

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia

**Avaliação Temporal da Hipertensão Renovascular:
Aspectos Hemodinâmicos e Oxidativos**

Dissertação de Mestrado

Patricia Martins Bock

Porto Alegre, 2000.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

**Avaliação Temporal da Hipertensão Renovascular:
Aspectos Hemodinâmicos e Oxidativos**

Patricia Martins Bock

Orientadora: Dra. Adriane Belló Klein

Dissertação apresentada ao curso de pós graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Porto Alegre, novembro de 2000.

Avaliação Temporal da Hipertensão Renovascular: Aspectos Hemodinâmicos e Oxidativos

Por

Patricia Martins Bock

Dissertação apresentada ao curso de pós graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e analisada pela comissão examinadora formada pelos seguintes professores:

Orientador:

Dra. Adriane Belló Klein

Comissão examinadora:

Dra. Vera Farah

Dra. Vera Steffen

Dr. Carlos Severo Dutra Filho

"Todo conhecimento começa com o sonho, e nada mais é do que a aventura pelo mar desconhecido, em busca da terra sonhada."

Rubem Alves

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido marido Luiz Vicente, pelo amor, paciência, apoio e ajuda em todos os momentos.

À minha orientadora Adriane, pela presença e atenção constantes, mesmo estando parte do tempo distante.

À mais do que competente Tânia, por estar sempre disposta a ajudar quando precisamos, em qualquer sentido.

À minha mais amiga que colega Jaqueline Barp, por toda ajuda nos experimentos.

Aos **grandes amigos** da Fisiologia, Lucila, Maris, Jaque, Claudinha, Su, Pity, Joãozinho, B₁, B₂, Álvaro, Alex, Cláudia, Tati, Cris, Paulo, Mimi, (desculpem se esqueci alguém). Agradeço pelas idéias, por estarem sempre prontos a ajudar, pelas risadas, pelas festas, por tornarem os dias mais agradáveis e menos cansativos, enfim, por serem realmente **AMIGOS**.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia Cardiovascular, por fazerem parte desta jornada e sempre apoiarem quando necessário.

Aos professores Antônio Andrea Belló, Paulo Ivo Bittencourt, Maria Cláudia Irigoyen e Susana Llesuy pelas orientações recebidas.

Aos professores e funcionários do departamento de Fisiologia.

Aos órgãos financiadores de pesquisa CNPq, Finep, FAPERGS e CAPES, pois sem eles a pesquisa não poderia ser realizada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMO.....	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 HIPERTENSÃO.....	1
1.2 MODELO DE HIPERTENSÃO GOLDBLATT.....	3
1.2.1 Mecanismos pressores	5
1.3 RADICAIS LIVRES.....	7
1.4 DEFESAS ANTIOXIDANTES	13
1.5 PAPEL DOS RADICAIS LIVRES NA HIPERTENSÃO.....	19
1.6 HIPÓTESE	22
1.6 OBJETIVOS.....	23
2. METODOLOGIA.....	24
2.1 ANIMAIS ESTUDADOS.....	24
2.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	24
2.3 CIRURGIA DE CLAMPEAMENTO RENAL.....	25
2.4 REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL	26
2.4.1 Canulação	26
2.4.2 Registro e processamento de sinais.....	27
2.5 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PREPARO DOS HOMOGENEIZADOS.....	28
2.6 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	29
2.7 LIPOPEROXIDAÇÃO.....	30
2.7.1 Quimiluminescência.....	30
2.7.2 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS).....	31
2.8 CATALASE	32
2.9 GLUTATIONA PEROXIDASE.....	33
2.10 GLUTATIONA S-TRANSFERASE.....	35
2.11 SUPERÓXIDO DISMUTASE.....	36
2.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
3. RESULTADOS.....	38
3.1 CIRURGIA DE CLAMPEAMENTO RENAL.....	38
3.2 PRESSÃO ARTERIAL.....	40
3.2.1 Pressão arterial sistólica.....	40
3.2.2 Pressão arterial diastólica.....	42
3.2.3 Pressão arterial média.....	44
3.3 FREQUÊNCIA CARDÍACA	46
3.4 LIPOPEROXIDAÇÃO.....	47
3.4.1 Quimiluminescência.....	47
3.4.2 TBA-RS.....	51
3.5 CATALASE	53
3.6 GLUTATIONA PEROXIDASE.....	56
3.7 GLUTATIONA S-TRANSFERASE.....	60
3.8 SUPERÓXIDO DISMUTASE	65
4. DISCUSSÃO.....	68
5. CONCLUSÕES.....	79
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Demonstração do local de colocação do clipe na artéria renal.	4
Figura 2: Mecanismo pressor do modelo de hipertensão 2 rins 1 clipe.	6
Figura 3: Formação seqüencial das espécies ativas de oxigênio	8
Figura 4: Distribuição eletrônica da molécula de oxigênio e alguns de seus derivados	9
Figura 5: Reações de formação do radical hidroxil	10
Figura 6: Representação esquemática da peroxidação lipídica	12
Figura 7: Decomposição do peróxido de hidrogênio pela catalase	15
Figura 8: Dismutação do radical superóxido pela superóxido dismutase	16
Figura 9: Redução de peróxidos pela glutathiona peroxidase	17
Figura 10: Exemplo de reação de detoxificação através da glutathiona S-transferase	18
Figura 11: Reação do óxido nítrico com superóxido	21
Figura 12: Cirurgia de colocação do clipe.	26
Figura 13: Demonstração da atrofia apresentada por alguns dos rins esquerdos dos animais hipertensos.	34
Figura 14: Variação da pressão arterial sistólica	34
Figura 15: Variação da pressão arterial diastólica	34
Figura 16: Variação da pressão arterial média	34
Figura 17: Variação da frequência cardíaca	34
Figura 18: Quimiluminescência no homogeneizado cardíaco.	34
Figura 19: Quimiluminescência no homogeneizado de rins direitos	34
Figura 20: Quimiluminescência no homogeneizado de rins esquerdos	34
Figura 21: Conteúdo de TBA-RS no homogeneizado cardíaco	34
Figura 22: Atividade da catalase no homogeneizado cardíaco	34
Figura 23: Atividade da catalase em no homogeneizado de rins direitos	34
Figura 24: Atividade da catalase no homogeneizado de rins esquerdos.	34
Figura 25: Atividade da glutathiona peroxidase no homogeneizado cardíaco ...	34
Figura 26: Atividade da glutathiona peroxidase no homogeneizado de rins direitos.	34
Figura 27: Atividade da glutathiona peroxidase no homogeneizado de rins esquerdos.	34
Figura 28: Atividade da glutathiona S-transferase no homogeneizado cardíaco.	34
Figura 29: Atividade da glutathiona S-transferase no homogeneizado de rins direitos	34
Figura 30: Atividade da glutathiona S-transferase no homogeneizado de rins esquerdos.	34
Figura 31: Correlação entre pressão arterial média e atividade da glutathiona S-transferase em homogeneizado cardíaco.	34
Figura 32: Atividade da superóxido dismutase no homogeneizado cardíaco... 34	34
Figura 33: Atividade da superóxido dismutase no homogeneizado de rins direitos.	34
Figura 34: Atividade da superóxido dismutase no homogeneizado de rins esquerdos	34

LISTA DE ABREVIATURAS

- CDNB - Cloro dinitro-benzeno
DNA - Ácido desóxi-ribonucléico
DNP-SG - Dinitro fenil glutationa
EAO - Espécies ativas de oxigênio
ECA - Enzima conversora da angiotensina
EDRF - Fator de relaxamento derivado do endotélio
FC - Frequência cardíaca
GPx - Glutaciona peroxidase
GSH - Glutaciona reduzida
GSSG - Dissulfeto de glutaciona
GST - Glutaciona S-transferase
HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência
LPO - Lipoperoxidação
NO - Óxido nítrico
PAD - Pressão arterial diastólica
PAM - Pressão arterial média
PAS - Pressão arterial sistólica
PMSF - Fluoreto de fenil metil sulfonila
QL - Quimiluminescência
RNA - Ácido ribonucléico
SOD - Superóxido dismutase
SRA - Sistema renina-angiotensina
TBA-RS - Substâncias Reativas ao ácido tiobarbitúrico

RESUMO

A hipertensão é uma doença onde o envolvimento de espécies ativas de oxigênio tem sido sugerido. Neste trabalho, foi utilizado o modelo de hipertensão desenvolvido por Goldblatt e colaboradores em 1934, onde é feito o clampeamento da artéria renal esquerda de ratos e o rim contralateral é mantido intacto. Foram objetivos deste trabalho verificar os efeitos do clampeamento renal esquerdo na pressão arterial sistólica, diastólica e média e frequência cardíaca e efetuar uma análise temporal do estresse oxidativo, através da medida de lipoperoxidação e atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase, glutathione transferase e glutathione peroxidase.

Para tanto, foram utilizados ratos machos *Wistar* divididos em oito grupos experimentais: hipertensos de 7, 14, 21 e 28 dias após o procedimento cirúrgico, e respectivos controles.

A pressão arterial média foi sempre significativamente superior nos grupos hipertensos em relação aos respectivos controles, sendo 20% maior no grupo 7 dias, 14% maior no grupo 14 dias, 23% maior no grupo 21 dias, e 22% maior no grupo 28 dias. Não foram observadas alterações na frequência cardíaca nos distintos grupos experimentais. A lipoperoxidação igualmente não foi modificada. A atividade da enzima

glutathione peroxidase mostrou-se 74% maior nos corações do grupo hipertenso 7 dias em relação aos respectivos controles, 213% maior nos rins direitos do grupo hipertenso 7 dias em relação aos controles e 196% maior nos rins esquerdos do grupo hipertenso 7 dias em relação aos controles. Nos demais tempos, não foram verificadas diferenças na atividade desta enzima. As enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione transferase não foram alteradas ao longo do período de experimentação.

Os resultados encontrados mostram que a enzima glutathione peroxidase está alterada somente na primeira semana de hipertensão. Este fato sugere uma resposta adaptativa da enzima ao estresse promovido pela hipertensão. Ao sétimo dia, não foram observadas alterações na lipoperoxidação, possivelmente devido a proteção oferecida pela glutathione peroxidase. Antes deste período, no entanto, é possível que a elevação da pressão desencadeie um aumento da produção de radicais livres, com incremento da lipoperoxidação previamente à ativação desta enzima.

1. INTRODUÇÃO

1.1 HIPERTENSÃO

A hipertensão é uma elevação sustentada da pressão arterial sistêmica e pode ser produzida por aumento do débito cardíaco ou principalmente pelo aumento da resistência periférica. Na doença crônica, o mecanismo reflexo barorreceptor é reajustado para manter a pressão arterial elevada. A hipertensão é uma anormalidade muito comum nos seres humanos, sendo o principal fator de risco para doenças cardiovasculares, como hipertrofia do músculo cardíaco, infarto do miocárdio, arteriosclerose, trombose de vasos cerebrais, hemorragia cerebral, insuficiência renal, entre outros problemas. Estas doenças são principalmente desenvolvidas pelo inadequado controle da pressão arterial em indivíduos hipertensos, sendo que a correlação é mais intensa com a pressão arterial sistólica do que com a diastólica (CARRETERO, 2000).

Esta enfermidade pode ser produzida por vários fatores ou ter causa desconhecida, sendo chamada de hipertensão essencial, primária ou idiopática. Na verdade, a causa deste tipo de hipertensão não é exatamente desconhecida, pois existem diversos fatores, chamados "fatores hipertensinogênicos", que aumentam a pressão arterial, como obesidade, resistência à insulina, alto consumo de álcool, sedentarismo e estresse, entre outros (GANONG, 1995; CARRETERO, 2000).

Cerca de 90 a 95% das pessoas hipertensas apresentam hipertensão essencial, existindo dados que demonstram uma forte tendência hereditária ligada a isso (GUYTON & HALL, 1996). Informações obtidas no projeto Genoma Humano e em estudos recentes sobre as bases genéticas da hipertensão podem revolucionar os tratamentos e auxiliar no desenvolvimento de terapias mais efetivas, baseadas no genótipo do paciente (CARRETERO, 2000). Na hipertensão, observa-se uma disfunção endotelial, mas ainda não se pode afirmar se ela está relacionada com a causa da hipertensão ou é secundária a esta (EVORA et al, 1995). Na maior parte dos pacientes hipertensos, as endotelinas, que são peptídeos com potente ação vasoconstritora derivados do endotélio, estão em níveis normais no plasma, podendo estar elevadas somente em pacientes com hipertensão severa (SCHIFFRIN, 1998).

Devido aos vários problemas decorrentes da hipertensão, e do crescente número de casos da doença, foram desenvolvidos vários modelos experimentais para o estudo desta em animais. Em sua maior parte, estes procedimentos envolvem a manipulação dos rins, do sistema nervoso ou das supra-renais, além da inibição da síntese de óxido nítrico. Também há várias cepas de ratos que desenvolvem hipertensão espontaneamente (ratos espontaneamente hipertensos-SHR), ou quando alimentados com dieta rica em sódio (ratos DAHL) (RIBEIRO, 1992; JOVER, 1993; GANONG, 1995). O estudo de animais hipertensos poderia elucidar alguns mecanismos envolvidos na hipertensão, facilitando o controle clínico desta e melhorando a qualidade de vida de pacientes com esta doença.

1.2 MODELO DE HIPERTENSÃO GOLDBLATT

O modelo de hipertensão descrito por Goldblatt e colaboradores em 1934 é um modelo renovascular de hipertensão. Neste modelo, o procedimento envolve restrição do suprimento de sangue para o rim esquerdo, por clampeamento da artéria renal esquerda, sendo que o rim direito pode ser mantido intacto (modelo 2 rins, 1 clipe) ou ser retirado (modelo 1 rim, 1 clipe). A artéria renal esquerda é a escolhida para colocação do clipe devido às dificuldades de se acessar a artéria renal direita em ratos (RUZICKA, 1994).

Em ratos, a constrição de uma das artérias renais, preservando-se o rim contralateral, resulta em progressiva elevação da pressão arterial, cujos níveis pressóricos dependem do grau de constrição imposto pelo clipe e da extensão desta constrição. A aplicação do clipe de prata na artéria renal esquerda produz pequena elevação da pressão arterial já no primeiro dia após a estenose. A elevação gradual da pressão independe do grau de estenose imposto pelo clipe, mas os valores de pressão arterial atingidos variam conforme este grau, podendo causar hipertensão de moderada à severa (RUZICKA, 1994).

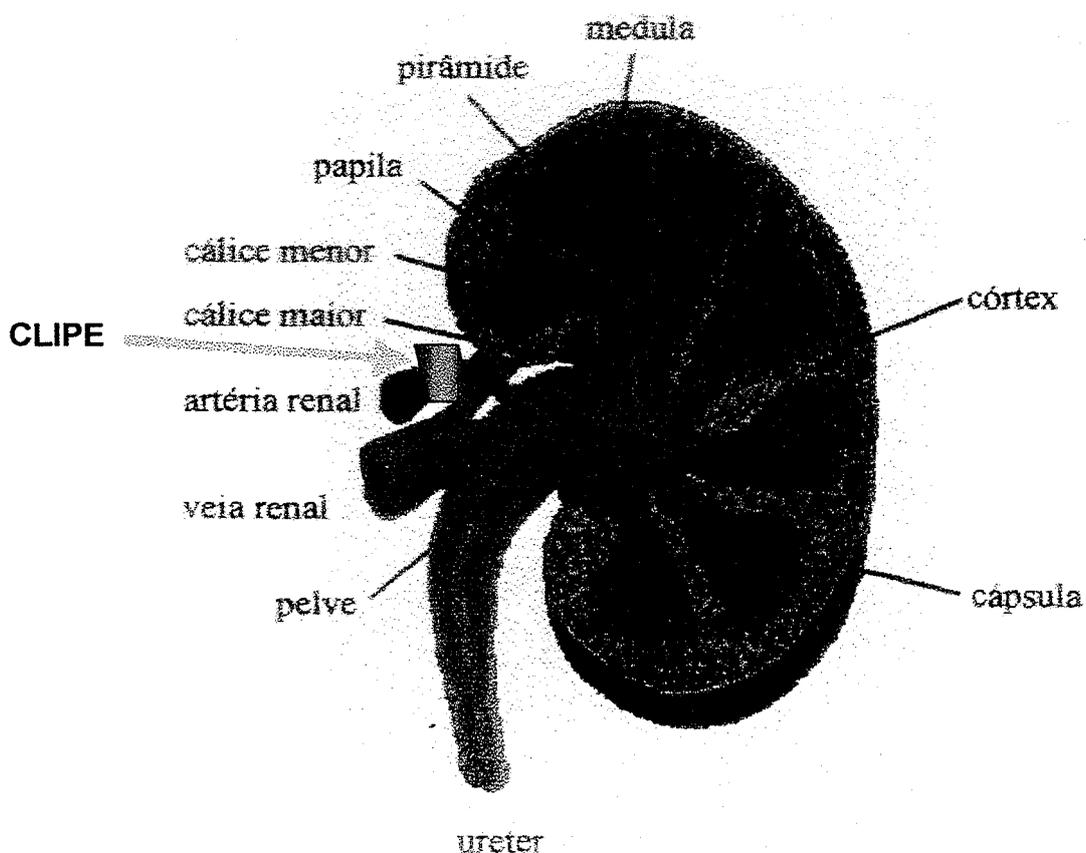


Figura 1: Demonstração do local de colocação do clipe na artéria renal.

O peso inicial dos animais deve ser verificado, pois o estreitamento produzido pelo clipe irá variar conforme o peso do animal. Em cerca de 10 a 20% dos animais a pressão arterial é normalizada após uma resposta pressora inicial, e os rins destes animais normalmente mostram-se atróficos (RUZICKA, 1994).

1.2.1 Mecanismos pressores

No modelo 2 rins, 1 clipe, o estabelecimento e a manutenção da hipertensão dependem principalmente do sistema renina-angiotensina (SRA), existindo componentes pressores rápidos (agudos) e lentos (crônicos) para o desenvolvimento da hipertensão. O componente rápido, neste modelo, é o aumento da resistência periférica total mediada por angiotensina II circulante. O componente lento é o aumento no volume sangüíneo mediado por ações renais da angiotensina II e aldosterona, efeitos tróficos da angiotensina II nos músculos cardíacos e lisos vasculares (resultando em hipertrofia cardiovascular), e efeitos da angiotensina II na atividade simpática, além de ativação do SRA vascular. Nesse modelo, o rim contralateral ao que recebeu o clipe excreta com eficiência a sobrecarga de sódio imposta pelo rim isquêmico, prevenindo assim o acúmulo deste íon no organismo. Dessa forma, este modelo de hipertensão está associado com altos níveis de renina plasmática e hipersecreção de aldosterona (RUZICKA, 1994).

Embora o rim contralateral não produza o fator iniciador da hipertensão, este tem um papel importante no desenvolvimento desta. O rim intacto apresenta um aumento de atividade na enzima conversora de angiotensina intra-renal, e contém altos níveis de angiotensina II, embora apresente baixos níveis de renina (RUZICKA, 1994). Neste modelo, o sistema de endotelinas não é ativado (SCHIFFRIN, 1998).

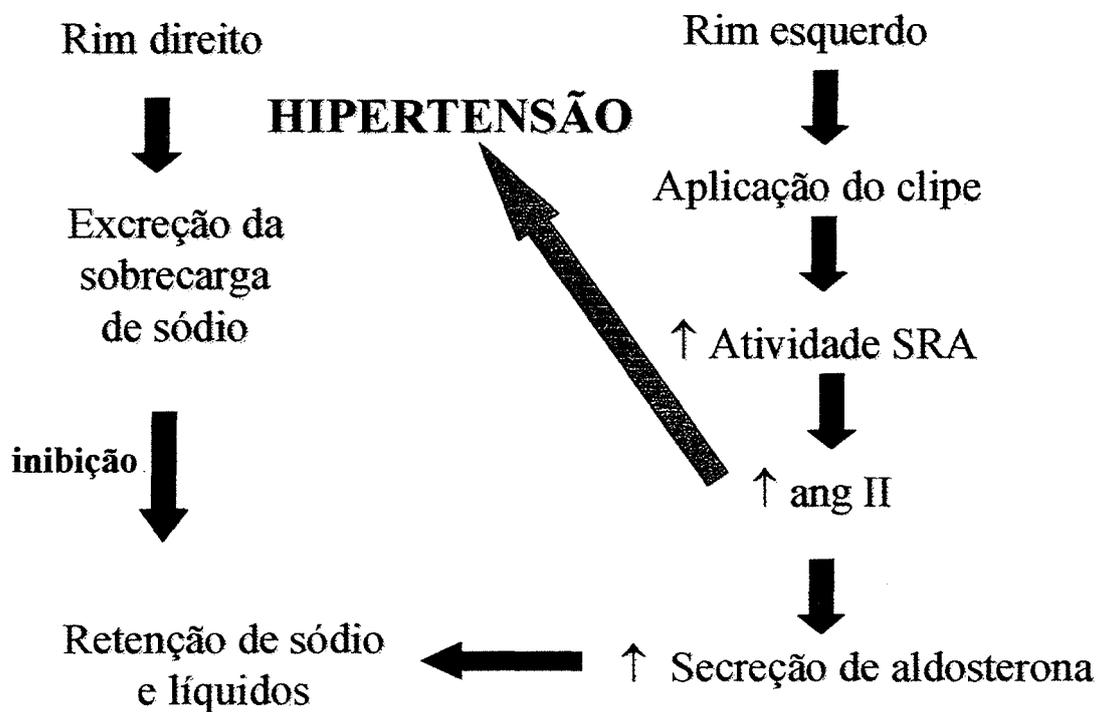


Figura 2: Mecanismo pressor do modelo de hipertensão 2 rins 1 clipe.
SRA: sistema renina-angiotensina

Ang II: angiotensina II

1.3 RADICAIS LIVRES

Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existência independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, sendo assim altamente reativos e capazes de atacar qualquer biomolécula (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Durante a respiração celular, o oxigênio recebe 4 elétrons de uma só vez através da enzima citocromo oxidase, mas, devido a sua configuração eletrônica, ele pode receber um elétron de cada vez, formando compostos intermediários que são altamente reativos. Estes compostos são chamados espécies ativas de oxigênio (EAO), sendo alguns radicais livres, que são formados em aproximadamente 5% do processo de transformação celular de oxigênio até água (YU, 1994). Existem outras fontes de radicais livres no organismo, que podem ser enzimáticas ou não, como resultado da atividade de cicloxigenases, lipoxigenases, xantina oxidase, aldeído oxidase, oxidação de catecolaminas, flavinas e ferridoxinas e várias outras oxidases, além de reações catalisadas por ferro e cobre (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Além disso, também há a formação de EAO em processos inflamatórios, quando ocorre isquemia-reperfusão, ativação de neutrófilos, hiperóxia, exposição à radiação, entre outros processos (HARRIS, 1992).

