, A.; BRECHTEL, G.; BARON, A.D. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. **J Clin Invest**. 97, 2601–10, 1996.
- SUNANO, S.; WATANABE, H.; TANAKA, S.; SEKIGUCHI, F.; SHIMAMURA, K. Endothelium-derived relaxing, contracting and hyperpolarizing factors of mesenteric arteries of hypertensive and normotensive rats. **Br. J. Pharmacol**. 126, 709–716, 1999.
- SUZAKI, Y.; YOSHIKUMI, M.; KAGAMI, S.; KOYAMA, A.H.; TAKETANI, Y.; HOUCHI, H.; TSUCHIYA, K.; TAKEDA, E.; TAMAKI, T. Hydrogen Peroxide Stimulates c-Src-mediated Big Mitogenactivated Protein Kinase 1 (BMK1) and the MEF2C Signaling Pathway in PC12 Cells. **The Journal of Biological Chemistry**. 277(11), 9614-9621, 2002.
- TANG, E.H.; LEUNG, F.P.; HUANG, Y.; FÉLÉTOU, M.; MAN, R.Y.; VANHOUTTE, P.M. Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor. **Br. J. Pharmacol**. 151, 15-23, 2007.
- TANG, E.H.C.; VANHOUTTE, P.M. Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. **Physiol Genomics**. 32, 409–418, 2008.
- TAWAKOL, A.; FORGIONE, M.A.; STUEHLINGER, M.; ALPERT, N.M.; COOKE, J.P.; LOSCALZO, J. Homocysteine impairs coronary microvascular dilator function in humans. **J Am Coll Cardiol**. 40, 1051–1058, 2002.
- TORSONI, A.S.; MARIN, T.M.; VELLOSO, L.A.; FRANCHINI, K.G. RhoA/ROCK signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 289, H1488–H1496, 2005.

- TSAPLINA, L. A.; VRZHESHCH, P.V. Cyclooxygenase and peroxidase inactivation of prostaglandin-H-synthase during catalysis. **Biochemistry (Moscow)**. 72, 631-639, 2007.
- UENO, N.; TAKEGOSHI, Y.; KAMEI, D.; KUDO, I.; MURAKAMI, M. Coupling between cyclooxygenases and terminal prostanoid synthases. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 338, 70–76, 2005.
- ÜLKER, S.; MCMASTER, D.; MCKEOWN, P. P.; BAYRAKTUTAN, U. Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. **Cardiovascular Research**. 59, 488–500, 2003.
- VAN HINSBERGH, V.W.M. Endothelial Permeability for Macromolecules - Mechanistic Aspects of Pathophysiological Modulation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. 17, 1018-1023, 1997.
- VAN HINSBERGH, V.W.M. The endothelium: vascular control of haemostasis. **Eur J. Obst. Gynecol. Reprod. Biol.** 95(2), 98-201, 2001.
- VECCHIONE, C.; MAFFEI, A.; COLELLA, S.; ARETINI, A.; POULET, R.; FRATI, G.; GENTILE, M.T.; FRATTA, L.; TRIMARCO, V.; TRIMARCO, B.; LEMBO, G. Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. **Diabetes**. 51, 168–173, 2002.
- VIRDIS, A.; COLUCCI, R.; FORNAI, M.; DURANTI, E.; GIANNARELLI, C.; BERNARDINI, N.; SEGNANI, C.; IPPOLITO, C.; ANTONIOLI, L.; BLANDIZZI, C.; TADDEI, S.; SALVETTI, A.; DEL TACCA, M. Cyclooxygenase-1 Is Involved in Endothelial Dysfunction of Mesenteric Small Arteries From Angiotensin II -Infused Mice. **Hypertension**. 49, 679-686, 2007.
- VIRDIS, A.; COLUCCI, R.; VERSARI, D.; GHISU, N.; FORNAI, M.; ANTONIOLI, L.; DURANTI, E.; DAGHINI, E.; GIANNARELLI, C.; BLANDIZZI, C.; TADDEI, S.; DEL TACCA, M. Atorvastatin Prevents Endothelial Dysfunction in Mesenteric Arteries From Spontaneously Hypertensive Rats Role of Cyclooxygenase 2-Derived Contracting Prostanoids. **Hypertension**. 53, 1008-1016, 2009.
- VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; CARDINAL, H.; FAVILLA, S.; DURANTI, P.; BIRINDELLI, R. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction induced by fasting hyperhomocystinemia in normotensive subjects and patients with essential hypertension. **J Am Coll Cardiol**. 38, 1106–15, 2001.

- WEI, C.M.; HU, S.; MILLER, V.M.; BURNETT JR, J.C. Vascular actions of C-type natriuretic peptide in isolated porcine coronary arteries and coronary vascular smooth muscle cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 205, 765–771, 1994.
- WILCOX, J.N.; SUBRAMANIAN, R.R.; SUNDELL, C.L.; TRACEY, W.R.; POLLOCK, J.S.; HARRISON, D.G.; MARSDEN, P.A. Expression of Multiple Isoforms of Nitric Oxide Synthase in Normal and Atherosclerotic Vessels. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 17, 2479–2488, 1997.
- WU, X.; MAKYNEN, H.; KAHONEN, M.; ARVOLA, P.; PORSTI, I. Mesenteric arterial function in vitro in three models of experimental hypertension. **J. Hypertens.** 14, 365–372, 1996.
- XU, P.; COSTA-GONCALVES, A.C.; TODIRAS, M.; RABELO, L.A.; SAMPAIO, W.O.; MOURA, M.M.; SANTOS, S.S.; LUFT, F.C.; BADER, M.; GROSS, V.; ALENINA, N.; SANTOS, R.A.S. Endothelial Dysfunction and Elevated Blood Pressure in Mas Gene-Deleted Mice. **Hypertension.** 51, 574-580, 2008.
- YAMADA, E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. **J. Biophys. Biochem. Cytol.** 1, 445–458, 1955.
- YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGÁRRON, J.M. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. **Anal Bioanal Chem.** 382, 884–886, 2005.
- YIN, C.C.; HUANG, K.T. H_2O_2 but not O_2^- elevated by oxidized LDL enhances human aortic smooth muscle cell proliferation. **Journal of Biomedical Science.** 14, 245–254, 2007.
- YOGI, A.; CALLERA, G.E.; HIPÓLITO, U.V.; SILVA, C.R.; Rhian M. TOUYZ, R.M.; TIRAPELLI, C.R. Ethanol-induced vasoconstriction is mediated via redox-sensitive cyclo-oxygenase-dependent mechanisms. **Clinical Science.** 118, 657–668, 2010.
- YOSHIDA, J.; YAMAMOTO, K.; MANO, T.; SAKATA, Y.; NISHIKAWA, N.; NISHIO, M.; OHTANI, T.; MIWA, T.; HORI, M.; MASUYAMA, T. AT1 receptor blocker added to ACE inhibitor provides benefits at advanced stage of hypertensive diastolic heart failure. **Hypertension.** 43, 686–691, 2004.

Anexo de Publicação

Manuscrito aceito para publicação na European Journal Pharmacology

Hydrogen peroxide modulates phenylephrine-induced contractile response in renal hypertensive rat aorta

Bruno R. Silva^a, Laena Pernomian^a, Marcella D. Grandó^b, Jefferson H. Amaral^a, Jose E. Tanus-Santos^a, Lusiane M. Bendhack^{b,*}

^aDepartment of Pharmacology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

^bLaboratory of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14040-903 Ribeirão Preto, SP- Brazil

*** Correspondent Author**

Lusiane Maria Bendhack

Laboratório de Farmacologia

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Av. do Café s/n°.

14040-903 Ribeirão Preto, SP - Brazil

Phone: 55-16-36024704

FAX: 55-16-36024880

e-mail: bendhack@usp.br

Abstract

Aim: Endothelium-derived factors play an important role in vascular tone control. This study aimed to evaluate how endothelium and reactive oxygen species (ROS) contribute to phenylephrine (PE)-induced contraction in renovascular hypertensive (2K-1C) and normotensive (2K) rats aortas. **Methods and Results:** The effects of the superoxide scavenger Tiron (0.1 mM and 1 mM) or catalase (30 U/mL, 90 U/mL, 150 U/mL and 300 U/mL) on the PE-induced contraction were evaluated in both intact endothelium (E+) and denuded (E-) aortas. Endothelium removal increased the PE-induced contractions. The maximum contractile response decreased only in 2K-1C rat E+ aorta, and catalase (30 U/mL, 90 U/mL, 150 U/mL) partially reversed this effect. Endothelium increased the basal hydrogen peroxide (H₂O₂) production in 2K and 2K-1C rats aortas. PE-stimulated H₂O₂ production was higher in 2K-1C (E+/E-) than in 2K (E+/E-). Inhibition of the enzymes cyclooxygenase, NADPH-oxidase, xanthine-oxidase, and superoxide dismutase reduced the PE-stimulated H₂O₂ production in 2K-1C rat aorta. **Conclusion:** The decreased contraction to PE in 2K-1C rat aorta is partially due to endothelial H₂O₂ production; however, in denuded aorta, it contributes to maintaining the contractile response. Superoxide plays an important role on the PE-induced contraction in 2K rat denuded aorta, whereas in 2K-1C rat aorta, it is H₂O₂ that plays an important role in this effect.