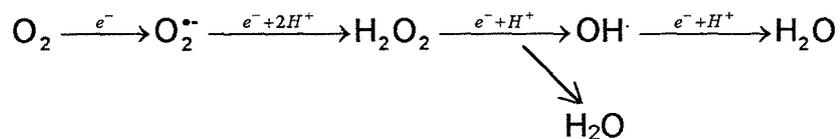


Figura 3: Formação seqüencial das espécies ativas de oxigênio

$\text{O}_2^{\cdot -}$ - radical superóxido

H_2O_2 - peróxido de hidrogênio

OH^{\cdot} - radical hidroxil

São espécies ativas de oxigênio (EAO) o ânion radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil, além de formas de oxigênio com o spin alterado. Cada uma destas EAO tem características próprias, mostrando diferente reatividade e tempo de meia-vida (YU, 1994). A molécula diatômica de oxigênio é um radical livre, mas possui spins paralelos, o que dificulta a reação química com outras moléculas e torna o oxigênio mais estável quimicamente. As formas de oxigênio mais reativas são os oxigênios "singlets" Δ e Σ , que não possuem restrição de spin e por isso são muito mais reativas que o oxigênio molecular no estado fundamental. O peróxido de hidrogênio apresenta todos os elétrons emparelhados, portanto não é um radical livre, mas possui a propriedade de atravessar facilmente membranas biológicas, e pode formar espécies radicais. Já o ânion superóxido e o radical hidroxil são radicais livres, pois apresentam elétrons desemparelhados (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

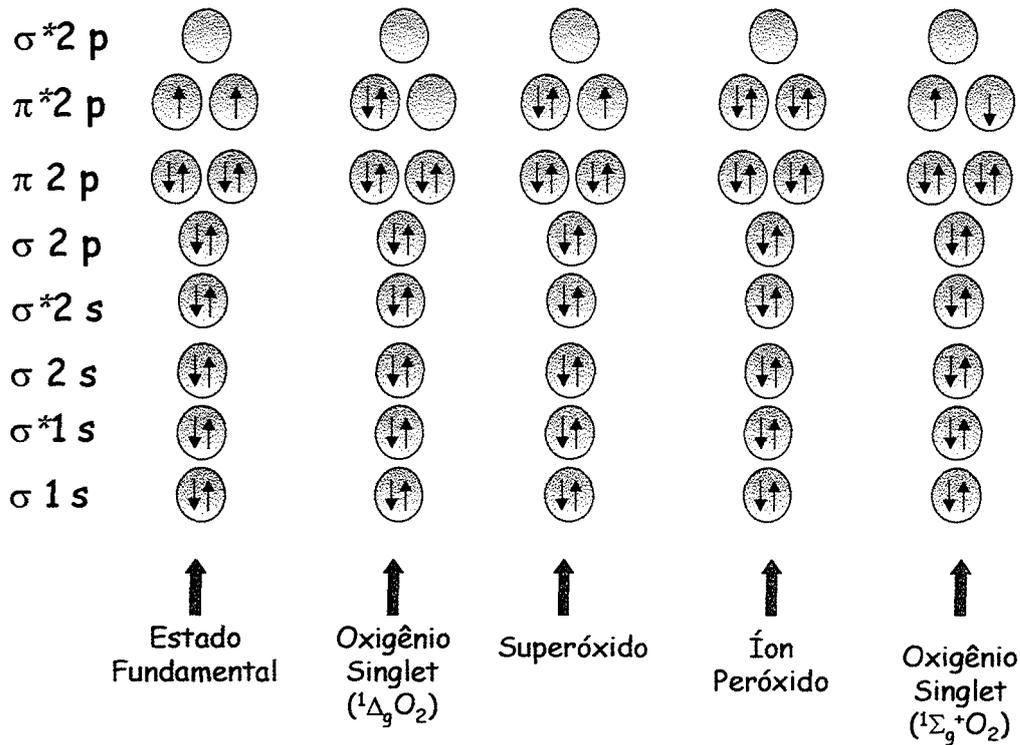


Figura 4: Distribuição eletrônica da molécula de oxigênio e alguns de seus derivados

(modificado de Halliwell & Guteridge, 1999)

A mais reativa das espécies ativas de oxigênio é o radical hidroxil, que é formado quando o peróxido de hidrogênio, reage com os íons ferro ou cobre, através da reação descrita por Fenton em 1894. Este radical ataca quase todas as moléculas encontradas nos organismos vivos, tendo uma meia-vida extremamente curta (YU, 1994). Quando o peróxido de hidrogênio reage com o ânion superóxido, com catálise de íons divalentes de metais de transição, através da reação descrita por Haber-Weiss em 1934, também é formado este radical. Assim que o radical hidroxil é formado, reage imediatamente com qualquer

biomolécula em sua vizinhança, podendo, por ser uma molécula pequena e não possuir carga, atravessar membranas e causar dano ao DNA. O ânion superóxido tem uma meia-vida mais longa que o radical hidroxil, sendo mais estável quimicamente, mas podendo também reagir com biomoléculas, sendo altamente tóxico em muitos sistemas biológicos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; GOLDSTEIN, 1996).

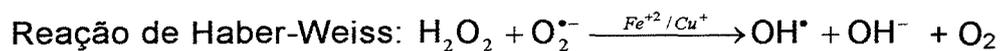
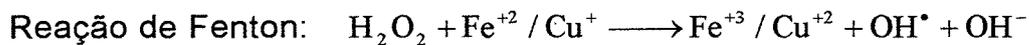


Figura 5: Reações de formação do radical hidroxil

Muitos são os efeitos deletérios conhecidos que são provocados ou influenciados pelas EAO, como artrite, enfisema, catarata, lesão isquêmica, entre outras (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Além disso, diversas enzimas têm sua atividade modulada por radicais livres, como a aconitase, diversas hidratases e desidratases (GARDNER, 1995).

Os mecanismos pelos quais as células são destruídas pelas EAO ainda não são perfeitamente claros. Sabe-se que elas atacam os lipídios de membrana, num processo denominado lipoperoxidação (LPO). Esta modificação estrutural altera as propriedades das membranas, sobretudo

a permeabilidade e a capacidade de transporte, o que pode acarretar a liberação de enzimas que degradam os lisossomos e rapidamente destroem as células. A peroxidação dos lipídios também acontece fisiologicamente, sendo um processo contínuo que ocorre nas membranas celulares para formação de prostaglandinas e leucotrienos a partir do ácido araquidônico, para formação de vesículas de endocitose e exocitose, além de processos de renovação das membranas celulares. As EAO podem também levar à destruição de proteínas, através da oxidação de grupamentos sulfidril, além de oxidar o DNA (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Na figura 6, observamos a representação esquemática da peroxidação lipídica. Na primeira fase da LPO, uma EAO, provavelmente o radical hidroxil ou o oxigênio "singlet" (espécie com os spins antiparalelos), atrai um átomo de hidrogênio do lipídio, formando um radical centrado no carbono. Este, na presença de oxigênio, dá origem a um radical peroxil, o qual reage com uma nova molécula de lipídio, gerando o lipoperóxido e um novo radical centrado no carbono. Essa reação continua em cadeia, e a fase final ocorre quando dois radicais reagem entre si formando um tetróxido instável que pode ser decomposto. O lipoperóxido sofre rearranjo molecular, formando malondialdeído e outros aldeídos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; THOMAS, 1997).

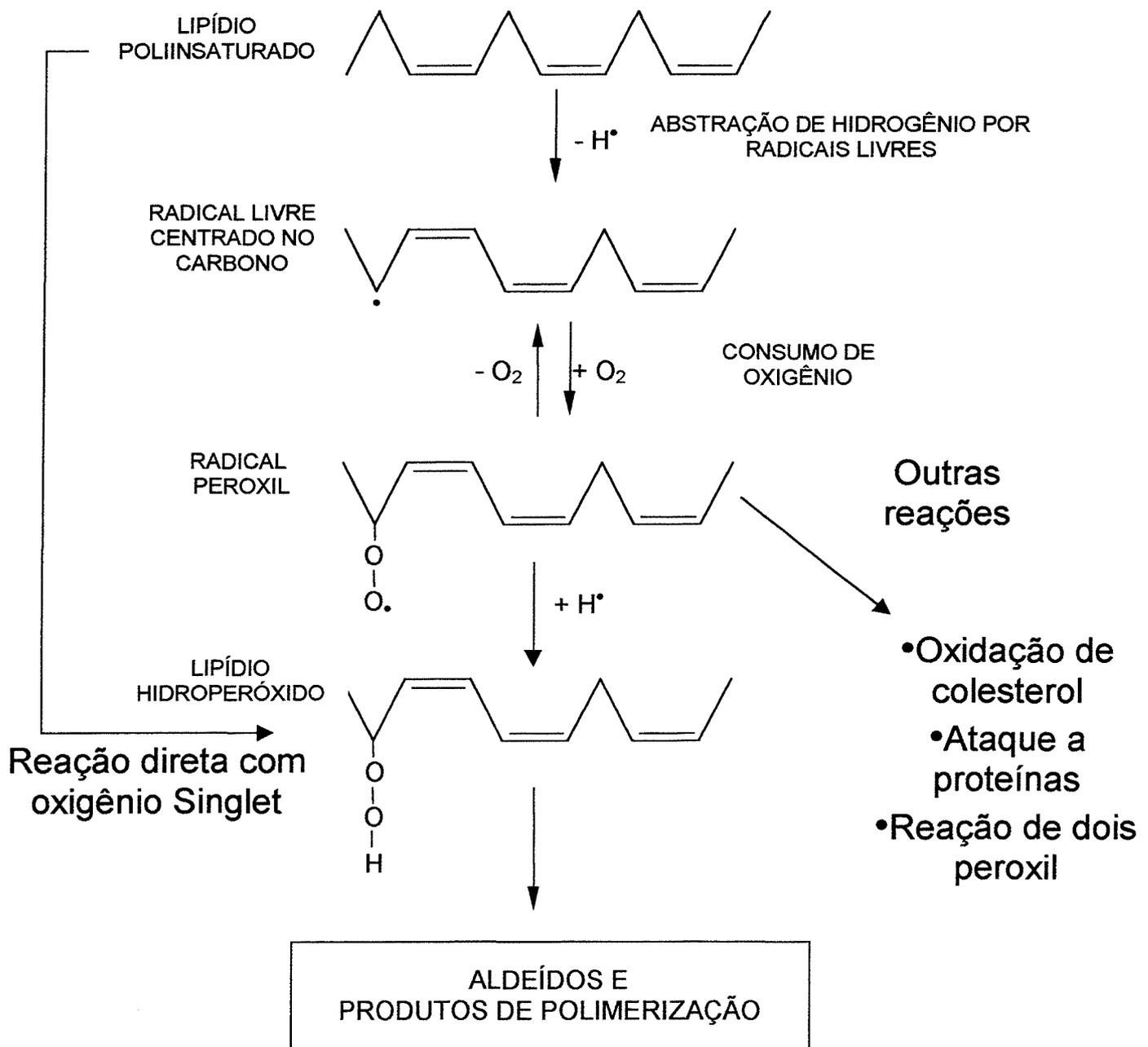


Figura 6: Representação esquemática da peroxidação lipídica (modificado de Halliwell & Gutteridge, 1999)

1.4 DEFESAS ANTIOXIDANTES

As células desenvolveram mecanismos de proteção para lidarem com a toxicidade do oxigênio, que são os antioxidantes. Estes são definidos como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas a um substrato oxidável, retardam ou previnem a oxidação deste substrato, que pode ser lipídio, proteína, DNA ou outras moléculas (HALLIWELL, 1997). Os mecanismos de ação dos antioxidantes são diversos, e podem incluir remoção do oxigênio presente no meio, varredura das EAO ou seus precursores, inibição da formação das EAO, quelação de metais que catalisam sua formação, indução de aumento da geração de antioxidantes endógenos, entre outros mecanismos, envolvendo muitas vezes integração funcional de vários destes componentes (HALLIWELL, 1997). Os antioxidantes minimizam os distúrbios no meio interno e preservam a ótima atividade celular, além de estarem estrategicamente compartimentalizados nas organelas celulares para gerarem proteção máxima (YU, 1994).

Existem antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Como antioxidantes não enzimáticos existem as vitaminas A e E, o ácido ascórbico, o ácido úrico, a glutathione, a melatonina, certos flavonóides, entre outros. Dentre os antioxidantes enzimáticos responsáveis pela detoxificação das EAO podemos citar a catalase, a superóxido dismutase, e a glutathione peroxidase (SIES, 1997).

A regulação das enzimas antioxidantes, necessária para manutenção da homeostase celular em condições adversas ao organismo, depende de vários fatores, como especificidade do órgão, idade, estágio de desenvolvimento, perfil hormonal e disponibilidade de cofatores (HARRIS, 1992).

As vitaminas A e E são lipossolúveis, estando presentes em alguns tecidos de mamíferos, já a vitamina C, por ser hidrossolúvel, possui mais ampla distribuição no organismo. A vitamina C age reciclando a vitamina E, mas em grandes quantidades pode se tornar pró-oxidante (YU, 1994). Estudos demonstram que os carotenóides e a vitamina A podem ser antioxidantes efetivos, reduzindo o desenvolvimento de doenças cardíacas, porém, em excesso podem ser tóxicos (PALACE, 1999).

A glutathione é o mais abundante tiol de baixo peso molecular presente em células de mamíferos. Além de ser um importante antioxidante não enzimático, participa de reações de enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase e a glutathione transferase. Sua ação antioxidante se deve à presença de um grupamento sulfidril, que atua como doador de elétrons (SIES, 1999).

A geração de peróxido de hidrogênio foi demonstrada como um evento fisiológico diretamente relacionado ao consumo de oxigênio, sendo a catalase e peroxidases as enzimas que metabolizam este peróxido de hidrogênio à água e oxigênio, impedindo assim a formação

de radical hidroxil e conseqüente dano celular. A catalase é altamente específica, e possui atividade apenas para hidroperóxidos de hidrogênio, de metila e de etila. A catalase está presente principalmente nos peroxissomas, e, por não possuírem peroxissomas, alguns órgãos estão mais expostos a danos, como o coração, pulmões e cérebro. Nestes órgãos, um mecanismo de defesa pode ser a difusão de peróxido de hidrogênio para o sangue, onde reage com a catalase eritrocitária (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

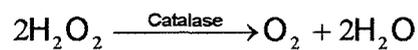


Figura 7: Decomposição do peróxido de hidrogênio pela catalase

As superóxido dismutases são metaloenzimas que catalisam muito eficientemente a dismutação de dois íons superóxido para formar oxigênio e peróxido de hidrogênio, que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas. A velocidade desta reação é 10^4 vezes maior que a velocidade da dismutação espontânea em pH fisiológico (FRIDOVICH, 1975; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Sua função enzimática foi associada em 1969 a proteínas já conhecidas que continham cobre, que eram chamadas de cupreínas (MCCORD & FRIDOVICH, 1969). Porém, posteriormente foram descobertas outras SODs que continham outros metais além do cobre, como manganês e ferro (KEELE, 1970; YOST, 1973).

No organismo humano, são encontrados dois tipos de SOD: as que contêm cobre e zinco e são encontradas no citoplasma e as que contêm manganês e estão presentes na matriz mitocondrial (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

Tem sido reconhecido que estas enzimas, que estão presentes em quase todos os organismos vivos, são um sistema de defesa essencial para a sobrevivência em condições aeróbias. O papel deletério do superóxido durante a isquemia, que ocorre em transplante de órgãos, muitas intervenções cirúrgicas e durante acidentes vasculares no cérebro e coração, sugerem que SOD pode ter um uso clínico potencial. Isto levou muitos pesquisadores a procurar por SOD miméticos, pois a SOD humana tem curta meia-vida (<10min), e não penetra nas células (GOLDSTEIN, 1996). Além disso, a modulação da atividade da SOD extracelular pode ser utilizada no tratamento de doenças vasculares, como a arteriosclerose (LUOMA et al, 1998).

O mecanismo de catálise da dismutação do superóxido por SOD e miméticos tem sido sugerido como “mecanismo ping-pong”, no qual o catalisador oscila entre dois estados de oxidação (GOLDSTEIN, 1996).



Figura 8: Dismutação do radical superóxido pela superóxido dismutase

Entre as peroxidases, a mais importante é a glutathiona peroxidase, que catalisa a redução de muitos peróxidos, como peróxidos lipídicos e peróxido de hidrogênio. Para a redução dos peróxidos, esta enzima utiliza o grupamento sulfidril da glutathiona reduzida, que pode ser reciclado pela interação da forma oxidada com NADPH através da enzima glutathiona redutase. Os grupamentos sulfidril doam dois hidrogênios, formando uma ligação dissulfeto. Deste modo, uma molécula de peróxido se transforma em um álcool, ou, no caso do peróxido de hidrogênio, em água. Há dois tipos de glutathiona peroxidase, uma que utiliza selênio como cofator, que é encontrada tanto na mitocôndria como no citosol, e uma selênio independente, que se encontra apenas no citosol e metaboliza exclusivamente hidroperóxidos orgânicos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

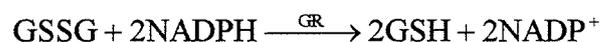
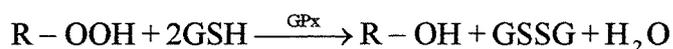


Figura 9: Redução de peróxidos pela glutathiona peroxidase e regeneração da glutathiona reduzida pela glutathiona redutase.

Onde: ROOH - peróxido orgânico, GSH - glutathiona reduzida e GSSG - dissulfeto de glutathiona.

Além disso, as enzimas chamadas glutathione S-transferases (GSTs) também têm um importante papel fisiológico na detoxificação de potentes agentes alquilantes, incluindo compostos farmacologicamente ativos como herbicidas, pesticidas e xenobióticos. Estas enzimas catalisam a reação destes compostos com o grupamento SH da glutathione, neutralizando assim seus sítios eletrofílicos e transformando-os em produtos mais hidrossolúveis, que são mais facilmente metabolizáveis (HABIG, 1974).

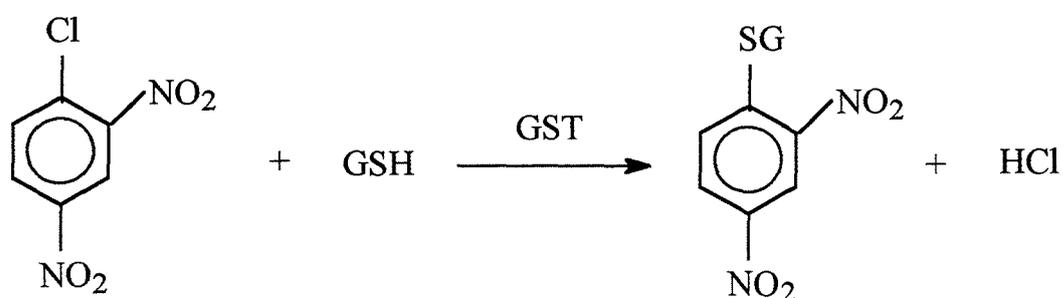


Figura 10: Exemplo de reação de detoxificação através da glutathione S-transferase (GST)

Dessa forma, notamos a importância da existência das enzimas antioxidantes e dos antioxidantes não enzimáticos, pois, sem eles, seria alterado o equilíbrio celular, facilitando o surgimento de disfunções que poderiam levar a processos patológicos.