Key Words: adrenergic α_1 agonist, contractile response, endothelial factor, 2K-1C renal hypertension, oxygen radical

1. Introduction

Vascular cells such as endothelial and smooth muscle cells produce reactive oxygen species (ROS) originating from O_2 metabolism. ROS include superoxide ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), and the hydroxyl radical (OH^{\cdot}). However, under physiological conditions, nitric oxide (NO) is a recognized vasodilator nitrogen species that endothelial cells produce in a controlled manner (Touyz and Schiffrin, 2004). Together, these species control vascular smooth muscle contraction and relaxation.

Angiotensin II (Ang II) stimulates ROS production mainly by activating the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate enzymatic activity (NADPH Oxidase, Nox) in the vessel wall (Griendling et al., 1994; Pagano et al., 1995; Rajagopalan et al., 1996). Moreover, Nox seems to contribute to ROS production in spontaneously hypertensive rats (SHR) endothelial cells regardless of Ang II (Wind et al., 2010). Other oxidases such as xantine oxidase (Phan et al., 1989) and uncoupled NO-synthase (NOS) (Sato et al., 2005) can also produce ROS in the vascular system.

Independent of the source, $O_2^{\cdot-}$ seems to be the major vascular oxygen metabolism-derived ROS (Rajagopalan et al., 1996); the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) rapidly dismutates $O_2^{\cdot-}$ to H_2O_2 (McCord and Fridovich, 1969). Following this reaction, the antioxidant enzyme catalase degrades H_2O_2 to water and molecular oxygen (Maral et al., 1977). The imbalance between pro- and antioxidant enzymes characterizes oxidative stress, which is implicated in the pathogenesis of hypertension. Attention is currently focused on ROS enzymatic sources, because they seem to play an important role in developing and maintaining arterial hypertension in humans (Sagar et al., 1992) and in experimental models of

hypertension such as SHR (Suzuki et al., 1995), Dahl salt-sensitive rats (Swei et al., 1997), and Ang II-infused rats (Laurson et al., 1997).

The $O_2^{\cdot-}$ anion is highly reactive and can reduce NO availability; NO is an important vasodilator that endothelial cells produce (Costa et al., 2009). Impaired endothelium-dependent vascular relaxation characterizes endothelial dysfunction, which is usually found in several hypertensive models. However, $O_2^{\cdot-}$ production can also contribute to sympathetic hyperactivity, besides decreasing endothelium-dependent vasodilation during renovascular hypertension (Costa et al., 2009; Nishi et al., 2010). The $O_2^{\cdot-}$ anion can also increase the arteriolar tone in SHR rats (Suzuki et al., 1998), and an adrenal pathway may partially mediate this effect. Adrenalectomy reduces xanthine oxidase expression, ROS production, and arteriolar tone to normotensive levels (Delano et al., 2006). These findings reveal a close relationship between $O_2^{\cdot-}$ production and adrenergic pathways activity.

Although it is known that renovascular hypertension involves reduced endothelium-dependent relaxation (Callera et al., 2004), the role of ROS on the contractile response induced by adrenergic α_1 receptor agonists in this hypertensive model is not yet clear. Therefore, the present study aimed to evaluate the role of ROS, $O_2^{\cdot-}$, and H_2O_2 on the contractile response induced by the adrenergic α_1 receptor agonist phenylephrine in denuded (E-) or intact endothelium (E+) aortas from normotensive (2K) and hypertensive (2K-1C) rats.

2. Methods

2.1 Animals

All the procedures were performed in accordance with the standards and policies of the Ethics Committee on Animal Care and Use of the University of São

Paulo. Male rats (180-200 g) were anesthetized with tribromoethanol (2.5 mg kg⁻¹, i.p.); after a midline laparotomy, a silver clip with 0.20-mm internal diameter was placed around the left renal artery. Normotensive two-kidney rats (2K) were submitted to laparotomy only. Animals were maintained on standard rat chow, as described previously (Callera et al., 2004). The systolic blood pressure (SBP) was measured by an indirect tail-cuff method six weeks after the surgery. Rats were considered hypertensive when SBP was higher than 180 mmHg.

2.2 Functional Study by Vascular Reactivity

Male rats (400-450 g) were killed by decapitation under anesthesia. The thoracic aorta was quickly removed and cut into rings (4-mm length). In some rings, the endothelium was mechanically removed by gently rolling the vessel lumen on a thin wire. The aortic rings were placed between two stainless-steel stirrups and connected to an isometric force transducer (Letica Scientific Instruments, Barcelona–Spain), to measure tension in the vessels. The rings were placed in the organ chamber containing Krebs solution with the following composition (mM): 130.0 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 14.9 NaHCO₃, 5.5 glucose, and 1.6 CaCl₂. The solution was maintained at pH 7.4 gassed with 95% O₂ and 5% CO₂ at 37 °C. The rings were initially stretched to a basal tension of 1.5 g; then, they were allowed to equilibrate for 60 min. Endothelial integrity was qualitatively assessed by the degree of relaxation induced by acetylcholine (1 μM) in the presence of a contractile tone induced by phenylephrine (PE, 0.1 μM). For studies in endothelium-intact artery, the ring was discarded if relaxation with acetylcholine was not 80% or greater; in the case of endothelium-denuded artery, the ring was discarded if there was any degree of relaxation. Concentration-effect curves were constructed for PE in the case of 2K

and 2K-1C denuded (E-) or intact endothelium (E+) rats aortas. These curves were obtained in the absence of or after 30-min incubation with the antioxidant agents $O_2^{\cdot-}$ scavenger Tiron (0.1 mM or 1mM) or Catalase (extracted from bovine liver at concentrations of 30, 90, 150, and 300 Units mL^{-1}), to degrade H_2O_2 to H_2O and O_2 . The PE potency (pD_2) and maximum effect (ME) in inducing contraction were evaluated.

2.3 Measurement of basal ROS levels in aortic rings and plasma

The aortic rings were initially stretched to a basal tension of 1.5 g; next, they were allowed to equilibrate for 60 min in the organ chamber. Endothelial integrity was assessed qualitatively as previously described. After intact-endothelium aortas were vertically embedded in Tissue-tek, they were frozen and cut in serial 4- μm sections. Unfixed cryo-sections were incubated with 10 μL of DHE (10 μM) for 30 min at room temperature, in the dark, to evaluate the *in situ* ROS production (Castro et al., 2009). Some experiments were performed in the absence or in the presence of Tiron (1 mM) or Peg Catalase (300 Units mL^{-1}). Sections were examined by fluorescence microscopy (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge-England), and the image was captured at $\times 400$. Red fluorescence from 20 fields around the vessel was evaluated by using the ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), as described before (Montenegro et al., 2009). The arithmetic means of the fluorescence were calculated for each slide.

Plasma lipid peroxide levels were determined by measuring thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) using a previously described fluorimetric method (Castro et al., 2009). This technique requires excitation at 515 nm, emission at 553

nm, and 1,1,3,3-tetramethoxypropane as standard (Yagi, 1998). The lipoperoxide levels were expressed in terms of malondialdehyde (MDA, nmol mL⁻¹).

2.4 Measurement of H₂O₂ production in aortic rings

2K and 2K-1K rats E+ and E- aortic rings samples were initially stretched to a basal tension of 1.5 g in the organ bath in order to reproduce the tension to which the preparations were submitted in the vascular reactivity studies. The effectiveness of endothelial removal (E-) or its integrity (E+) was assessed qualitatively. To this end, the aortic rings were stimulated with PE (0.1 μM) until they reached the maximum contractile response; another group of aortic rings was not stimulated (basal). Then, the aortas were immediately removed from the organ chamber and frozen in liquid nitrogen. Another group of 2K and 2K-1C rats intact aortas (E+) was incubated or not (control) with non-selective enzyme inhibitors of nitric oxide synthase (NOS) (L-NAME, 100 μM), cyclooxygenase (COX) (ibuprofen, 10 μM), NADPH oxidase (apocynin, 100 μM), xanthine oxidase (allopurinol, 100 μM), or superoxide dismutase (SOD) (DDC, 10 μM) for 30 min. After that, aortas were stimulated with PE (0.1 μM) until they reached maximum contractile response, followed by their immediate removal from the organ chamber and freezing in liquid nitrogen. Next, all the frozen samples of wet tissue were macerated in 200 μL of Krebs solution and centrifuged at 14.770 xg. The H₂O₂ production was measured by using the Amplex red H₂O₂ assay kit (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA-USA) according to the manufacturer's protocol. A H₂O₂ solution used to construct the standard curve on the same 96-well plate was incubated with Ultra red working solution (100 μM) at 37 °C together with the supernatant of the tissues; it was used to determine the H₂O₂ concentrations in the samples. Fluorescence emission was measured at excitation of

530 nm and emission of 590 nm on the Biotek Synergy HT plate reader. The results are expressed as the mean \pm SEM of the absolute detected H_2O_2 concentration ($\mu\text{mol L}^{-1}$), without correction for tissue mass or total protein, because the aim of this experimental protocol was to evaluate total (absolute) H_2O_2 concentration produced by 2K and 2K-1C rats aortic rings in the absence or presence of PE and to verify possible sources of H_2O_2 production through enzymes inhibition.

2.5 Drugs and solutions

Phenylephrine, acetylcholine, Tiron, catalase from bovine liver, Peg-Catalase, L-NAME (L-N^G-Nitroarginine methyl ester), apocynin, indomethacin, allopurinol, and sodium diethyldithiocarbamate (DDC) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO-USA). The Amplex red assay Kit was purchased from Invitrogen (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA-USA). All the solutions were prepared immediately before use.

2.6 Statistical analysis

Results are presented as the mean \pm SEM. Comparisons between groups were conducted by the student *t* test, one-way analysis of variance followed by Newman-Keuls, or two-way analysis of variance using Bonferroni correction for multiple comparisons, as appropriate. The level of statistical significance was defined as $P < 0.05$.

3. Results

3.1 Endothelium reduces the maximum phenylephrine-induced contractile response only in 2K-1C rat aorta

The cumulative addition of PE in 2K and 2K-1C aortic rings induced contraction in a concentration dependent-way (Fig.1). The contractile response induced by PE was not different between denuded aortas (E-) from 2K and 2K-1C (2K, ME: 2.5 ± 0.2 g; pD_2 : 7.93 ± 0.10 ; n=8 / 2K-1C ME: 2.6 ± 0.2 g; pD_2 : 7.89 ± 0.08 ; n=9). However, in intact endothelium aorta (E+) the contractile response induced by PE was less potent than in denuded aortas, in both 2K and 2K-1C. The potency of PE was not different between E+ aortas from 2K and 2K-1C whereas the ME was decreased only in 2K-1C (2K, ME: 2.2 ± 0.1 g; pD_2 : 7.44 ± 0.03 ; n=5 / 2K-1C, ME: 1.2 ± 0.2 g; pD_2 : 7.54 ± 0.06 ; n=7; $P < 0.001$).

3.2 Systemic oxidative stress levels are higher in 2K-1C than in 2K rats aorta

To investigate the systemic oxidative stress levels in 2K and 2K-1C rats, we evaluated the plasma MDA levels using TBARS. Figure 2A shows that MDA production was higher in 2K-1C rat plasma as compared with 2K ($P < 0.05$).

3.3 Anion superoxide scavenger and Peg-Catalase reduce the basal oxidative stress in the 2K-1C rat aortic ring

We evaluated ROS production using the sensitive probe DHE in 2K and 2K-1C rats E+ aortic slices. Figures 2B and 2C reveal significantly increased DHE oxidation in 2K-1C rat E+ aorta, as compared with 2K ($P < 0.05$). However, incubation with the powerful direct superoxide scavenger Tiron 1 mM or with the enzyme Peg-Catalase 300 U mL⁻¹, which degrades H₂O₂, totally reversed the increased DHE oxidation in 2K-1C rat aorta to levels similar to those observed in 2K rat aorta.

3.4 The superoxide anion contributes to phenylephrine-induced contractile response in 2K rat aorta while the hydrogen peroxide contributes to this response in 2K-1C rat aorta

Figure 3 and Table 1 evidences that incubation with Tiron reduced the PE-induced contractile response potency ($P < 0.001$) and ME only in 2K rat denuded aorta ($P < 0.05$), but incubation with catalase did not alter the PE-induced contractile response in 2K rat aorta. However, in 2K-1C rat aorta, Tiron did not modify the PE-induced contractile response, whereas all catalase concentrations decreased the PE-induced contractile response potency ($P < 0.001$) and ME ($P < 0.001$) in 2K-1C rat E-aorta (Fig. 4 and Table 1). Otherwise, incubation with catalase at concentrations of 30, 90, and 150 U mL⁻¹ but not 300 U mL⁻¹ partially reversed the decreased PE-induced contractile response in 2K-1C rat intact aorta ($P < 0.001$).

3.5 Phenylephrine determines the maintenance of elevated H₂O₂ levels in 2K-1C rat aorta

In basal conditions, H₂O₂ production in E+ aorta did not differ between 2K and 2K-1C rats. However, it was higher in E+ than in E- aorta in both 2K and 2K-1C rats ($P < 0.05$). On the other hand, PE reduced and increased H₂O₂ production in 2K rat E+ ($P < 0.05$) and 2K-1C rat E- ($P < 0.05$) aortas, respectively, as compared with the respective basal conditions. However, H₂O₂ production in PE-stimulated E+ and E-aortas was higher in 2K-1C than in 2K rats ($P < 0.001$).

3.6 Inhibition of cyclooxygenase (COX), NADPH oxidase, xanthine oxidase, and superoxide dismutase (SOD) but not nitric oxide synthase (NOS) reduces PE-stimulated H₂O₂ production in 2K-1C rat intact endothelium aorta

Inhibition of these enzymes did not reduce H₂O₂ production in 2K rat aorta (Fig. 6A). However, inhibition of COX with ibuprofen (10 μM) (P < 0.01), NADPH oxidase with apocynin (100 μM) (P < 0.01), xanthine oxidase with allopurinol (P < 0.001), and SOD with DDC (10 μM) (P < 0.05) reduced H₂O₂ production as compared with the control (Fig. 6B). On the other hand, NOS inhibition with L-NAME (100 μM) did not affect H₂O₂ production in 2K-1C rat E+ aorta.

4. Discussion

Biological studies have been performed in several vascular beds such femoral, carotid, mesenteric arteries and aortas from different animal species. We have used thoracic aorta because in this vessel the contractile response induced by phenylephrine (selective adrenergic α₁ receptor agonist) is lower in renovascular hypertensive rat (2K-1C) than in normotensive rat. The main finding of this study is that superoxide plays an important role in PE-induced contraction in 2K rat denuded aorta, whereas in 2K-1C rat aorta this effect is due to H₂O₂ production in smooth muscle cells. However, endothelial H₂O₂ production contributes to reducing the PE-induced contractile response in 2K-1C rat aorta only. In pathological conditions, increased ROS production/availability, termed oxidative stress, leads to endothelial dysfunction, which means that the endothelium becomes impaired (Montezano and Touyz, 2011). The altered function of endothelial cells is a hallmark of vascular diseases including hypertension. In the present study, we examined whether oxidative stress would be systemically present in 2K and 2K-1C rats aorta slices.

Furthermore, we evaluated the role oxidative stress plays in endothelial and smooth muscle cells with respect to the PE-induced contractile response in 2K and 2K-1C rats aortas.

Increased ROS bioavailability along with decreased NO production and increased NO consumption by ROS have been proposed to contribute to the events underlying endothelial injury. Impaired endothelium-mediated vasodilation and increased contractile response are generally described (Hamilton et al., 2001; Payne et al., 2003). Interestingly, in our study, the PE-induced contractile response is lower in intact endothelium 2K-1C rat aorta as compared with 2K rat aorta. Moreover, $O_2^{\bullet-}$ produced in 2K rat vascular smooth muscle cells is believed to maintain the contractile response induced by adrenergic α_1 receptor activation. However, H_2O_2 produced in 2K-1C rat aortic endothelial cells contributes to decreased contractile response induced by adrenergic α_1 receptor activation. Hydrogen peroxide affects 2K-1C rat E+ and E- aortas differently. In E+ aorta, H_2O_2 reduces PE-induced contractile response, whilst in E- aorta H_2O_2 rather than $O_2^{\bullet-}$ contributes to maintaining the contractile response.

The apparently controversial H_2O_2 effect on 2K-1C aorta vascular tone could be explained in terms of its concentration/availability due to its additional production by PE-stimulated endothelial cells. Our results suggest that both endothelium and smooth muscle contribute to increased H_2O_2 availability in 2K-1C rat aorta. In endothelial cells, low catalase concentrations might remove H_2O_2 in quantities that are possibly important to the endothelium vasodilating function without impairing its availability to smooth muscle cells. However, in the absence of endothelium, all the catalase concentrations directly affect the smooth muscle H_2O_2 concentration necessary to maintain the maximum PE-induced contractile response. Thus, in E+

aorta, high catalase concentrations probably remove H_2O_2 in both endothelium and smooth muscle; consequently, the PE-induced contractile response in intact aorta is similar to that elicited in E- aorta in the presence of any catalase concentration.

Hydrogen peroxide is described as a highly stable cell-permeant. Several authors have increasingly pointed out that H_2O_2 acts as an important signaling agent in smooth muscle cells and hypertrophy (Ardanaz and Pagano, 2006). Several studies have also reported vasodilating and vasoconstricting effects for H_2O_2 depending on the species, vascular bed, and contractile state. Our results further suggest that H_2O_2 concentration as well as its localization (endothelium/smooth muscle) can be crucial to understanding its effect on the vascular tone in renovascular hypertension.