1.5 PAPEL DOS RADICAIS LIVRES NA HIPERTENSÃO

O estresse oxidativo é definido como um distúrbio no balanço dos pró-oxidantes e antioxidantes, em favor dos pró-oxidantes, levando a um potencial dano às células (HALLIWELL, 1997). No sistema vascular, o estresse oxidativo causa uma redução do vasorrelaxamento dependente do endotélio. A regulação do tônus vascular, em condições fisiológicas e patológicas, está relacionada com mecanismos de oxi-redução, destacando-se o papel do óxido nítrico, que é um radical livre gasoso com atividade vasorrelaxante (MONCADA, 1991). As EAO podem também ser importantes mediadores da regulação vascular, reagindo com o NO endotelial. As mesmas podem estar envolvidas em várias etapas da hipertensão arterial, como aumento da resistência vascular periférica, disfunção do relaxamento dependente do endotélio, remodelação vascular e complicações tardias, como hipertrofia cardíaca (LAURINDO & LUZ, 1995). Estudos demonstram que o peróxido de hidrogênio induz contração de células endoteliais em cultura, um efeito que parece ser essencialmente dependente de proteína quinase C e cálcio, que causam a liberação de outros fatores vasoativos secundários (LOPEZ-ONGIL, 1999).

Foram encontradas ligações entre a hipertensão por doença renal crônica e síntese de óxido nítrico. Em pacientes com falência renal crônica, foi verificado um aumento nas concentrações de arginina dimetilada, um falso substrato de ocorrência natural para a enzima NO sintase, em níveis elevados o suficiente para inibir a síntese de NO (KUO & SCHROEDER, 1995).

Pesquisas realizadas em pacientes com hipertensão essencial mostraram um aumento na produção de peróxido de hidrogênio e superóxido, e também aumento dos níveis de lipoperóxidos em relação a indivíduos normais, além de diminuição da síntese de NO. Em pacientes tratados com fármacos anti-hipertensivos, os níveis voltaram a ser semelhantes aos dos controles. As concentrações de antioxidantes tais como vitamina E e superóxido dismutase mostraram-se diminuídas nestes pacientes (KUMAR & DAS, 1993).

Estudos em animais com hipertrofia cardíaca induzida por aumento da pressão arterial mostraram aumento da atividade de enzimas antioxidantes e redução da lipoperoxidação, além de aumento da tolerância a condições de estresse como isquemia-reperfusão (SINGAL, 1994).

O radical superóxido tem grande importância na regulação vascular, pois interage com o óxido nítrico de várias maneiras, sendo considerado um fator constritor derivado do endotélio. O superóxido reage diretamente com o NO, inativando-o e formando nitratos com atividade biológica reduzida, podendo também reagir e gerar

peroxinitrito, que é um subproduto tóxico, além de inativar diretamente a guanilato ciclase no endotélio (LAURINDO & LUZ, 1995). Como o NO possui ação antioxidante por ser “scavenger” de radicais peroxil, um aumento na produção de superóxido nos vasos poderia não somente interferir com a regulação do tônus vascular, por reação com o NO, mas também por remover um antioxidante e gerar um forte pró-oxidante, que é o peroxinitrito (HOGG et al, 1994; KOPPENOL, 1998).

O mecanismo de formação do peroxinitrito pela reação do superóxido com o NO é independente de ferro e outros íons de metais de transição. O decaimento espontâneo do peroxinitrito a nitrato ocorre após sua protonação, formando radical hidroxil. O processo de oxidação de moléculas próximas pelo peroxinitrito compete com sua transformação em nitrato, sendo o potencial redox do peroxinitrito próximo ao do radical hidroxil (DENICOLA et al, 1995).

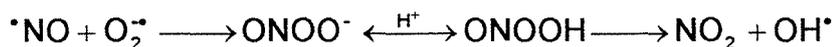


Figura 11: Reação do óxido nítrico (NO) com superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) formando peroxinitrito (ONOO^-), que é rapidamente protonado (ONOOH), e a decomposição do mesmo em nitrato (NO_2) e radical hidroxil (OH^{\cdot}).

1.6 HIPÓTESE

As células podem tolerar um ligeiro estresse oxidativo, que frequentemente resulta em regulação da síntese de defesas antioxidantes para restaurar o balanço oxidante/antioxidante. Assim, o organismo se adapta ao aumento do estresse oxidativo, aumentando suas defesas antioxidantes para proteção contra um mais severo estresse aplicado subsequentemente, ou modificando a sensibilidade de alvos normalmente vulneráveis ao dano oxidativo, sem no entanto aumentar suas defesas antioxidantes.

O presente estudo procurou verificar se o aumento continuado da pós-carga imposto pela hipertensão poderia provocar adaptações do sistema antioxidante nos tecidos-alvo da hipertensão (coração e rins). O desenho experimental foi planejado para testar a hipótese de que, frente a um estresse agudo (hipertensão 7 dias), o sistema antioxidante estaria ativado, o que não se observaria a longo prazo, tendo em vista os processos adaptativos dos tecidos.

1.6 OBJETIVOS

- Verificar os efeitos do clampeamento renal esquerdo na pressão arterial sistólica, diastólica e média e frequência cardíaca aos 7, 14, 21 e 28 dias após o procedimento cirúrgico.

- Efetuar uma análise temporal do estresse oxidativo, através da medida de lipoperoxidação e atividade enzimática antioxidante nos animais hipertensos de 7, 14, 21 e 28 dias, e nos seus respectivos controles.

2. METODOLOGIA

2.1 ANIMAIS ESTUDADOS

Foram utilizados ratos machos Wistar pesando entre 250-320 g, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Os animais foram mantidos em caixas plásticas de 27x26x31 cm, com o assoalho coberto de serragem, sendo 5 animais por caixa. Eles receberam água e alimentação à vontade e foram mantidos em período de 12 horas luz/12 horas escuro, com temperatura em torno de 25 °C.

2.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram estabelecidos oito grupos experimentais:

- grupo hipertenso 7 dias (n=9),
- grupo controle 7 dias (N=7),
- grupo hipertenso 14 dias (n=7),
- grupo controle 14 dias (n=6),
- grupo hipertenso 21 dias (n=9),

- grupo controle 21 dias (n=6),
- grupo hipertenso 28 dias (n=9),
- grupo controle 28 dias (n=7).

Nos grupos hipertensos, foi colocado um clipe na artéria renal esquerda, que foi mantido durante cada um dos tempos de tratamento (7, 14, 21 e 28 dias) e nos grupos controle foi realizada cirurgia de simulação, sem colocação de clipe, com os mesmos tempos de tratamento.

2.3 CIRURGIA DE CLAMPEAMENTO RENAL

A cirurgia foi realizada sob anestesia com 90 mg/Kg de cetamina e 10 mg/Kg de xilazina para cada animal. Os animais foram inicialmente depilados na região abdominal, após foi feita uma incisão nesta região, e foram afastados os tecidos para a localização da artéria renal. Nos animais hipertensos, foi colocado um clipe com 0,30 mm de diâmetro interno e 2 mm de extensão na artéria renal esquerda, deixando-se intacto o rim direito. Nos animais controle, foi realizada a mesma cirurgia, sendo que o clipe não foi colocado. Este modelo de hipertensão foi descrito por Goldblatt, em 1934 (GOLDBLATT, 1934).

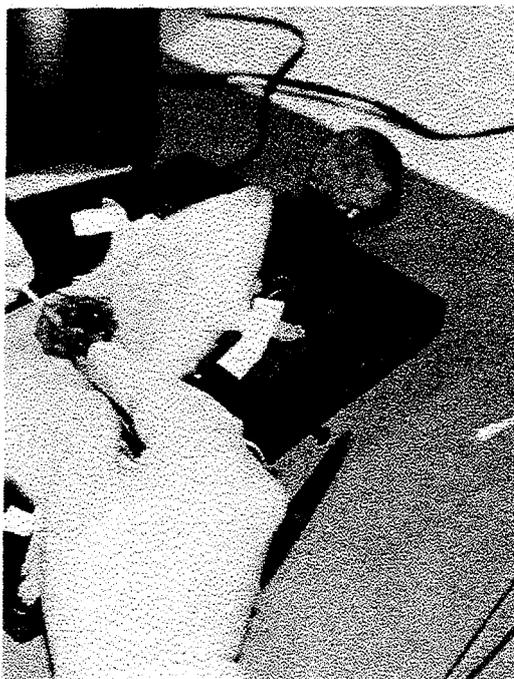


Figura 12: Cirurgia de colocação do clipe.

2.4 REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL

2.4.1 Canulação

O procedimento cirúrgico, bem como os cuidados pós-operatórios, foram baseados na descrição feita por Waynforth e Flecknell (1992). Um dia antes do final de cada tempo de tratamento, os animais foram anestesiados da mesma forma que para a cirurgia de clampeamento e receberam catéteres na artéria carótida, exteriorizados na região dorsal. Os catéteres foram confeccionados com tubos de Tygon PE- 90, conectados a tubos de polietileno PE-50 (Clay Adams, USA). As cânulas foram mantidas desobstruídas utilizando-se 0,01 ml de heparina sódica

(Liquemine - Roche, 5.000 U) em 0,1 ml de solução de NaCl 0,9%, durante a lavagem que precedia cada registro de pressão.

2.4.2 Registro e processamento de sinais

Após a cateterização, foram feitos registros de pressão batimento-a-batimento nos animais acordados. Para evitar alterações significativas na medida devido ao estresse provocado por ruídos, os animais foram levados para o local de registro cerca de 15 minutos antes do mesmo para adaptação.

Os registros foram feitos conectando-se a cânula arterial a um transdutor de pressão (P23Db, Gould-Statham, Oxford, CA, USA) acoplado a um condicionador de sinais Hewlett Packard (HP 8805C) que se encontrava ligado por um seletor de canais à placa analógico-digital CODAS (AT/MCA CODAS - DATAQ Instruments, Inc., Akron, Ohio, USA) em computador 486 (66MHz e 8Mb RAM). A frequência de amostragem utilizada foi de 2000 KHz para os registros de PA e frequência cardíaca (FC). O programa utilizado (CODAS) permite trabalhar diretamente com a onda de pulso, que é vista na tela do computador, e os dados podem ser gravados em disco rígido. Neste mesmo programa, podem-se executar cálculos a partir dos valores obtidos, gerando-se uma planilha com valores de pico (sístole), vale (diástole) e período (entre um pico e outro), para cada onda de pulso. Assim, é possível trabalhar com valores

de pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e período de cada pulso de pressão. A partir dos períodos entre um pico e outro, calculam-se os valores de frequência cardíaca (FC) (para cada batimento), através do inverso do período multiplicado por 60 (segundos). Após gravados os sinais em disco rígido, gera-se uma planilha que pode ser analisada em programa Excel for Windows, a partir da qual se obtém, para cada animal experimental registrado, valores de PAS, PAD, PAM e FC, bem como seus respectivos gráficos.

2.5 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PREPARO DOS HOMOGENEIZADOS

Os animais foram sacrificados após o registro de pressão arterial através de anestesia etérea. Os corações e rins foram rapidamente retirados e homogeneizados durante 30 segundos em KCl 1,15% (5 mL por g de tecido) contendo fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF) na concentração de 100mM em iso-propanol e na quantidade de 10 μ L por ml de KCl adicionado. O PMSF é um inibidor de proteases, e foi utilizado para que não houvesse degradação das enzimas cuja atividade foi medida. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados à temperatura de 0 a 4°C, por 10 minutos a 1000 g, e o sobrenadante foi retirado e congelado em freezer a -80°C para as dosagens posteriores (LLESUY et al, 1985).

2.6 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores, que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL (LOWRY, 1951). Para a realização das dosagens foram utilizados os seguintes reagentes:

a) NaHCO_3 (bicarbonato de sódio) 2% em NaOH (hidróxido de sódio) 0,1N;

b) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (sulfato de cobre) 1%;

c) $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (tartarato de sódio e potássio) 2%

Foi preparada a fresco uma mistura utilizando-se 50 ml do reagente "a", 0,5 ml do "b" e 0,5 ml do "c".

Foram adicionados 20 μL de homogeneizado de tecido em 0,78 mL de água destilada e 2 mL do reativo descrito acima, aguardando-se 10 minutos. Após esse tempo, foram adicionados com agitação 0,2 mL do reativo de Folin Ciocalteu, diluído em água destilada na proporção 1:3. Após 30 minutos, a solução adquiriu coloração azulada que foi medida em espectrofotômetro marca Varian, modelo Cary a 625 nm.

O cálculo foi feito utilizando-se fator de correção calculado a partir da curva de calibração construída utilizando-se a solução padrão de albumina na concentração 1mg/mL.

2.7 LIPOPEROXIDAÇÃO

A lipoperoxidação foi quantificada por dois métodos experimentais, quimiluminescência e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

2.7.1 Quimiluminescência

O método consiste em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética ao homogeneizado de tecido, avaliando-se a capacidade de resposta produzida pela amostra. A realização deste tipo de teste consiste no fato de que os hidroperóxidos são espécies químicas bastante instáveis, reagindo com lipídios por um mecanismo radicalar que gera produtos que emitem luz pela amostra em estudo.

A QL foi medida em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Brommma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio. As determinações foram realizadas em sala escura, em frascos de vidro mantidos na penumbra para evitar a fosforescência ativada pela

luz fluorescente. O meio de reação no qual foi realizado o ensaio consistiu em 3,5mL de uma solução tampão de fosfatos 20mM, contendo KCl 140mM (pH 7,4), à qual foi adicionado 0,5 mL de homogeneizado. Após esse momento, foi realizada uma leitura inicial, considerada a emissão basal de luz pelo homogeneizado. O hidroperóxido orgânico utilizado foi o hidroperóxido de tert-butila, na concentração de 400mM, dos quais foram adicionados 30 μ L no meio de reação, para obter-se uma concentração final de 3mM. Foi medida então a emissão de luz e desta foi descontada a emissão basal do homogeneizado para fins de cálculos. Os resultados foram expressos em contagens por segundo (cps) por miligrama de proteína (GONZALEZ FLECHA et al, 1991).

2.7.2 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

Esta técnica é bastante utilizada para medir a LPO, pois o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos desta, entre eles o malondialdeído e outros aldeídos.

A técnica consiste em aquecer o material biológico a ser testado na presença de ácido tiobarbitúrico, para medir espectrofotometricamente a formação de um produto de coloração rósea. Para tanto, foi utilizada uma alíquota de 0,25 mL de homogeneizado, à qual foram adicionados 0,75 mL de ácido tricloroacético a 10%, que tem a função de desnaturar as proteínas

presentes e acidificar o meio de reação. Esta mistura foi, então, agitada e centrifugada durante 3 minutos a 1000 g. Foram retirados 0,5 mL do sobrenadante e a este foram adicionados 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,67%, que reage com os produtos da lipoperoxidação formando um composto de coloração rosada. A mistura foi incubada por 15 minutos a 100°C e resfriada. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a 535nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em nmoles de TBA-RS por mg de proteína (BUEGE & AUST, 1978).

2.8 CATALASE

A taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio é diretamente proporcional à atividade da catalase, e obedece a uma cinética de pseudo primeira ordem com relação a esse. Dessa forma, o consumo de peróxido de hidrogênio pode ser utilizado como uma medida de atividade da enzima catalase (Figura 7).

O ensaio consiste em medir a diminuição da absorbância a 240 nm, comprimento de onda onde há a maior absorção pelo peróxido de hidrogênio. Foram utilizadas cubetas de quartzo devido à alta energia presente neste comprimento de onda.

Para a realização das medidas, foi utilizada uma solução tampão constituída de fosfatos a 50 mM e pH 7,4. Foram colocados 955 μ L deste tampão e 10 μ L de amostra de tecido na cubeta do espectrofotômetro, sendo esta mistura descontada contra um branco de tampão fosfato. Após esse momento, foram adicionados 35 μ L de peróxido de hidrogênio 0,3 M e foi monitorada a diminuição da absorbância no comprimento de onda selecionado. Os resultados foram expressos em pmoles por mg de proteína (BOVERIS & CHANCE, 1973).

2.9 GLUTATIONA PEROXIDASE

A amostra foi preparada adicionando-se uma mistura de cianetos para inibir a atividade de pseudo-peroxidase da hemoglobina. Foram utilizadas soluções de cianeto de potássio (KCN 9 mM) e ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$ 0,9 mM), obtendo-se o reativo de Drabkin, para medir a quantidade de hemoglobina. Depois de conhecida a concentração de hemoglobina, estas mesmas soluções foram utilizadas em diferente proporção, obtendo-se a solução transformante, para a transformação de toda a hemoglobina em cianometahemoglobina.

SOLUÇÃO DE DRABKIN:

- * 0,85 mL da solução-mãe de KCN
- * 6,6 mL da solução-mãe de $K_3[Fe(CN)_6]$
- * q.s.p. 10 mL água destilada

SOLUÇÃO TRANSFORMANTE:

- 5,0 mL KCN
- 5,0 mL $K_3[Fe(CN)_6]$

Como a glutathione peroxidase (GPx) catalisa a reação de hidroperóxidos com glutathione reduzida (GSH) para formar glutathione oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido, a atividade da enzima pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução acoplada à reação da GPx (Figura 9).

A atividade da GPx foi medida em um espectrofotômetro de marca Varian, modelo Cary. Foi monitorada a diminuição de absorvância do NADPH a 340 nm, em um meio de reação contendo os seguintes reagentes:

- Solução tampão de fosfatos 143 mM e EDTA 1 mM (pH 7,5)
- NADPH 10 mM
- Azida sódica 1 mM, utilizada para inibir a atividade da catalase

- GSH 5 mM
- Glutathione redutase 0,25 U/mL
- Hidroperóxido de tert-butila 0,5 mM

Na cubeta do espectrofotômetro, foram adicionados 330 μ L de tampão, 50 μ L da amostra de coração ou amostra de rins, 500 μ L de NADPH, 10 μ L de azida sódica, 50 μ L de GSH e 10 μ L de GR. Foi registrada a absorbância por um período de aproximadamente 2 minutos, para obtenção da linha de base. Após esse momento, foram adicionados 50 μ L de hidroperóxido de tert-butila, e a diminuição da absorbância devida ao consumo de NADPH foi monitorada por mais 3 minutos. Os resultados foram expressos em nmoles por minuto por mg de proteína (FLOHÉ & GUNZLER, 1984).

2.10 GLUTATIONA S-TRANSFERASE

As glutathionas transferases são um grupo de enzimas que catalisam reações de conjugação de glutathione com vários substratos, tendo um importante papel na detoxificação de agentes alquilantes. Todas as transferases são ativas com o composto cloro-dinitro-benzeno (CDNB), sendo a conjugação deste com GSH utilizada para quantificar-se sua atividade (Figura 10). A formação do composto corado dinitro-

fenil-glutationa (DNP-SG), foi medida espectrofotometricamente a 340 nm (MANNERVIK & GLUTHENBERG, 1981).

A atividade da glutathione transferase (GST) foi medida acompanhando-se a reação de formação do DNP-SG a 340 nm em um meio de reação contendo 850 μ L de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,5), 50 μ L de GSH 20 mM, 50 μ L de CDNB 20 mM, e 50 μ L de amostra. A atividade da GST foi expressa em nmoles/minuto/mg de proteína.

2.11 SUPERÓXIDO DISMUTASE

As superóxido dismutases catalisam a reação de dois ânions superóxido, com a consequente formação de peróxido de hidrogênio (Figura 8), que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a catalase e a glutathione peroxidase. A velocidade da reação catalisada pela SOD é 10^4 vezes maior que a velocidade de dismutação espontânea em pH fisiológico.

A técnica utilizada neste trabalho para determinação da SOD está baseada na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O superóxido é gerado pela auto-oxidação do pirogalol quando em meio básico. A SOD presente na amostra em estudo compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. Dado que não se pode determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, se utiliza a quantificação em

unidades relativas. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector. A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado (MARKLUND, 1985).

No meio de reação, foram utilizados 973 μL de tampão tris 50 mM (pH 8,2), 8 μL de pirogalol 24 mM, 4 μL de catalase 30 μM . O aumento na absorbância foi acompanhado a 420 nM durante 2 minutos. Esta curva obtida foi utilizada como branco. Foi também feita uma curva padrão utilizando três concentrações distintas de SOD (0,25U, 0,5U e 1U), através da qual foi obtida a equação da reta para realização dos cálculos. Os resultados foram expressos em U SOD/mg proteína.

2.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a realização de todos os testes, foram calculadas as médias, e os erros padrões dos fenômenos estudados para cada um dos grupos. Para análise dos dados, foi realizado o teste de análise de variância complementado com o teste de comparações múltiplas de Student-Newmann-Keuls. As diferenças foram consideradas significativas para um nível de significância de, pelo menos, 5%.

3. RESULTADOS

Os valores apresentados são a média de cada grupo \pm o erro padrão da média. Para cada fenômeno estudado há uma figura, a fim de permitir uma melhor visualização dos dados.

3.1 CIRURGIA DE CLAMPEAMENTO RENAL

Foi observado que cerca de 20% dos animais não desenvolveram hipertensão. Alguns animais, cerca de 5%, após o final do tratamento estavam com os rins esquerdos atróficos, porém estes animais apresentavam hipertensão.