Although the role of H_2O_2 on endothelial proliferation (Zanetti et al., 2002) and growth (Faucher et al., 2003) has been described, no studies have evaluated the participation of endogenous H_2O_2 as signaling agent on vascular tone control in denuded and intact endothelium vessels from normotensive and renovascular hypertensive animals. Earlier studies demonstrated that H_2O_2 produces endothelium-dependent and -independent vasorelaxation (Thomas and Ramwell, 1993; Rubanyi and Vanhoutte, 1999). Hydrogen peroxide can induce vasorelaxation by activating soluble guanylyl cyclase (sGC) (Burke-Wolin et al., 1991; Meurer et al., 2005) or opening voltage-dependent (Gao et al., 2003), Ca^{2+} -activated (Iida and Katusic, 2000), or ATP-sensitive K^+ channels (Wei et al., 1996). In fact, the H_2O_2 -induced vasodilation also seems to depend on eNOS, because N^{ω} -nitro-L-arginine methyl ester prevents it (Zembowicz et al., 1993; Yang et al., 2001). In another set of experiments, our results also show that the non-selective NOS inhibition with L-NAME abolishes the reduced PE-induced contractile response in 2K-1C rat intact

aorta as compared with 2K (data not shown). Indeed, Cai et al. (2003) and Thomas et al. (2004) showed that H_2O_2 causes endothelial NO release mediated by cooperative effects between PI_3 -kinase/Akt-dependent eNOS Ser¹¹⁷⁹ phosphorylation and MEK/ERK1/2 activation. Recently, Looft-Wilson et al. (2012) reported that PE induces eNOS Ser¹¹⁷⁹ phosphorylation in intact endothelium mice mesenteric artery. We hypothesize that high ROS concentration, mainly H_2O_2 in 2K-1C rat intact aorta, may contribute to exacerbating this state. Our findings are in accordance to Kang and cols. (2007) that reported that the increased H_2O_2 production induced by acetylcholine could compensate the impaired relaxation during endothelium dysfunction in mesenteric arteries from Ang II-infused hypertensive rat.

In fact, our data indicate that adrenergic α_1 receptor activation might contribute to ROS production in different ways in 2K and 2K-1C rats E- and E+ aortas. In concentration-effect curves, endothelium removal from 2K-1C rat aorta eliminates the endothelial H_2O_2 effects on eNOS. Thus, H_2O_2 plays a role in PE-induced contractile response only in smooth muscle cells, in contrast with $O_2^{\cdot-}$ in 2K rat aorta. Hydrogen peroxide can also induce contraction in several vessels (Jin and Rhoades, 1997; Rodríguez-Martínez et al., 1998; Yang et al., 1999; Gao and Lee, 2001; Hernanz et al., 2003). The mechanisms involved in H_2O_2 -induced vasoconstriction seem to depend on smooth muscle Ca^{2+} influx (Yang et al., 1999; Tabet et al., 2004). The intracellular pathways proposed for H_2O_2 -mediated vasoconstriction include activation of protein kinase C (Yang et al., 1999), tyrosine kinases (Jin and Rhoades, 1997), COX (Rodríguez-Martínez et al., 1998; Gao and Lee, 2001), and mitogen-activated protein kinases (Thakali et al., 2007).

The relationship between adrenergic α_1 receptors activation and ROS production in the cardiovascular system is increasingly evident⁵⁰⁻⁵². Furthermore,

other studies have shown that patients with essential hypertension have increased H_2O_2 plasma levels (Lacy et al., 1998; Lacy et al., 2000). Our results indicate that both 2K-1C rat E+ and E- aortas produce H_2O_2 by adrenergic α_1 receptors activation. Although adrenergic α_1 receptors activation in smooth muscle cells induces H_2O_2 production in 2K-1C rat, endothelial cells seem to determine the maintenance of high H_2O_2 concentration in 2K-1C rat aorta during adrenergic activation, as verified by the reduced H_2O_2 levels upon endothelial cells removal. Surprisingly, 2K rat aortic endothelial cells contribute to high H_2O_2 concentration only in the absence of PE stimulus, whereas adrenergic α_1 receptors activation reduces H_2O_2 concentration. Adrenergic α_1 receptors activation seems to involve a different downstream signalling pathway to H_2O_2 production in 2K and 2K-1C rat endothelial cells. These differences could involve changes in the expression/activity of enzymes such as catalase and SOD, which are known to regulate H_2O_2 availability. Interestingly, comparison between mice aorta with high blood pressure versus aorta with normal blood pressure indicates diminished catalase expression and activity along with increased Mn-SOD and extracellular-SOD activity (Uddin et al., 2003).

Even though we have not evaluated the expression/activity of endogenous catalase, our results suggest that, at least in part, SOD plays an important role in $O_2^{\cdot-}$ dismutation to H_2O_2 in 2K-1C rat intact aorta. In fact, our results indicate that, in contrast to 2K, several enzymes such as COX, NADPH oxidase and xanthine oxidase contribute to H_2O_2 production in 2K-1C rat intact aorta. Other hypertension models have also revealed that COX (Tang et al., 2007), NADPH oxidase (Rajagopalan et al., 1996), and xanthine oxidase (Nakazono et al., 1991) can produce $O_2^{\cdot-}$.

Recently, much has been discussed about the use of apocynin as a NADPH oxidase inhibitor or only as an antioxidant molecule in the vascular system (Heumüller et al., 2008; Touyz, 2008). Independent of this controversy, our results suggest that several enzymes contribute to H₂O₂ overproduction in 2K-1C rat hypertension. Interestingly, NOS inhibition does not reduce H₂O₂ concentration in 2K-1C rat aorta. Nitric oxide synthase probably does not contribute to H₂O₂ production due to adrenergic α_1 receptor activation. Otherwise, NOS seems to be sensitized by ROS such as H₂O₂ in 2K-1C rat hypertension model.

5. Conclusion

Taken together, our results suggest that reduced contractile response to PE in 2K-1C intact endothelium aorta is partially mediated by increased ROS production, mainly H₂O₂ in the endothelial cells. In contrast to other hypertension models, the oxidative stress in renovascular hypertensive rat aorta contributes to sensitizing the enzyme eNOS during adrenergic stimulation. The enzymes COX, NADPH oxidase, xanthine oxidase, and SOD contribute to increasing H₂O₂ availability. These findings represent a new approach to endothelial dysfunction in renovascular hypertension and could contribute to understanding the hypertension process.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflict to interest: none declared.

References

- Ardanaz, N., Pagano, P.J. 2006. Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: regulation and signaling leading to dysfunction. *Exp. Biol. Med.* 231(3), 237-251.
- Burke-Wolin, T., Abate, C.J., Wolin, M.S., Gurtner, G.H., 1991. Hydrogen peroxide induced pulmonary vasodilation: role of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Am. J. Physiol.* 261, L393-L398.
- Cai, H., Li, Z., Davis, M.E., Kanner, W., Harrison, D.G., Dudley, S.C.Jr., 2003. Akt dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide. *Mol. Pharmacol.* 63(2), 325-331.
- Callera, G.E., Yogi, A., Tostes, R.C., Rossoni, L.V., Bendhack, L.M., 2004. Ca²⁺-Activated K⁺ Channels Underlying the Impaired Acetylcholine-Induced Vasodilation in 2K-1C Hypertensive Rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309, 1036-1042.
- Castro, M.M., Rizzi, E., Rodrigues, G.J., Ceron, C.S., Bendhack, L.M., Gerlach, R.F., Tanus-Santos, J.E., 2009. Antioxidant treatment reduces matrix metalloproteinase-2- induced vascular changes in renovascular hypertension. *Free Rad. Biol. Med.* 46, 1298-1307.
- Costa, C.A., Amaral, T.A.S., Carvalho, L.C.R.M., Ognibene, D.T., da Silva, A.F.E., Moss, M.B., Valença, S.S., de Moura, R.S., Resende, A.C., 2009. Antioxidant Treatment With Tempol and Apocynin Prevents Endothelial Dysfunction and Development of Renovascular Hypertension. *Am. J. Hypertens.* 22(12), 1242-1249.
- Delano, F.A., Parks, D.A., Ruedi, J.M., Babior, B.M., Schmid-Schönbein, G.W., 2006. Microvascular Display of Xanthine Oxidase and NADPH Oxidase in the Spontaneously Hypertensive Rat. *Microcirculation* 13(7), 551-566.
- Faucher, K., Rabinovitch-Chable, H., Barriere, G., Cook-Moreau, J., Rigaud, M., 2003. Overexpression of cytosolic glutathione peroxidase (GPX1) delays endothelial cell growth and increases resistance to toxic challenges. *Biochimie* 85, 611-617.

- Gao, Y.J., Hirota, S., Zhang, D.W., Janssen, L.J., Lee, R.M., 2003. Mechanisms of hydrogen-peroxide-induced biphasic response in rat mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.* 138, 1085-1092.
- Gao, Y.J., Lee, R.M., 2001. Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane A(2) production. *Br. J. Pharmacol.* 134, 1639-1646.
- Griendling, K.K., Minieri, C.A., Ollerenshaw, J.D., Alexander, R.W., 1994. AngiotensinIII stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 74, 1141-1148.
- Guo, J., Gertsberg, Z., Ozgen, N., Steinberg, S.F., 2009. p66Shc Links α_1 -Adrenergic Receptors to a Reactive Oxygen Species-Dependent AKT-FOXO3A Phosphorylation Pathway in Cardiomyocytes. *Circ. Res.* 104,660-669.
- Hamilton, C.A., Brosnan, M.J., McIntyre, M., Graham, D., Dominiczak, A.F., 2001. Superoxide Excess in Hypertension and Aging: A Common Cause of Endothelial Dysfunction. *Hypertension* 37, 529-534.
- Hao, L., Nishimura, T., Wo, H., Fernandez-Patron, C., 2006. Vascular Responses to α_1 -Adrenergic Receptors in Small Rat Mesenteric Arteries Depend on Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26,819-825.
- Hernanz, R., Alonso, M.J., Briones, A.M., Vila, E., Simonsen, U., Salices M., 2003. Mechanisms involved in the early increase of serotonin contraction evoked by endotoxin in rat middle cerebral arteries. *Br. J. Pharmacol.* 140,671-680.
- Heumüller, S., Wind, S., Barbosa-Sicard, E., Schmidt, H.H.H.W., Busse, R., Schröder, K., Brandes, R.P., 2008. Apocynin is not inhibitor of vascular NADPH Oxidases but an antioxidant. *Hypertension* 51,211-217.
- Iida, Y., Katusic, Z.S., 2000. Mechanisms of cerebral arterial relaxations to hydrogen peroxide. *Stroke.* 31, 2224-2230.
- Jin, N., Rhoades, R.A., 1997. Activation of tyrosine kinases in H₂O₂-induced contraction in pulmonary artery. *Am. J. Physiol.* 272, H2686-H2692.
- Kang, K.T., Sullivan, J.C., Sasser, J.M., Imig, J.D., Pollock, J.S., 2007. Novel nitric oxide synthase-dependent mechanism of vasorelaxation in small arteries from hypertensive rats. *Hypertension* 49, 893-901.

- Lacy, F., Kailasam, M.T., O'Connor, D.T., Schmid-Schönbein, G.W., Parmer, R.J., 2000. Plasma hydrogen peroxide production in human essential hypertension. Role of heredity, gender, and ethnicity. *Hypertension* 36, 878-884.
- Lacy, F., O'Connor, D.T., Schmid-Schönbein, G.W., 1998. Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J. Hypertens.* 16, 291-303.
- Laursen, J.B., Rajagopalan, S., Galis, Z., Tarpey, M., Freeman, B.A., Harrison, D.G., 1997. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation.* 95, 588-593.
- Looft-Wilson, R.C., Todd, S.E., Araj, C.A., Mutchler, S.M., Goodell, C.A.R., 2013. Alpha1-adrenergic-mediated eNOS phosphorylation in intact arteries. *Vasc. Pharmacol.* 58, 112-117.
- Maral, J., Puget, K., Michelson, A.M., 1977. Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77(4), 1525-1535.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide Dismutase. An enzymic function for erythrocyte protein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244(22), 6049-6055.
- Meurer, S., Pioch, S., Gross, S., Müller-Esterl, W., 2005. Reactive Oxygen Species Induce Tyrosine Phosphorylation of and Src Kinase Recruitment to NO-sensitive Guanylyl Cyclase. *J. Biol. Chem.* 280(39), 33149-33156.
- Montenegro, M.F., Pessa, L.R., Gomes, V.A., Desta, Z., Flockhart, D.A., Tanus-Santos, J.E., 2009. Assessment of vascular effects of tamoxifen and its metabolites on the rat perfused hindquarters vascular bed. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 104, 400-407.
- Montezano, A.C., Touyz, R.M., 2011. Reactive oxygen species and endothelial function-role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 110, 87-94.
- Nakazono, K., Watanabe, N., Matsuno, K., Sasaki, J., Sato, T., Inoue, M., 1991. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 10045-10048.
- Nishi, E.E., Oliveira-Sales, E.B., Bergamashi, C.T., Oliveira, T.G.C., Boim, M.A., Campos, R.R., 2010. Chronic Antioxidant Treatment Improves Arterial

- Renovascular Hypertension and Oxidative Stress Markers in the Kidney in Wistar Rats. *Am. J. Hypertens.* 23(5), 473-480.
- Pagano, P.J., Ito, Y., Tornheim, K., Gallop, P.M., Tauber, A.I., Cohen, R.A., 1995. An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am. J. Physiol.* 268, H2274-H2280.
- Payne, J.A., Reckelhoff, J.F., Khalil, R.A., 2003. Role of oxidative stress in age-related reduction of NO-cGMP-mediated vascular relaxation in SHR. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285, R542-R551.
- Phan, S.H., Gannon, D.E., Varani, J., Ryan, U.S., Ward, P.A., 1989. Xanthine oxidase activity in rat pulmonary artery endothelial cells and its alteration by activated neutrophils. *Am. J. Pathol.* 134, 1201-1211.
- Rajagopalan, S., Kurz, S., Münzel, T., Tarpey, M., Freeman, B.A., Griending, K.K., Harrison, D.G., 1996. Angiotensin II mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor tone. *J. Clin. Invest.* 97, 1916-1923.
- Rodríguez-Martínez, M.A., García-Cohen, E.C., Baena, A.B., González, R., Salaíces, M., Marín, J., 1998. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats: endothelial modulation and mechanism involved. *Br. J. Pharmacol.* 125, 1329-1335.
- Rubanyi, G.M., Vanhoutte, P.M., 1999. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 250, H815-H821.
- Sagar, S., Kallo, I.J., Kaul, N., Ganguly, N.K., Sharma, B.K., 1992. Oxygen free radicals in essential hypertension. *Mol. Cell Biochem.* 111, 103-108.
- Satoh, M., Fujimoto, S., Haruna, Y., Arakawa, S., Horike, H., Komai, N., Sasaki, T., Tsujioka, K., Makino, H., Kashihara, N., 2005. NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 288, F1144-F1152.
- Suzuki, H., DeLano, F.A., Parks, D.A., Jamshidi, N., Granger, D.N., Ishii, H., Suematsu, M., Zweifach, B.W., Schmid-Schonbein, G.W., 1998. Xanthine oxidase activity associated with arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 4754-4759.

- Suzuki, H., Swei, A., Zweifach, B.W., Schmid-Schönbein, G.W., 1995. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography. *Hypertension* 25, 1083-1089.
- Swei, A., Lacy, F., DeLano, F.A., Schmid-Schönbein, G.W., 1997. Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. *Hypertension*. 30, 1628-1633.
- Tabet, F., Savoia, C., Schiffrin, E.L., Touyz, R.M., 2004. Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 44, 200-208.
- Tang, E.H., Leung, F.P., Huang, Y., Félétou, M., Man, R.Y., Vanhoutte, P.M., 2007. Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor. *Br. J. Pharmacol.* 151, 15-23.
- Thakali, K., Davenport, L., Fink, G.D., Watts, S.W., 2007. Cyclooxygenase, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), extracellular signal-regulated kinase MAPK, Rho kinase, and Src mediate hydrogen peroxide-induced contraction of rat thoracic aorta and vena cava. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 320, 236-243.
- Thomas, G., Ramwell, P., 1993. Induction of vascular relaxation by hydroperoxides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139, 102-108.
- Thomas, S.R., Chen, K., Keaney, J.F.Jr., 2004. Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 6017-6024.
- Touyz, R.M., 2008. Apocynin, NADPH Oxidase, and Vascular Cells: A Complex Matter. *Hypertension* 51, 172-174.
- Touyz, R.M., Schiffrin, E.L., 2004. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem. Cell Biol.* 122, 339-352.
- Tsai, M., Jiang, M.J., 2010. Reactive oxygen species are involved in regulating α_1 -adrenoceptor-activated vascular smooth muscle contraction. *J. Biomed. Sci.* 17, 67.
- Uddin, M., Yang, H., Shi, M., Polley-Mandal, M., Guo, Z., 2003. Elevation of oxidative stress in the aorta of genetically hypertensive mice. *Mech. Ageing Dev.* 124, 811-817.

- Wei, E.P., Kontos, H.A., Beckman, J.S., 1996. Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Am. J. Physiol.* 271, H1262-H1266.
- Wind, S., Beuerlein, K., Armitage, M.E., Taye, A., Kumar, A.H.S., Janowitz, D., Neff, C., Shah, A.M., Wingler, K., Schmidt, H.H.H.W., 2010. Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Aortas of Aged Spontaneously Hypertensive Rats by NOX1/2 Is Reversed by NADPH Oxidase Inhibition. *Hypertension.* 56, 490-497.
- Yagi, K., 1998. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol. Biol.* 108, 101-106.
- Yang, Z., Zhang, A., Altura, B.T., Altura, B.M., 1999. Hydrogen peroxide-induced endothelium-dependent relaxation of rat aorta Involvement of Ca^{2+} and other cellular metabolites. *Gen. Pharmacol.* 33, 325-336.
- Yang, Z.W., Zheng, T., Wang, J., Zhang, A., Altura, B.T., Altura, B.M., 1999. Hydrogen peroxide induces contraction and raises $[Ca^{2+}]_i$ in canine cerebral arterial smooth muscle: participation of cellular signaling pathways. *Naunyn Schm. Arch Pharmacol.* 360, 646-653.
- Zanetti, M., Katusic, Z.S., O'Brien, T. 2002. Adenoviral-mediated overexpression of catalase inhibits endothelial cell proliferation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283, H2620-H2626.
- Zembowicz, A. Hatchett, R.J., Jakubowski, A.M., Gryglewski, R.J., 1993. Involvement of nitric oxide in the endothelium-dependent relaxation induced by hydrogen peroxide in the rabbit aorta. *Br. J. Pharmacol.* 110, 151-158.