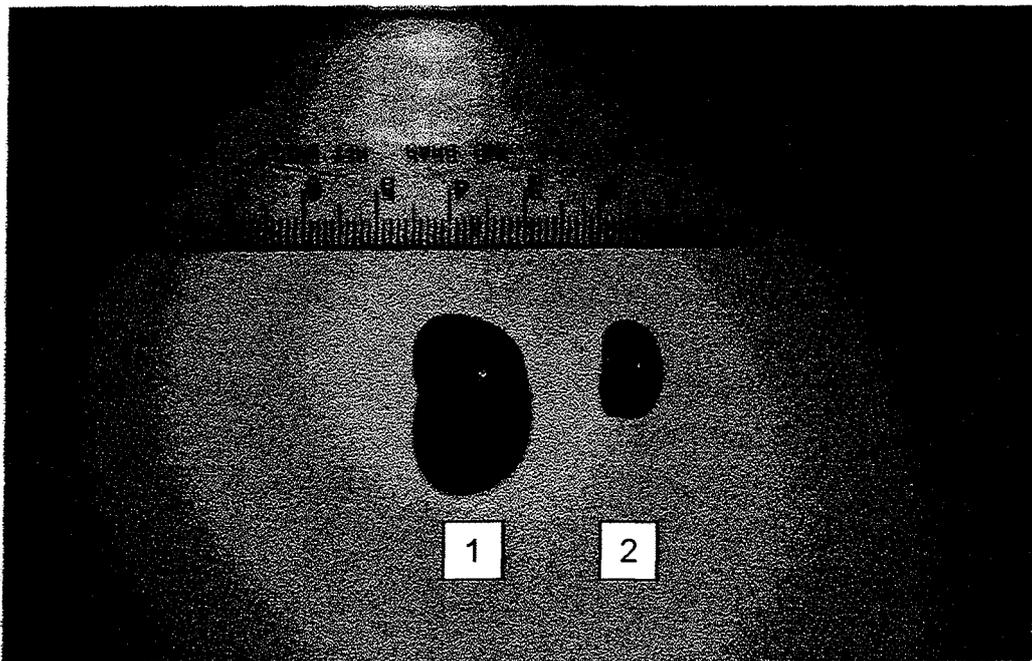


Figura 13: Demonstração da atrofia apresentada por alguns dos rins esquerdos dos animais hipertensos. Em 1, vê-se um rim não isquêmico de tamanho normal (rim direito), e em 2, um rim atrófico de um animal hipertenso (rim esquerdo).

3.2 PRESSÃO ARTERIAL

Foram analisadas a pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), e a média (PAM) de cada grupo.

3.2.1 Pressão arterial sistólica

Os resultados de pressão arterial sistólica estão representados na figura 12. A pressão arterial sistólica foi 18% maior no grupo hipertenso 7 dias em relação ao grupo controle 7 dias, 12% maior no grupo hipertenso 14 dias em relação ao grupo controle 14 dias, 23% maior no grupo hipertenso 21 dias em relação ao grupo controle 21 dias, e 22% maior no grupo hipertenso 28 dias em relação ao grupo controle 28 dias.

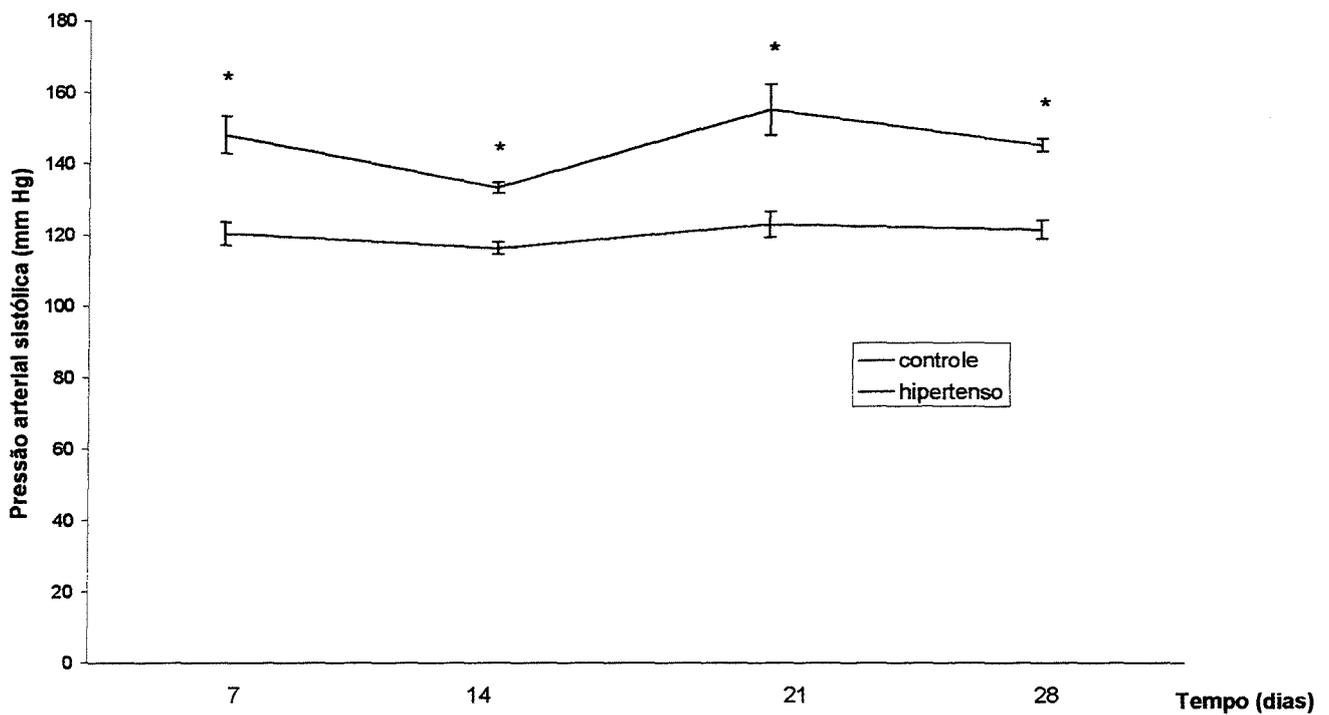


Figura 14: Variação da pressão arterial sistólica (em mmHg) nos grupos experimentais.

Os valores da figura são expressos como média \pm erro padrão da média.

* representa diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle ($p < 0,05$).

3.2.2 Pressão arterial diastólica

Os resultados de pressão arterial diastólica estão representados na figura 13. A pressão arterial diastólica foi 23% maior no grupo hipertenso 7 dias em relação ao grupo controle 7 dias, 15% maior no grupo hipertenso 14 dias em relação ao grupo controle 14 dias, 26% maior no grupo hipertenso 21 dias em relação ao grupo controle 21 dias, e 19% maior no grupo hipertenso 28 dias em relação ao grupo controle 28 dias.

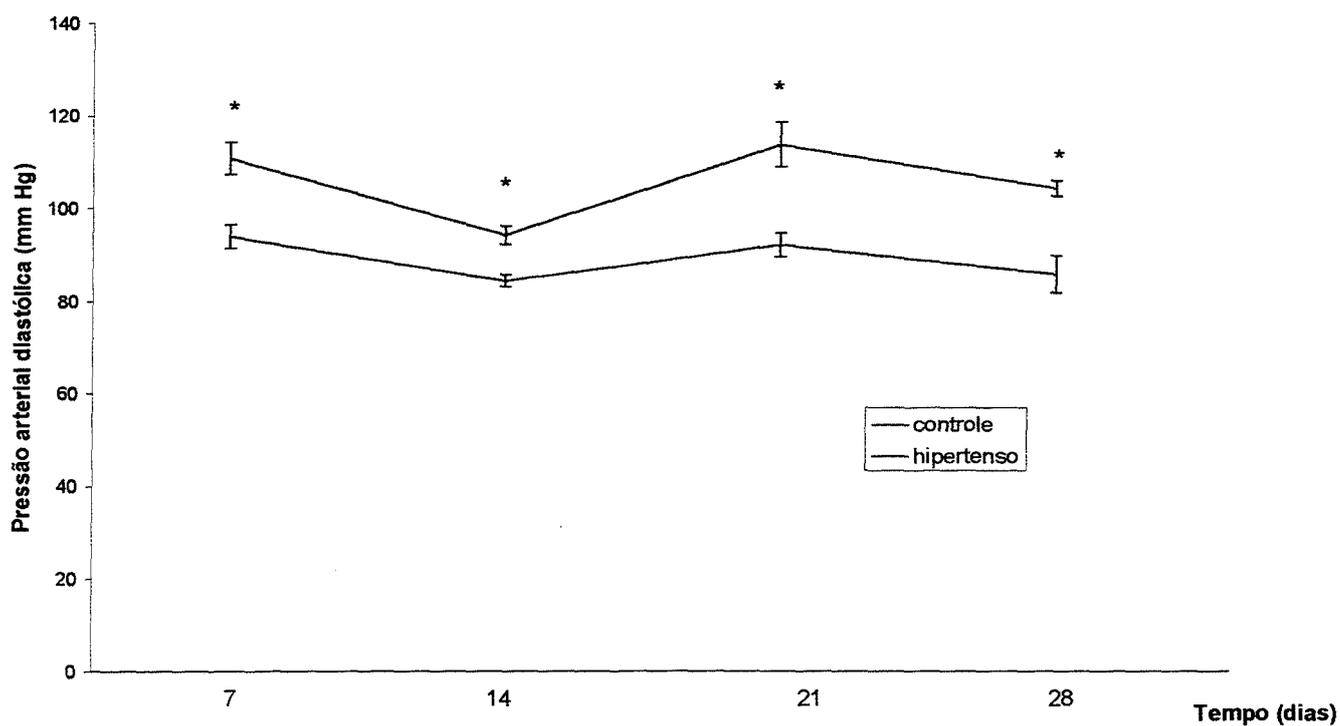


Figura 15: Variação da pressão arterial diastólica (em mmHg) nos grupos experimentais.

Os valores da figura são expressos como média \pm erro padrão da média.

* representa diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle ($p < 0,05$).

3.2.3 Pressão arterial média

Os resultados estão representados na figura 14. A pressão arterial média foi 20% maior no grupo hipertenso 7 dias em relação ao grupo controle 7 dias, 14% maior no grupo hipertenso 14 dias em relação ao grupo controle 14 dias, 23% maior no grupo hipertenso 21 dias em relação ao grupo controle 21 dias, e 22% maior no grupo hipertenso 28 dias em relação ao grupo controle 28 dias.

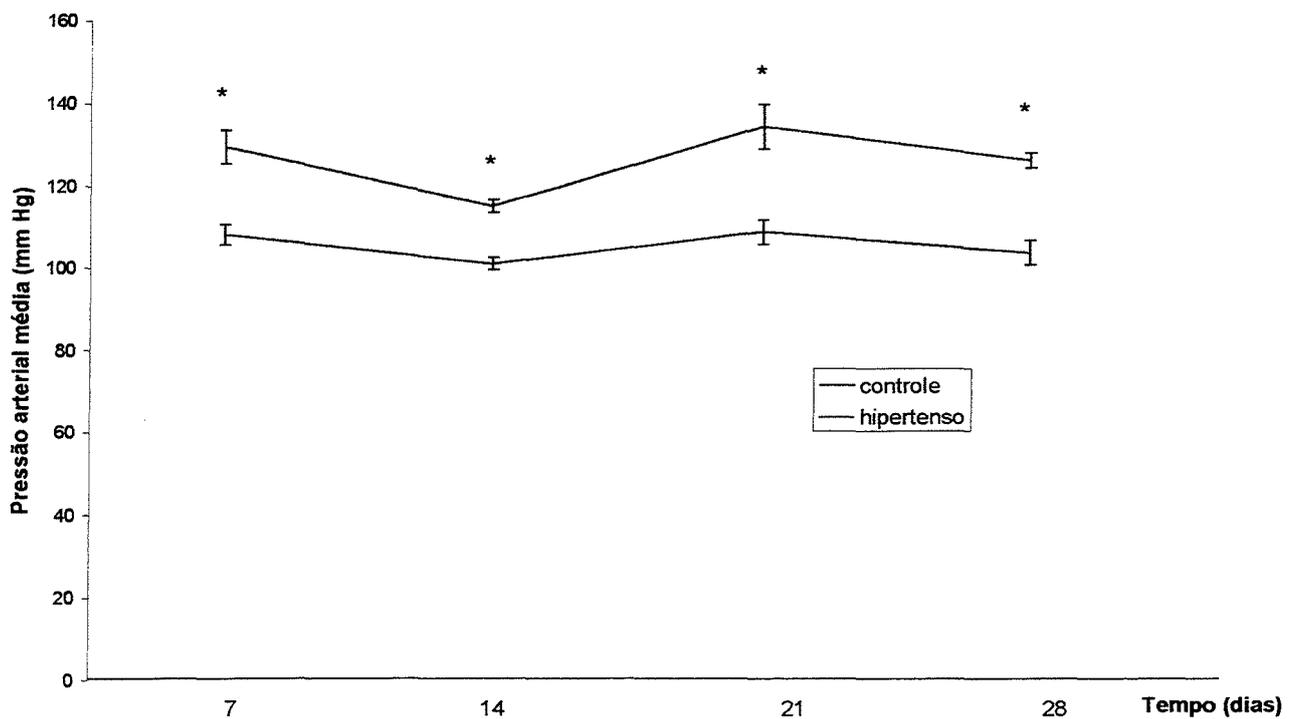


Figura 16: Variação da pressão arterial média em mmHg nos grupos experimentais.

Os valores da figura são expressos como média \pm erro padrão da média.

* representa diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle ($p < 0,05$).

3.3 FREQUÊNCIA CARDÍACA

A frequência cardíaca não mostrou alterações significativas entre os grupos experimentais. Os resultados estão demonstrados na figura 15.

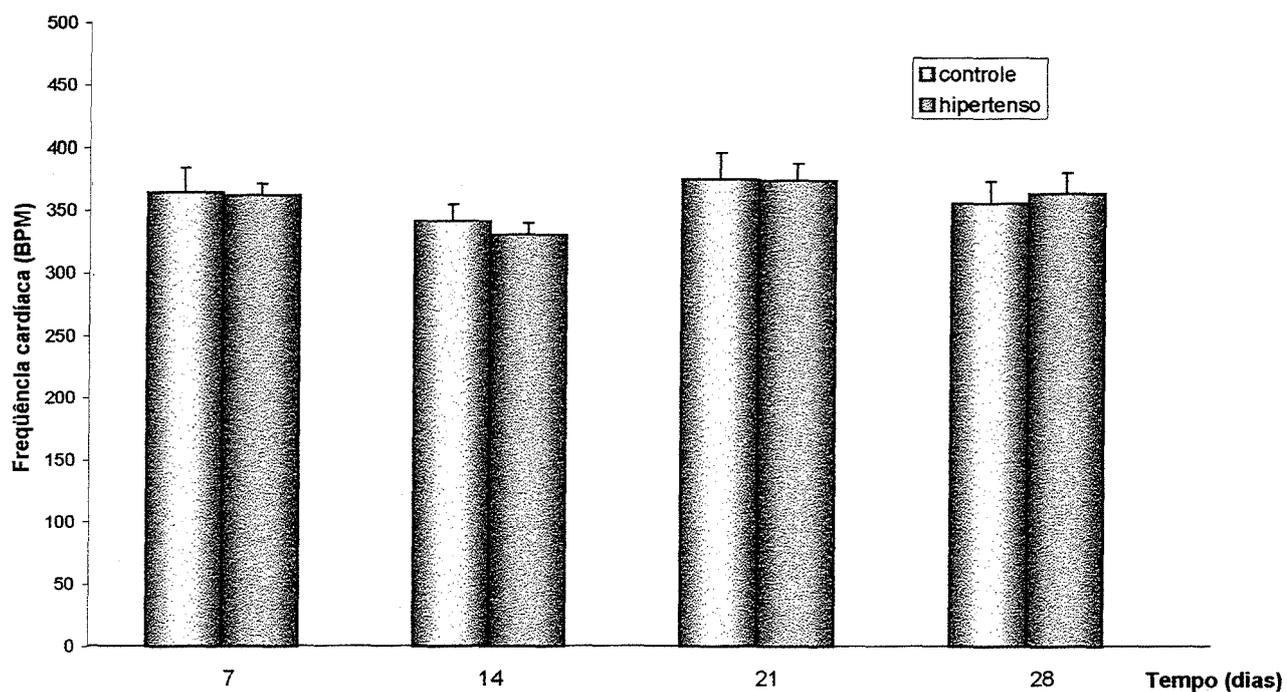


Figura 17: Variação da frequência cardíaca em batimentos por minuto nos grupos experimentais.

Os valores da figura são expressos como média \pm erro padrão da média.

3.4 LIPOPEROXIDAÇÃO

A lipoperoxidação foi avaliada através de quimiluminescência e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

3.4.1 Quimiluminescência

A quimiluminescência no homogeneizado de corações, rins direitos e rins esquerdos não mostrou alterações significativas nos grupos hipertensos em relação aos seus respectivos controles. Os resultados são apresentados nas figuras 16, 17 e 18.

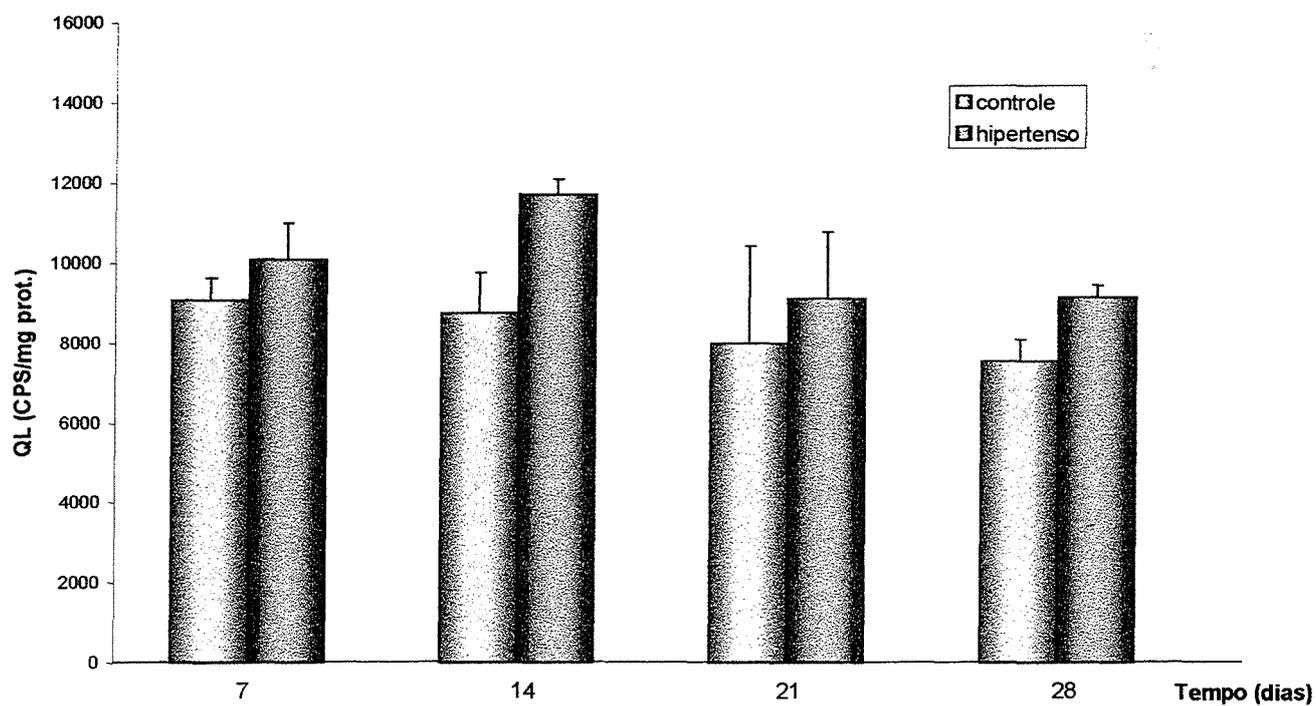


Figura 18: Quimiluminescência em contagens por segundo por mg de proteína no homogeneizado cardíaco nos grupos experimentais.

Os valores da figura são expressos como média \pm erro padrão da média.