Figure Legends

Fig.1. Phenylephrine (PE)-induced contractile response in normotensive (2K) and renovascular hypertensive (2K-1C) rats denuded (E-) or intact endothelium (E+) aortic rings. Data represent mean \pm SEM (n=5-9). ***Indicate difference of ME between 2K-1C E+ and 2K E+ or 2K-1C E-; or pD_2 between E+ and E- ($P < 0.001$).

Fig. 2. (A) Concentration of thiobarbituric acid-reactive species (TBARS) expressed in MDA (nmol mL^{-1}) in plasma samples from normotensive (2K) and hypertensive (2K-1C) rats. (B) Representative photomicrographs (original magnification $\times 400$) of 2K and 2K-1C rats intact aortas (E+) incubated with DHE and the effects of the superoxide scavenger Tiron and Peg Catalase on the ROS production in the absence of phenylephrine. (C) DHE basal fluorescence intensity in aorta (Control) or after addition of Tiron 1 mM or Peg-Catalase 300 Units mL^{-1} . Data represent mean \pm SEM (n = 5-9). * $P < 0.05$ vs 2K.

Fig. 3. Phenylephrine (PE)-induced contractile response in normotensive (2K) and renovascular hypertensive (2K-1C) rats denuded (E-) or intact endothelium (E+) aortic rings in the absence or in the presence of Tiron or different catalase (Cat) concentrations. Data represent mean \pm SEM (n=5-9). * $P < 0.05$ for ME value vs 2K E-. *** $P < 0.001$ for pD_2 values vs 2K E-.

Fig. 4. Phenylephrine (PE)-induced contractile response in normotensive (2K) and renovascular hypertensive (2K-1C) rats denuded (E-) or intact endothelium (E+) aortic rings in the absence or in the presence of Tiron or different catalase (Cat)

concentrations. Data represent mean \pm SEM (n = 5-9). *** P < 0.001 for ME with catalase vs control. # P < 0.001 for ME and pD₂ values with catalase vs control.

Fig. 5. Hydrogen peroxide (H₂O₂) production in normotensive (2K) or hypertensive (2K-1C) rats intact (E+) or denuded (E-) aortas stimulated with phenylephrine or not. Data represent mean \pm SEM (n = 5). * P < 0.05 vs E+ basal. ** P < 0.05 vs E+ stimulated with PE. # P < 0.001 vs 2K stimulated with PE. Ψ P < 0.05 denotes difference between 2K/E+/PE vs 2K/E+/basal or 2K-1C/E-/PE vs 2K-1C/E-/basal.

Fig. 6. Hydrogen peroxide (H₂O₂) production in PE-stimulated normotensive (A) and hypertensive (2K-1C) (B) rats intact aortas without (control) and with inhibition of the enzymes nitric oxide synthase (L-NAME, 100 μ M), cyclooxygenase (ibuprofen, 10 μ M), NADPH oxidase (apocynin, 100 μ M), xanthine oxidase (allopurinol, 100 μ M), and superoxide dismutase (diethyldithiocarbamate– DDC, 10 μ M) for 30 min. Data represent mean \pm SEM (n = 4-7). * P < 0.05 vs control. ** P < 0.01 vs control. *** P < 0.001 vs control.

Figure 1

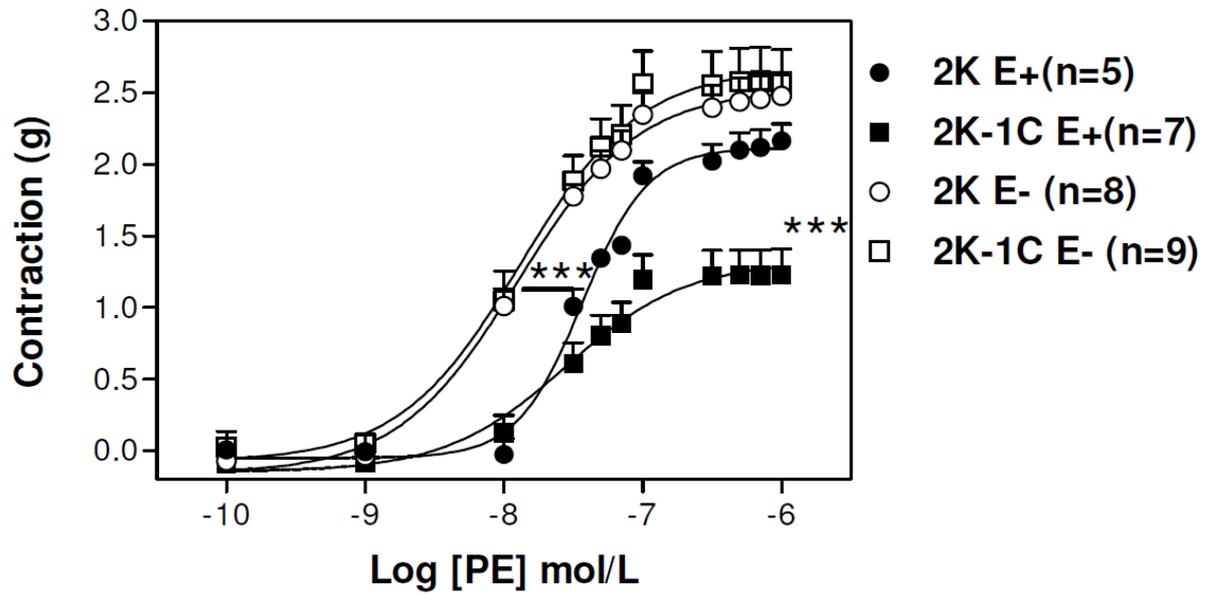


Figure 2

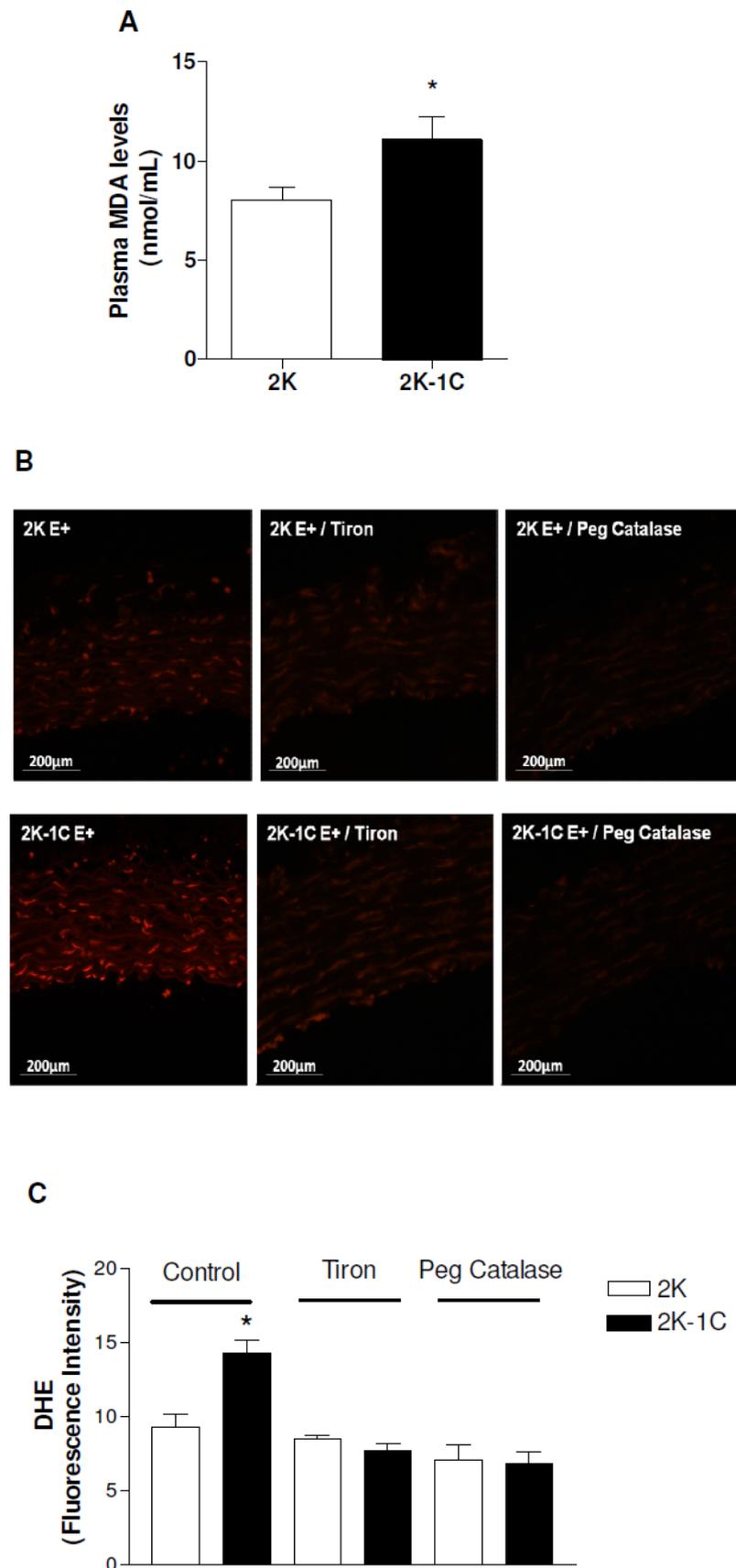


Figure 3

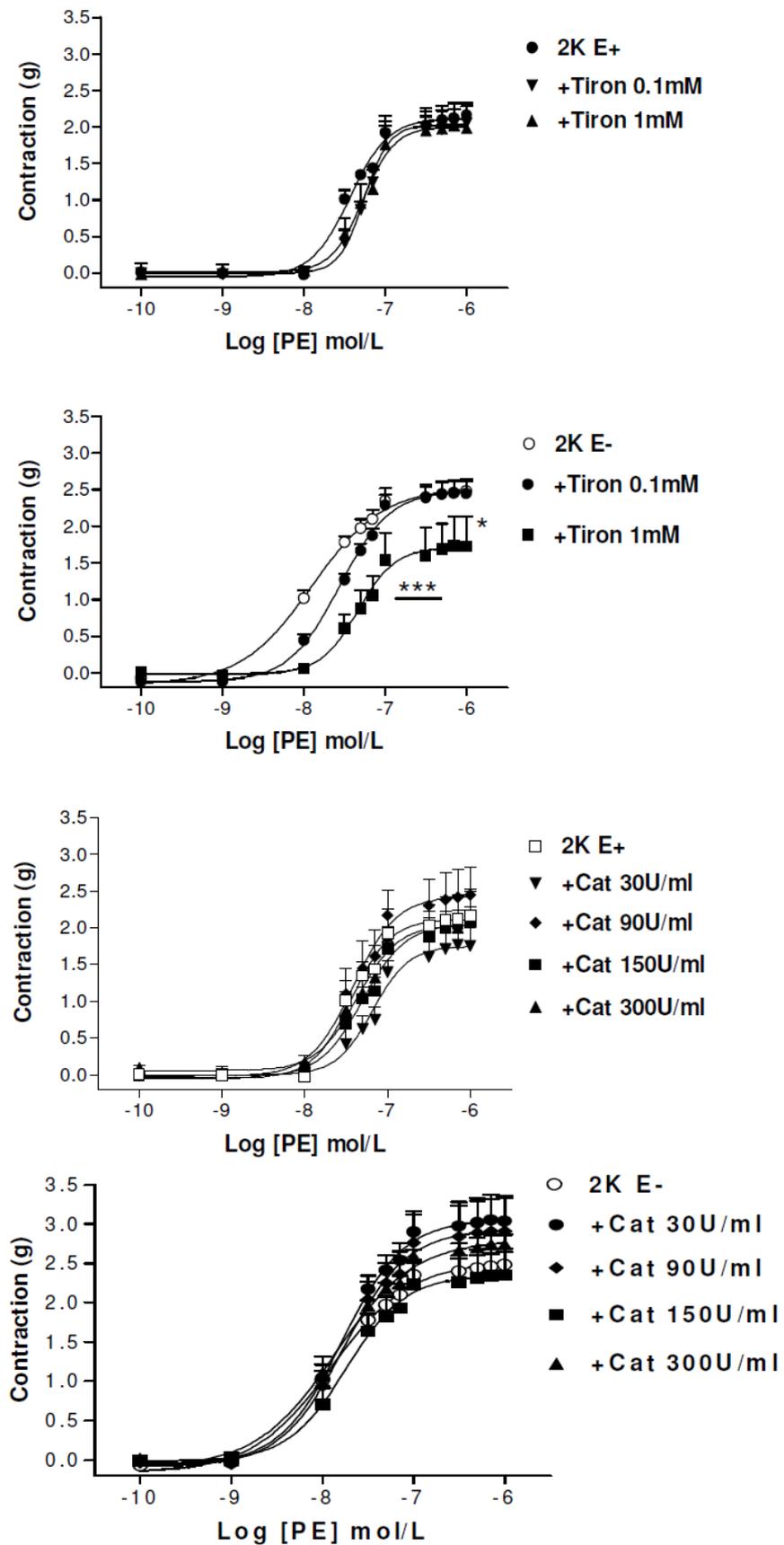


Figure 4

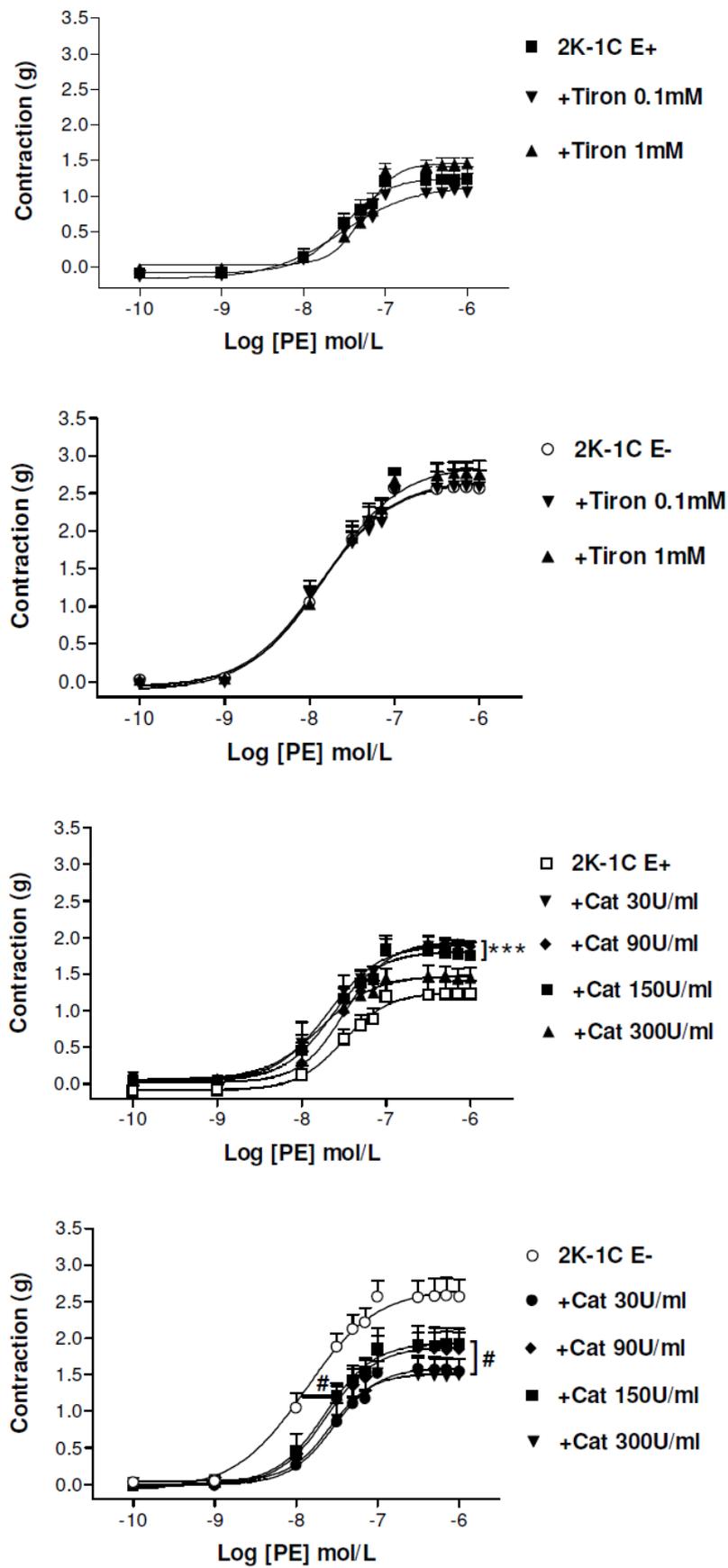


Figure 5

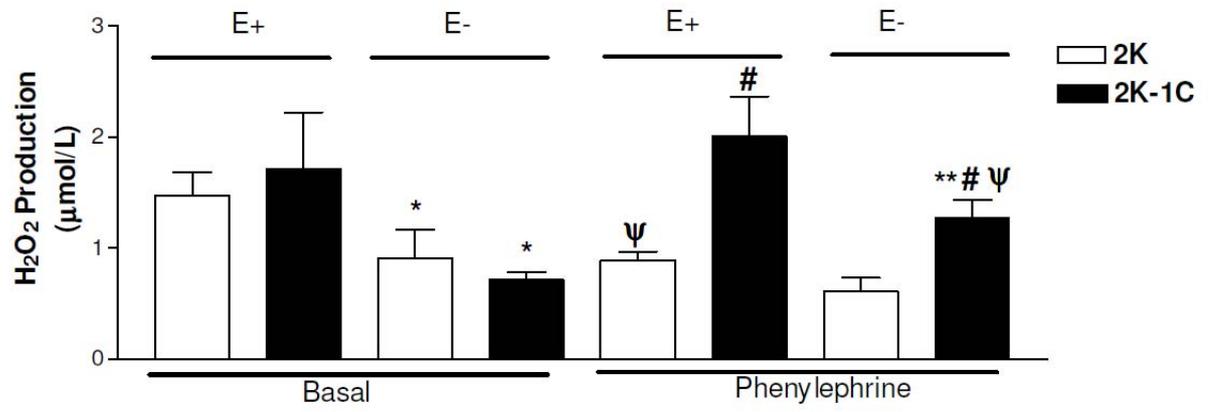


Figure 6

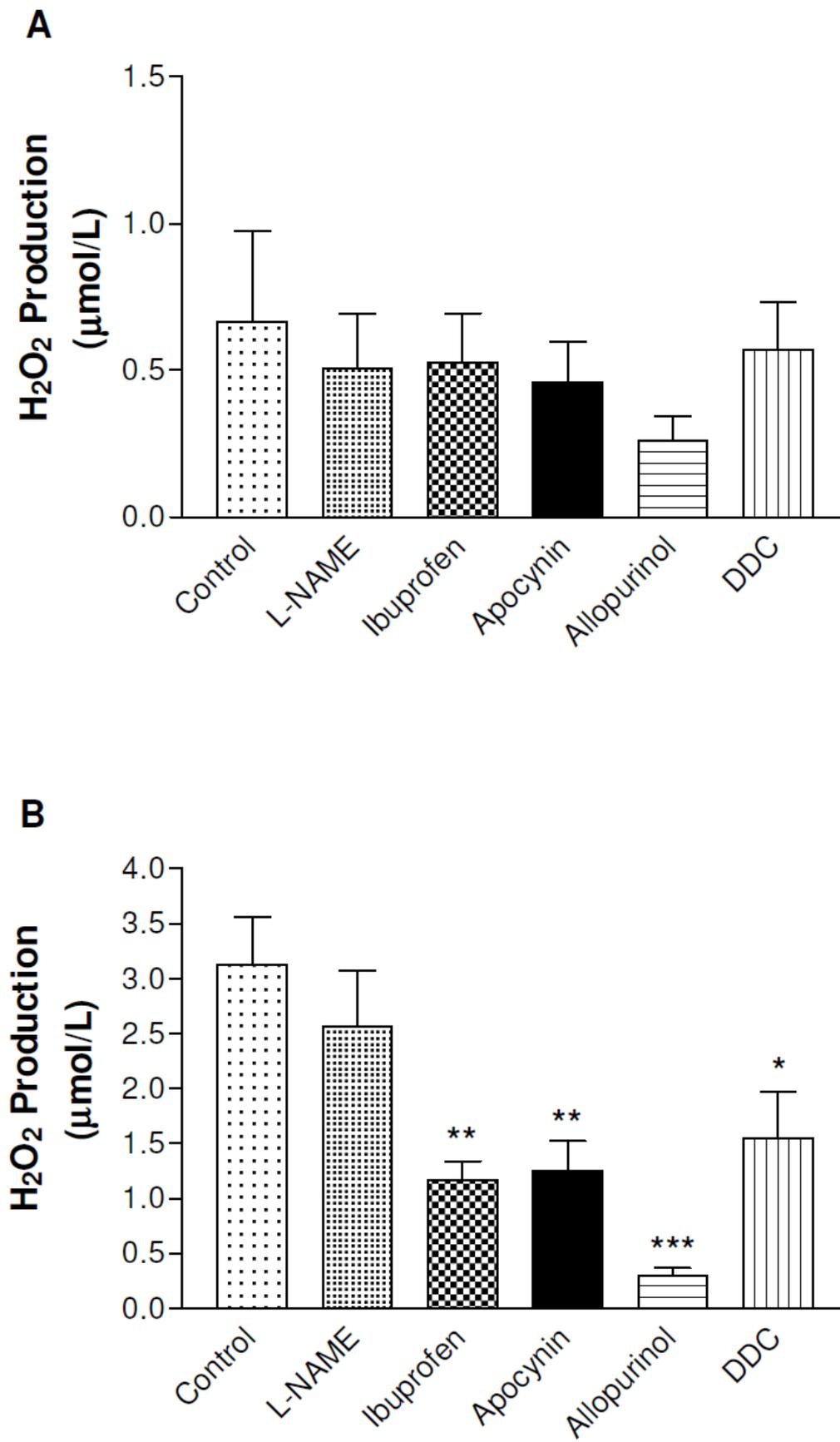


Table 1 - Emax and pD₂ values and standard error median (SEM) to contractile response in grams (g) induced by phenylephrine (PE) in denuded (E-) or intact (E+) aorta from normotensive (2K) or hypertensive (2K-1C) rat, in absence or presence of superoxide anion scavenger Tiron (0.1 or 1 mM) or Catalase (30, 90, 150 or 300 U/mL).

| Rat Aorta / Endothelium | Agonist / Incubation | ME ± SEM (g) | pD ₂ | n |
|-------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|---|
| 2K/ E+ | PE | 2.2 ± 0.1 | 7.44 ± 0.03 | 5 |
| 2K/ E+ | PE/ Tiron 0.1 mM | 2.0 ± 0.3 | 7.26 ± 0.06 | 5 |
| 2K/ E+ | PE/ Tiron 1 mM | 2.1 ± 0.3 | 7.30 ± 0.04 | 5 |
| 2K/ E+ | PE/ Catalase 30 U/mL | 1.7 ± 0.3 | 7.25 ± 0.11 | 5 |
| 2K/ E+ | PE/ Catalase 90 U/mL | 2.4 ± 0.4 | 7.40 ± 0.10 | 5 |
| 2K/ E+ | PE/ Catalase 150 U/mL | 2.1 ± 0.4 | 7.30 ± 0.06 | 5 |
| 2K/ E+ | PE/ Catalase 300 U/mL | 2.1 ± 0.4 | 7.34 ± 0.08 | 5 |
| 2K/ E- | PE | 2.5 ± 0.2 | 7.93 ± 0.10 | 8 |
| 2K/ E- | PE/ Tiron 0.1 mM | 2.4 ± 0.2 | 7.60 ± 0.06 *** | 8 |
| 2K/ E- | PE/ Tiron 1 mM | 1.7 ± 0.4 * | 7.32 ± 0.04 *** | 5 |