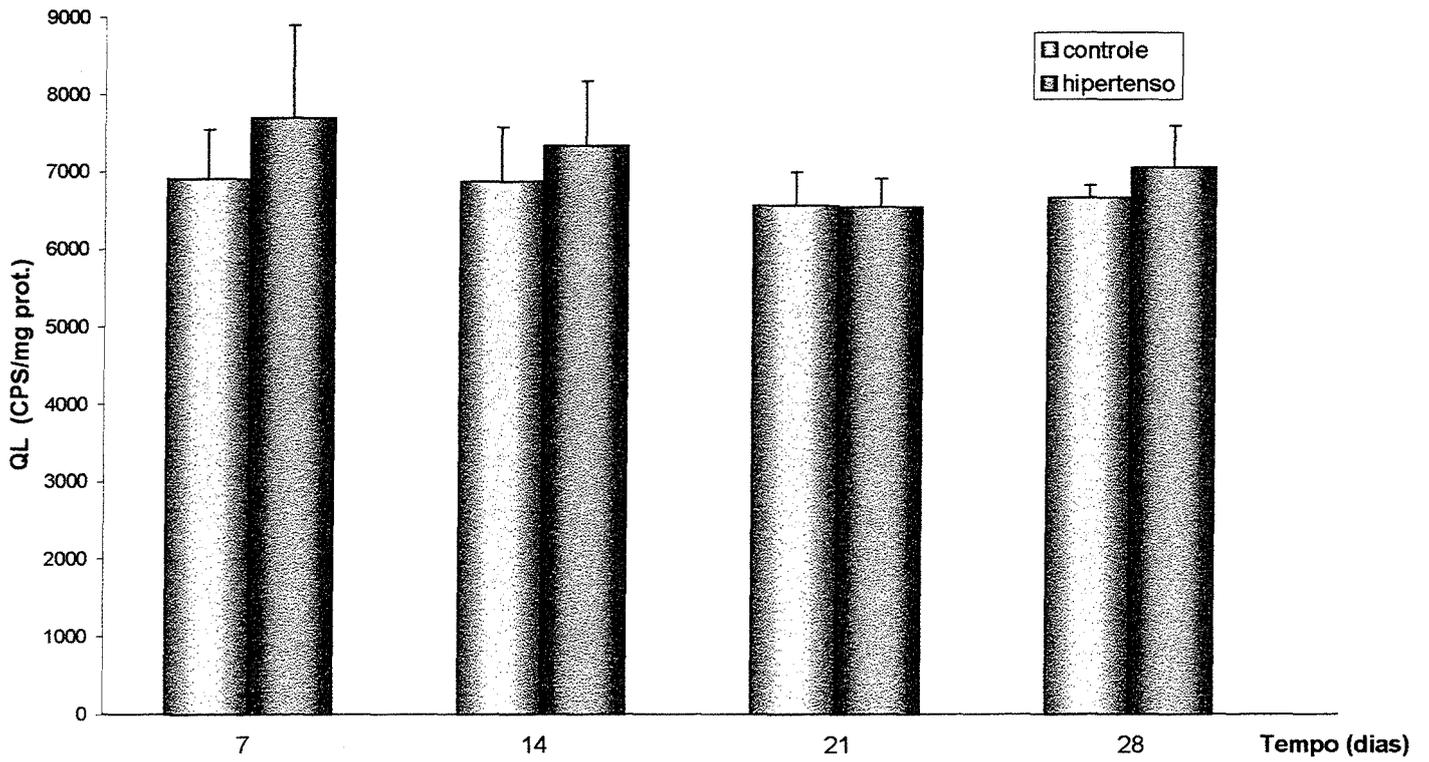


Figura 19: Quimiluminescência em contagens por segundo por mg de proteína no homogeneizado de rins direitos nos grupos experimentais.

Os valores da figura são expressos como média \pm erro padrão da média.

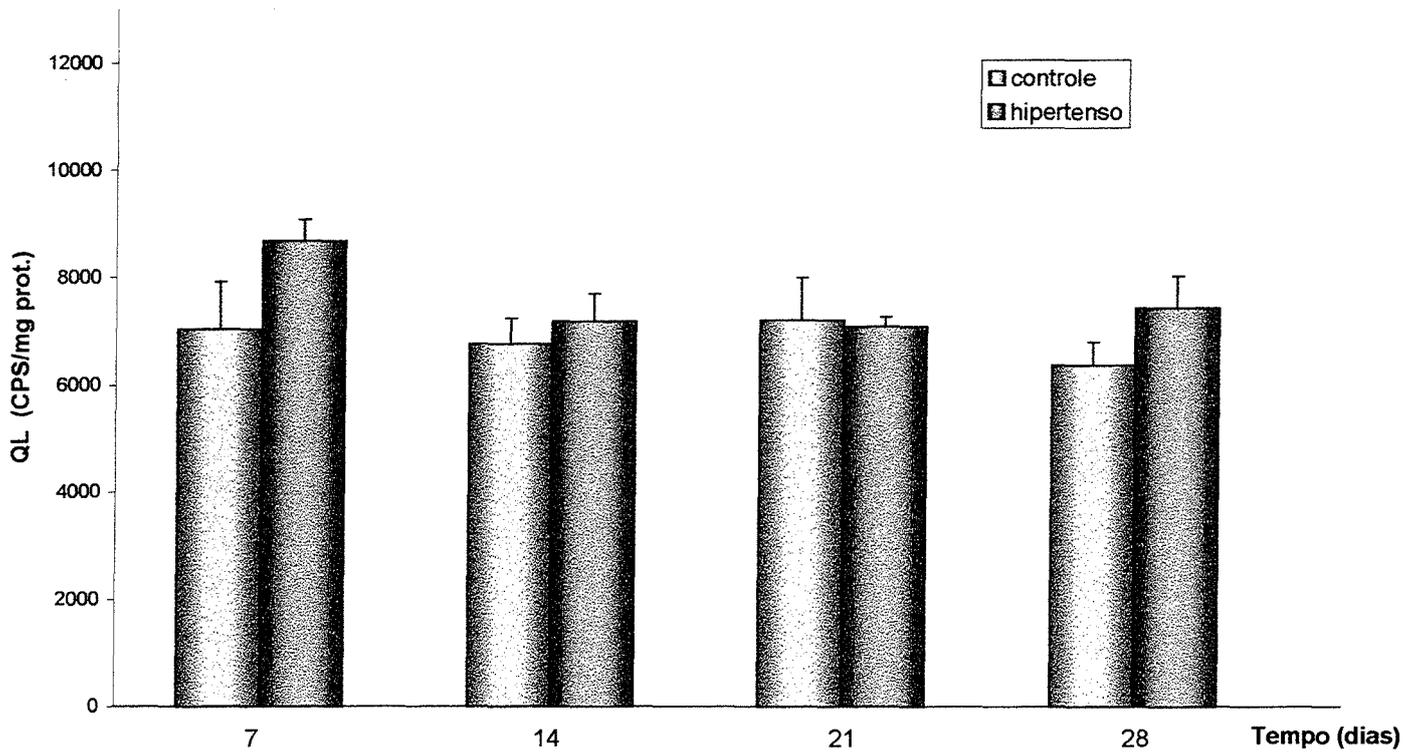


Figura 20: Quimiluminescência em contagens por segundo por mg de proteína no homogeneizado de rins esquerdos nos grupos experimentais.

Os valores da figura são expressos como média \pm erro padrão da média.

3.4.2 TBA-RS

O conteúdo de TBA-RS medido no homogeneizado de corações, não mostrou alterações significativas nos grupos hipertensos em relação aos seus respectivos controles. Os resultados são apresentados na figura 19. No tecido renal não foi possível realizar esta medida, tendo em vista que em algumas amostras a reação de cor não se verificou.

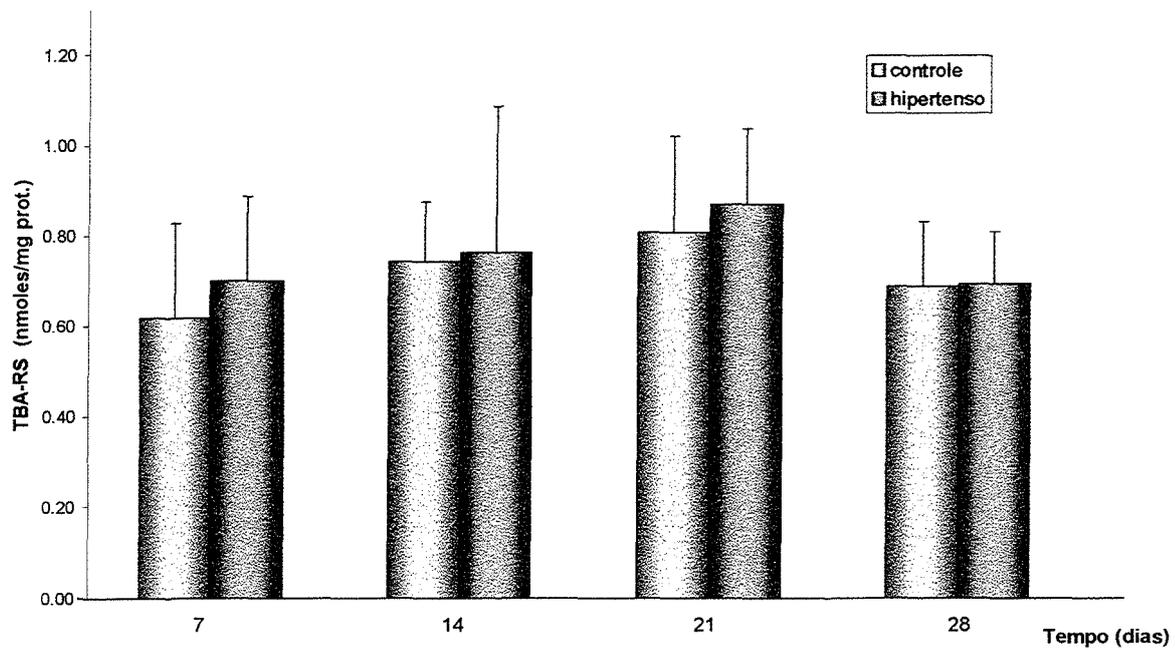


Figura 21: Conteúdo de TBA-RS em nmoles por mg de proteína no homogeneizado cardíaco nos grupos experimentais.

Os valores da figura são expressos como média \pm erro padrão da média.

3.5 CATALASE

A atividade da enzima catalase não mostrou diferenças significativas nos homogeneizados de corações, rins direitos e rins esquerdos entre os grupos estudados. Os resultados são apresentados nas figuras 20, 21 e 22.

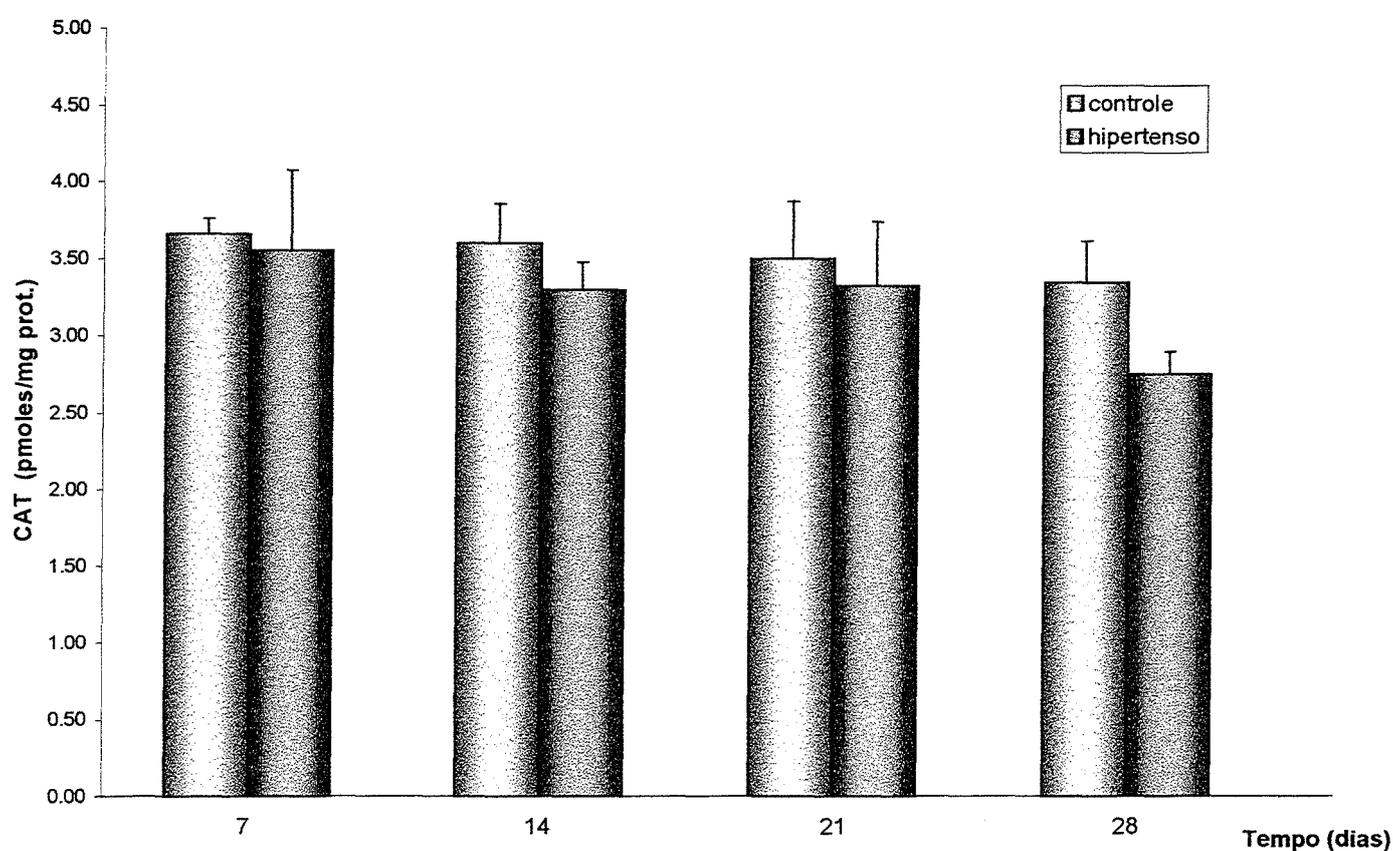


Figura 22: Atividade da catalase em pmoles por mg de proteína no homogeneizado cardíaco nos grupos experimentais.

Os valores da figura são expressos como média \pm erro padrão da média.

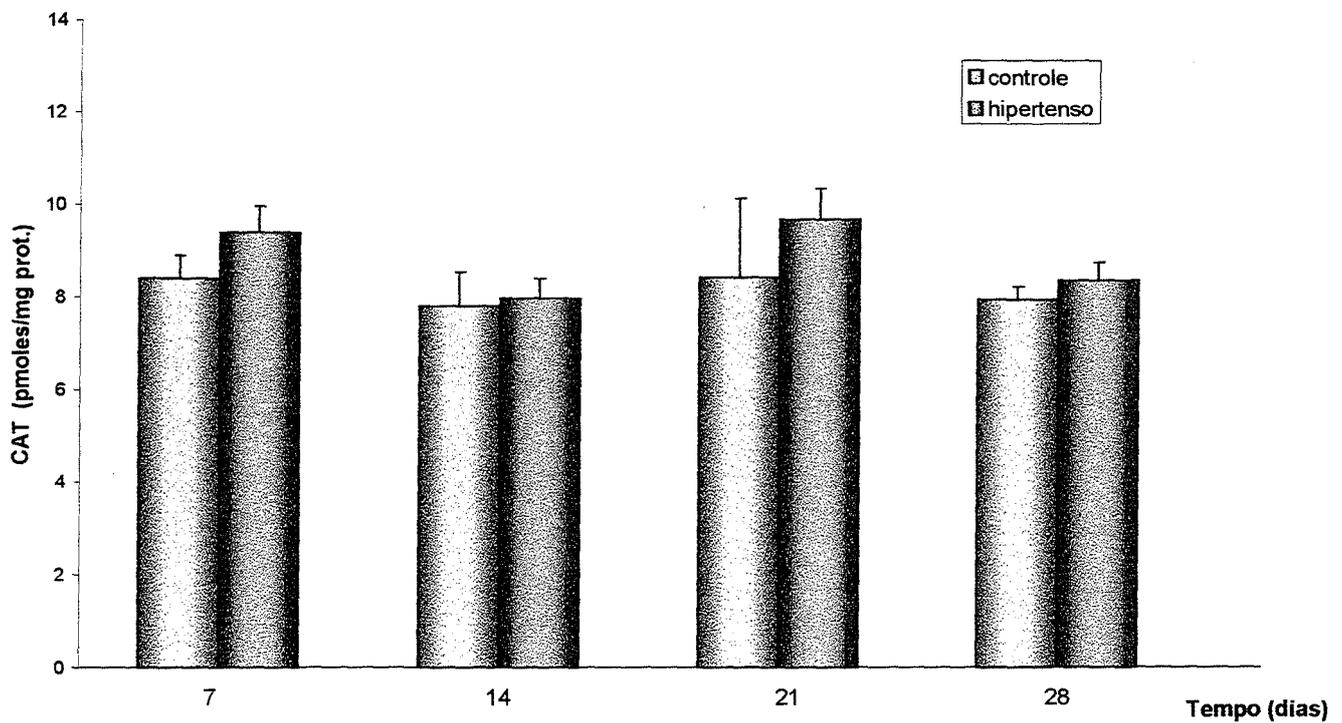


Figura 23: Atividade da catalase em pmoles por mg de proteína no homogeneizado de rins direitos nos grupos experimentais.

Os valores da figura são expressos como média \pm erro padrão da média.

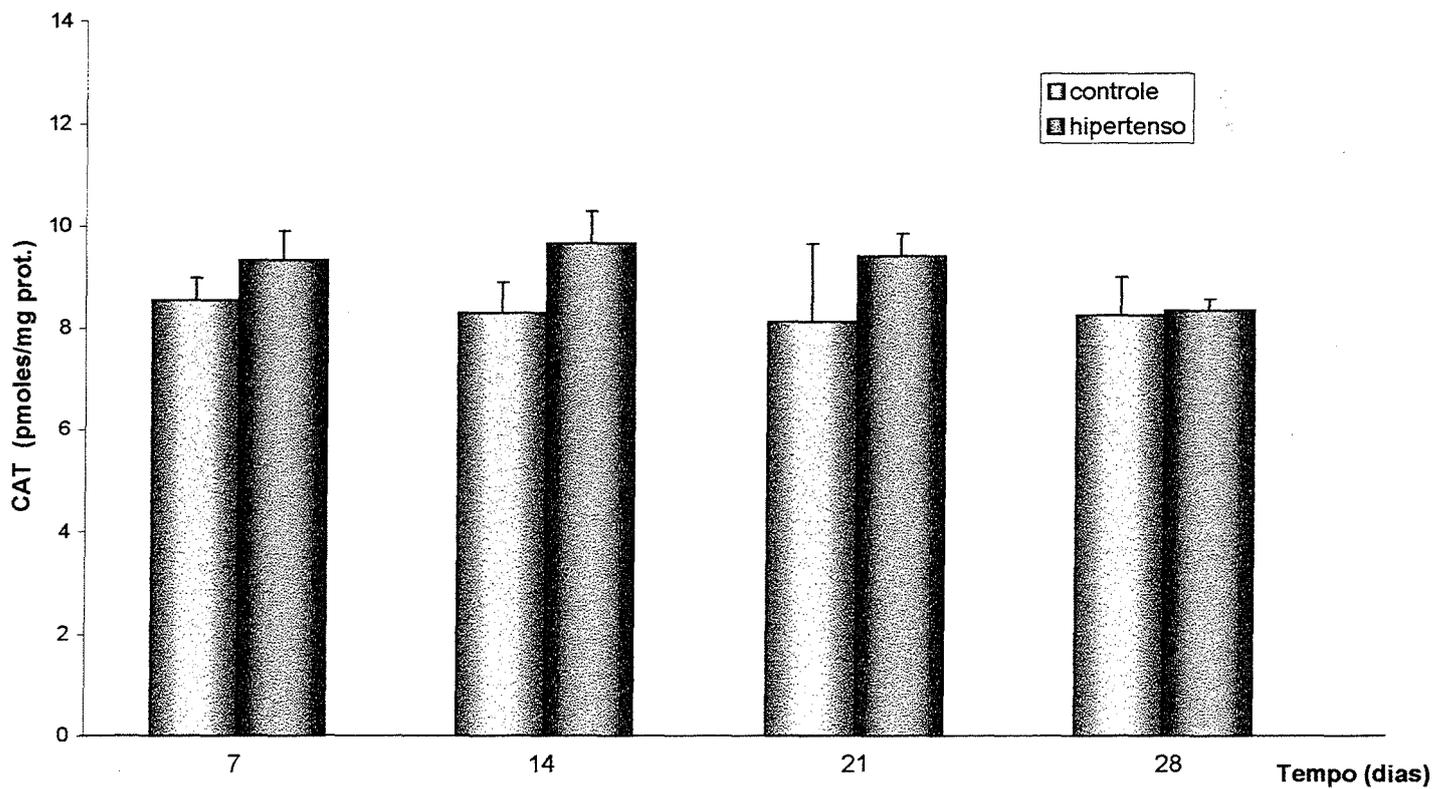


Figura 24: Atividade da catalase em pmoles por mg de proteína no homogeneizado de rins esquerdos nos grupos experimentais.

Os valores da figura são expressos como média \pm erro padrão da média.

3.6 GLUTATIONA PEROXIDASE

Os resultados são apresentados nas figuras 22, 23 e 24, em nmoles por minuto por mg de proteína . A atividade da enzima glutaciona peroxidase mostrou-se 74% maior nos corações do grupo hipertenso 7 dias em relação aos corações do grupo controle 7 dias, 213% maior nos rins direitos do grupo hipertenso 7 dias em relação aos rins direitos do grupo controle 7 dias e 196% maior nos rins esquerdos do grupo hipertenso 7 dias em relação aos rins esquerdos do grupo controle 7 dias. Nos demais tempos de tratamento, não foram verificadas diferenças na atividade da enzima glutaciona peroxidase.

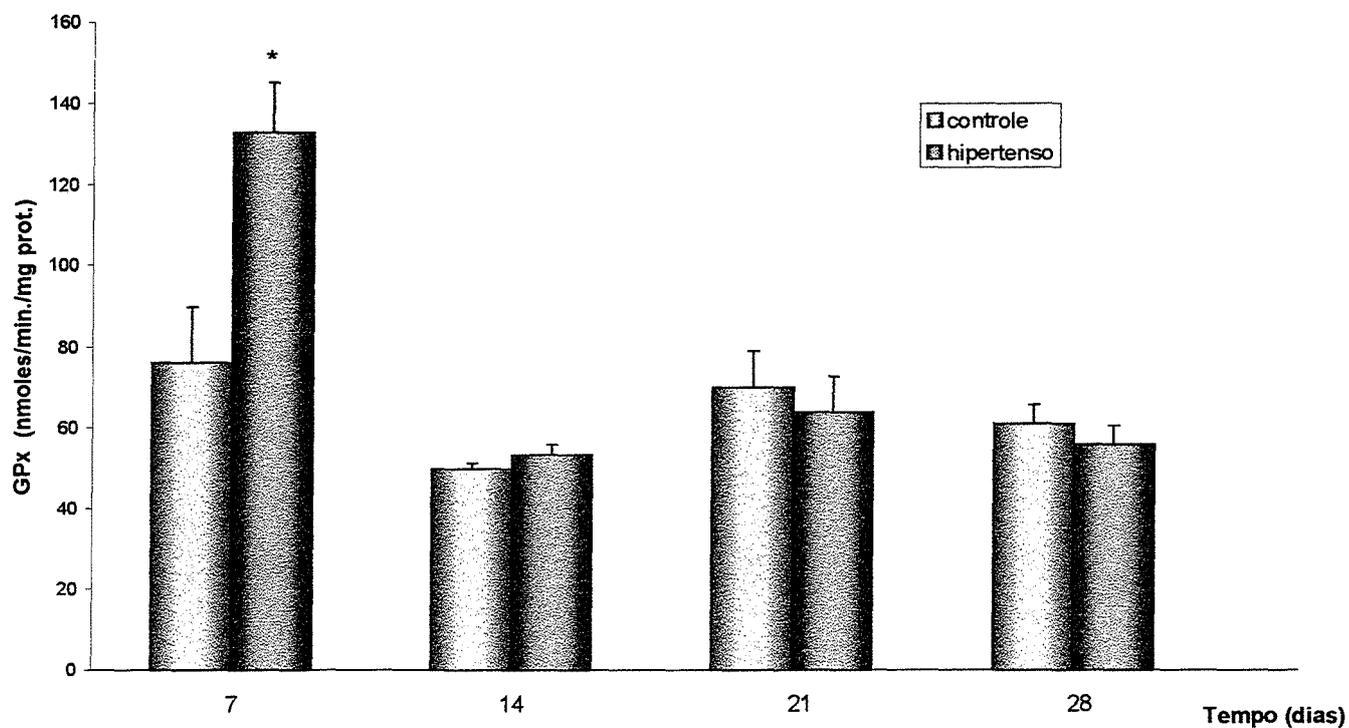


Figura 25: Atividade da glutathione peroxidase em nmoles por minuto por mg de proteína no homogeneizado cardíaco nos grupos experimentais.

Os valores da figura são expressos como média \pm erro padrão da média.

* representa diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle ($p < 0,01$).

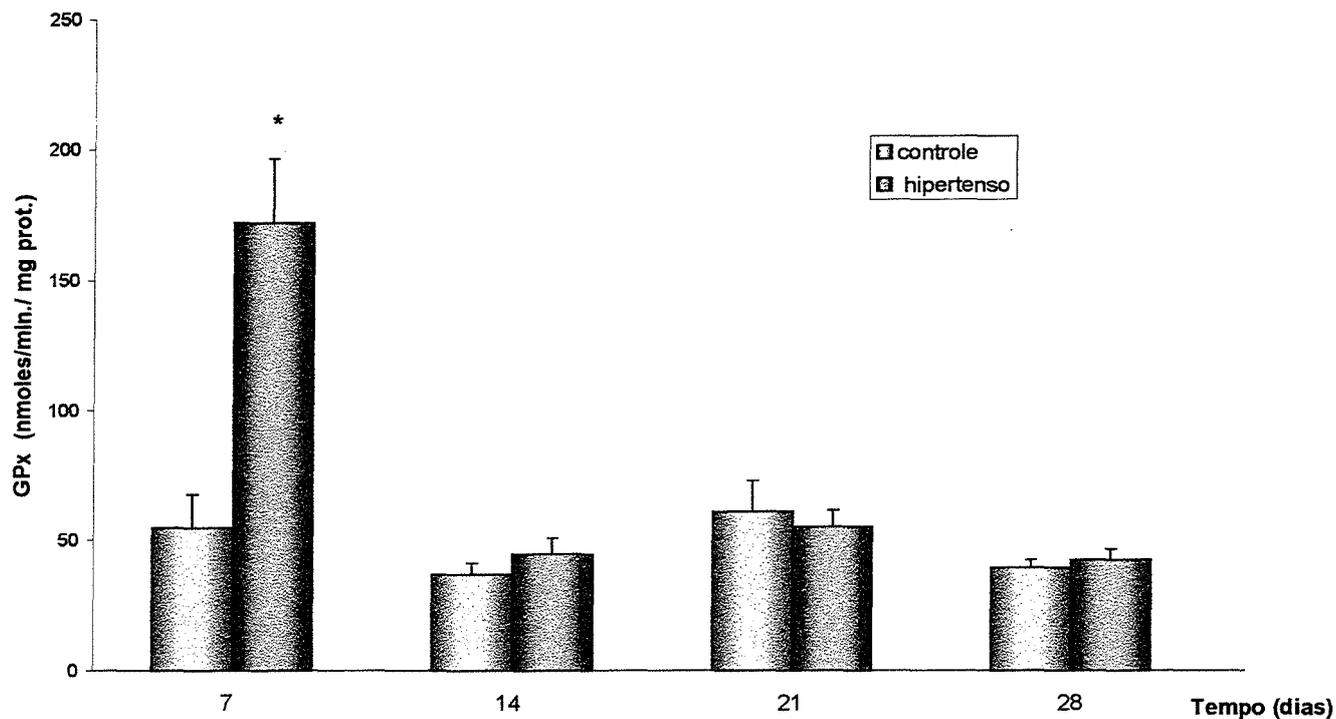


Figura 26: Atividade da glutathione peroxidase em nmoles por minuto por mg de proteína no homogeneizado de rins direitos nos grupos experimentais.

Os valores da figura são expressos como média \pm erro padrão da média.

* representa diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle ($p < 0,01$).

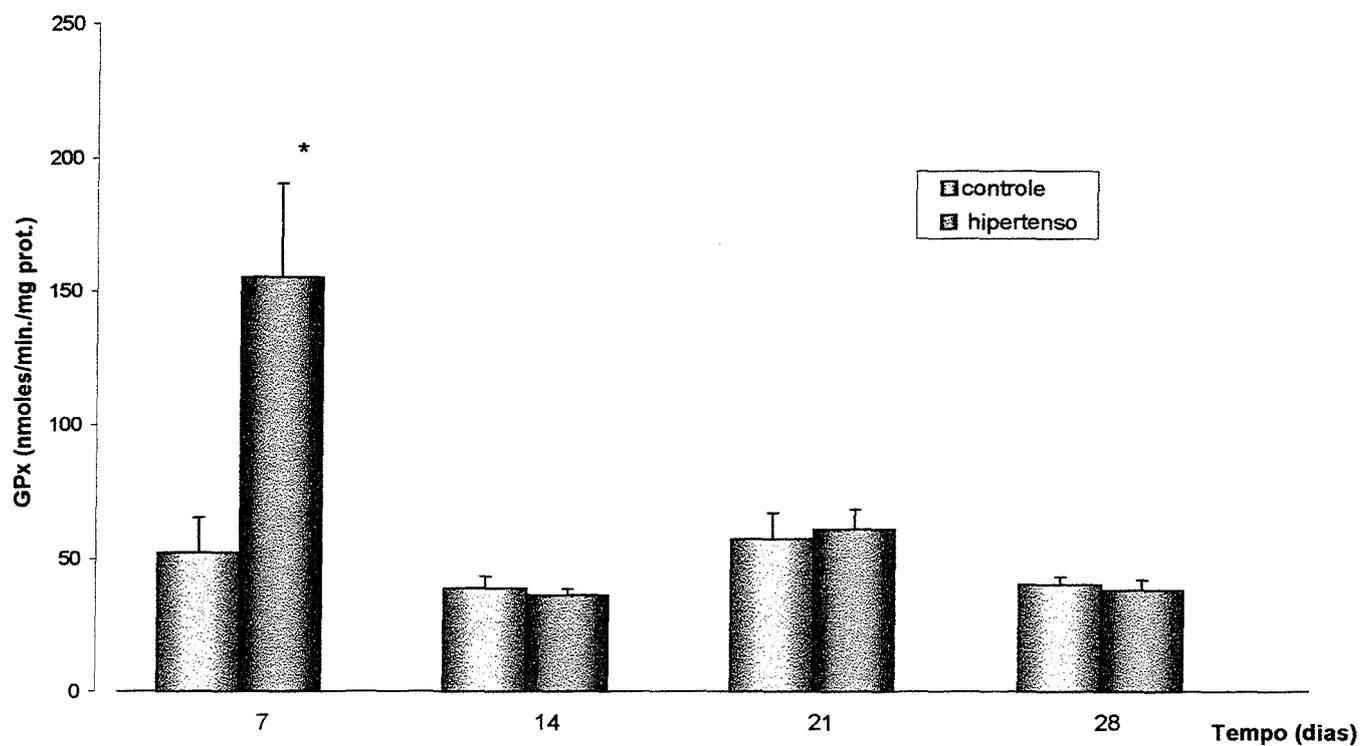


Figura 27: Atividade da glutathione peroxidase em nmoles por minuto por mg de proteína no homogeneizado de rins esquerdos nos grupos experimentais.

Os valores da figura são expressos como média \pm erro padrão da média.

* representa diferença significativa em relação ao respectivo grupo controle ($p < 0,01$).

3.7 GLUTATIONA S-TRANSFERASE

A atividade da enzima glutaciona S-transferase não mostrou diferenças significativas nos homogeneizados de corações, rins direitos e rins esquerdos entre os grupos estudados, porém a variação da atividade desta enzima no homogeneizado cardíaco mostrou estreita correlação com as variações de pressão arterial. Os resultados são apresentados nas figuras 26, 27, 28 e 29.

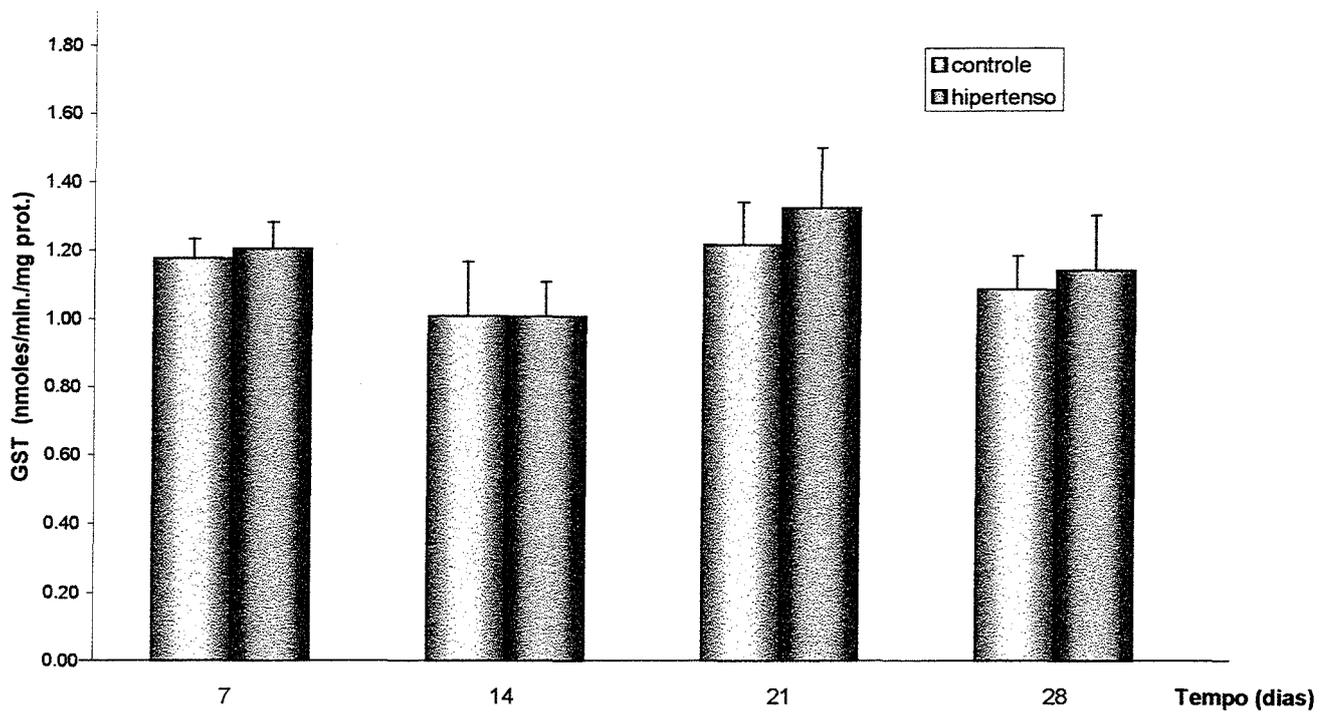


Figura 28: Atividade da glutatona S-transferase em nmoles por minuto por mg de proteína no homogeneizado cardíaco nos grupos experimentais.

Os valores da figura são expressos como média \pm erro padrão da média.

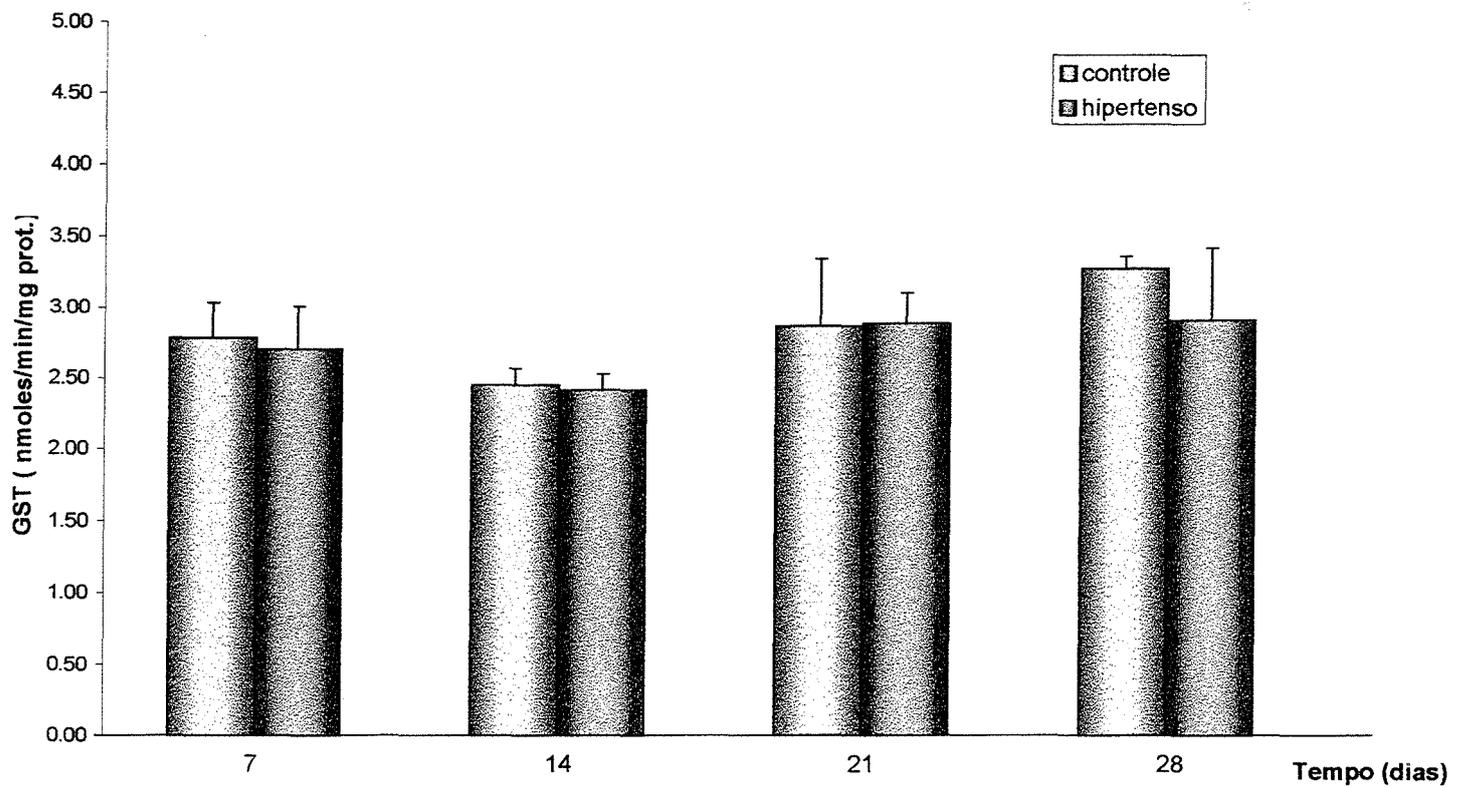


Figura 29: Atividade da glutathione S-transferase em nmoles por minuto por mg de proteína no homogeneizado de rins direitos nos grupos experimentais.

Os valores da figura são expressos como média \pm erro padrão da média.

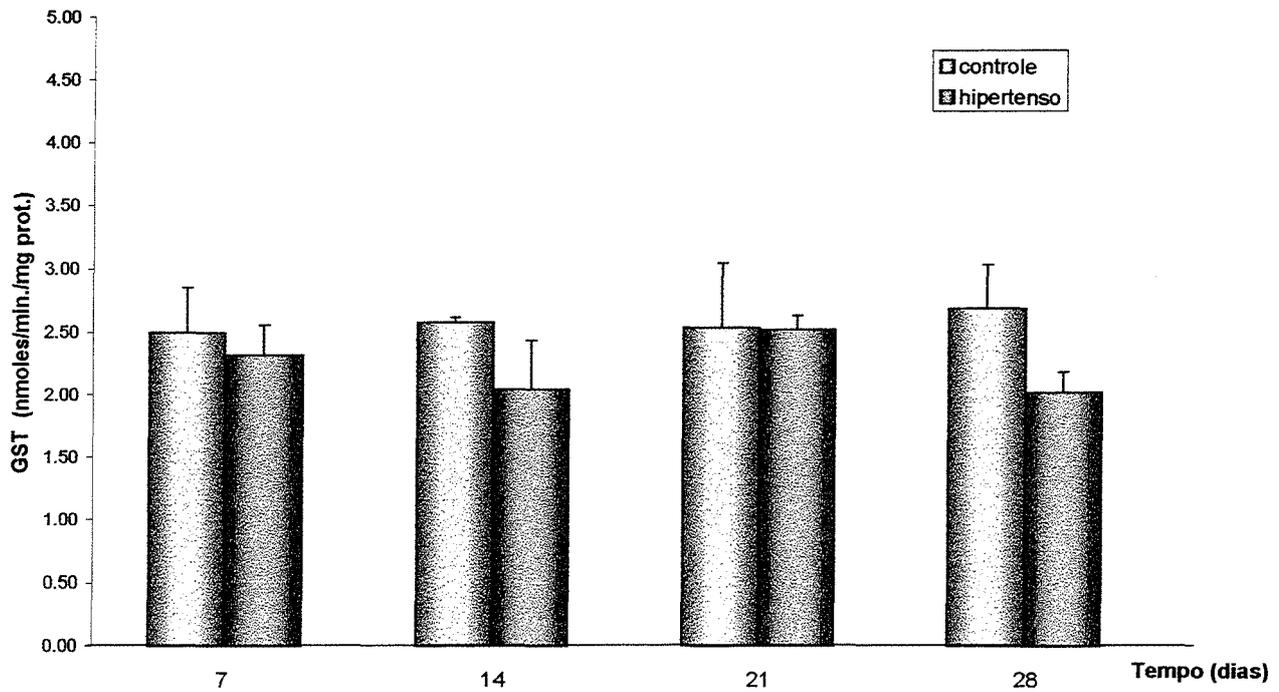


Figura 30: Atividade da glutatona S-transferase em nmoles por minuto por mg de proteína no homogeneizado de rins esquerdos nos grupos experimentais. Os valores da figura são expressos como média \pm erro padrão da média.

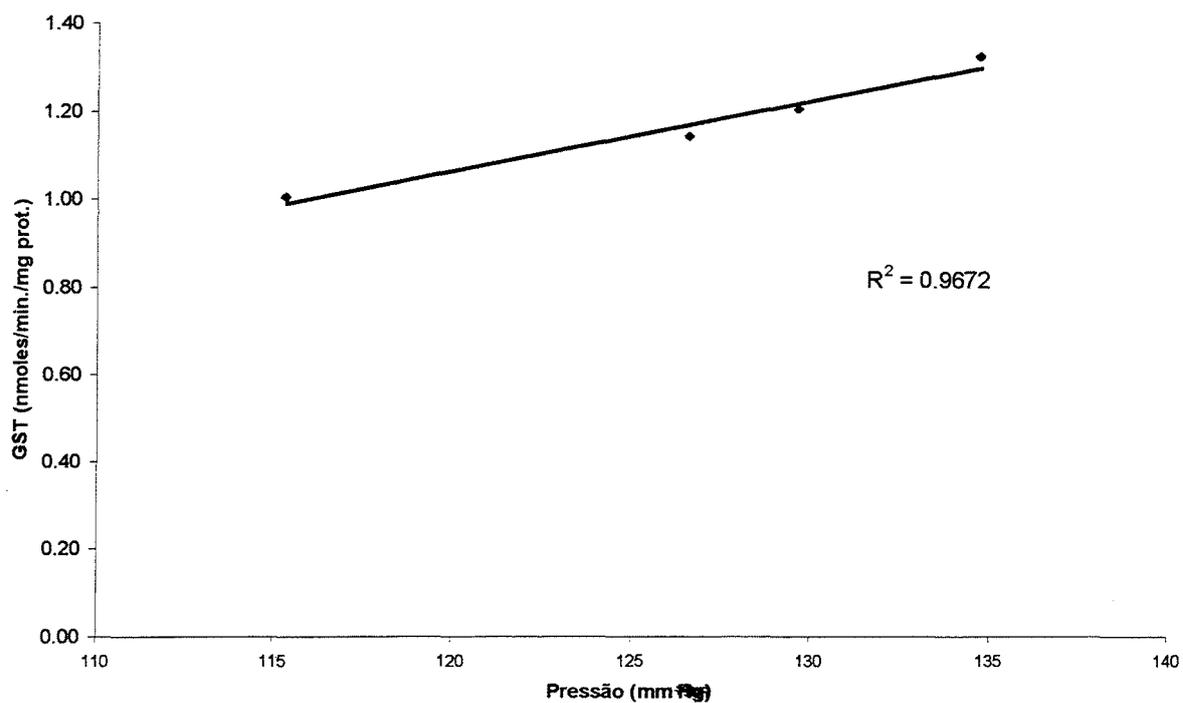


Figura 31: Correlação entre pressão arterial média e atividade da glutatona S-transferase em homogeneizado cardíaco.