| 2K/ E- | PE/ Catalase 30 U/mL | 3.0 ± 0.3 | 7.84 ± 0.09 | 5 |
| 2K/ E- | PE/ Catalase 90 U/mL | 2.9 ± 0.4 | 7.84 ± 0.10 | 5 |
| 2K/ E- | PE/ Catalase 150 U/mL | 2.3 ± 0.3 | 7.80 ± 0.07 | 5 |
| 2K/ E- | PE/ Catalase 300 U/mL | 2.7 ± 0.1 | 7.87 ± 0.08 | 5 |
| 2K-1C/ E+ | PE | 1.2 ± 0.2 | 7.54 ± 0.06 | 7 |
| 2K-1C/ E+ | PE/ Tiron 0.1 mM | 1.4 ± 0.1 | 7.32 ± 0.11 | 5 |
| 2K-1C/ E+ | PE/ Tiron 1 mM | 1.0 ± 0.3 | 7.50 ± 0.08 | 7 |
| 2K-1C/ E+ | PE/ Catalase 30 U/mL | 1.9 ± 0.1*** | 7.71 ± 0.14 | 5 |
| 2K-1C/ E+ | PE/ Catalase 90 U/mL | 1.9 ± 0.1*** | 7.52 ± 0.09 | 5 |
| 2K-1C/ E+ | PE/ Catalase 150 U/mL | 1.8 ± 0.2*** | 7.67 ± 0.07 | 5 |
| 2K-1C/ E+ | PE/ Catalase 300 U/mL | 1.4 ± 0.2 | 7.78 ± 0.07 | 5 |
| 2K-1C/ E- | PE | 2.6 ± 0.2 | 7.89 ± 0.08 | 9 |
| 2K-1C/ E- | PE/ Tiron 0.1 mM | 2.7 ± 0.2 | 7.81 ± 0.10 | 5 |
| 2K-1C/ E- | PE/ Tiron 1 mM | 2.6 ± 0.2 | 7.91 ± 0.06 | 9 |
| 2K-1C/ E- | PE/ Catalase 30 U/mL | 1.5 ± 0.2 [#] | 7.54 ± 0.03 [#] | 5 |
| 2K-1C/ E- | PE/ Catalase 90 U/mL | 1.8 ± 0.3 [#] | 7.64 ± 0.12 [#] | 5 |
| 2K-1C/ E- | PE/ Catalase 150 U/mL | 1.9 ± 0.2 [#] | 7.64 ± 0.03 [#] | 5 |
| 2K-1C/ E- | PE/ Catalase 300 U/mL | 1.5 ± 0.2 [#] | 7.58 ± 0.07 [#] | 5 |

Data represent mean ± SEM (n=5-9). **(2K)** **P*<0.05 for ME value vs 2K E-. ****P*<0.001 for pD₂ values vs 2K E-. **(2K-1C)** ****P*<0.001 for ME with catalase vs 2K-1C E+. [#]*P*<0.001 for ME and pD₂ values with catalase vs 2K-1C E-.