3.8 SUPERÓXIDO DISMUTASE

A atividade da enzima superóxido dismutase não mostrou diferenças significativas nos homogeneizados de corações, rins direitos e rins esquerdos entre os grupos estudados. Os resultados são apresentados nas figuras 30, 31 e 32.

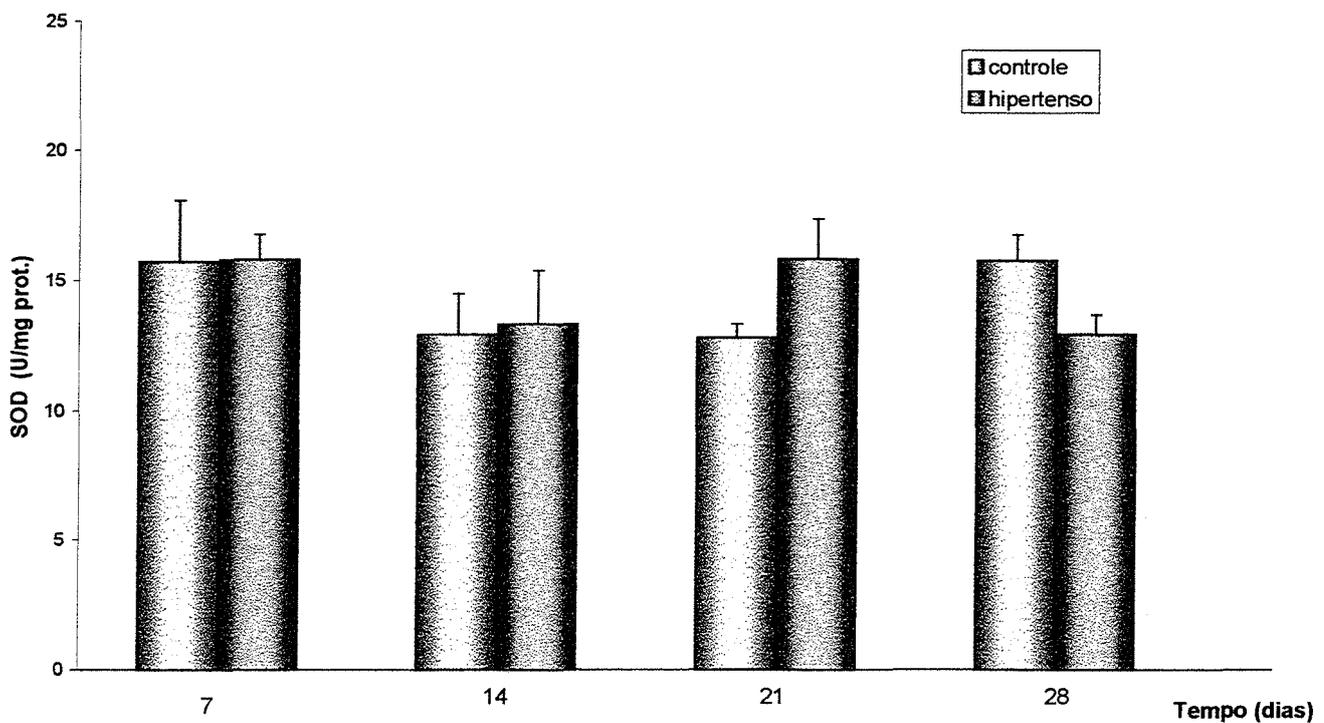


Figura 32: Atividade da superóxido dismutase em U SOD por mg de proteína no homogeneizado cardíaco nos grupos experimentais.

Os valores da figura são expressos como média \pm erro padrão da média.

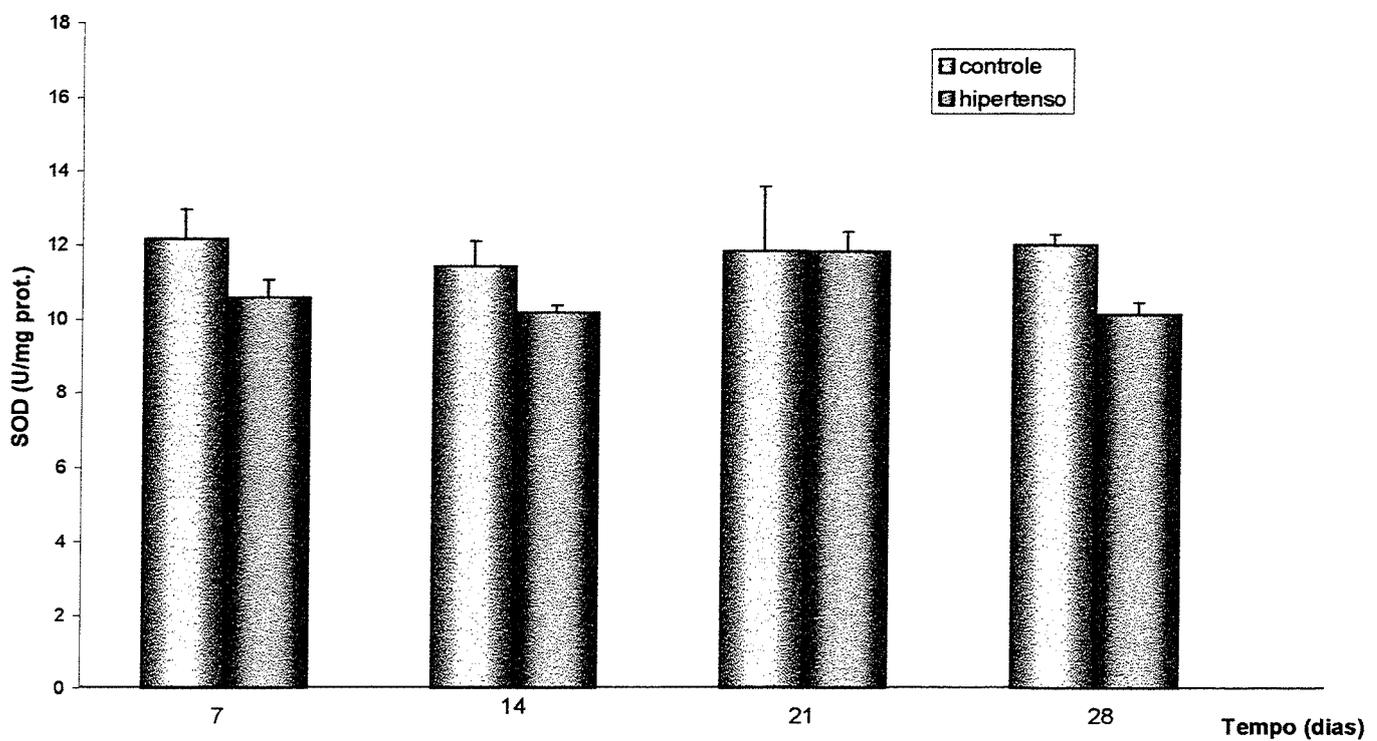


Figura 33: Atividade da superóxido dismutase em U SOD por mg de proteína no homogeneizado de rins direitos nos grupos experimentais.

Os valores da figura são expressos como média \pm erro padrão da média.

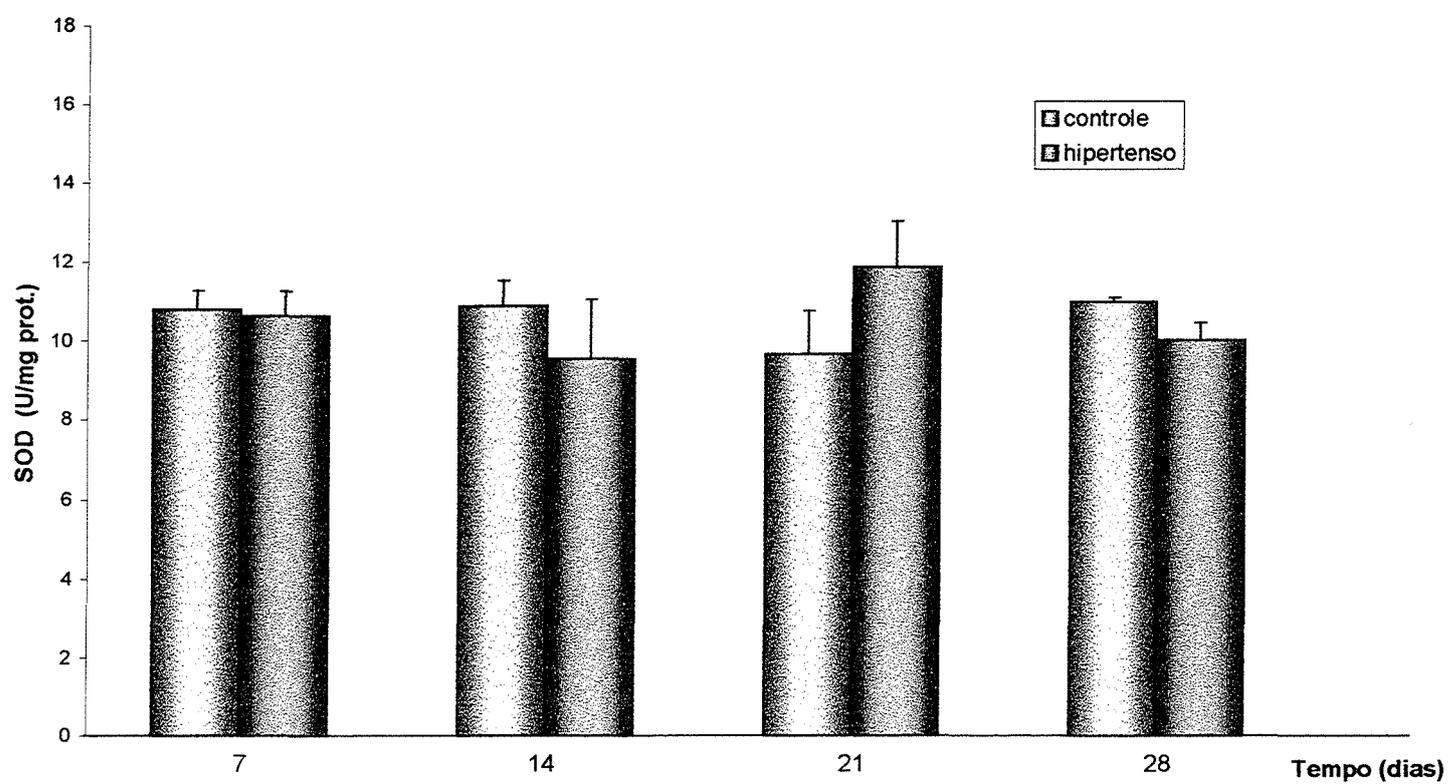


Figura 34: Atividade da superóxido dismutase em U SOD por mg de proteína no homogeneizado de rins esquerdos nos grupos experimentais.

Os valores da figura são expressos como média \pm erro padrão da média.

4. DISCUSSÃO

Muitas evidências sugerem que há o envolvimento de espécies ativas de oxigênio na hipertensão, mas permanece ainda obscuro se os eventos oxidativos são simplesmente conseqüências do dano ao tecido, ou se estão envolvidos no mecanismo patogênico primário desta doença. Tanto um aumento na produção de radicais livres ou uma diminuição na produção de antioxidantes poderia causar estresse oxidativo, e poderia contribuir para complicações cardiovasculares (LACY, 1998).

As espécies ativas de oxigênio podem ter um duplo papel. Por um lado, poderiam afetar a resistência vascular por inativar o óxido nítrico, causando vasoconstrição arteriolar e elevação na resistência hemodinâmica periférica. Por outro lado, poderiam desencadear mecanismos para a formação de lesões (SWEI, 1997). Em razão disto, têm sido desenvolvidos diversos trabalhos para tentar elucidar os mecanismos da hipertensão e a participação das espécies ativas de oxigênio, buscando fornecer subsídios para futuras pesquisas e alternativas clínicas para o tratamento da hipertensão, como o uso de antioxidantes.

Neste estudo, foi feita uma avaliação temporal do desenvolvimento da hipertensão renovascular Goldblatt 2, para verificar possíveis alterações nas enzimas antioxidantes e na lipoperoxidação do coração e rins dos animais hipertensos. Para tanto foram utilizados quatro diferentes tempos de hipertensão: 7 dias, 14 dias, 21 dias e 28 dias, de forma que os resultados pudessem mostrar o perfil oxidativo no desenvolvimento deste modelo de hipertensão. A aplicação do clipe já resulta em aumento da pressão arterial após um dia do procedimento, porém o alcance do platô se dá cerca de uma semana após o procedimento cirúrgico (RUZICKA, 1994). Em razão disto, o primeiro tempo utilizado neste trabalho foi sete dias de hipertensão. Os animais que sofreram a cirurgia de colocação do clipe na artéria renal esquerda mostraram aumento da pressão arterial sistólica, diastólica e média em relação aos animais controle em todos os tempos de tratamento. Além disso, neste trabalho foi observado também que cerca de 20% dos animais não desenvolveram hipertensão, resultados que estão de acordo com dados da literatura (RUZICKA, 1994). Alguns animais, cerca de 5%, estavam, após o final do tratamento, com os rins esquerdos atróficos. Contudo, estes animais apresentavam hipertensão, demonstrando que o fluxo sanguíneo para o rim não foi impedido, somente diminuído. Os animais que não desenvolveram hipertensão estavam com os rins esquerdos com aparência normal. Não desenvolveram a patologia provavelmente devido à pequena estenose da artéria renal, que não foi suficiente para desencadear a doença.

Com relação à angiotensina II, que está aumentada neste modelo de hipertensão, tradicionalmente atribui-se um efeito vasoconstritor predominante por interações com o receptor de angiotensina do tipo 1 (AT₁) no músculo liso vascular. Recentemente, foi descrito um novo mecanismo sinalizador, que pode ter importantes efeitos fisiológicos e fisiopatológicos. Estudos demonstraram que a hipertensão induzida por angiotensina II aumenta a produção vascular de ânion superóxido via NADH e NADPH oxidases ligadas à membrana (RAJAGOPALAN, 1997) e também estão aumentadas as atividades destas oxidases em ratos geneticamente hipertensos (ZALBA, 2000). Foram excluídas outras fontes de produção de superóxido, como xantina oxidase, ciclooxigenase e outras enzimas. Os passos desta ativação ainda não são claros, mas parecem envolver estímulo de fosfolipase A₂ e liberação de ácido araquidônico. Este aumento na produção do ânion superóxido pode contribuir para as alterações no relaxamento vascular dependente do endotélio, por promover inativação do óxido nítrico. A reação entre superóxido e óxido nítrico é extremamente rápida, excedendo inclusive a velocidade de reação entre o superóxido e a enzima superóxido dismutase. Dessa forma, o equilíbrio entre superóxido, NO e SOD é tênue, e pequenas mudanças nos níveis de qualquer destes pode alterar substancialmente a regulação do tônus vascular, elevando a pressão arterial (RAJAGOPALAN, 1997).

Sendo assim, o sistema renina-angiotensina não somente influencia a pressão arterial, mas pode afetar uma variedade de outros importantes fenômenos fisiológicos, por aumentar a produção de radicais livres, como superóxido e peroxinitrito. Estes podem levar à oxidação de diversos substratos ou a ativação de proto-oncogenes, como c-fos e c-jun (OSKARSSON, 1997). Além da hipertensão, este sistema também participa na produção de superóxido via NADH e NADPH oxidases em processos ateroscleróticos (WANHOLTZ, 1999)

O tratamento com anti-hipertensivos que bloqueiam a atividade da enzima conversora da angiotensina ou antagonizam o efeito da angiotensina II sobre o receptor AT₁, diminuem os níveis plasmáticos de peróxido de hidrogênio, indicando menor produção de superóxido. Estas observações indicam que a produção de radicais livres na hipertensão pode ser mediada pelo aumento da atividade do sistema renina angiotensina, mas não foram realizados estudos com outras classes de anti-hipertensivos para verificar se estes também afetam a produção de EAO (LACY, 1998). Além disso, os inibidores da ECA inibem a degradação de bradicinina e outras cininas, que liberam óxido nítrico; assim, além de aumentarem a liberação de óxido nítrico, diminuem a produção de superóxido (OSKARSSON, 1997).

Na fase crônica da hipertensão, causada pelo modelo utilizado neste trabalho, ocorre uma facilitação da liberação de noradrenalina mediada por angiotensina II (RUZICKA, 1994). Pacientes com hipertensão essencial tem hiperresponsividade à noradrenalina, que pode envolver um mecanismo dependente de inativação de óxido nítrico por EAO, pois esta vasoconstrição é diminuída pelo tratamento com ascorbato (LEMBO, 2000).

Alguns trabalhos mostram que ocorre aumento da lipoperoxidação na hipertensão, em plasma de pacientes (RUSSO, 1998), neutrófilos de pacientes (SAGAR, 1992) e órgãos de animais hipertensos (BOCK, 1998). O aumento da lipoperoxidação nesta enfermidade pode ser devido ao aumento do consumo de oxigênio, o que levaria a um aumento na formação de EAO. Muitos procedimentos têm sido usados para medir a LPO, mas todos os métodos tratam-se de medidas indiretas e nenhum deles reúne todos os critérios necessários, tais como sensibilidade, seletividade e praticabilidade, não havendo uma técnica completamente adequada. Portanto, a literatura aconselha a utilizar dois ou mais métodos. Se os resultados forem concordantes, considera-se que houve uma resposta positiva. Neste trabalho, foram utilizados dois métodos: TBA-RS e quimiluminescência, nos quais os resultados foram concordantes. Não foram observadas alterações na lipoperoxidação dos corações e rins dos animais hipertensos em relação aos controles, resultado diferente do encontrado em trabalhos anteriores de nosso laboratório utilizando o modelo de hipertensão por inibição da síntese de óxido nítrico, onde foi verificado aumento da lipoperoxidação nos

corações dos animais hipertensos (BOCK, 1998). O aumento da lipoperoxidação encontrado no trabalho utilizando o inibidor da síntese de óxido nítrico L-NAME pode ter ocorrido por efeito tóxico deste nos órgãos, ou por lesões isquêmicas causadas pela hipertensão. Além disso, os valores de pressão arterial média (7 dias 130 mmHg, 14 dias 116 mmHg, 21 dias 135 mmHg e 28 dias 127 mmHg), sistólica (7 dias 148 mmHg, 14 dias 134 mmHg, 21 dias 155 mmHg e 28 dias 145 mmHg) e diastólica (7 dias 111 mmHg, 14 dias 95 mmHg, 21 dias 114 mmHg e 28 dias 105 mmHg), encontrados nos animais hipertensos neste estudo são muito menores que os valores encontrados nos animais tratados com L-NAME (21 dias pressão arterial média 167 mmHg, pressão arterial sistólica 192 mmHg e pressão arterial diastólica 146 mmHg). Desta forma, a pequena elevação da pressão arterial no modelo de hipertensão Goldblatt 2 poderia ser a explicação para não ocorrerem aumentos na lipoperoxidação. Complementando este fato, foi demonstrado que tanto a inibição crônica quanto a aguda da síntese de NO causam lesões miocárdicas isquêmicas em ratos, principalmente fibrose e alguns focos necróticos, que podem ser relacionados com a ação de radicais livres. Essas lesões são similares às observadas em pacientes sofrendo de hipertensão arterial crônica. Além disso, ratos com hipertensão renovascular (Goldblatt), desenvolvem hipertrofia ventricular esquerda mas não apresentam estas lesões isquêmicas. Como as lesões podem ser devidas à ação de radicais livres, e este modelo não apresenta tais lesões, o fato de não ocorrer aumento da

lipoperoxidação está de acordo com estes dados (MORENO JR., 1995; MORENO JR., 1997).

O aumento da LPO foi também demonstrado através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em plasma de pacientes com hipertensão essencial. Este resultado foi obtido utilizando-se a técnica por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), que é muito mais sensível que a técnica espectrofotométrica utilizada neste trabalho (RUSSO, 1998).

Em termos de atividade enzimática antioxidante, foi observado um pronunciado aumento na atividade da enzima glutathione peroxidase nos animais com sete dias de hipertensão, em todos os órgãos estudados (74% no coração, 213% nos rins direitos e 196% nos rins esquerdos). Também foram observados aumentos na atividade desta enzima em corações de ratos, utilizando o modelo de hipertensão por inibição da síntese de óxido nítrico (BOCK, 1998), e no plasma de humanos com hipertensão essencial (RUSSO, 1998). Estes resultados sugerem uma maior produção de lipoperóxidos aos sete dias de hipertensão, já que estes são os principais substratos para esta enzima. Esta elevada atividade enzimática poderia contribuir para a manutenção da LPO em níveis semelhantes ao controle nesta fase. O notável aumento da atividade da GPx frente a uma pequena variação da pressão arterial, poderia também preparar os tecidos para enfrentar a manutenção da pressão elevada nas fases subseqüentes (14, 21 e 28 dias).

As enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione S-transferase não sofreram alterações significativas nos diferentes tempos de observação. No entanto, a variação da atividade da enzima glutathione S-transferase no coração dos animais hipertensos mostrou estreita correlação com a variação da pressão arterial, mostrando que um aumento da pressão arterial induz um aumento da atividade desta enzima. Este incremento na atividade enzimática poderia ser decorrente de aumentada transcrição do RNA mensageiro para esta enzima.

Apesar de não terem sido observadas alterações na atividade da enzima catalase neste estudo, trabalhos realizados em humanos demonstram que os níveis de peróxido de hidrogênio são maiores em pacientes hipertensos do que em normotensos. Da mesma forma, em pacientes normotensos com risco genético de hipertensão, os níveis desta EAO também são maiores em relação aos normotensos sem este fator genético (LACY, 1998). Swee e colaboradores também verificaram um aumento na concentração plasmática de peróxido de hidrogênio em ratos hipertensos Dahl sensíveis a sal em relação a seus controles normotensos (SWEI, 1997).

Outro estudo sugere que os níveis de xantina oxidase e ácido úrico se correlacionam com a pressão arterial, estando elevados em pacientes hipertensos. Assim, a origem do aumento do peróxido de hidrogênio poderia ser a enzima xantina oxidase, que produz superóxido, que por sua vez é convertido a peróxido de hidrogênio. A utilização de alopurinol, um inibidor da enzima xantina oxidase que não é "scavenger" de peróxido de hidrogênio, diminuiu a concentração deste,

mostrando que a fonte de peróxido de hidrogênio pode ser esta enzima. Outra fonte de peróxido de hidrogênio poderia ser o aumento de leucócitos circulantes observado na hipertensão (LACY, 1998), ou superóxido proveniente da ação da cicloxigenase (TADDEI, 1998) e NADH/NADPH oxidases (RAJAGOPALAN, 1997; ZALBA, 2000).

As evidências citadas sugerem que a excessiva produção de espécies ativas de oxigênio poderia ser um evento inicial na patogênese da hipertensão, precedendo o aumento da pressão arterial. Esta produção de EAO poderia induzir um aumento (observado neste trabalho) da atividade da enzima glutathione peroxidase, que também detoxifica peróxido de hidrogênio.

A correlação entre tônus arteriolar e peróxido de hidrogênio plasmático sugere que animais que tem níveis maiores de peróxido de hidrogênio podem também ter arteríolas em estado mais contraído. Porém, a resposta observada ao peróxido de hidrogênio é freqüentemente bifásica em relação a contração ou dilatação, sendo dependente da concentração (SWEI, 1997).

Recentemente, foi descrito um novo modelo de hipertensão experimental, através de indução de estresse oxidativo por inibição da síntese de glutathione. Sugere-se que este modelo cause hipertensão por aumento da oxidação e inativação de óxido nítrico, entre outros mecanismos. Este fato é corroborado pela diminuição da excreção urinária de metabólitos do óxido nítrico, e pelo aumento das concentrações de nitrotirosina, que é um dos produtos de reação do

peroxinitrito com proteínas. O alto conteúdo de nitrotirosina indica a interação do óxido nítrico com as espécies ativas de oxigênio. Neste mesmo trabalho, o tratamento dos animais com vitamina E e vitamina C reverteu parcialmente a hipertensão, mostrando efetividade da terapia com antioxidantes (VAZIRI, 2000).

Sendo o estresse oxidativo uma das possíveis causas da hipertensão, vários trabalhos utilizam a terapia com antioxidantes para minimizar seus efeitos deletérios. Pesquisas realizadas em pacientes com hipertensão essencial mostram que a administração de SOD não diminui a pressão arterial, fato que pode ser explicado em parte pela pobre penetrância da enzima no líquido intracelular (GARCIA, 1995), mas outros trabalhos utilizando SOD modificada quimicamente podem produzir queda na pressão arterial (RUSSO, 1998). Foi também demonstrado que a utilização de SOD encapsulada em lipossomas é efetiva na diminuição da hipertensão causada por infusão de angiotensina II, mas não tem efeito sobre a infusão de noradrenalina, suportando a hipótese da relação da angiotensina II com maior produção de superóxido (OSKARSSON, 1997). Antioxidantes como dimetiltiouréia e fulerenol foram utilizados para atenuar a hipertensão pulmonar em ratos, por serem scavengers de radicais livres (LAI, 1998). Foi observada diminuição nas quantidades de vitamina A e vitamina E em pacientes hipertensos (RUSSO, 1998). Além disso, em animais com deficiência de vitamina E, foi observado um aumento da inativação de óxido nítrico por radicais superóxido (DAVIDGE, 1998). Outros autores demonstraram que a utilização de vitamina C pode ser efetiva na

reversão da vasoconstrição causada por epinefrina (LEMBO, 2000), pode proteger o óxido nítrico da inativação por superóxido em concentrações iguais às presentes normalmente no plasma, sugerindo um efeito protetor tônico na vasculatura (DUDGEON, 1998), além de melhorar a função endotelial em pacientes com hipertensão essencial (TADDEI, 1998).

No presente trabalho, não foram avaliados os antioxidantes não enzimáticos, como a glutathione e as vitaminas, mas pode haver alguma alteração destes no modelo de hipertensão experimental utilizado.

Este é o primeiro estudo a caracterizar o perfil oxidativo na hipertensão renovascular em ratos. O modelo de hipertensão utilizado é extremamente interessante, já que não envolve a utilização de fármacos, mas apenas procedimentos cirúrgicos. Portanto, é um modelo com menos interferentes. Foram determinadas quatro janelas temporais para observação de parâmetros hemodinâmicos e caracterização do perfil oxidativo. Para dar continuidade a este estudo, seria de extrema relevância efetuar o mesmo tipo de avaliações em tempos mais precoces, assim como medir a produção de ânion superóxido no leito vascular, oxidação de DNA e proteínas, além de técnicas de biologia molecular para avaliar a transcrição das enzimas antioxidantes estudadas.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados podemos concluir que:

- O clampeamento da artéria renal esquerda induziu significativo aumento da PAS, PAD e PAM, em todos os tempos avaliados, sem alterar a frequência cardíaca.
- A lipoperoxidação não está aumentada neste modelo nos tempos avaliados.
- As enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione transferase não sofreram variações ao longo do período de estudo.
- Aos sete dias de hipertensão, observa-se uma ativação da glutathione peroxidase, efeito este que a longo prazo não se verifica.
- A hipertensão renovascular promove uma adaptação do sistema antioxidante agudamente, de modo a compensar possíveis incrementos da oxidação dos lipídios de membrana.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bock, P.M.; Fernandes, T.G, Araújo, A.S.R.; Severino, L; Belló-Klein, A.; Belló, A.A. *Efeito do Enalapril na Hipertensão inuzida por L-NAME: Avaliação Hemodinâmica e Estresse Oxidativo*. XIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), 1998.
2. Boveris A; Chance B . *The Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide*. *Biochemistry Journal* 134:707-716, 1973.
3. Buege JÁ; Aust SD. *Microsomal Lipid Peroxidation*. *Methods Enzymology* 52:302-309, 1978.
4. Carretero, O.A.; Oparil, S. *Essential Hypertension:Definition and Etiology*. *Circulation* 101:329-335, 2000.
5. Carretero, O.A.; Oparil, S. *Essential Hypertension:Treatment*. *Circulation* 101:446-453, 2000.
6. Davidge, S.T.; Ojimba, J.; McLaughlin, M.K. *Vascular Function in the Vitamin E Deprived Rat: An Interaction Between Nitric Oxide and Superoxide Anions*. *Hypertension*, 31:830-835, 1998.

7. Denicola, A.; Souza, J.M.; Gatti, R.M.; Augusto, O.; Radi, R. *Desferrioxamine Inhibition of the Hydroxyl Radical-Like Reactivity of Peroxynitrite: Role of the Hydroxamic Groups*. Free Radical Biology & Medicine. Vol 19 n^o 1:11-19, 1995.
8. Dudgeon, S.; Benson, D.P.; MacKenzie, A.; Paisley-Zyskiewicz, K.; Martin, W. *Recovery by Ascorbate of Impaired Nitric Oxide-Dependent Relaxation Resulting from Oxidant Stress in Rat Aorta*. British Journal of Pharmacology, 125:782-786, 1998.
9. Evora, P.R.B.; Pearson, P.J.; Discigil, B.; Seccombe, J.F.; Schaff, H.V. *Endotélio e Óxido Nítrico: História, Fisiologia e as Primeiras Observações Relacionadas com a Hipertensão Arterial*. Hiper Ativo, volume 2, n^o 2, 1995.
10. Flohé L; Gunzler W.A. *Assays of Glutathione Peroxidase*. Methods Enzymology 105:114-121, 1984.
11. Fridovich, I. *Superoxide Dismutases*. Annal Review of Biochemistry. 44: 147-157, 1975.
12. Ganong, W.F. *Fisiologia Médica*. 17. ed. Rio de Janeiro: Editora Prentice-Hall do Brasil Ltda, 1995.

13. Garcia, C. E.; Kilcoyne, C.M.; Cardillo, C.; Cannon, R.O.; Quyyumi, A.A.; Panza, J. , *Effect of Copper-Zinc Superoxide Dismutase on Endothelium-Dependent Vasodilation in Patients with Essential Hypertension*. *Hypertension* 26:1, 863-868, 1995.
14. Gardner, P.R.; Rainieri, I.; Epstein, L.B.; White, C.W. *Superoxide Radical and Iron Modulate Aconitase Activity in Mammalian Cells*. *The Journal of Biological Chemistry* vol. 270 - n° 22: 13399-13405, 1995.
15. Goldblatt, H., Lynch, J., Hanzal, R.F., Sumerville, W.W. *Studies on Experimental Hypertension. I. The Production of Persistent Elevation of Systolic Blood Pressure by Means of Renal Ischemia*. *Journal of Experimental Medicine*. 59, 347-379, 1934.
16. Goldstein, S.; Czapski, G. *Superoxide Dismutase*. In PUNCHARD, N.A. & KELLY, F.J. (ed) *Free Radicals: A Practical Approach*. Oxford University Press, 1996.
17. Gonzalez Flecha, B.; Llesuy, S.; Boveris, A. *Hydroperoxide-initiated Chemiluminescence: an Assay for Oxidative Stress in Biopses of Liver, Heart and Muscle*. *Free Radical Biology & Medicine* 10:41-47, 1991.
18. Guyton, A.C.; Hall, J.E. *Textbook of Medical Physiology*. 9. ed. Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 1996.

19. Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakobi, W.B. *Glutathione S-Transferases*. The Journal of Biological Chemistry vol. 249 - nº 22: 7130-7139, 1974.
20. Halliwell, B. *Antioxidants: The Basis - What They Are and How to Evaluate Them*. In Sies, H.(ed) *Antioxidants in Diseases: Mecanisms and Therapy*. (Advances in Pharmacology vol 38) California: Academic Press, 1997.
21. Halliwell, B.; Gutteridge, J.C.M. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3th ed. Oxford Univesity Press, 1999.
22. Harris, E.D. *Regulation of Antioxidant Enzimes*. FASEB Journal 6:2675-2683, 1992.
23. Hogg, N.; Kalynaraman, B.; Darley-USmar, V *Oxidant and Antioxidant Effects of Nitric Oxide and Superoxide in the Vasculature*. Annals Conference Pronounced of the 1994. Roussel Uclaf Prize, 1994.
24. Jover, B.; Herizi, A.; Ventre, F.; Dupont, M.; Mimram, A.. *Sodium and Angiotensin in Hypertension Induced by Long Term Nitric Oxide Blockade*. Hypertension 21: 944-948, 1993

25. Keele, B.B; McCord, J.M.; Fridovich, I. *Superoxide Dismutase from Escherichia coli: A New Manganese-Containing Enzyme*. The Journal of Biological Chemistry vol. 245 - nº 22: 6176-6181, 1970.
26. Koppenol, W.H. *The Basic Chemistry of Nitrogen Monoxide and Peroxynitrite*. Free Radical Biology & Medicine Vol. 25 nº 4/5 385-391, 1998.
27. Kumar, K.V.; Das, U.N. *Are Free Radicals involved in the Pathobiology of Human Essential Hypertension?* Free Radical Research Communication 19:1, 59-66, 1993.
28. Kuo, P.C.; Schroeder, R.A. *The Emerging Multifaceted Roles of Nitric Oxide*. Annals of Surgery vol 221(3), 220-235, 1995
29. Lacy, F.; O'Connor, D.T.; Schmid-Schonbein, G.W. *Plasma Hydrogen Peroxide in Hypertensive and Normotensive Subjects at Genetic Risk of Hypertension*. Journal of Hypertension, 16:291-303, 1998.
30. Lacy, F.; Gough, D.A.; Schmid-Schonbein, G.W. *Role of Xanthine Oxidase in Hydrogen Peroxide Production*. Free Radical in Biology and Medicine, vol 25 nº 6:720-727, 1998.

31. Lai, Y.L.; Wu, H.D.; Chen, C.F. *Antioxidants Attenuate Chronic Hypoxic Pulmonary Hypertension*. *Journal of cardiovascular Pharmacology*, 32: 714-720, 1998.
32. Laurindo, F.R.M.; Luz, P.L. *Espécies Ativas de Oxigênio Podem Contribuir para Aumento da Resistência Vascular Periférica na Hipertensão: Uma Hipótese*. *Hiper Ativo*, volume 2, nº 2, 1995.
33. Lembo, G.; Vecchione, C.; Izzo, R.; Fratta, L.; Fontana, D.; Marino, G.; Pilato, G.; Trimarco, B. *Noradrenergic Vascular Hyper-Responsiveness in Human Hypertension is Dependent on Oxygen free Radical Impairment of Nitric Oxide Activity*. *Circulation*, 102:552-557, 2000.
34. Llesuy SF et al. *Comparison of Lipid Peroxidation and Myocardial Damage Induced by Adriamycin and 4'-epiadremicin in Mice*. *Tumori*, 71:241-249, 1985.
35. Lopez-Ongil, S.; Torrecilas, G.; Peran-Sala, D.; Gonzalez-Santiago, L.; Rodriguez-Puyol, M.; Rodriguez-Puyol, D. *Mechanisms Involved in the Contraction of Endothelial Cells by Hydrogen Peroxide*. *Free Radical Biology & Medicine* Vol. 26 nº 5/6 501-510, 1999.

36. Lowry, O.H, Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. *Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent*. Journal Biology Chemistry 193: 265-275, 1951.
37. Luoma, J.S.; Stralin, P.; Marklund, S.L.; Hiltunen, T.P.; Sarkioja, T.; Ylä-Herttuala, S. *Expression of Extracellular SOD and iNOS in Macrophages and Smooth Muscle Cells in Human and Rabbit Atherosclerotic Lesions*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 18:157-167, 1998.
38. Mannervik, B., Gluthenberg, C. *Glutathione Transferase*. Methods in Enzymology, 77:231-5, 1981.
39. Marklund, S. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton. CRC Press. 243-247, 1985.
40. McCord, J.M.; Fridovich, I. *Superoxide Dismutase: An Enzymic Function for Erythrocyte*. The Journal of Biological Chemistry vol. 244 - nº 22: 6049-6055, 1969.
41. Moncada, S. *Nitric Oxide: Physiology, pathophysiology and Pharmacology*. Pharmacol. Review 43:109-142, 1991.

42. Moreno JR.; Nathan, L.P.; Costa, S.K.P.; Metze, K; Antunes, E.; Zatz, R.; De Nucci, G. *Enalapril does not Prevent the Myocardial Ischemia Caused by the Chronic Inhibition of Nitric Oxide Synthesis.* European Journal of Pharmacology. 287:93-96, 1995.
43. Moreno JR., Nathan, L.P.; Metze, K.; Costa, S.K.P.; Antunes, E.; Hyslop, S.; Zatz, R.; De Nucci, G. . *Non-Specific Inhibitors of Nitric Oxide Synthase Cause Myocardial Necrosis in the Rat.* Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 24:349-352, 1997.
44. Oskarsson, H.J.; Heistad, D. *Oxidative Stress Produced by Angiotensin Too: Implications for Hypertension and Vascular Injury.* Circulation, 95:557-559, 1997.
45. Palace, V.P.; Khaper, N.; Qin, Q.; Singal, P. *Antioxidant Potentials of Vitamin A and Carotenoids and their Relevance to Heart Disease.* Free Radical Biology & Medicine Vol. 26 n° 5/6 746-761, 1999.
46. Rajagopalan, S. et al, *Angiotensin II-Mediated Hypertension in the Rat Increases Vascular Superoxide Production via Membrane NADH/NADPH Oxidase Activation.* The Journal of Clinical Investigation Vol. 97 n° 8:1916-1923, 1997.

47. Ribeiro, M.O.; Antunes, E.; de Nucci, G.; Lovisolo, S.M.; Zatz, R. *Chronic Inhibition of Nitric Oxide Synthesis: A New Model of Arterial Hypertension*. *Hypertension*, 20: 298-303, 1992.
48. Russo, C.; Olivieri, O. Girelli, D.; Faccini, G.; Zenari, M.L.; Lombardi, S.; Corrocher, R. *Anti-Oxidant Status and Lipid Peroxidation in Patients with Essential Hypertension*. *Journal of Hypertension*, 16:1267-1271, 1998.
49. Ruzicka, M.; Leenen, F.H.H. *Experimental Renovascular Hypertension: Methodological Aspects and Role of the Renin-Angiotensin System*. In Ganten, d., Jond, W., (ed) *Handbook of Hypertension*, vol 16: Experimental and Genetic Models of Hypertension. Elsevier Science B V , 1994.
50. Sagar, S.; Kallo, I.J.; Jaul, N.; Ganguly, N.K.; Sharma, B.K. *Oxygen Free Radical in Essential Hypertension*. *Mol. Cell. Biochem.*, 111:103-108, 1992.
51. Schiffrin, E.L. *Endothelin and Endothelin antagonists in Hypertension*. *Journal of Hypertension*, 16:1891-1895, 1998.
52. Sies, H. *Glutathione and its Role in Cellular Functions*. *Free Radical Biology & Medicine* Vol. 27 n^o 9/10 916-921, 1999.

53. Singal, P.K.; Dhalla, A.K.; Slezák, J.; Singh, N. *Effects of Different Oxidative Stress Condition in Hypertrophied Rat Hearts*. in Nagano, M. *The Adapted Heart* . New York: Raven Press, Ltd, 1994.
54. Swee, A.; Lacy, F.; Delano, F.A.; Schmid-Schonbein, G.W. *Oxidative Stress in the Dahl Hypertensive Rats*. *Hypertension*, 30:1628-1633, 1997.
55. Taddei, S.; Virdis, A.; Ghiadoni, L.; Magagna, A.; Salvetti, A. *Vitamin C Improves Endothelium-Dependent Vasodilation by Restoring Nitric Oxide Activity in Essential Hypertension*. *Circulation*, 97:2222-2229, 1998.
56. Vaziri, N.D.; Wang, X.Q.; Oveisi, F.; Rad, B. *Induction of Oxidative Stress by Glutathione Depletion Causes Severe Hypertension in Normal Rats*. *Hypertension*, 36:142-146, 2000.
57. Warnholtz, A.; Nickenig, G.; Schulz, E.; Macharzina, R.; Brasen, J.H.; Skatchkov, M.; Heitzer, T.; Stasch, J.P.; Griendling, K.K.; Harrison, D.; Bohm, M.; Meinertz, T.; Munzel, T. *Increased NADH-Oxidase-Mediated Superoxide Production in the Early Stages of Atherosclerosis: Evidence for Involvement of the Renin-Angiotensin System*. *Circulation*, 99:2027-2033, 1999.

58. Waynfoth, H.B.; Flecknell, P.A. *Experimental and Surgical Technique in the Rat*. Academic Press London, 1992.
59. Yost, F.J.; Fridovich, I. *An Iron-Containing Superoxide Dismutase from Escherichia coli*. The Journal of Biological Chemistry vol. 248 - nº 14: 4905-4908, 1973.
60. Yu, B.P. *Cellular Defenses Against Damage from Reactive Oxygen Species*. Physiological Reviews, 74: 139-162, 1994.
61. Zalba, G.; Beaumont, F.J.; San José, G.; Fortuno, A.; Fortuno, M.A.; Etayo, J.C.; Diez, J. *Vascular NADH/NADPH Oxidase is Involved in Enhanced Superoxide Production in Spontaneously Hypertensive Rats*. Hypertension, 35:1055-1061, 2000.